



**HAL**  
open science

# Rétention et "pitting" splénique des globules rouges au cours du paludisme aigu traité par dérivé de l'artémisinine

Stéphane Jauréguiberry

► **To cite this version:**

Stéphane Jauréguiberry. Rétention et "pitting" splénique des globules rouges au cours du paludisme aigu traité par dérivé de l'artémisinine. Parasitologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066047 . tel-01146815

**HAL Id: tel-01146815**

**<https://theses.hal.science/tel-01146815>**

Submitted on 29 Apr 2015

**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.

## UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

École Doctorale 515 : Complexité du Vivant

# Rétention et « pitting » splénique des globules rouges au cours du paludisme grave traité par dérivés de l'artémisinine

Par Stéphane JAUREGUIBERRY

Thèse de doctorat de biologie

Dirigée par : Dr. Pierre Buffet

Codirecteur de Thèse : Pr. Éric Caumes

Présentée et soutenue publiquement le 10 mars 2015

Composition du JURY :

*Présidente du Jury* : Pr. Dominique Mazier

*Rapporteurs* : Pr. Olivier Bouchaud,

Pr. Antoine Berry

*Examineurs* : Pr. Henri Agut,

Dr. Thierry Peyrard,

Dr. Odile Puijalon



## REMERCIEMENTS

*« Comme l'on serait savant, si l'on connaissait bien seulement cinq à six livres ! » G. Flaubert.*

Merci Pierre de m'avoir proposé ce travail, accueilli dans ton équipe, encadré et essayé de me faire partager ta précision, ta rigueur et ton exigence. J'ai tenté, à mon tour, ici de répondre à tes attentes.

Merci Éric de m'avoir autorisé à mener de front cette recherche et notre exercice de soin. Ce ne fut pas idyllique tous les jours, mais le résultat est là et j'espère qu'il te satisfait.

Je remercie le Professeur Dominique Mazier et le Professeur François Bricaire de m'avoir donné l'opportunité de participer à cette riche aventure et d'en avoir soutenu la genèse, la réalisation et l'épilogue.

Un grand et respectueux remerciement au Professeur Henri Agut et au Docteur Odile Pujalon, mes deux « tuteurs » qui ont veillé sur moi durant ces années de thèse. Trouvez dans ce travail l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie vivement le Professeur Martin Danis, en souvenir d'un cours de 1996, conservé et gravé dans ma mémoire : ce travail en est peut être une forme de prolongement.

Un immense merci à toi Marc pour tes ressources bibliographiques instantanées et ton soutien bienveillant, actif et productif dans cette entreprise. Un remerciement appuyé au Docteur Bénédicte Lebrun-Vignes, pour nos discussions de « pharmacovigilants ».

A toute l'équipe 6, Alioune, Liliane, Sylvestre, Oussama, Benjamin, qui m'avez appris la culture plasmodiale, les joies du microscope, les mystères du marquage, l'excitation de la cytométrie... surtout après le microscope ; un grand merci ! En attendant « The Big One » ; on ne s'en est pas si mal sortis, en fin de compte ! Je remercie vivement aussi Flavie, Benoit et Nathalie : sans vous rien n'aurait été fait ni faisable ! L'on ne se fait jamais seul.

A mes parents, à ma sœur qui veillez sur moi depuis toujours, et me soutenez dans toutes mes entreprises !

To the Princess Bride and the Visitor.

Many thanks to: Haru great team leader, Ipsi faster than her you can't, Hugh, Stilje, Htee Ku, Phaikiyeong, Benjamin, Madame Sakina, Yvonne, the Sisters and the Kingasani team ...great memories from Bangkok to Rourkela, from Bangkok to Kinshasa...To Bob, Gareth, Pi Oi, Arjen Dondorp, Charlie Woodrow and so on for the outstanding talks and the warm welcoming.



## RÉSUMÉ

L'artésunate est désormais le traitement de référence du paludisme grave au plan mondial. Cependant, des cas d'anémie hémolytique différée ont été décrits chez 20% à 25% des voyageurs traités. L'épisode hémolytique survient 2 à 3 semaines après traitement. Environ la moitié des patients vont nécessiter une transfusion sanguine. L'artésunate induit un phénomène original en physiologie humaine : le "pitting" ou épépinage splénique des érythrocytes parasités. Il consiste en l'expulsion du parasite mort de l'érythrocyte hôte lorsque celui-ci traverse une structure microcirculatoire splénique appelée « fente interendothéliale ». Ces érythrocytes pittés retournent sans destruction immédiate dans la circulation générale. Nous avons étudié l'efficacité et la tolérance de l'artésunate intraveineux chez 123 voyageurs atteints de paludisme grave. Cent dix-sept patients ont survécu (95%). Parmi 78 patients suivis plus de 8 jours, 76 (97%) ont eu une anémie au cours du suivi et 21 une hémolyse différée typique (27%). Dans ce sous groupe de patients la chute médiane en hémoglobine a été de 1,3g/dl avec un nadir <7g/dl dans 15% des cas. Un seul patient a été transfusé. Le marquage de la protéine parasitaire Resa, véritable empreinte de l'infection érythrocytaire par *Plasmodium falciparum*, permet la visualisation des érythrocytes pittés. Chez 21 patients non transfusés le pic de concentration en érythrocytes pittés est survenu durant la première semaine. Chez 9 patients évoluant vers une hémolyse différée le pic de pittés était significativement plus élevé que chez 12 patients présentant d'autres profils évolutifs d'anémie (0,30 vs. 0,07 ; P = 0,0001). Une concentration d'érythrocytes pittés au pic supérieure à 180 millions/l aurait prédit le risque d'hémolyse différée avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 83%. Utilisant la technologie ImageStream\* l'étude morphologique érythrocytaire chez 4 patients a montré que l'infection plasmodiale suivi de pitting entraîne une réduction de surface projetée de 8,9%. Cette altération pourrait contribuer à la réduction de la durée de vie des érythrocytes pittés. La destruction différée des érythrocytes infectés et épargnés par le pitting durant le traitement par artésunate est un mécanisme original d'anémie hémolytique. Ce travail a permis de structurer l'espace nosologique de l'anémie post-thérapeutique au cours du paludisme, de clarifier la physiopathologie de l'hémolyse différée et d'identifier certains de ses mécanismes. Malgré l'incidence élevée de l'hémolyse différée, l'anémie résultante n'est préoccupante que dans 15% des cas et ne remet pas en cause le bénéfice de l'artésunate par rapport à la quinine dans le traitement du paludisme grave. La concentration précoce des érythrocytes pittés pourrait être un marqueur prédictif intéressant de la survenue d'une hémolyse différée post-artésunate.

**Mots-clés** : Paludisme grave, *Plasmodium falciparum*, Artésunate, Anémie hémolytique, Pitting, Rate, Resa, Immunofluorescence, Imagerie cellulaire en flux, ImageStream, Amnis°, test prédictif.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADMA</b>	arginine diméthylée asymétrique
<b>AHAI</b>	anémie hémolytique auto-immune
<b>AHIM</b>	anémie hémolytique induite par le médicament
<b>ALAT</b>	alanine amino transférase
<b>AMA</b>	antigène de membrane apicale
<b>AMM</b>	autorisation de mise sur le marché
<b>AMPc</b>	adénosine monophosphate cyclique
<b>ANSM</b>	agence nationale de sécurité du médicament
<b>AS</b>	artésunate intraveineux
<b>ASAT</b>	aspartate amino transférase
<b>ATU</b>	autorisation temporaire d'utilisation
<b>AUC</b>	aire sous courbe
<b>C'</b>	Complément
<b>CD</b>	complexe de différenciation
<b>CNR</b>	centre national de référence
<b>CRH</b>	compte rendu d'hospitalisation
<b>CRP</b>	protéine C réactive
<b>DAPI</b>	marqueur d'ADN
<b>DHA</b>	Dihydroartémisinine
<b>EI</b>	index d'élongation
<b>EIR</b>	taux entomologique d'inoculation
<b>EMIF</b>	Erythrocyte Membrane ImmunoFluorescence
<b>FBH</b>	fièvre bilieuse hémoglobinurique
<b>G6PD</b>	glucose 6 phosphate deshydrogénase
<b>GMP</b>	bonne méthode de fabrication
<b>HCSP</b>	haut conseil à la santé publique
<b>ICAM1</b>	inter cell adhesion molecule de type 1
<b>IL</b>	Interleukine
<b>iRBC</b>	érythrocyte parasité
<b>LDH</b>	lactate deshydrogénase
<b>LORCA</b>	Laser Optical Rotational Cell Analyser
<b>MSP</b>	protéine de surface du mérozoite
<b>NO</b>	oxyde nitrique
<b>NOS</b>	oxyde nitrique synthétase
<b>oiRBC</b>	érythrocyte pité ou épépiné
<b>OMS</b>	organisation mondiale de la santé
<b>PADH</b>	post artesunate delayed hemolysis
<b>PECAM</b>	platelet endothelium cell adhesion molecule
<b>Pf155</b>	voir RESA
<b>PfEMP1</b>	<i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
<b>PV</b>	vacuole parasitophore
<b>PVM</b>	membrane de la vacuole parasitophore
<b>RBC</b>	érythrocyte (Red Blood Cell)
<b>RESA</b>	ring erythrocyte surface antigen

<b>RPI</b>	index de production réticulocytaire
<b>S/V</b>	ratio surface/volume
<b>SEM</b>	erreur standard à la moyenne
<b>SMA</b>	anémie sévère palustre
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor
<b>TNR</b>	taux normalisé de rétention
<b>TR</b>	taux de rétention
<b>uRBC</b>	érythrocyte non parasité

# SOMMAIRE

1	INTRODUCTION.....	16
1.1	Le paludisme : le parasite et ses interactions .....	17
1.1.1	Le cycle parasitaire : approche globale.....	17
1.1.2	Compétence vectorielle et interaction vecteur/hôte définitif et vecteur/hôte intermédiaire .....	19
1.1.3	Interaction parasite/hôte intermédiaire et biomasse parasitaire.....	21
1.1.4	En conclusion de ce chapitre.....	29
1.2	Le paludisme : la maladie clinique, classification, physiopathologie et immunité .....	30
1.2.1	Le paludisme simple : accès de primo-invasion à <i>P. falciparum</i> .....	30
1.2.2	Le paludisme grave .....	31
1.2.3	Physiopathologie de l'accès grave : séquestration tissulaire, inflammation, hémolyse et anoxie (Figure 1-9) .....	35
1.2.4	Effet de l'âge parasitaire sur l'expression clinique : nosologie chronologique et histopathologique .....	41
1.2.5	Mesures de contrôle de l'hôte à l'exception de la rate : facteurs génétiques et immunité (innée, acquise).....	45
1.2.6	Épidémiologie générale du paludisme, impact en santé humaine.....	50
1.2.7	Résumé du chapitre .....	52
1.3	Le globule rouge au cours de l'infection à <i>P. falciparum</i> .....	53
1.3.1	Micro-anatomie et histoire naturelle .....	53
1.3.2	Hémolyse intra et extravasculaire : une distinction difficile .....	54
1.3.3	Modifications globulaires liées à l'infection plasmodiale à <i>P. falciparum</i> .....	58
1.4	La rate au cours de l'infection à <i>P. falciparum</i> .....	62
1.4.1	Un rôle majeur.....	62

1.4.2	La rate mécanique : le filtre splénique, apprécie les compétences biomécaniques du globule rouge.....	62
1.4.3	La rate immunologique .....	66
1.4.4	Expériences et quantification <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> .....	67
1.4.5	La rate mécanique : une régulation innée de l'infection plasmodiale.....	69
1.4.6	Résumé du chapitre .....	71
1.5	L'Artésunate (AS) et le paludisme grave.....	72
1.5.1	De la quinine à l'AS : historique et pharmacodynamique de l'AS .....	72
1.5.2	Pharmacocinétique de l'AS.....	73
1.5.3	Le « <i>pitting</i> » et le paludisme sous AS : une spécificité .....	73
1.5.4	Données d'efficacité : études comparatives en population humaine .....	74
1.5.5	Tolérance du médicament, études animales et humaines .....	75
1.5.6	AS France : mise en place du système, organisation de la dispensation .....	77
1.5.7	Résumé du chapitre .....	80
1.6	L'anémie au cours de l'infection à <i>Plasmodium falciparum</i> .....	81
1.6.1	L'anémie au cours du paludisme à <i>P. falciparum</i> : hémolyse, insuffisance de production et facteurs confondants .....	81
1.6.2	Approche populationnelle cellulaire : les populations globulaires au cours de l'accès palustre et leur devenir .....	82
1.6.3	Impact de l'âge du patient sur la survenue de l'anémie .....	86
1.6.4	Impact de la température corporelle (fièvre) .....	87
1.6.5	Autres causes inconstantes d'anémie hémolytique dans ce contexte .....	87
1.6.6	Défaut de production : un déséquilibre immuno-inflammatoire.....	93
1.6.7	Hémolyse différée et AS : un nouveau profil évolutif de l'hémoglobine au cours de l'infection plasmodiale traitée par AS.....	95
1.6.8	Approche chronologique de la perte et signification clinique les profils évolutifs de l'hémoglobine au cours de l'infection .....	99
1.6.9	Analyse mécanistique et populationnelle de la perte en globules rouges .....	101
1.7	Résumé de la problématique scientifique au démarrage de la thèse.....	103

1.7.1	Points clés.....	103
1.7.2	Impact de la PADH en santé publique à l'échelle mondiale.....	103
1.7.3	Fréquence, gravité ? .....	104
1.7.4	Hémolyse chez certains : pourquoi ?.....	104
1.7.5	Objectifs et questions posées.....	105
2	RESULTATS OBTENUS.....	106
2.1	Organisation générale du travail de thèse : deux approches complémentaires .....	106
2.1.1	Une approche épidémiologique-clinique .....	106
2.1.2	Une approche expérimentale cognitive : « <i>pitting</i> » et rétention splénique des globules rouges	106
2.2	Organisation spécifique du travail de thèse .....	107
2.2.1	Système de recueil de l'information clinique et biologique.....	107
2.2.2	Recueil et analyse des données cliniques, traitement utilisé.....	108
2.2.3	Recueil et analyse des données biologiques standards et des marqueurs d'hémolyse	109
2.2.4	Recueil et analyse des prélèvements biologiques spécialisés au sein de l'unité : <i>pitting ex vivo</i> et évaluation du ratio S/V .....	109
2.2.5	Outils statistiques utilisés.....	113
2.3	Efficacité et tolérance de l'AS au cours du traitement du paludisme grave 2011-2013 (Annexe 4.2, article accepté à <i>Emerging Infectious Diseases</i> ) .....	114
2.3.1	L'anémie au cours du paludisme grave traité par AS : une définition large .....	114
2.3.2	Principaux résultats d'efficacité et de tolérance générale (Annexe 4.2) .....	114
2.3.3	Confirmation des profils évolutifs de l'hémoglobine.....	116
2.3.4	Clarification de la PADH : fréquence, importance et impact .....	118
2.3.5	En résumé de cette 1 <sup>ère</sup> étude .....	119
2.4	Premiers résultats de l'évaluation du <i>pitting ex vivo</i> en 2011 : l'hypothèse principale de la perte	120
2.5	Explications physiopathologiques de la perte globulaire lors de la PADH (Annexe 4.3, article publié [254]) .....	120

2.5.1	Approche physiopathologique : une définition stringente .....	121
2.5.2	Population étudiée et facteurs associés à la PADH .....	121
2.5.3	Confirmation d'un effet propre à l'AS par rapport à la quinine .....	122
2.5.4	Hyperparasitémie à l'admission : une condition nécessaire pour le risque de PADH mais non suffisante .....	122
2.5.5	Taux de pitting élevé à l'admission : une condition nécessaire pour le risque de PADH mais non suffisante .....	123
2.5.6	Le nombre en valeur absolu d'oiRBC est corrélé au risque de PADH.....	124
2.5.7	Canevas général explicatif du risque de PADH (Figure 2-12) .....	126
2.5.8	En résumé de cette 2 <sup>ème</sup> étude .....	128
2.6	Une étude de rétention sur « microsphiltre » .....	129
2.6.1	Plan de manipulation .....	129
2.6.2	Résultats.....	131
2.6.3	En résumé de cette 3 <sup>ème</sup> étude .....	133
2.7	Valorisation écrite, orale et projets congruents et parallèles.....	134
3	DISCUSSION .....	135
3.1	Synthèse et discussion des résultats .....	135
3.1.1	Quelle est l'incidence de la PADH et son évolution au cours du temps auprès d'une population de voyageurs traités pour paludisme grave par AS ? .....	135
3.1.2	Quelle est sa gravité et son impact ? .....	135
3.1.3	Quel(s) sont le(s) mécanisme(s) de cette hémolyse retardée en retenant l'hypothèse que cet effet secondaire est en rapport étroit avec le mode d'action original de la molécule mais qu'il ne se manifeste pas chez tous les patients traités par AS ? .....	136
3.1.4	Quel pourrait être le facteur prédictif de survenue de cette hémolyse afin de sélectionner les patients les plus à risque qui pourront bénéficier d'un suivi rapproché et adapté ?	138
3.2	Les limites de l'approche et des questions soulevées .....	138
3.2.1	Limites intrinsèques du travail .....	138
3.2.2	Les questions soulevées : création et destruction des oiRBC .....	140

3.2.3	Anémie au cours du paludisme : une sélection phénotypique des uRBC ? .....	148
3.3	Perspectives .....	150
3.3.1	Confirmation du modèle explicatif dans une population vivant en zone d'endémie et pré immune (essai DHART, collaboration Mahidol Oxford Research Unit 2014-2016) .....	150
3.3.2	Marqueur pronostic : « pitiéme de J3 ».....	152
3.4	Conclusion générale .....	154
3.4.1	Mécanisme unique et original d'épargne et de perte : une nouvelle anémie .....	154
3.4.2	Effet secondaire ou effet thérapeutique ?.....	154
3.4.3	Un effet indésirable en partie expliqué : sélection des patients à risque.....	154
3.4.4	Une transition thérapeutique préservée au bénéfice des malades .....	155
4	ANNEXES.....	156
4.1	Fiche de recueil et de suivi ANSM .....	156
4.2	Article : "Delayed hemolysis does not undermine the life-saving impact of artesunate. A prospective study of 123 patients with imported <i>P. falciparum</i> severe malaria" (article accepté à <i>Emerging Infectious Diseases</i> ).....	160
4.3	Article : "Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins" (article publié).....	191
4.4	Valorisation écrite, orale et projets congruents .....	200
4.5	Détails du marquage mis au point pour l'utilisation du CyflowSLOptics (mission Kinshasa – DHART-avril, juin 2014).....	205
5	BIBLIOGRAPHIE .....	209

## SOMMAIRE DES FIGURES ET TABLEAUX

### Figures

Figure 1-1.	18
Figure 1-2.	19
Figure 1-3.	21
Figure 1-4.	23
Figure 1-5.	25
Figure 1-6.	26
Figure 1-7.	27
Figure 1-8.	34
Figure 1-9.	40
Figure 1-10.	43
Figure 1-11.	43
Figure 1-12.	45
Figure 1-13.	47
Figure 1-14.	49
Figure 1-15.	63
Figure 1-16.	64
Figure 1-17.	65
Figure 1-18.	67
Figure 1-19.	68
Figure 1-20.	69
Figure 1-21.	74
Figure 1-22.	79
Figure 1-23.	91
Figure 1-24.	95
Figure 1-25.	101
Figure 1-26.	102
Figure 2-1.	108
Figure 2-2.	112
Figure 2-3.	115
Figure 2-4.	117
Figure 2-5.	118

**Figure 2-6.** ..... 120  
**Figure 2-7.** ..... 122  
**Figure 2-8.** ..... 123  
**Figure 2-9.** ..... 124  
**Figure 2-10.** ..... 125  
**Figure 2-11.** ..... 126  
**Figure 2-12.** ..... 127  
**Figure 2-13.** ..... 131  
**Figure 2-14.** ..... 132  
**Figure 3-1.** ..... 146

## **Tableaux**

<b>Tableau 1-1.</b> ....	<b>32</b>
<b>Tableau 1-2.</b> ....	<b>57</b>
<b>Tableau 1-3.</b> ....	<b>91</b>
<b>Tableau 1-4.</b> ....	<b>98</b>

# 1 INTRODUCTION

## **Les différents acteurs**

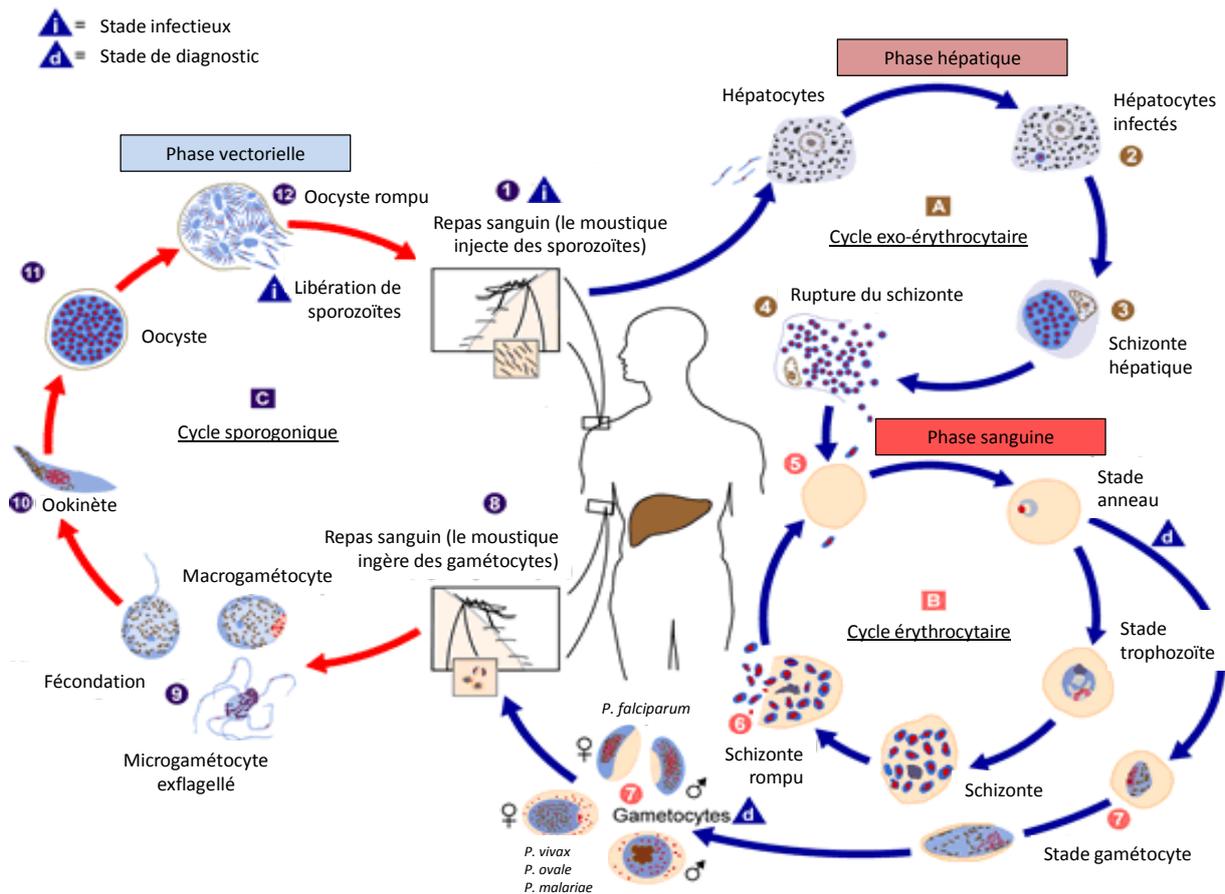
La première partie de ce travail va s'efforcer de donner un cadre global de compréhension du phénomène anémique hémolytique retardé au cours du paludisme grave traité par artésunate. Successivement nous aborderons le paludisme et sa physiopathologie au cours du paludisme grave, le globule rouge, la rate et ses interactions physiopathologiques dans ce contexte, l'artésunate au cours du paludisme grave et l'anémie palustre.

## 1.1 Le paludisme : le parasite et ses interactions

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est une infection humaine. Spontanément résolutive ou mortelle selon les terrains chez lesquels il se développe, son expression clinique est diverse. Il s'accompagne de fièvre évoluant classiquement de manière irrégulière et discontinue, d'une splénomégalie d'importance variable associée à la présence dans le sang périphérique de parasites dont le nombre peut être extrêmement élevé [1]. L'anémie est initialement inconstante et de profondeur variable. Il s'y associe des manifestations cliniques variées pouvant engager le pronostic vital ; il s'agit alors du paludisme grave.

### 1.1.1 Le cycle parasitaire : approche globale

Le paludisme, ou « malaria » des Anglo-Saxons est une infection humaine ou animale d'origine parasitaire due à des protozoaires du genre *Plasmodium*. Plus de 125 espèces ont été décrites pouvant toucher de nombreux vertébrés, mammifères ou non. Il existe une spécificité d'hôte permettant de définir des espèces plasmodiales simiennes, reptiliennes, murines, aviaires et humaines. Cinq espèces peuvent être responsables de pathologies chez l'Homme. *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées et les plus dangereuses pouvant conduire au décès et/ou l'anémie chronique. *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et une espèce anthropozoophile, *Plasmodium knowlesi*. Ces deux dernières espèces sont beaucoup plus rarement rencontrées chez l'homme et ne constituent pas ou pas encore un problème majeur de santé publique [2]. Les parasites du genre *Plasmodium* sont transmis par des arthropodes vecteurs, de type diptères nématocères du genre *Anopheles* chez lequel se déroule le cycle sexué, l'homme étant un hôte intermédiaire. La **figure 1-1** représente les différentes phases de l'infection chez l'homme et le moustique.

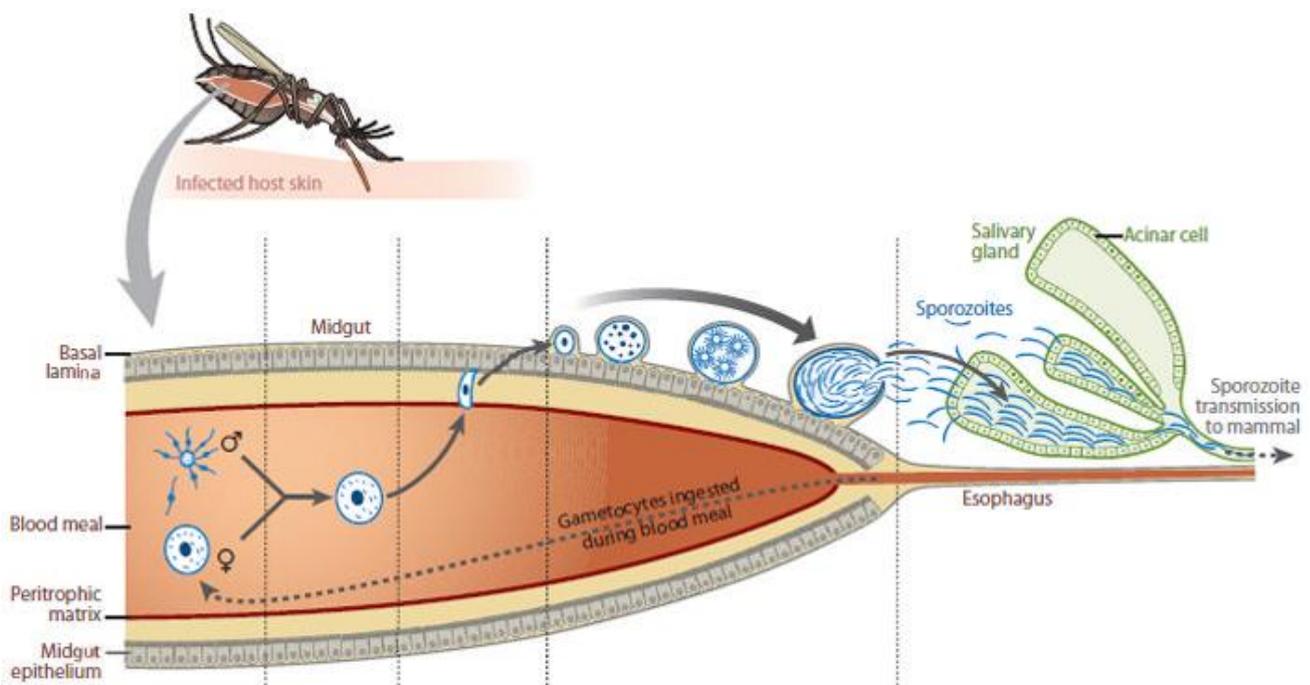


**Figure 1-1.** Cycle asexué et sexué de l'infection à *Plasmodium* sp. (adapté de <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>).

Le cycle parasitaire complet correspond à l'enchaînement de 3 phases distinctes. La phase hépatique ou schizogonie exo-érythrocytaire **A** dure de 5 à 7 jours [3]. La phase sanguine ou schizogonie érythrocytaire **B** est en réalité une succession de cycles d'invasion-rupture-invasion des globules rouges et de multiplication rapide de la biomasse parasitaire [4]. Chaque cycle dure de 1 à 3 jours selon les espèces de *Plasmodium* et va se répéter jusqu'à la différenciation sexuée et/ou le traitement en cas de paludisme maladie. La phase vectorielle se déroule chez le moustique où la multiplication et la différenciation parasitaire sont alors appelées cycle sporogonique **C**. Elle dure de 2 à 3 semaines [3].

Lors d'un repas sanguin, l'anophèle femelle, infectée, inocule des sporozoïtes (forme infectante du parasite), chez un être humain **1**. Les sporozoïtes infectent alors les hépatocytes **2** en moins d'une heure [3], et donnent naissance au schizonte hépatique **3**, qui après maturation libère, lors de sa rupture, des mérozoïtes **4** qui initient la phase sanguine (pour mémoire, lors de l'infection à *P. vivax* et *P. ovale* une forme dormante appelée hypnozoïte, peut persister dans le foie durant plusieurs mois ou années et être à l'origine de rechute plusieurs mois ou années après la dernière infection).

Les mérozoïtes libérés infectent des globules rouges réceptifs **5**. Les formes sanguines intra érythrocytaires circulantes (anneau, puis trophozoïtes de plus en plus âgés) mûrissent en schizontes érythrocytaires (aussi appelé corps en rosace) qui se rompent et libèrent des mérozoïtes **6**. Au bout d'un certain nombre de cycle, certains parasites se différencient en forme sexuées (gamétocytes) **7**. Les gamétocytes, mâles et femelles, sont ingérés par une anophèle femelle durant son repas sanguin **8**. Dans l'estomac de celle-ci les microgamétocytes pénètrent les macrogamétocytes et génèrent des zygotes **9**, qui deviennent mobiles et allongés (ookinètes) **10**. Ils envahissent la paroi du tube digestif du moustique et deviennent oocystes **11**. Les oocystes croissent, se rompent et libèrent des sporozoïtes **12**, qui se concentrent dans les glandes salivaires du moustique, hôte définitif. L'inoculation à un nouveau sujet hôte intermédiaire lors d'un repas sanguin, de ces formes infectantes, perpétue le cycle parasitaire **1** et figure 1-2.

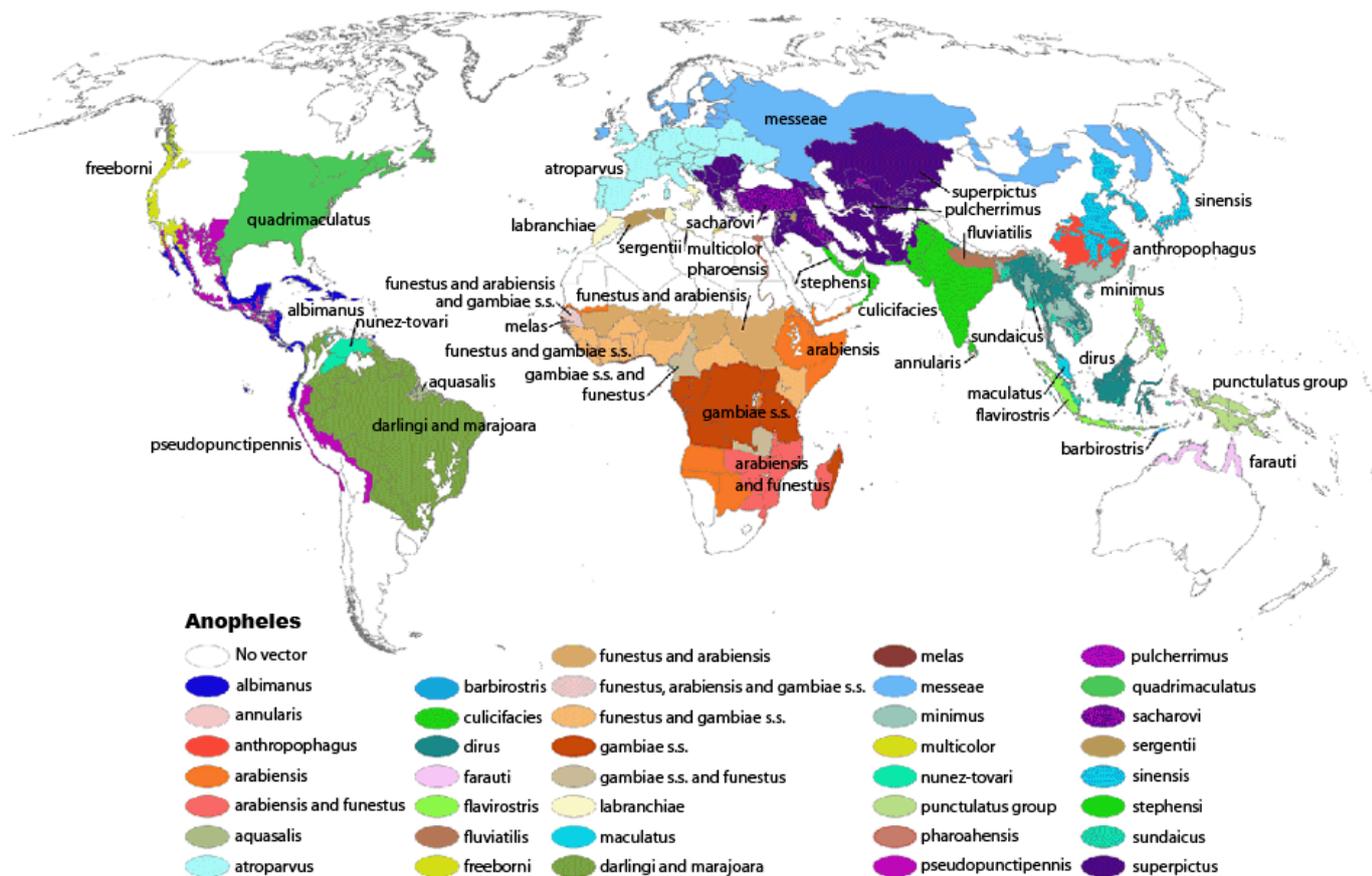


**Figure 1-2.** Représentation schématique du cycle parasitaire sporogonique de *Plasmodium sp.* (tiré de [5]).

### 1.1.2 Compétence vectorielle et interaction vecteur/hôte définitif et vecteur/hôte intermédiaire

Les sporozoïtes, formes infectantes du parasite, sont donc transmis par des femelles moustiques du genre *Anopheles* qui inclut 465 espèces identifiées et plus de 50 membres d'espèces complexes [6]. Approximativement 70 de ces espèces ont la capacité vectorielle de transmettre le parasite à l'homme et 41 sont considérées comme vecteurs dominants à haut impact en santé publique [7]. On

parle alors de complexe vecteur dominant espèce/espèce. En Afrique subsaharienne, la transmission est due à trois espèces principales d'anophèle : *An. gambiae*, *An. funestus* et *An. arabiensis*. La **figure 1-3** représente la répartition des principaux vecteurs de paludisme dans le monde. Le taux entomologique d'inoculation (EIR), qui correspond au nombre de piqûres infectantes par unité de temps, peut varier de une à mille piqûres infectantes par homme et par an [8]. Les déterminants de cette variabilité et de fait l'intensité du risque de transmission de la maladie reposent sur 4 facteurs vectoriels intriqués : (i) la densité de vecteurs, (ii) leur longévité et leur adaptation au milieu environnant et changeant, (iii) leurs habitudes alimentaires (rythme, horaire, intensité) et (iv) l'efficacité du vecteur, c. à. d sa capacité à transmettre la maladie [9]. Les taux entomologiques d'inoculation les plus élevés sont rencontrés essentiellement en Afrique sub-saharienne et Océanie et concerne essentiellement *P. falciparum*. Dans les zones géographiques de transmission faible saisonnière ou sporadique (Asie, Amérique centrale et du sud), *P. falciparum* et *P. vivax* sont présents de manière équivalente et les EIR sont faibles, de l'ordre de 1 piqure infectante par homme et par an [8]. Ces différents éléments auront un impact sur le profil immunitaire de réponse de l'hôte intermédiaire (cf. infra). Un élément complémentaire est venu s'ajouter sur les déterminants de la transmission vectorielle. Celui de l'influence du parasite lui-même sur le comportement du moustique. Il a été montré que la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires d'*An. gambiae*, en Tanzanie, augmentait son agressivité (nombre de piqûres par nuit) et le volume sanguin prélevé par repas (82% de repas complets comparés à 72% de repas complets chez des moustiques non infectés) [10], augmentant ainsi le risque de transmission de la maladie. L'action de piqure est une opération risquée pour le moustique. Il a été montré, chez *P. yoelii*, une espèce murine de plasmodium, que le nombre de piqûres des moustiques porteurs de formes non transmissibles (oocyste) diminuait afin de permettre au parasite de compléter sa maturation en formes infectantes pour l'hôte intermédiaire [11]. En outre la présence dans le sang de malades de gamétocytes accroît d'un facteur 2 l'attractivité de ces patients pour les moustiques (étude menée au Kenya chez 12 groupes de 3 enfants avant et après traitement, porteurs ou non de formes sexuées ou non de *P. falciparum*) [12]. Ces différentes interactions parasite-vecteur tendent à favoriser la transmission de sporozoïtes chez l'homme et de fait impactent directement l'épidémiologie du paludisme.



**Figure 1-3.** Répartition mondiale des principaux vecteurs du paludisme (tiré de <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/map.html>).

### 1.1.3 Interaction parasite/hôte intermédiaire et biomasse parasitaire

#### 1.1.3.1 Amplification hépatique

La phase hépatique, dite aussi phase de schizogonie exo-érythrocytaire fait suite à la pénétration de sporozoïtes aux travers de la peau lors du repas sanguin du moustique. Seule une partie de ces sporozoïtes vont gagner le tissu hépatique, de l'ordre d'une centaine [13]. Cette phase est asymptomatique et unique après chaque inoculation de sporozoïtes. Cette partie du cycle entraîne une première augmentation de la biomasse parasitaire. On estime qu'un sporozoïte ayant complété son cycle hépatique, d'une durée de 5 à 7 jours, donnera de l'ordre 10 000 mérozoïtes fils après rupture des mérosomes [5].

#### 1.1.3.2 Pour comprendre la schizogonie exo-érythrocytaire (résumé cellulaire et moléculaire)

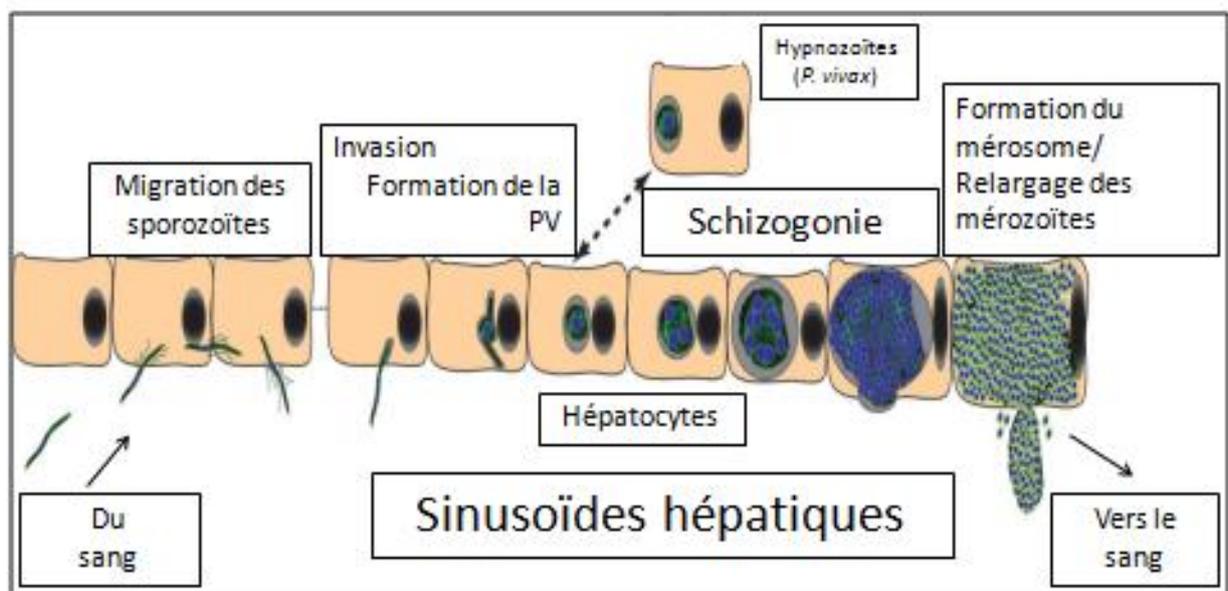
##### a. Migration et invasion

La plupart des données cellulaires et moléculaires concernant la phase hépatique sont issues de travaux utilisant des souris et des espèces plasmodiales murines (*P. berghei* et *P. yoelii*). Certaines de ces phases ont été confirmées chez *P. falciparum*. Les sporozoïtes acquièrent leur capacité infectieuse avant même leur inoculation à l'homme, lors de leur séjour dans les glandes salivaires du moustique. Elle est secondaire à l'activation de gènes de la famille UIS (*upregulated in infectious sporozoite*) [14] permettant la synthèse de protéines conférant au sporozoïte une capacité infectieuse (SAP1/SLARP, UIS1/IK2) [3, 5, 14, 15]. La délétion de certains de ces gènes et de leur transcrits n'empêche pas le sporozoïte de pénétrer l'hépatocyte après inoculation mais stoppe son développement très rapidement [14, 15]. La **figure 1-4** résume schématiquement les principales étapes de développement intrahépatique. Après inoculation les sporozoïtes, doués d'une motilité particulière appelée « *gliding motility* », que l'on pourrait traduire librement par « motilité planante », sont amenés par le flux sanguin au contact des hépatocytes. Après franchissement des capillaires sinusoides ils traversent plusieurs hépatocytes par transcytose, en trouant leur membrane plasmique de part et d'autre. Ils perdent peu à peu de leur mobilité par exposition à des gradients croissants de potassium tout en augmentant leur infectivité [16]. C'est le « mode migration ». L'interaction entre la « *Circum Sporozoite Protein (CSP)* » située à la surface du sporozoïte et des protéoglycanes particuliers de la surface de l'hépatocyte, les « *highly sulfated-heparan sulfate proteoglycans (hsHSPGs)* », entraîne une protéolyse de la CSP (via une protéase cystéinique) permettant au sporozoïte d'être activé en « mode invasif ». Cette phase d'invasion met en jeu le CD81 et une lipoprotéine de haute densité riche en cholestérol de la surface hépatocytaire, la « *scavenger receptor (SR-BI)* » nécessaire à l'invasion et au développement intra cellulaire du parasite [3]. Après invasion de l'hépatocyte le parasite se constitue en vacuole parasitophore (PV). La membrane de celle-ci (PVM) dérive de la membrane plasmique de l'hépatocyte remodelée par des protéines d'origines parasitaires. Ces protéines, issues de la famille de gènes UIS (UIS3, UIS4) ou d'autres (Hep17, famille ETRAMP) [17], servent d'interface entre la vacuole et le cytoplasme de la cellule hôte. La délétion des gènes codant pour ces protéines stoppe toute croissance parasitaire et interrompt le cycle [17].

#### b. Maturation et réplication

Les échanges avec le cytoplasme de la cellule hôte sont intenses et ceux-ci permettent au parasite d'accumuler des acides gras nécessaires à sa maturation, par l'intermédiaire d'une protéine de transport (L-FABP) [18], mais aussi d'empêcher la pénétration de molécules non désirées de la cellule hôte [17, 18]. La différenciation qui va suivre transforme la PV, forme d'invasion, en trophozoïte hépatique, forme de réplication. Le parasite se débarrasse par exocytose de toutes les organelles ayant servi à l'étape d'invasion lui donnant un aspect en bulbe [19]. Il ne garde que l'apicoplaste, les

mitochondries et le réticulum endoplasmique nécessaires à sa transformation progressive en syncytium multinucléés (schizogonie avec réplication d'ADN et de toutes les organelles), prélude au schizonte hépatique. Ce sont les conditions intracellulaires de pH et de température [20] qui enclenchent ce processus qui s'accompagne d'une augmentation de la concentration intraparasitaire de calcium [21]. Les organelles entrelacées subissent des changements positionnels et morphologiques et donnent naissance à autant de mérozoïtes [22]. On parle alors de ségrégation des organelles. La fabrication de ces mérozoïtes, constitués chacun d'un noyau et des organelles utiles nécessitent de grandes quantités de membranes plasmiques parasites utilisant la voie FAS-II (*Fatty Acid Synthesis-II*) de fabrication, produit de l'activation de gènes du même nom au sein des cellules hépatiques [23]. Durant la fabrication des mérozoïtes la PVM est détruite par un système de protéases (protéases de SErin Repeat Antigen) présentes chez toutes les espèces de *Plasmodium*. Sont ainsi libérés les mérozoïtes dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ceux-ci vont être empaquetés par milliers dans des vésicules appelées mérosomes [24] constitués de membranes plasmiques hépatocytaires (un moyen d'échapper au système immunitaire lors de la phase suivante). La mort cellulaire non nécrotique et non apoptotique de l'hépatocyte remanié, induite par le parasite, libère les mérosomes dans l'espace de Disse. Ceux-ci rejoignent alors passivement la circulation sanguine afin d'initier la phase de schizogonie érythrocytaire.



**Figure 1-4.** Les différentes phases de progression et de maturation parasitaire au sein des hépatocytes lors de la phase hépatique (tiré de [3]).

### 1.1.3.3 Amplification sanguine

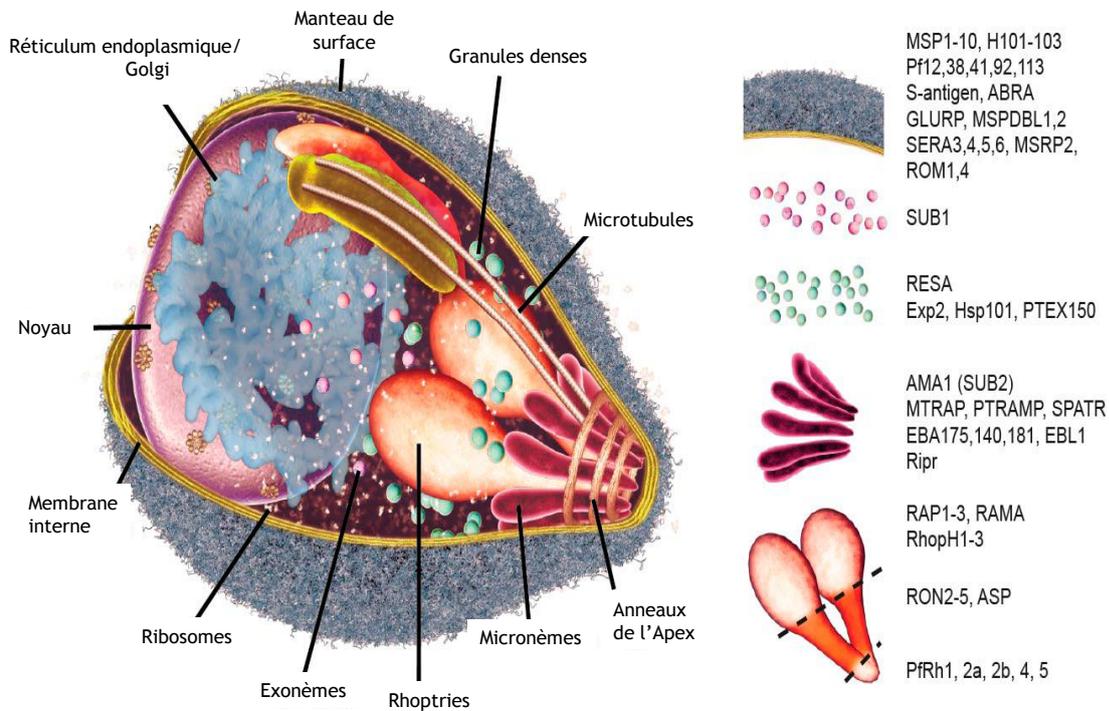
La phase sanguine dite de schizogonie érythrocytaire fait suite à la libération des mérozoïtes dans le sang circulant. Chaque invasion est suivie d'une maturation intraglobulaire, de 48h pour *P. falciparum*, qui libèrera à son tour de 6 à 30 mérozoïtes fils, chacun à leur tour en capacité d'envahir de nouveaux globules rouges [25]. Il en résulte, chez un sujet réceptif, un accroissement de population parasitaire d'un facteur 6 à 30 par cycle. Six à 8 jours après avoir quitté le foie, le parasite devient détectable dans le sang par microscopie ou test de diagnostic rapide (antigénique). Sa concentration est alors de l'ordre de 50 parasites par microlitre de sang pour une biomasse parasitaire totale de 100 millions de parasites [9]. La maladie peut alors devenir symptomatique.

### 1.1.3.4 Pour comprendre la schizogonie érythrocytaire (résumé cellulaire et moléculaire)

#### a. Adhésion et invasion

Les mérozoïtes sont libérés par éclatement de l'hépatocyte, ou des mérosomes (espèces murines) ou par l'éclatement des globules rouges infectés d'un cycle précédent [5, 24]. Le mérozoïte, d'une taille de 1 à 2  $\mu\text{m}$ , va entrer en contact avec les globules rouges de son voisinage [26]. Le mérozoïte est une cellule eucaryote constitué d'un cytosquelette, d'organelles sécrétoires (micronèmes, rhoptries, granules denses), de mitochondries, d'un noyau et d'un apicoplaste et possède tous les éléments nécessaires à l'invasion des globules rouges (**Figure 1-5**) [27]. Les protéines de la surface du mérozoïte, très nombreuses (manteau de surface de la **figure 1-5**) vont être responsables de la première interaction avec la surface du globule rouge. Ces protéines superficielles d'adhésion et d'invasion à venir appartiennent à 3 groupes : (i) des protéines de type « *Merozoite Surface Protein* » (MSP) ancrées à la membrane plasmique du mérozoïte via un glycosylphosphatidylinositol (GPI) destinées aux interactions ligand-récepteur à la surface du globule rouge (Bande 3 de la paroi du globule rouge pour MSP-1 par exemple), (ii) des protéines périphériques de surface (familles MSPDBL, SERA aux activités protéasiques) et (iii) des protéines de la membrane plasmique (ROM1-4) qui interviendront dans la constitution de la vacuole parasitophore [26]. Leur répartition à la surface du mérozoïte est fonction de leur rôle dans les différentes phases d'accrochage et d'invasion. Les protéines d'invasion se répartissent en « adhésines », destinées à des récepteurs spécifiques de la surface du globule rouge, et des « invasines », intervenant dans le processus d'invasion sans récepteurs obligatoires au niveau de la cellule hôte. Les adhésines, situées au niveau des organelles (rhoptries, micronèmes) sont spécifiques à chaque espèce de *Plasmodium*. Les plus importantes sont EBL-1 et *PfRh*. Elles se lient à des protéines de surface du globule rouge (glycophorine B, C, récepteurs Y, Z, ou encore basigine ou CD147) [28]. Parmi les « invasines » qui toutes sont

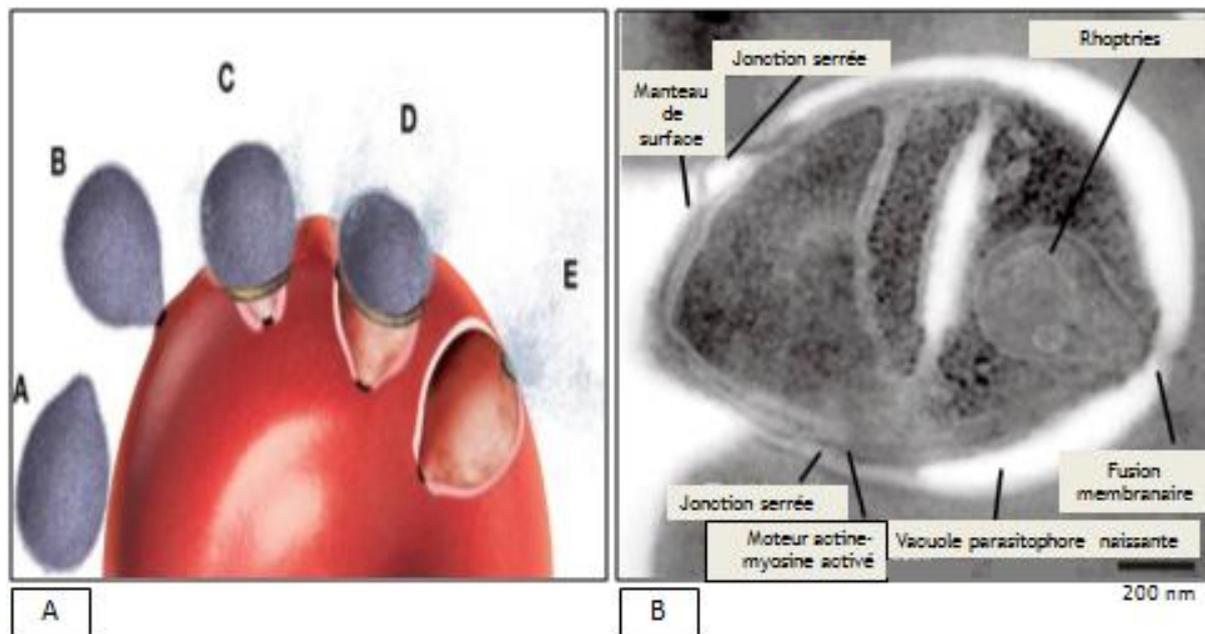
essentielles à l'invasion, la plus connue est la « *Apical membrane antigen-1 (AMA1)* » qui formera complexe avec des protéines RON pour la constitution des jonctions serrées latérales.



**Figure 1-5.** Micro-anatomie du mérozoïte. Les principales protéines par élément anatomique du mérozoïte sont listées sur la droite du dessin. L'action des protéines d'importance sont détaillées dans le texte. Les granules denses vont être libérées très tôt après l'invasion du globule rouge. Elle contiennent entre autre une protéine d'importance, la *Ring Erythrocyte Surface Antigen (RESA)*, marqueur d'infection parasitaire (cf. infra) (tiré de [26]).

Les mérozoïtes libérés des mérosomes, ou des globules rouges, sont exposés à une faible concentration de potassium (kaliémie). Ceci a pour effet d'entraîner une libération de calcium libérant les « adhésines » et les « invasines » des micronèmes [26] à la surface du parasite. Une interaction (contact) de faible affinité se crée entre les protéines périphériques de surface du manteau et la surface du globule rouge. Elle est suivie par un attachement irréversible, de l'apex du mérozoïte, après rotation du mérozoïte, par le biais des protéines EBL et *PfRh*. Cet attachement met en jeu le complexe protéique RON (RON2 spécifiquement) et AMA1 qui vont s'ancrer dans la surface du globule rouge créant une jonction serrée en forme d'anneau délimitant une zone d'entrée dans le globule rouge [29]. Cet accrochage entraîne la libération du reste des rhoptries, après phosphorylation d'AMA1 (par une kinase A dépendante de l'AMPc) [30], fournissant lipides et

protéines pour la constitution de la vacuole parasitophore et de sa membrane à l'entrée dans le globule rouge (**Figure 1-6 A**). La pénétration du parasite se fait de manière active grâce à l'action de ponts d'actine et de myosine ancrés dans la membrane parasitaire interne, situés latéralement en anneaux reliés aux jonctions serrées. Ils propulsent le contenu du mérozoïte dans la vacuole parasitophore naissante (**Figure 1-6 B**). La jonction serrée est alors tirée à travers la surface du mérozoïte, avec la membrane érythrocytaire jusqu'à ce que la cellule parasitaire soit scellée, probablement par fusion entre la vacuole parasitophore et la membrane érythrocytaire [31].

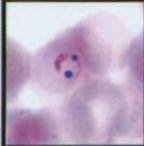
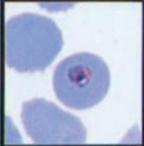
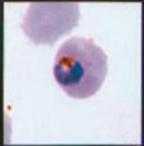
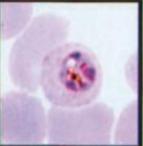
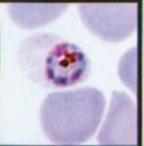


**Figure 1-6. (A)** Représentation schématique de l'invasion d'un érythrocyte par un mérozoïte (tiré de [27]). A : l'invasion débute par une reconnaissance via des récepteurs de surface. B : elle est suivie d'une réorientation apicale avec constitution d'une jonction serrée mettant en jeu une interaction ligand-récepteurs de haute affinité des surfaces cellulaires. C-D : cette jonction se déplace vers le pôle postérieur du mérozoïte sous l'action de moteurs actine-myosine. Le mérozoïte est dépouillé de son manteau de surface protéique sous l'action de protéases (Sheddase). Une fois arrivé au pôle postérieur la jonction serrée protéique est lysée par une protéase résidente ce qui autorise sa fermeture. Par ces différentes étapes le mérozoïte envahit le globule rouge de manière à créer une vacuole parasitophore. **(B)** Pénétration d'un mérozoïte de *P. falciparum* dans un globule rouge en microscopie électronique à transmission (tiré de [26]).

L'ensemble de ces phases (reconnaissance-adhésion-invasion) est très rapide et dure moins de 60 secondes, permettant de limiter l'exposition du mérozoïte au système immunitaire [27]. Le parasite désormais internalisé au sein du globule rouge va initier sa multiplication et sa maturation.

b. Multiplication, maturation et libération

La première forme de maturation est appelée stade « anneau » ou « annulaire » ou stade dit de « bague à chaton » (**Figure 1-7**). A mesure que le parasite se multiplie (par mitose) au sein du globule rouge et pour son développement, il consomme, dans sa vacuole nutritive, près des 2/3 des réserves d'hémoglobine du globule [32]. L'hème de l'hémoglobine est oxydé par le parasite en hématine, résidu toxique pour la paroi parasitaire (entraîne une lyse). De fait une détoxification par peroxydation glutathionique transforme les dimères d'hématine en hémazoïne ou pigment malarique, cristal inerte [33]. La présence de ce pigment est caractéristique d'un âge plus avancé du parasite (entre 26 et 38h de maturation intra-globulaire) qui définit le stade trophozoïte [34]. La phase tardive correspond à la maturation du parasite en schizonte contenant *stricto sensu* de 2 à 32 mérozoïtes nouvellement formés [27]. Sous l'action de protéases (de la famille SERA) s'accompagnant d'une augmentation de pression cellulaire, la vacuole parasitophore puis la membrane globulaire sont lysées propulsant les mérozoïtes dans la circulation sanguine. Le cycle se poursuit par l'invasion de nouveaux globules rouges sains (**Figure 1-1**).

0-6 H	6-16 H	16-26 H	26-30 H	30-34 H	34-38 H	38-44 H	44-48 H
							
<u>Minuscule Anneau</u> Largeur du cytoplasme < ½ noyau	<u>Petit Anneau</u> Largeur du cytoplasme ≥ ½ noyau	<u>Grand Anneau</u> Largeur du cytoplasme > noyau	<u>Jeune Trophozoïte</u> Leger pigment brun visible	<u>Trophozoïte Moyen</u> Pigment brun Cytoplasme noir Noyau et cytoplasme élargi	<u>Vieux Trophozoïte</u> Devient sphérique Pigment brun Noyaux ≤ 2	<u>Jeune Schizonte</u> Pigment brun-noir 3-5 noyaux Cytoplasme globulaire pâle	<u>Vieux Schizonte</u> Pigment brun-noir > 5 noyaux

**Figure 1-7.** Les différents stades de maturation parasitaire lors de la phase érythrocytaire, issues de culture de *P. falciparum* (microscopie optique, coloration Giemsa, grossissement 1000) (adapté de [34]).

Certains parasites se différencient en gamécyte et apparaissent dans le sang périphérique environ 8 à 10 jours après l'apparition des formes asexuées [1]. La maturation des gamécytes (stade I à IV) se déroulent dans la moelle osseuse pendant 6 à 8 jours [35, 36]. Seuls les gamécytes matures (stade V), sont retrouvés dans le sang périphérique [37]. Le cycle vectoriel peut alors débuter. Toutes

les multiplications et amplification de biomasse parasites ont lieu par mitose chez l'homme. Les recombinaisons génétiques parasites, dues aux méioses, se déroulent chez le moustique uniquement.

#### 1.1.4 En conclusion de ce chapitre

Les signes cliniques sont dus à l'infection du globule rouge nécessaire à la multiplication parasitaire, le cycle intra érythrocytaire de la phase sanguine [4]. Celui-ci dure 48h en moyenne pour *P. falciparum*. La rupture des globules rouges infectés entraîne fièvre et frissons (libération de composant parasites induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et pyrogènes comme l'IL-6). Cette rythmicité lui a conféré le nom de « fièvre tierce » au sein des fièvres rémittentes [1]. Il est classique de décrire les différentes phases de développement de la maladie par sa phase prépatente (délai entre la contamination et l'apparition des formes asexuées dans le sang périphérique) et son incubation intrinsèque (délai entre la contamination et l'apparition des signes cliniques comme la fièvre et les manifestations systémiques) [1, 38]. Sur une série historique de 220 cas d'infection naturellement induite par 6 souches parasitaires différentes, les durées moyennes de prépatence et d'incubation intrinsèque furent de 11 et 13 jours respectivement [38]. Le seuil de détection communément admis pour la mise en évidence d'une parasitémie circulante est de 0,001% des hématies parasitées (50 parasites/ $\mu$ L de sang) [9]. Le niveau de parasitémie s'accompagnant de manifestations cliniques (seuil de patence clinique) est lui évalué à 0,01% [39].

## **1.2 Le paludisme : la maladie clinique, classification, physiopathologie et immunité**

Contrairement aux voyageurs qui s'infectent une fois au cours d'un voyage, les personnes vivant en zone d'endémie sont contaminées de façon répétée. Le parasite est présent dans le sang en permanence : il s'agit du « paludisme infection », permise par une relative immunité protectrice, appelée prémunition. Ainsi en zone d'endémie à haut niveau de transmission la présence d'une parasitémie asymptomatique chez les adultes ou chez les enfants âgés est fréquente et concourt à la pérennisation du cycle parasitaire complet (cf. infra) (**Figure 1-8**) [40]. En l'absence de prémunition (voyageur, perte de prémunition) ou lorsque la parasitémie dépasse un certain seuil, les moyens de régulation ne peuvent empêcher l'accès palustre ou le « paludisme maladie ». L'accès palustre est défini épidémiologiquement et cliniquement par la présence de formes asexuées parasitaires dans le sang associée à des signes cliniques [41].

### **1.2.1 Le paludisme simple : accès de primo-invasion à *P. falciparum***

L'accès palustre de primo-invasion se manifeste par un syndrome algique (arthromyalgies, céphalées, douleurs abdominales) fébrile, associé à des troubles digestifs (anorexie, nausées, vomissements, diarrhée). La fièvre est quasi constante (80 % des cas), en plateau et associée à des frissons [42]. Il n'y a pas d'éruption cutanée. L'adage de « l'embaras gastrique fébrile chez un patient céphalalgique » reste d'actualité. En l'absence de signes de gravité (cliniques ou biologiques) et de vomissements, cet accès est considéré comme « simple sans gravité » autorisant un traitement ambulatoire si par ailleurs les conditions d'un retour au domicile en toute sécurité pour le malade sont réunies [41, 43]. Non diagnostiqué et non traité, il peut évoluer vers la forme de l'accès palustre rythmé (fièvre rémittente) ou vers un accès grave en cas d'infection à *P. falciparum*. L'accès palustre rythmé ou fièvre rémittente, qui survient après une phase de fièvre aiguë, est la manifestation clinique de la synchronisation progressive de la destruction globulaire. Il est classiquement constitué par la succession de trois phases : (i) frissons, avec sensation de froid et malaise intense, pendant 1 à 2 heures, (ii) chaleur, avec fièvre à 40 °C et éréthisme, pendant 1 à 4 heures, et (iii) sueurs, avec hypersudation à la suite de la phase précédente et retour à une température normale, laissant le malade asthénique et myalgique. Ces accès se répètent tous les 2 ou 3 jours, selon l'espèce parasitaire considérée (fièvre tierce ou quarte). Lorsque plusieurs populations parasitaires évoluent chez un même malade en parallèle, avec des cycles parasitaires décalés, la rythmicité de la fièvre est moins marquée [1, 38]. La répétition des accès en zone de transmission stable entraîne chez l'enfant anémie chronique et splénomégalie [9]. Sans traitement la répétition des accès peut durer plus d'un mois et spontanément se résoudre [1, 44].

### 1.2.2 Le paludisme grave

L'accès palustre, après un début banal, peut évoluer, et cela rarement en zone d'endémie (cf. infra), vers l'accès grave. Il est caractérisé par la survenue de manière séquentielle de défaillance d'organes pouvant engager le pronostic vital et fonctionnel [45]. La définition de l'accès grave repose sur des critères cliniques et biologiques, non forcément indépendants entre eux [45]. La présence d'un critère de gravité (clinique ou biologique) associé à une parasitémie suffit à définir l'accès grave [41]. Les critères utilisés proviennent, en France de 4 sources officielles : la définition de l'accès grave de l'OMS de 2000, ses révisions françaises de 2007 et de l'OMS de 2010 et les données d'un essai majeur SEAQUAMAT, en 2005 (**Tableau 1-1**) [41, 45-47]. Dans les recommandations de l'OMS de 2000, ces différents critères étaient accompagnés d'une échelle semi quantitative relative à la fréquence de survenue du signe clinique ou biologique (chez l'enfant et l'adulte) et sa valeur pronostique [45]. Au fil des années et des travaux complémentaires, cette évaluation s'est affinée.

Pronostic	Critères de gravité	Fréquence
	<b><u>Toute défaillance neurologique incluant :</u></b>	
+++	<b>Adulte :</b> <b>Obnubilation, confusion, somnolence</b> , prostration, impossibilité de se nourrir Coma avec score de Glasgow < 11	+++
+++	<b>Enfant :</b> <i>coma avec score de Blantyre &lt; 3</i> Troubles de conscience (Glasgow <14) et coma (Glasgow < 11) Prostration	+++
	<b><u>Toute défaillance respiratoire incluant :</u></b>	
+++	<b>Adulte :</b> <i>dyspnée d'acidose métabolique (Kussmaul)</i> <b>Si VM<sup>1</sup> ou VNI<sup>2</sup> :</b> PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> < 300 mmHg <b>Si non ventilé</b> PaO <sub>2</sub> < 60 mmHg et/ou SpO <sub>2</sub> < 90 % en air ambiant et/ou FR > 32/mn Signes radiologiques d'œdème aigu pulmonaire : images interstitielles et/ou alvéolaires	+
+++	<b>Enfant :</b> battement continu des ailes du nez, dépression inspiratoire franche de la base du thorax, dyspnée d'acidose métabolique (Kussmaul)	+++
	<b><u>Toute défaillance cardio-circulatoire incluant :</u></b>	
+++	<b>Adulte :</b> Collapsus avec pression artérielle systolique < 80 mmHg, en présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire Patient recevant des drogues vasoactives quel que soit le chiffre de pression artérielle <b>Signes périphériques d'insuffisance circulatoire sans hypotension</b>	++
+++	<b>Enfant :</b> PAs < 50 mmHg chez l'enfant PAs < 60 mm Hg avant 5 ans, PAs < 80 mm Hg après 5 ans, signes d'insuffisance circulatoire périphérique	+
	<b><u>Convulsions répétées</u></b>	
++	<b>Adulte :</b> au moins 2 par 24h	+
+	<b>Enfant :</b> idem	+++
	<b><u>Hémorragie</u></b>	
++	<b>Adulte :</b> définition purement clinique	+
+++	<b>Enfant :</b> idem	+/-
	<b><u>Ictère</u></b>	
+	<b>Adulte :</b> <i>clinique et défaillance d'organe associée</i> <b>ictère clinique et/ou bilirubine totale &gt; 50 µmol/l</b>	+++
++	<b>Enfant :</b> ictère clinique	+

	<b><u>Hémoglobinurie macroscopique</u></b>	
<b>+</b> <b>+</b>	<b>Adulte</b> : clinique <b>Enfant</b> : idem	<b>+</b> <b>+/-</b>
<b>+</b> <b>+</b>	<b><u>Anémie profonde</u></b> <b>Adulte</b> : <i>hémoglobine &lt; 5 g/dl, hématokrite &lt; 15 %</i> <i>hémoglobine &lt; 7 g/dl, hématokrite &lt; 20 %</i> <b>Enfant</b> : hémoglobine < 5 g/dl, hématokrite < 15 %	<b>+</b> <b>+++</b>
<b>+</b> <b>+++</b>	<b><u>Hypoglycémie</u></b> <b>Adulte</b> : glycémie < 2,2 mmol/l <b>Enfant</b> : idem	<b>+</b> <b>+++</b>
<b>+++</b> <b>+++</b>	<b><u>Acidose métabolique</u></b> <b>Adulte</b> : bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/l ou acidémie avec pH < 7,35 <i>(surveillance rapprochée dès que bicarbonates &lt; 18 mmol/l)</i> <b>Enfant</b> : idem	<b>++</b> <b>+++</b>
<b>+++</b> <b>+++</b>	<b><u>Hyperlactatémie</u></b> <b>Adulte</b> : lactate artériel plasmatique > 5 mmol/l <i>Toute hyperlactatémie : dès que la limite supérieure de la normale est dépassée. A fortiori si lactate plasmatique &gt; 5 mmol/l</i> <b>Enfant</b> : idem	<b>++</b> <b>++</b>
<b>+</b> <b>+/-</b>	<b><u>Hyperparasitémie</u></b> <b>Adulte</b> : <i>parasitémie &gt; 2% (100 000/μl) dans les zones de faible intensité de transmission ou &gt; 5% (250 000/μl) dans les zones de haute et/ou stable intensité de transmission</i> <i>Dès que parasitémie &gt; 4 %, notamment chez le non immun (selon les contextes les seuils de gravité varient de 4 à 20 %)</i> <b>Enfant</b> : ≥ 4 % chez le sujet non immun, ou ≥ 20 % chez le sujet semi-immun	<b>+++</b> <b>+</b>
<b>++</b> <b>++</b>	<b><u>Insuffisance rénale</u></b> <b>Adulte</b> : créatininémie > 265 μmol/l <i>ou urée sanguine &gt;17 mmol/l</i> , et diurèse < 400 ml/24 h malgré réhydratation <b>Enfant</b> : diurèse < 12 ml/kg/24 h ou créatininémie élevée pour l'âge, persistante après réhydratation	<b>+++</b> <b>+</b>

**Tableau 1-1.** Critères cliniques et biologiques de gravité définissant le paludisme grave de l'adulte et de l'enfant en France. Ils sont basés sur les recommandations internationales et l'apport de l'étude SEAQUAMAT [41, 45-47]. En italique les définitions internationales de l'OMS non retenues en France. En bleu les apports de l'essai SEAQUAMAT. En rouge les adjonctions françaises à la définition qui tiennent compte des spécificités du paludisme d'importation.

+/- : traduit une incidence peu élevée

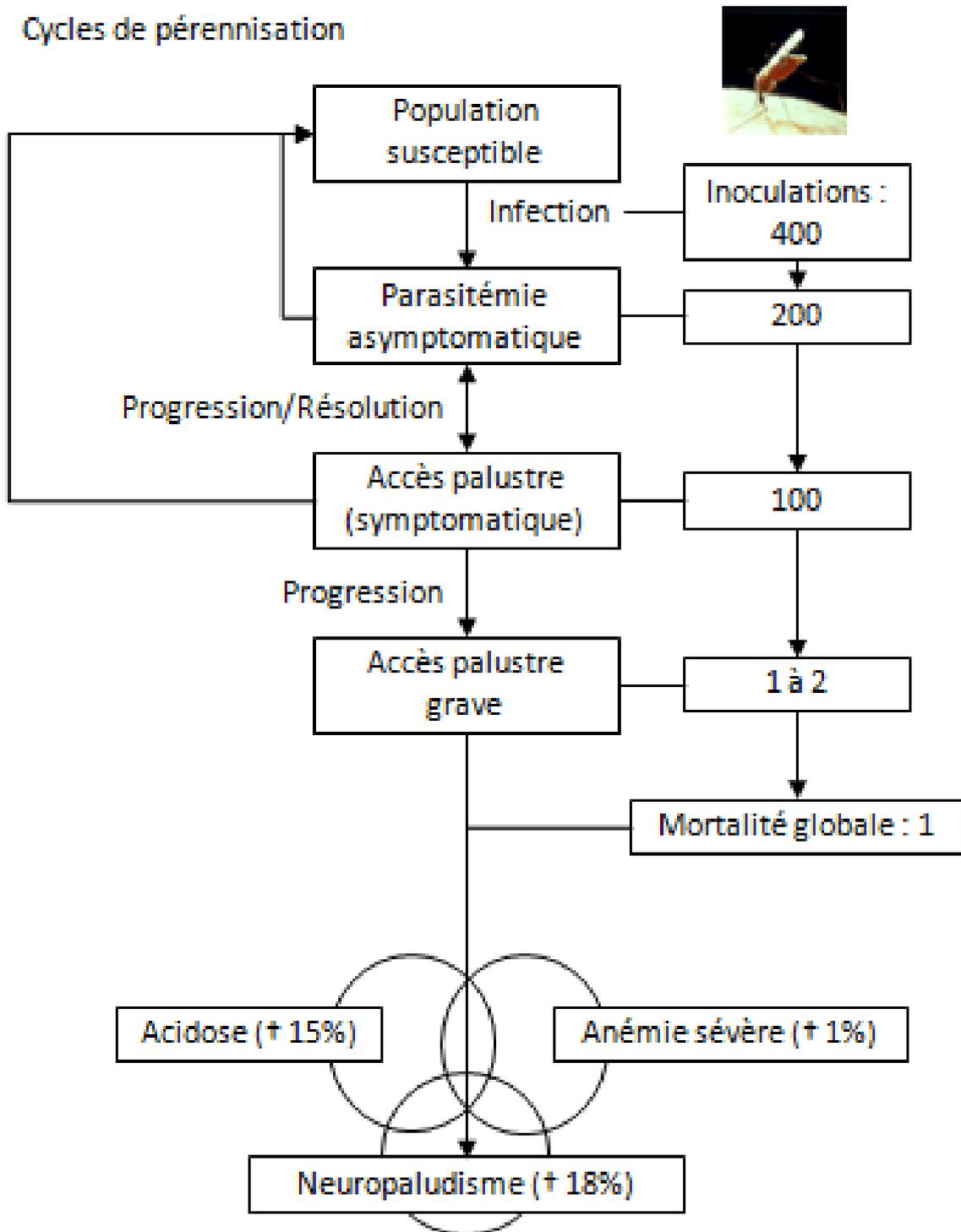
VM : ventilation mécanique, VNI : ventilation non invasive, FR : fréquence respiratoire. PAs : pression artérielle systolique

L'incidence des manifestations du paludisme grave varient en fonction de l'âge et du niveau d'intensité de transmission de la maladie. En zone de faible transmission, comme en Asie, l'hypoglycémie et l'anémie sont plus fréquemment retrouvées chez l'enfant que chez l'adulte. L'œdème pulmonaire, l'atteinte rénale ou l'ictère sont l'apanage des sujets plus âgés. L'atteinte neurologique (neuropaludisme et coma) et l'acidose métabolique sont aussi fréquents chez l'enfant

que chez l'adulte en cas de paludisme grave [48]. Ce sont de bons marqueurs prédictifs de mortalité. A contrario, dans les pays à haut niveau de transmission (Afrique Subsaharienne), l'anémie est l'une des plus fréquentes complications du paludisme même si sa létalité est faible (sous réserve d'un traitement adéquat) [9]. De fait l'anémie sévère au cours du paludisme représente un contingent majeur des décès au niveau de la mortalité globale. Le paludisme grave devient rare chez l'adulte alors qu'il est fréquent chez l'enfant.

La **figure 1-8** résume le schéma évolutif de la maladie dans une population susceptible.

## Cycles de pérennisation



**Figure 1-8.** Schéma évolutif du paludisme dans une population susceptible (haute endémicité). Parmi les associations les plus sévères au cours du paludisme grave (définition OMS), l'atteinte neurologique, l'acidose métabolique et l'anémie sévère sont responsables de la plupart des décès (inspiré de [32, 44]). † : mortalité.

### **1.2.3 Physiopathologie de l'accès grave : séquestration tissulaire, inflammation, hémolyse et anoxie (Figure 1-9)**

La physiopathologie de l'accès grave repose sur l'intrication de phénomènes cellulaires, moléculaires et métaboliques qui concourent à la dysfonction d'organe. Schématiquement 7 mécanismes intervenant à des degrés divers selon les malades et leurs conséquences vont entrer en jeu et se compléter pour entraîner une diminution de l'apport d'oxygène au niveau des tissus et l'altération du revêtement endothélial et de son fonctionnement [9, 32].

#### **1.2.3.1 Séquestration globulaire et parasitaire dans la microcirculation sanguine tissulaire : cytoadhérence, « rosetting » et auto-agglutination**

A partir de 12 à 15 heures après l'invasion de l'hématie, le parasite (stade trophozoïte) va faire exprimer à la surface de son globule rouge hôte un complexe de molécules d'adhésion sous la forme d'excroissances électrodenses appelées « knobs ». La plus connue de ces protéines d'adhésion est la « *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein* » de type 1 (PfEMP1). C'est une protéine, faisant saillie à la surface du globule rouge, de haut poids moléculaire, de grande variabilité antigénique (codée par environ 60 gènes *var*), qui va être responsable de la cytoadhérence. Cette protéine est exportée à la surface globulaire (face externe) de l'hématie parasitée au niveau des *knobs*. Les molécules réceptrices de liaison, se trouvent, elles, à la surface des cellules endothéliales. L'« *Inter Cell Adhesion Molecule* » de type 1 (ICAM1) est prédominante dans la circulation cérébrale, le chondroïtine sulfate A dans le placenta, l'héparane sulfate, un glycosaminoglycane transmembranaire, et le CD36 le sont dans la plupart des endothéliums des organes. La molécule d'adhésion endothélium/plaquette (PECAM) crée une liaison dépendante des plaquettes. Les globules rouges infectés adhèrent à la surface des vaisseaux (cytoadhérence) via ces interactions ligand-récepteurs. Ils adhèrent aussi à d'autres globules rouges infectés formant complexes avec les plaquettes exprimant le CD36 (auto-agglutination) [49] et aussi à des globules rouges non infectés ; c'est le phénomène de « *rosetting* » [50, 51]. Ces 3 phénomènes additionnés créent des conglomerats de globules rouges parasités, non parasités et de plaquettes, dans la microcirculation des organes. Celle-ci réduit le flux sanguin des organes considérés, entraîne une congestion et des conséquences métaboliques responsables de l'expression clinique [9, 52]. L'accrochage à ICAM 1 induit une activation de la kinase RhoA intraendothéliale entraînant des réarrangements du cytosquelette avec rétraction des cellules endothéliales et rupture des jonctions serrées intercellulaires. Cette kinase active aussi la voie NF-κB et exerce des effets pro-inflammatoires, pro-coagulants et augmente l'adhésivité intercellulaire [32].

Un autre phénomène cellulaire a été mis en évidence. A mesure que le parasite mature au sein du globule rouge celui-ci, peu à peu remodelé, devient de moins en moins déformable c'est-à-dire de

plus en plus sphérique et rigide. Cette diminution de déformabilité touche aussi les globules rouges non parasités [53]. Il en résulte une modification du flux microcirculatoire qui concourt au blocage de la circulation sanguine dans les microvaisseaux (capillaires et veinules post capillaires). Sur une étude de 232 patients, la profondeur de cette altération était étroitement associée à la présentation clinique du paludisme et au risque de décès [54]. La réduction du flux est aussi due à des phénomènes plus généraux concernant l'écoulement des fluides (phénomène de Fårheus-Lindqvist) selon lequel la viscosité globale du sang dépend du diamètre du vaisseau sanguin. A mesure que le diamètre du vaisseau diminue, la viscosité diminue. Le plasma sert de « lubrifiant » encadrant les globules rouges circulants. Il facilite leur écoulement. Pour des diamètres inférieurs à 5 µm (capillaires et veinules post-capillaires) il est noté une réaugmentation très brutale de la viscosité sanguine par disparition du plasma accompagnant les érythrocytes (inversion du phénomène de Fårheus-Lindqvist). Les érythrocytes occupent alors toute la lumière du vaisseau ; la fine couche de plasma a disparu et n'assure plus son effet facilitateur de l'écoulement. Cette augmentation de viscosité physiologique s'ajoute aux capacités cytoadhésives de l'hématie parasitée et à la réduction de déformabilité des érythrocytes infectés ou non, et favorise la réduction du débit sanguin et la séquestration [55].

Par ailleurs cette séquestration, en bloquant la mobilité de l'hématie parasitée, est un moyen pour le parasite d'échapper au filtre splénique et au système immunitaire (cf. infra) tout en continuant sa maturation intraglobulaire.

Ces modifications morphologiques et la séquestration globulaire entraîne donc un ralentissement voire un blocage de la microcirculation sanguine. Celui-ci est responsable d'une hypoxie tissulaire confinante à l'anoxie en cas de blocage complet et d'un métabolisme anaérobie (glycolyse anaérobie) pourvoyeur d'acide lactique responsable de l'acidose métabolique.

#### **1.2.3.2 Lyse des globules rouges parasités (iRBC) et non parasités (uRBC)**

La rupture des globules parasités arrivés à maturité (schizonte) et la destruction des globules rouges non infectés impliqués dans les rosettes [56] (appelés « *Bystander Red Blood Cells* ») entraîne fièvre et frissons. La répétition des cycles entraîne une anémie. Celle-ci s'accompagne de dysérythropoïèse ce qui aggrave le phénomène. Les mérozoïtes libérés vont envahir les globules rouges réceptifs de proximité et à distance, afin de pérenniser le cycle parasitaire. L'hémolyse libère de l'hémoglobine libre, de l'arginase et de l'ADMA (diméthyle arginine asymétrique) dans le plasma.

### **1.2.3.3 Consommation et altération de la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) : un puissant régulateur de l'homéostasie endothéliale**

L'infection palustre perturbe le métabolisme de l'oxyde nitrique (NO), puissant métabolite vasodilatateur à effet paracrine (local) et entraîne une activation délétère de l'endothélium [57]. L'hémoglobine libre consomme le NO libre plasmatique pour donner naissance à son métabolite inactif, du nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Il en résulte une diminution progressive des stocks de NO de provenance endothéliale et de son action vasorégulatrice. L'arginase libérée des hématies rompues transforme l'arginine en ornithine. Le stock disponible d'arginine diminue donc, réduisant l'activité de fabrication du NO, par la voie NOS (Nitric Oxide Synthetase) dépendante de l'arginine intra endothéliale (cellulaire). La kinase RhoA a un effet inhibiteur de NOS. La voie de fabrication NOS intracellulaire utilise de l'oxygène, de l'arginine et du NADPH comme substrat pour la fabrication du NO. En l'absence d'arginine, la NOS agit comme une oxydase et produit des radicaux libres (toxiques) à partir d'oxygène moléculaire et du NADPH. A l'état de fonctionnement normal l'arginine intracellulaire est transformé en ADMA par une méthylase. Cette ADMA, inhibiteur de NOS, est transformée en citrulline par la diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH). La DDAH joue un rôle de régulateur indirect sur la fabrication de NO en métabolisant l'ADMA. L'arginine et l'ADMA peuvent franchir la membrane cellulaire endothéliale dans les deux sens par le biais d'un transporteur cationique (CAT). La résultante de la consommation d'arginine et de l'excès d'ADMA est une diminution de fabrication de NO et de son action vasodilatatrice.

Il en résulte une vasoconstriction secondaire à la diminution de la concentration de NO disponible. Une étude réalisée en Indonésie au cours du paludisme grave de 51 patients comparés à un groupe de 48 malades non sévères a révélé une diminution du NO exhalé et de la concentration plasmatique de L-arginine chez les malades les plus graves (10,5 ppb vs. 16,5 ppb, chez les cas graves et les cas simples respectivement, p=0,02). Dans cette même étude, l'évaluation de l'activation endothéliale par la mesure d'un index (RH-PAT) a révélé une vasoconstriction plus importante au cours du paludisme grave et réversible (augmentation de 19%) après injection d'arginine [58].

### **1.2.3.4 L'inflammation vasculaire**

Le glycosylphosphatidylinositol (GPI) d'origine parasitaire déclenche une réaction inflammatoire, au contact des récepteurs Toll de la surface endothéliale (Toll-like receptor 2-TLR2). Il s'ensuit l'activation de la voie NF-κB et la transcription de cytokines inflammatoires (comme le Tumor necrosis factor - TNF), l'expression de molécules d'adhésion (ICAM1) et de facteurs pro-coagulants (facteur tissulaire -TF). Le NO, s'il est en concentration normale exerce un effet anti-inflammatoire en inhibant la voie NF-κB.

### **1.2.3.5 Perte de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique**

L'intégrité de l'endothélium vasculaire, et son imperméabilité, repose sur les jonctions serrées (*zonula occludens*), structures fibrillaires et protéiques transmembranaires qui assurent la coalescence des cellules endothéliales entre elles. Elles sont sous la dépendance de l'angiopoïétine 1 et de sa voie de signalisation une tyrosine kinase (Tie2). Au cours de l'accès grave l'angiopoïétine 2, libéré par les corps de Weibel-Palade se fixe aussi sur la Tie2 mais sans transduction de signal stoppant l'action de l'angiopoïétine 1. Des taux circulants élevés d'angiopoïétine 2 sont associés à la rétinopathie et au décès au cours du neuropaludisme [59, 60]. La conséquence est une dégradation des jonctions serrées entraînant fuite capillaire, inflammation, œdème et hémorragies. Par ailleurs dans ce contexte inflammatoire, le TNF stimule l'action de l'angiopoïétine 2 et l'expression d'ICAM1 à la surface endothéliale aggravant la perte de contact entre les cellules. Dans le cadre de l'atteinte cérébrale l'impact clinique de la fuite capillaire/œdème vasogénique (accompagné d'une augmentation de pression intracrânienne) et de l'œdème cytotoxique (réactionnel à la destruction cellulaire) demeure une source d'interrogations. L'atteinte rétinienne au cours du paludisme (blanchiment de zones rétinienne au fond d'œil) reflète l'obstruction hétérogène de la microcirculation cérébrale par la séquestration parasitaire donnant naissance à des micro-ischémies cérébrales. Elle est associée au coma. Par contre l'œdème cérébral diffus en général très modéré, si il est fréquent (51% des cas) ne semble pas corrélé au coma ou au décès au cours du paludisme grave chez l'adulte au Bangladesh [61]. Au Malawi, chez l'enfant, l'œdème cérébral de nature vasogénique est corrélé à la gravité de la rétinopathie et du tableau clinique. Il s'y associe une hypertension intracrânienne avec engagement de l'uncus et/ou du cervelet dans 10% des cas [62].

### **1.2.3.6 Exocytose des corps de Weibel Palade et facteur de Willebrandt**

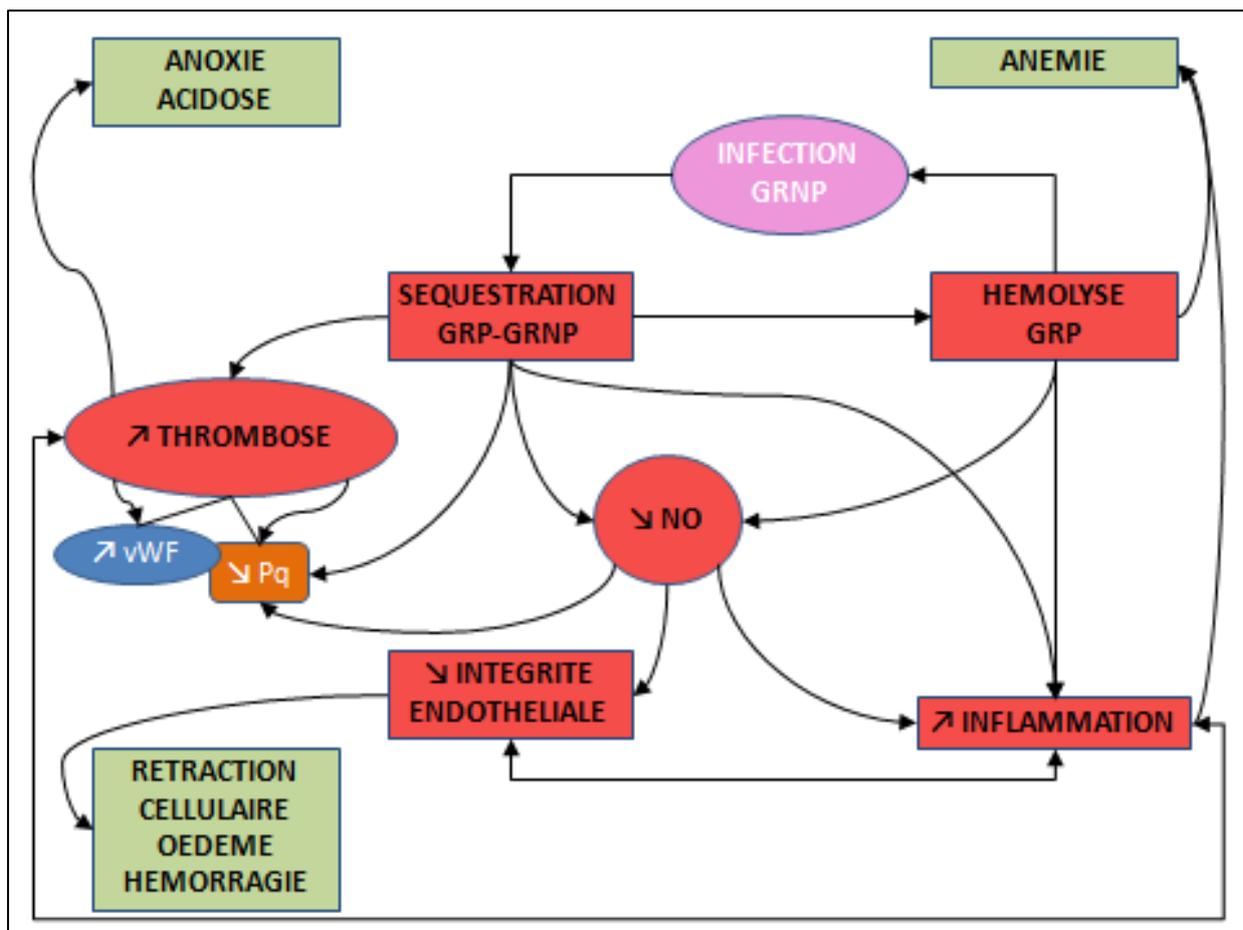
L'activation endothéliale entraîne l'exocytose des granules de Weibel-palade qui sont des organelles intracellulaires de stockage de la cellule endothéliale. Elles contiennent des multimères de facteur de Willebrandt (vWF) qui intervient dans les étapes de la coagulation, de la sélectine P qui a un rôle dans le recrutement macrophagique et de l'angiopoïétine 2, entre autre composants. Le vWF libéré interagit avec les plaquettes (par le récepteur CD36) et déclenche un phénomène thrombotique. Les multimères de vWF accrochent les plaquettes circulantes et crée un ancrage et des ponts avec les globules rouges infectés et l'endothélium aggravant l'obstruction vasculaire. Les multimères de vWF sont normalement clivés et inactivés par une protéase, ADAMTS13 (une disintégrine et métalloprotéinase avec domaine thrombospondine-like de type 1), ce qui limite l'extension de la thrombose. Il a été noté une réduction d'activité et de quantité d'ADAMTS13 et une abondance de long multimères de vWF au cours du paludisme grave [63]. Son interaction avec les plaquettes

expliquerait de manière assez satisfaisante la thrombopénie, l'agrégation plaquettaire et la maladie microvasculaire (activation endothéliale) qui caractérise le paludisme [57, 64, 65].

#### **1.2.3.7 Thrombose et hypercoagulabilité**

Le facteur tissulaire, exprimé à la surface de la cellule endothéliale, activée par l'inflammation et la présence des hématies parasitées va recruter des facteurs de coagulation et activer la thrombine [64]. Celle-ci catalyse les dépôts de fibrine qui agrégée aux plaquettes circulantes va constituer un thrombus. Celui-ci bloque la lumière des petits vaisseaux et stoppe le flux sanguin. La thrombine active aussi une protéase (récepteur PAR) de la surface endothéliale qui couplée aux protéines G entraîne une rétraction du cytosquelette et l'expression de cytokines proinflammatoires et de molécules d'adhésion [66]. Les études autopsiques montrent des résultats contrastés en mettant parfois en évidence la présence de thrombis au sein des vaisseaux cérébraux de sujets décédés [65]. Cet état d'hypercoagulabilité peut s'accompagner de réels thrombis dans certaines circonstances (chez les malades les plus graves) en rapport avec une activation endothéliale délétère [57] mais probablement pas de manière systématique et ne résume pas la physiopathologie de l'accès grave.

La **figure 1-9** résume et schématise l'interaction des différents mécanismes et leurs conséquences sur la pathogénèse du paludisme grave.



**Figure 1-9.** Schéma simplifié des interactions entre les différents mécanismes et leurs conséquences qui interviennent dans la physiopathologie et la pathogénèse du paludisme grave. Pq : plaquettes. GRP : globule rouge parasité. GRNP : globule rouge non parasité. NO : oxyde nitrique.

### 1.2.3.8 Éléments discutés

Les éléments et mécanismes discutés ci-dessus font l'objet d'un consensus raisonnable auprès de la communauté médicale et scientifique. Deux éléments intervenants dans la physiopathologie pourraient être rajoutés : les microparticules et la toxicité directe des cytokines sur le tissu cérébral.

Les microparticules sont des vésicules microscopiques issues de la vésiculation de membranes cellulaires de différentes cellules. Elles dérivent ainsi des plaquettes, des leucocytes, des globules rouges, des cellules endothéliales. Elles expriment à leur surface des molécules d'adhésion propre à leur type cellulaire d'origine. Ces molécules facilitent l'attache de facteurs de coagulation renforçant la cascade signalisation-coagulation-inflammation. Le taux des microparticules dérivées de plaquettes, par exemple, a été positivement associé à la profondeur du coma et à la thrombopénie au cours du neuropaludisme [67]. La place des microparticules comme responsable de pathogénicité ou cofacteur dans la pathogénèse du paludisme grave reste à préciser.

Si des cytokines, en tant que messagers intercellulaires sont libérées en masse pendant ces phases d'inflammation et d'interaction cellulaire (hyper expression d'ICAM-1), la toxicité directe de celles-ci est moins claire. Le TNF, cytokine pyrogène, libéré suite à la libération des mérozoïtes, est surexprimé dans les zones de séquestration intense. Son taux varie de manière importante en rapport avec la rupture des schizontes. Au stade précoce de la maladie il pourrait avoir un rôle protecteur et un rôle délétère au stade tardif. Certains polymorphismes dans les gènes codant pour l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et l'interleukine 12 (IL-12) jouant sur la balance Th1 –Th2 de la réponse inflammatoire et anti inflammatoire seraient associés au neuropaludisme [68]. Bien que les taux des différentes cytokines puissent être élevés ou abaissés aucune cytokine n'a montré un rôle directement létal [69].

#### **1.2.3.9 « Le bon grain de l'ivraie »**

La plupart de ces éléments physiopathologiques ont été décrits sur des modèles murins d'infection plasmodiale. Cependant 3 éléments semblent avoir un réel impact en santé humaine. La séquestration, le métabolisme du NO et l'altération de la barrière hémato-encéphalique semblent être les pierres angulaires de l'expression clinique du paludisme grave. La variabilité phénotypique de la physiopathologie peut aussi s'expliquer par les éléments liés à l'hôte (terrain génétique de susceptibilité liée à des mutations dans les gènes codant pour la synthèse d'IL-4 par exemple [70]) ou certaines souches plasmodiales qui induisent un paludisme « différent », fonction de la régulation immunitaire dirigé contre lui (cf. infra) [71].

### **1.2.4 Effet de l'âge parasitaire sur l'expression clinique : nosologie chronologique et histopathologique**

#### **1.2.4.1 Évaluation de la charge parasitaire : corrélation à la gravité**

Il résulte de la séquestration, la quasi-absence de formes matures parasites (trophozoïtes, schizontes) dans le sang périphérique circulant des patients infectés par *P. falciparum*. De fait la parasitémie (nombre de globules rouges infectés rapporté aux globules rouges totaux sur du sang prélevé de patient, donc – par définition – périphérique) mesurée par les techniques classiques (frottis sanguin, goutte épaisse) est un mauvais reflet de la biomasse parasitaire totale [72] puisqu'elle ne met en évidence que la biomasse parasitaire circulante et non pas la biomasse séquestrée dans les petits vaisseaux [73]. L'impact de la séquestration sur le fonctionnement des organes est corrélé à l'importance et à la synchronisation en âge de cette biomasse parasitaire et de sa capacité à séquestrer [74]. Il est admis depuis les années 30 qu'il existe une relation forte entre une parasitémie élevée et la mortalité. Sur une série de 750 cas, colligés à Kuala Lumpur en 1937, le

seuil de 2% de parasitémie était associée à une mortalité de 7% et celle-ci atteignait 63% lorsque la parasitémie dépassait 10% [75]. La parasitémie donne une indication du nombre de parasites et de leurs hématies hôtes, susceptibles de cytoadhérer dans les 24 heures suivant le prélèvement, et fait partie des critères de gravité même si cette parasitémie ne représente que la partie (visible) de la population parasitaire totale. Une parasitémie élevée (>20%) est toujours considérée comme grave et ce, quel que soit le niveau de prémunition du malade considéré [76]. L'existence de cette synchronisation parasitaire et du moment de réalisation du frottis sanguin explique les observations cliniques connues de longues dates. Elles traduisent la grande variabilité de la relation entre la parasitémie et le pronostic. Certains patients à parasitémie élevée semblent tolérer de fortes charges parasitaires circulantes, parfois jusqu'à 50%, alors que d'autres sont retrouvés dans le coma avec une parasitémie de 0,1% [73]. La population parasitaire visualisée sur lame est caractérisée par sa jeunesse (anneaux, jeunes trophozoïtes) et de fait l'absence d'expression de molécules d'adhésion et de capacité immédiate à séquestrer. Dans un modèle parfaitement synchronisé de croissance parasitaire (moins de 4 heures de déviation standard de l'âge parasitaire des populations présentes chez un individu) le phénomène de séquestration surviendra au même moment compte tenu du fait que les parasites ont à peu près le même âge [73] (il est estimé le début de séquestration effective dans la microcirculation à 16-20h de maturation parasitaire [77]). Il en résulte la possibilité de voir dans le sang périphérique des parasitémies élevées constituées de populations parasitaires jeunes, n'ayant pas encore adhéré sans retentissement clinique majeur immédiat. La situation peut changer du tout au tout, quelques heures plus tard après maturation et séquestration progressive des globules rouges parasités. La parasitémie réalisée à partir de ce moment là, en conséquence, diminuera rapidement à mesure que la population parasitaire cytoadhère et disparaît du sang périphérique [74]. La gravité du paludisme est corrélée à la biomasse parasitaire mais aussi à la proportion de la biomasse séquestrée au moment du prélèvement donc au degré moyen de maturité de la population parasitaire totale [78].

L'« *Histidine Rich protein* » de type 2 (*PfHRP2*), une protéine produite par *P. falciparum*, stockée dans le cytoplasme et la vacuole nutritive du parasite, joue un rôle dans la polymérisation de l'hème en hémotoïne. Elle est libérée dans le plasma lors de la rupture des schizontes, essentiellement (89%). Soluble dans l'eau, son taux est corrélé à la biomasse parasitaire totale, et au contraire de la parasitémie, est étroitement corrélée à la gravité clinique et au risque de décès [78].

#### **1.2.4.2 Données histopathologiques corroboratives**

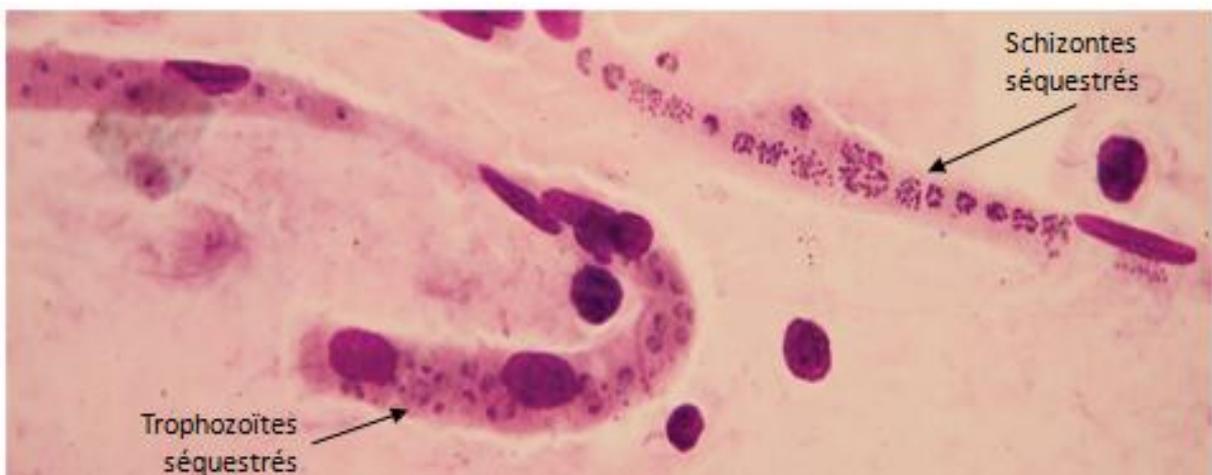
Les études histopathologiques réalisées sur des patients décédés ont confirmé l'intense séquestration des hématies parasitées dans les organes vitaux, particulièrement le cerveau, mais cette séquestration est très inégalement répartie entre les organes [69]. De plus au sein d'un même

organe certains vaisseaux peuvent être totalement obstrués (**Figure 1-10**) alors que d'autres ne le sont pas permettant le maintien du débit sanguin global au prix d'une vasodilatation importante du réseau non infecté.



**Figure 1-10.** Coupe de 3 vaisseaux sanguins de tissu cérébral post mortem. 1 : vaisseau où cytoadhère un schizonte. 2 : vaisseau obstrué par des schizontes à gauche, et des trophozoïtes matures à droite. 3 : vaisseau à la lumière libre (adapté de [69]).

Il a été montré que même dans des vaisseaux apparemment occlus, les globules rouges non infectés arrivent à franchir malgré tout les obstacles cellulaires constitués. Par ailleurs chez un patient donné, il existe une cytoadhésion de formes synchrones par vaisseaux pris un à un (âge identique) mais l'observation de plusieurs vaisseaux montre des stades parasitaires différents (**Figure 1-11**). Cela est expliqué par la stimulation asynchrones des molécules d'adhésion [34, 69].



**Figure 1-11.** Coupe de vaisseaux cérébraux post mortem. Deux populations parasitaires d'âge différent (schizontes et trophozoïtes) de *P. falciparum* séquestrés dans deux vaisseaux différents d'un même patient décédé (adapté de [69]).

En cas d'infection à *P. falciparum*, l'absence de mixité des âges parasitaires dans le sang périphérique suggère qu'une fois séquestrés, les globules rouges infectés ne peuvent plus passer de nouveau en circulation générale. La congestion microvasculaire vasculaire cérébrale est d'autant plus importante que le coma précédant la mort est profond et le décès rapide. Sur une série de 21 cas de décédés de neuropaludisme, le taux de séquestration vasculaire cérébral atteignait 85% contre 14% chez 23 contrôles décédés de paludisme non cérébral [52].

*In vivo*, l'évaluation des débits sanguins au sein de certains organes (cerveau, foie, rein) a montré que celui-ci était globalement conservé compte tenu de l'index cardiaque élevé et d'un plus faible contenu artériel en oxygène [79-82]. La mesure du taux de lactates sanguins, marqueur de glycolyse anaérobie est plus informatif car plus étroitement corrélé au degré de séquestration [83, 84]. Par contre des études évaluant la vitesse et la répartition du flot sanguin au sein même des microvaisseaux (rétine, rectum) chez les malades ont montré une hétérogénéité de cette microcirculation sanguine. L'obstruction est compensée par la vasodilatation des vaisseaux libres adjacents. De plus cette obstruction se lève à mesure que le patient guérit [84]. L'obstruction est un phénomène réversible si le patient survit. L'évaluation de la vitesse érythrocytaire dans un lit capillaire rectal a montré chez 43 patients atteints de paludisme grave, que des capillaires rectaux étaient bloqués chez 67% d'entre eux alors que les vaisseaux adjacents étaient le siège d'une accélération du débit capillaire (vitesse érythrocytaire > 750  $\mu\text{m/s}$ ) dans 93% des cas. Le degré d'obstruction capillaire est proportionnel à la sévérité [84, 85].

#### **1.2.4.3 Théorie de la séquestration et les chaînons manquants**

S'il apparaît évident que la séquestration globulaire est la pierre angulaire de la physiopathologie du paludisme grave, elle n'explique pas tout. Au-delà de l'ischémie il n'est pas clairement établi comment l'obstruction microvasculaire entraîne la dysfonction d'organe et la mort. La pathogénèse de la fuite capillaire, de l'œdème et des perturbations métaboliques demeure floue. Les autres atteintes d'organes potentiellement létales comme l'œdème pulmonaire, l'insuffisance rénale et l'anémie ne sont qu'en partie expliquée par l'obstruction microvasculaire [69]. A contrario la persistance de symptômes (coma persistant) et/ou la présence de séquelles (5 à 15 % chez l'enfant, 3% chez l'adulte atteints de neuropaludisme) malgré la disparition de toute séquestration est possiblement expliquée par la persistance d'une activation endothéliale liée à la présence de résidus membranaires et de pigment malarique associée à une atteinte de la signalisation axonale cérébrale et de la substance blanche (**Figure 1-12**) [9, 86, 87].



**Figure 1-12.** Vaisseau cérébral d'un patient décédé après plusieurs jours de traitement par quinine. La parasitémie périphérique était de 80/ $\mu$ L (adapté de [34]).

### 1.2.5 Mesures de contrôle de l'hôte à l'exception de la rate : facteurs génétiques et immunité (innée, acquise)

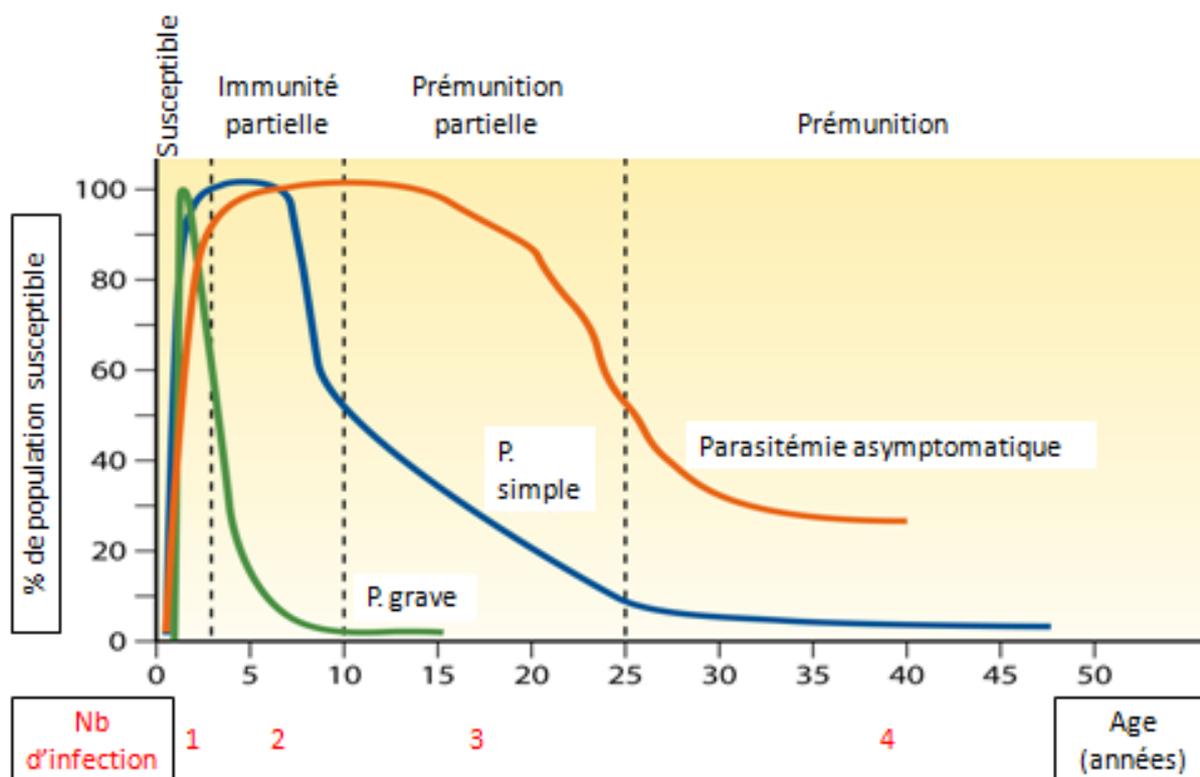
#### 1.2.5.1 Des facteurs génétiques de résistance à l'infection, à la maladie, à la maladie grave

Dans une perspective co-évolutive (l'Homme moderne et *Plasmodium* sp. seraient apparus il y a environ 100 000 ans), les mécanismes immuns de contrôle de l'infection chez l'Homme sont étroitement liés à l'évolution parasitaire [71]. Il est assez remarquable de noter que certaines maladies génétiques de l'hémoglobine (drépanocytoses), ovalocytose, hémoglobinose E, C ou des enzymopathies (déficit en G6PD) et la distribution du paludisme se recouvrent géographiquement. Il a été depuis longtemps supposé un avantage sélectif pour le parasite de sélectionner des génotypes humains compatibles avec sa multiplication et sa croissance sans effet péjoratif majeur (paludisme grave), qui coupe court à tout accroissement de population parasitaire. La drépanocytose à l'état homozygote (génotype HbSS) entraîne le décès dans les premières années de vie du patient en l'absence de traitement. A l'état hétérozygote, le portage du trait drépanocytaire (génotype HbAS) confère une résistance naturelle au paludisme grave. La prévalence du trait drépanocytaire se trouve

de fait maintenue dans les populations d'Afrique Subsaharienne à 10-20%, car elle confère un avantage sélectif réciproque aux populations atteintes et au parasite. Les mécanismes de protection contre le paludisme incluent une croissance parasitaire abaissée en cas de faible pression partielle en oxygène (HbAS), une diminution de cytoadhérence (HbAS, HbCC, HbAC), un taux d'invasion globulaire réduit (ovalocytose), une plus faible densité parasitaire (déficit en G6PD), une réduction de multiplication à de fortes densité parasitaire (HbAE) [88-90]. Autant de génotypes humains qui limitent la morbidité de l'infection palustre tout en pérennisant la circulation du parasite.

#### **1.2.5.2 Acquisition d'une protection naturelle : données observationnelles**

La qualité de la protection immune face à l'infection et son acquisition est fonction de l'exposition à la maladie. Dans les zones d'exposition pérenne et importante avec de forts EIR (Afrique Subsaharienne, Océanie) la morbidité et la mortalité dues à la maladie est importante durant l'enfance et décroît ensuite. Progressivement au cours du temps on note une disparition de survenue des accès graves, une moindre incidence des accès simples et une forte prévalence de parasitémie asymptomatique. L'immunité palustre, au contraire d'autres infections, virales ou bactériennes, n'est pas totalement immunisante. Elle s'acquiert à force d'infection répétées, d'abord contre le paludisme grave, puis les formes simples et enfin contre la parasitémie isolée (**Figure 1-13**) [91]. Schématiquement on parle de paludisme maladie et paludisme infection pour dissocier l'état de susceptibilité à la maladie clinique (grave ou simple) et à la parasitémie présente mais sans symptômes.



**Figure 1-13.** Graphique d'acquisition au cours du temps de la protection contre l'infection à *P. falciparum* en zone de haute transmission (adapté de [40, 92]). En pratique clinique, l'âge de 5 ans constitue un seuil important en termes de morbi-mortalité. P. : paludisme.

L'étude d'une population migrante naïve de tout contact antérieur avec le parasite vers une zone hyperendémique pour le paludisme (243 migrants partis de Java et arrivés en Papouasie suivis sur 33 mois), a montré que l'acquisition d'une immunité clinique (parasitémie sans fièvre) nécessitait 4 infections [92]. Dans les zones géographiques de faible transmission, erratique ou focale, aussi appelée zone de transmission instable, l'immunité protectrice ne peut se mettre en place. La maladie symptomatique, des formes graves aux formes simples peut survenir dans toutes les classes d'âge.

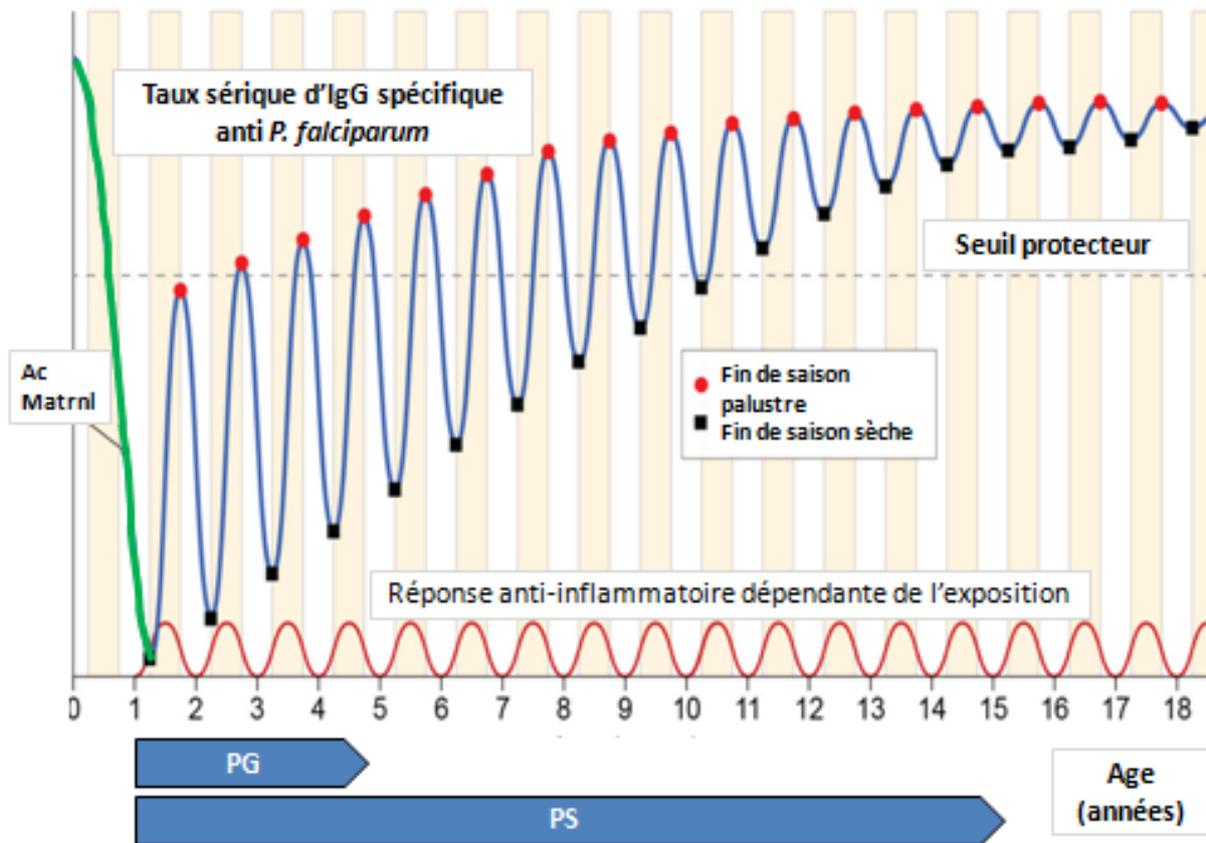
Une fois acquise la prémunition persiste probablement partiellement malgré l'absence de rappel naturel de la maladie (absence d'exposition itérative à la maladie). Une série de 252 malades nés en Afrique, immigrés en France depuis au moins 4 ans, ayant contracté leur infection lors d'un court séjour en Afrique Subsaharienne, a été comparée à 52 cas de paludisme survenant chez des touristes européens sans immunité préalable. Le niveau de parasitémie était significativement moins important dans le groupe migrant par rapport aux touristes européens (0,8% vs. 1,4%) et l'incidence des accès graves était de 4,4% vs. 15,2% respectivement [93]. Par ailleurs le groupe migrant

présentait de plus fort taux d'anticorps anti *P. falciparum* et une clairance parasitaire accélérée par rapport aux contrôles (55 heures et 63 heures respectivement).

### 1.2.5.3 Des éléments explicatifs de réponse immune innée et adaptative

La réponse immune qui se met en place intéresse les différents stades parasitaires. On parle d'immunité protectrice contre les stades cutanés, hépatiques, sanguins, et les formes sexuées du parasite. Pour la phase sanguine, phase principale d'accroissement populationnel pour le parasite, l'inflammation, sa régulation et la réponse anticorps sont les deux éléments des réponses immunes innées et adaptatives, qui concourent au contrôle de l'infection et de la maladie qu'elle entraîne. Les cellules de la réponse innée (NK, NKT,  $\gamma\delta$ T, mastocytes, neutrophiles) inhibent la croissance parasitaire, déclenchent la réponse inflammatoire et orientent la réponse immunitaire adaptative. Les cellules  $\gamma\delta$ T puis plus tardivement les cellules  $\alpha\beta$ T sont sources majeures d'IFN- $\gamma$ , entraînant une destruction des globules rouges infectés par activation des macrophages. Si l'IFN- $\gamma$  et le TNF ont aussi un rôle directement toxique pour la croissance parasitaire en contrôlant la synthèse de radicaux toxiques et de NO, leur synthèse en excès est associée au neuropaludisme et au décès (cf. supra). Compte tenu de l'aspect de l'acquisition de l'immunité anti palustre (**Figure 1-13**), il est cohérent de penser que cette immunité, lentement acquise au cours du temps, est une forme de tolérance progressive à l'inflammation causée par la présence parasitaire. Ces mécanismes immunorégulateurs et adaptatifs sont encore en grande partie incompris chez l'Homme [71].

La perfusion d'immunoglobulines purifiées (IgG) de patients immuns vis-à-vis du paludisme à des enfants malades de paludisme entraîne leur guérison rapidement (diminution de charge parasitaire et disparition de la fièvre) [94]. La constitution d'une immunité B spécifique et stérilisante est rendue difficile par la grande variabilité génétique et antigénique des protéines exprimées par *P. falciparum* [95]. Plus de 5000 protéines parasitaires vont être la cible des anticorps dont l'acquisition nécessite plusieurs infections. Il faut plusieurs années d'exposition au parasite afin de répondre à la diversité antigénique des protéines exprimées à la surface des globules rouges infectés, en particulier PfEMP1 [96]. Il s'agit de constituer un répertoire protecteur d'anticorps suffisamment large qui confère une protection vis à vis de l'infection (**Figure 1-14**). C'est le défi majeur de la vaccination, non encore définitivement relevé. La recherche se focalise actuellement sur des protéines hautement conservées chez le parasite essentielles à son développement, et en général faiblement immunogènes, comme par exemple la « *P. falciparum* reticulocyte-binding protein homologue 5 ».



**Figure 1-14.** Acquisition de l'immunité anti palustre anti *P. falciparum* en zone de transmission saisonnière. L'acquisition d'un taux d'IgG protecteur nécessite plusieurs saisons d'infection dans ce contexte de saison palustre (des pluies) et de saison sèche. La première année de vie est marquée par la protection anti palustre conférée par les anticorps maternels (adapté de [71]). Ac MatrnI : anticorps maternels. PG : Paludisme Grave. PS : paludisme simple.

L'immunité contre le paludisme grave implique probablement l'acquisition d'anticorps spécifiques de souches plasmodiales qui neutralisent des variants antigéniques particulièrement pathogènes (sous ensemble de *PfEMP1s* au potentiel très cytoadhérent). Il s'y associe l'induction de mécanismes régulateurs qui contrôlent la réaction inflammatoire excessive secondaire à la présence parasitaire (le phénomène de tolérance progressive). Ces deux phénomènes nécessitent de multiples expositions à *P. falciparum* pour être mis en place et maintenus dans le temps. Chez le petit enfant la réponse anticorps spécifique est de courte durée. Chaque année d'exposition entraîne un accroissement progressif de l'éventail de la réponse spécifique aux différents antigènes rencontrés et un accroissement des taux d'IgG spécifiques qui persisteront à terme, en l'absence de transmission (saison sèche, **Figure 1-14**). Ce taux ne conférera une réelle protection qu'après avoir dépassé un seuil critique (seuil protecteur).

## **1.2.6 Épidémiologie générale du paludisme, impact en santé humaine**

### **1.2.6.1 Épidémiologie mondiale du paludisme**

Le paludisme est la plus importante des maladies parasitaires au plan mondial, l'une des 3 priorités de santé publique pour l'OMS avec la tuberculose et le VIH/SIDA [2]. Maladie présente dans 108 pays, 3 milliards de personnes sont à risque de la contracter. En 2010 l'OMS fait état de 216 millions de cas responsables, selon les différents modes d'estimation, de 655000 à 1,2 millions de morts, soit environ 2000 morts par jour directement liés à la pathologie [2, 97]. Plus de 80% des cas surviennent en Afrique Subsaharienne. L'essentiel des décès sont observés en Afrique (90%) et touche principalement les enfants de moins de 5 ans dans 85% des cas. La principale espèce responsable de mortalité est *Plasmodium falciparum*. Le paludisme chez la femme enceinte, due à *P. falciparum* ou *P. vivax* entraîne des décès maternels, des avortements mais surtout en zone endémique des retards de croissance intra utérin et une mortalité infantile importante. Il est noté depuis une dizaine d'année une diminution appréciable du nombre de cas (diminution 17% depuis l'an 2000) et du nombre de morts (diminution de 26% de la mortalité spécifique). Cette réduction cache des disparités importantes puisque elle est le fait de 43 pays qui ont vu l'incidence de la maladie se réduire de 50%, alors qu'elle est quasiment inchangée pour le reste des pays concernés. Malgré tout plusieurs éléments concourent à cette amélioration : l'augmentation des fonds alloués à la lutte antipaludique (prévention, traitement préventif et curatif par thérapie comportant un dérivé d'artémisinine) - 2 milliards de dollars en 2011 - et un meilleur diagnostic de la maladie (utilisation des tests rapides-TDR) entraînant une baisse du nombre de cas rapportés (seuls les cas avérés par test rapide sont comptabilisés depuis 2000 ce qui n'étaient pas le cas auparavant). Cette amélioration ne doit pas faire perdre de vue l'apparition de résistance aux dérivés de l'artémisinine, les médicaments antipaludiques les plus puissants et les plus efficaces. Sont notées aussi des modifications comportementales vectorielles (modification du lieu de repas sanguin par le moustique) et humaines (destruction de la forêt primaire de Bornéo et apparition de cas de paludisme humain à *P. knowlesi*) qui peuvent obérer les progrès notés ces dernières années [98, 99].

### **1.2.6.2 Épidémiologie française du paludisme et du paludisme grave**

La France est le pays non endémique qui compte le plus grand nombre de cas de paludisme d'importation au monde. Elle rend compte de 20% des cas mondiaux de paludisme d'importation. Le Centre National de Référence (CNR), qui enregistre environ 50% des cas survenant sur le territoire, estime un nombre annuels de cas compris entre 3500 et 4800 entre 2006 et 2011. Pour 2013, ce nombre a été estimé à 4100, sans aucun cas autochtones (paludisme transfusionnel ou lié à d'autres espèces que *P. falciparum*). Une augmentation de 14% du nombre de cas par rapport à 2012, est notée [100]. Cette évolution se poursuit en 2014. La maladie est contractée en Afrique sub-

saharienne dans plus de 95% des cas et touche essentiellement les migrants nés en Afrique lors de la visite à la famille pendant les congés estivaux (80% des cas). Quatre-vingt huit pour cent des cas sont dus à *P. falciparum*.

Le réseau du CNR a enregistré 1606 cas de paludisme grave entre 2000 et 2011, soit 4,8 % du total des cas survenus. L'incidence du paludisme grave augmente depuis 10 ans et la mortalité annuelle par paludisme en France reste de 10 à 20 personnes. En cas de paludisme maladie, une visite initiale à un médecin de ville (plutôt qu'une consultation directe à l'hôpital), un délai diagnostique de 4 à 12 jours, un diagnostic effectué en automne ou en hiver, un âge élevé, être originaire d'une zone non-endémique, une infection contractée en Afrique de l'Est et une chimioprophylaxie inadaptée au regard du niveau de résistance du paludisme du pays visité, sont autant de facteurs de risque de paludisme grave [101-103]. Les quatre derniers paramètres de cette liste sont aussi associés à un risque accru de décès. A l'image de l'épidémiologie générale, les formes graves sont le fait de *P. falciparum* (98% en 2011), contracté en Afrique (98% en 2011). Les âges extrêmes (moins de 2 ans, plus de 60 ans) sont des facteurs de risque de forme grave. Certains critères de paludisme grave sont considérés de meilleur pronostic s'ils existent seuls chez le malade. Il s'agit de l'hyperparasitémie, de l'hypoglycémie, de l'anémie sévère, de l'ictère ou hyperbilirubinémie. Ils sont rares dans l'expérience française (2% en 2011 contre 6% en 2010). La parasitémie médiane des accès grave à *P. falciparum* est de 6 %. Moins de 10 % des patients atteints de paludisme grave ont une anémie marquée à l'admission (taux d'hémoglobine sérique < 8 g/dl).

### 1.2.7 Résumé du chapitre

Le paludisme grave, la forme la plus sévère de l'infection reste responsable chaque année d'environ 655000 à 1,2 millions de morts, essentiellement des enfants africains. Le coma, l'anémie et l'acidose sont les formes cliniques du paludisme grave se grevant de la plus lourde morbi-mortalité. La séquestration microvasculaire des érythrocytes infectés et non infectés, un déséquilibre du métabolisme du NO et l'altération de la barrière hémato-encéphalique semblent être les pierres angulaires de l'expression clinique du paludisme grave. Une relative protection contre le paludisme grave, puis contre le paludisme simple puis contre la simple infection s'acquiert au fil des années d'exposition à la maladie en zone d'endémie. Elle est appelée prémunition.

### 1.3 Le globule rouge au cours de l'infection à *P. falciparum*

Le globule rouge ou érythrocyte est la cellule hôte de *P. falciparum* où se produit la multiplication parasitaire la plus importante. Le stade érythrocytaire asexué est le seul associé à l'apparition de symptômes et de signes cliniques.

#### 1.3.1 Micro-anatomie et histoire naturelle

A l'homéostasie, l'érythrocyte est une cellule sans noyau de forme biconcave d'un diamètre de 5 à 7  $\mu\text{m}$ . Sa membrane est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle s'insère nombre de protéines reliées au cytosquelette sous-membranaire. Certaines de ces glycoprotéines et certains glycolipides expriment à la surface du globule des déterminants des groupes sanguins (glycophorines A et B du système MNS, ABO, Rh, Kell, Duffy, etc.). D'autres (par exemple la Bande 3) contribuent à déterminer la morphologie du globule et ses propriétés antiadhésives (par exemple l'acide sialique du glycocalix) ou d'échappement à l'opsonisation par le complément (CD35, « *Decay Accelerating Factor* »-CD55, CD59)<sup>A</sup>. Le cytosquelette est constitué de deux chaînes polypeptidiques de spectrine interagissant avec de la tropomyosine et de courts filaments d'actine. Les protéines ankyrine et bande 4.1 servent de points d'ancrages et de relais de fixation des protéines transmembranaires au cytosquelette. Ce cytosquelette confère à l'érythrocyte sa capacité à se déformer de manière majeure tout en conservant dans le temps sa forme biconcave lui permettant de franchir des obstacles anatomiques de diamètre très inférieur au sien (<2  $\mu\text{m}$ ).

##### 1.3.1.1 Sénescence, mort et naissance

La perte progressive de cette biconcavité et donc de déformabilité entraîne à terme une rétention splénique du globule rouge et une hémolyse extravasculaire. Cette augmentation de rigidité est corrélée à l'âge globulaire [104]. Les érythrocytes circulants accumulent des lésions oxydatives accompagnées de l'externalisation de phosphatidylsérine [105] et de modifications antigéniques de la bande 3 qui entraînent une phagocytose du globule rouge sénescant et recyclage de son hémoglobine [105-108]. A l'homéostasie, il disparaît chaque jour environ 1% de la masse globulaire totale qui est compensée par la production de 1% de nouveaux globules rouges [107].

---

<sup>A</sup> CD 35 et CD55 (DAF), CD59 : inhibiteurs physiologiques de l'activation du complément. Le CD 35 fixe le C3b en le dissociant du complexe convertasique. Le CD55 inhibe la C3 convertase (C4bC2a), qui normalement active la première étape de l'activation du complément. Le CD59 lie la fraction C8 du complément empêchant la constitution du Complexe d'Attaque Membranaire (C3b-C5bC6C7C8C9). Le déficit en CD59 et en DAF est responsable de « l'Hémoglobinurie Paroxystique nocturne » secondaire à l'activation du complément entraînant la lyse globulaire.

### **1.3.1.2 Production médullaire**

En cas de raccourcissement de la durée de vie des globules rouges la moelle va compenser la perte par un accroissement de production d'érythrocytes immatures : les réticulocytes. Cette production peut être augmentée jusqu'à un facteur 6 selon la demande. Si cette perte est plus importante (i.e. durée de vie des globules inférieure à  $1/6^{\text{ème}}$  de la durée de vie moyenne normale globulaire, soit moins de 20 jours), ce qui survient lors des hémolyses importantes (anémie hémolytique), la moelle ne peut compenser la perte et l'anémie sera déclarée cliniquement et biologiquement [108]. Si la moelle n'est pas à même de fonctionner correctement d'emblée (cf. infra) les conséquences de la perte seront d'autant plus flagrantes. A titre d'exemple, lors de l'infection à l'érythrovirus *Parvovirus B19*, les progéniteurs érythroïdes sont la cible de la réplication virale. Il s'ensuit une disparition de toute production médullaire érythroïde (réticulocytose) pendant 7 à 10 jours chez le sujet non immunodéprimé, avant une récupération progressive. La chute d'hémoglobine durant cette période est de l'ordre de 1 g/dl soit environ 7% pour un sujet doté de 13g/dl d'hémoglobine au début de l'infection virale [109].

### **1.3.1.3 Index de production réticulocytaire (RPI)**

L'index de production réticulocytaire évalue si la production de globules rouges (érythropoïèse sous la dépendance de l'érythropoïétine-EPO) est adaptée au niveau d'anémie. En cas de défaillance médullaire partielle la présence de réticulocytes (globule rouge contenant encore de l'ARN ribosomal cytoplasmique) dans le sang périphérique ne traduit pas forcément une réponse adaptée au niveau d'anémie (on parle alors d'insuffisance médullaire ou de régénération insuffisante). La maturation physiologique d'un réticulocyte dure 4 jours ; 3 jours dans la moelle (stade 0, I, II, III) et un jour dans le sang périphérique (stade IV) avant de devenir un jeune globule rouge débarrassé de tous résidus d'ARN. En cas d'anémie le passage plus rapide dans le sang des réticulocytes médullaires donne une fausse impression de production adaptée ; ce n'est pourtant pas la preuve d'une érythropoïèse adéquate. Un calcul permet, en tenant compte de l'hématocrite, abaissée en cas d'anémie, d'estimer grossièrement l'efficacité réelle de la production médullaire de remplacement [110-112]. Cet indice est fiable surtout en situation d'hémolyse stable, il est plus difficile à interpréter en contexte très dynamique où l'intensité de l'hémolyse fluctue d'un jour à l'autre.

### **1.3.2 Hémolyse intra et extravasculaire : une distinction difficile**

L'anémie hémolytique, quelle que soit sa cause, résulte de la destruction prématurée extravasculaire et/ou intravasculaire des globules rouges. L'hémolyse extravasculaire est aussi le devenir des globules rouges sénescents dont la déformabilité ou la surface sont altérées.

La destruction extravasculaire des érythrocytes, appelée « hémolyse extravasculaire », relève en fait d'une phagocytose d'érythrocytes entiers et seule la véritable lyse concerne le processus intravasculaire (destruction de la paroi érythrocytaire). L'usage et la pratique ont gommé cette distinction physiopathologique, résultant de travaux anciens menés avec des globules rouges marqués au Cr<sup>51</sup>. Par extension de langage l'hémolyse est dite extravasculaire et intravasculaire pour définir le lieu de la destruction qui relève en fait de processus différents. Cette définition oppose une destruction survenant dans un secteur circulant limité par un endothélium (vaisseaux, *stricto sensu* « intravasculaire »), d'un secteur circulant non limité par un endothélium, donc par définition « extravasculaire ». La pulpe rouge splénique, lieu préférentiel de phagocytose, est de fait un secteur circulant non vasculaire au sens histologique de la définition des vaisseaux (présence d'un endothélium). Elle est le cadre d'une destruction globulaire par phagocytose d'érythrocytes entiers, dénommé « hémolyse extravasculaire », par extension de langage. Nous garderons cette distinction consacrée par l'usage mais qui ne relève pas de la même physiopathologie en réalité.

En cas d'hémolyse intravasculaire, l'hémoglobine plasmatique est libérée dans le plasma par la destruction globulaire. L'haptoglobine (une alpha-globuline antioxydante qui limite la toxicité du fer de l'hémoglobine) lie les molécules de globines libérées, alors que l'hémopexine prend en charge les molécules d'hème. Leurs taux sont effondrés en cas d'hémolyse intravasculaire même modérée. Le complexe haptoglobine-globine est rapidement (quelques minutes) dégradé par le système monocyte-macrophage [113]. Lorsque la capacité de fixation par l'haptoglobine de l'hémoglobine libre plasmatique est dépassée, l'hémoglobine est filtrée par les reins. Si la fonction de réabsorption rénale tubulaire de l'hémoglobine est surpassée par l'importance de l'hémolyse, une hémoglobinurie survient [108]. L'hémolyse s'accompagne d'une augmentation de lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans le plasma par la destruction globulaire. C'est un marqueur non spécifique mais très évocateur d'hémolyse dans ce contexte.

L'hémolyse extravasculaire est secondaire à l'activation du système monocyte-macrophage et se produit essentiellement dans la rate. L'hémolyse extravasculaire est caractérisée par des modifications membranaires globulaires avec l'expression de phosphatidylsérine et de haut niveau d'annexine V (marqueur d'apoptose), de la diminution de CD35 et CD55 (DAF) permettant une sensibilisation à la phagocytose [105]. Il s'y associe la présence de marqueurs d'activation de la phagocytose par les monocytes-macrophages, comme l'augmentation de néoptérine ou la présence de pigments d'hémozoïne au sein des monocytes. L'étude de l'érythrophagocytose *ex vivo* des globules rouges en présence de monocytes autologues de patients permet de prouver l'origine extravasculaire d'une hémolyse [111]. Elle se traduit aussi selon la durée et son importance par

l'existence d'une splénomégalie plus ou moins importante [114]. En cas d'hémolyse extravasculaire importante, l'haptoglobine peut être aussi abaissée ou être indétectable [113].

En pratique clinique il est souvent difficile de définir le type d'hémolyse rencontrée (intravasculaire ou extravasculaire) et bien souvent les deux types d'hémolyses s'additionnent [111]. Ainsi une autre manière d'appréhender le problème est de considérer l'importance de l'hémolyse (réduction de la durée de vie des érythrocytes) plutôt que le lieu anatomique de celle-ci. Le **tableau 1-2** résume les perturbations biologiques rencontrées en fonction du type d'hémolyse (principaux marqueurs et mécanismes effecteurs de l'hémolyse extravasculaire et intravasculaire) et du niveau d'importance de l'hémolyse.

<u>Type d'hémolyse</u>	<b>Extravasculaire (iRBC ou uRBC sont phagocytés)</b>	<b>Intravasculaire (iRBC ou uRBC sont lysés)</b>
Marqueurs du processus	<i>Modifications érythrocytaires qui sensibilisent à la phagocytose :</i> Annexine V, Neoptérine ↗ CD35, CD55 ↘ <b>In vitro</b> phagocytose des uRBC Accumulation et phagocytose des iRBC et des uRBC dans la rate et la moelle	Haptoglobine et Hémopexine ↘ LDH et α-HBDH ↗
Mécanismes cellulaires suspectés (voir aussi <b>Chapitre 1.6</b> )	Rétention mécanique splénique des uRBC et des iRBC due à une diminution de déformabilité  Phagocytose et opsonisation des uRBC décorés par RSP-2/RAP-2, action du complément et faible expression de CD55, sensibilisation par anticorps  Stress oxydatif sur les uRBC et les iRBC	Rupture des schizontes séquestrés
<u>Importance de l'hémolyse</u>	<b>Hémolyse modérée</b> (durée de vie des GR de 20 à 40 jours)	<b>Hémolyse importante</b> (durée de vie des GR de 5 à 20 jours)
<b>Plasma ou sérum</b> Bilirubine Haptoglobine Hémoglobine libre LDH	↗, non conjuguée ↘, ou indosable ↗ ↗, variable	↗, non conjuguée indosable ↗↗ ↗↗, variable
<b>Urine</b> Bilirubine Hémosidérine Hémoglobine	0 0, + 0	0 + + (IVH)

**Tableau 1-2.** Mécanismes suspectés et évaluation semi-quantitative de marqueurs biologiques d'intérêts en fonction du type et de l'importance de l'hémolyse. L'hémoglobinurie qui traduit un dépassement des capacités de fixation et de réabsorption de l'hémoglobine libre plasmatique ne doit pas être confondue avec une hématurie. Celle-ci peut donner une fausse hémoglobinurie par lyse globulaire, dans les urines, des érythrocytes entiers qui libèrent de l'hémoglobine (adapté et tiré de [111, 113-128]). IVH : hémolyse intravasculaire.

### **1.3.3 Modifications globulaires lié à l'infection plasmodiale à *P. falciparum***

L'infection globulaire va entraîner des remaniements de la paroi globulaire et de son cytosquelette. Cependant les fonctions normales du globule vont être préservées longtemps en termes d'échange gazeux et de déformabilité. Elles sont essentielles à l'hôte et aussi au parasite pour sa croissance.

#### **1.3.3.1 L'invasion**

Certaines des protéines transmembranaires globulaires (glycophorines, basigine, bande 3) sont aussi des corécepteurs de l'infection plasmodiale et cible des adhésines et invasines mérozoitaires (cf. supra). Des mutations dans les gènes codants pour ces récepteurs globulaires membranaires entraînent une diminution de l'efficacité invasive du parasite et de fait impacte sur la multiplication parasitaire. Par exemple il existe dans certaines régions de Papouasie jusqu'à 30% du variant Gerbich de la glycophorine C, il existe de nombreux variants de la glycophorine A ou B au Brésil. En Mélanésie, l'ovalocytose héréditaire due à des mutations de la bande 3 d'une incidence de 10 à 30% réduit l'invasivité parasitaire par altération du récepteur membranaire mais aussi par augmentation de la rigidité globulaire [129].

#### **1.3.3.2 Évaluation de la déformabilité**

La déformabilité de l'érythrocyte dépend de 3 facteurs principaux : (i) la viscoélasticité membranaire, (ii) la viscosité cytoplasmique, et (iii) le ratio surface/volume (S/V) qui dépend de la géométrie cellulaire [130, 131].

Différentes techniques ont permis d'évaluer les modifications de viscoélasticité et de surface/volume au cours de l'infection plasmodiale. L'idée qui prévaut depuis plus de 20 ans est de reproduire la contrainte physique appliquée à l'érythrocyte lors de son passage dans les capillaires les plus fins (diamètre < 4  $\mu\text{m}$ ) et de mesurer les déformations subies par les globules infectés (à différents âges parasitaires) ou non.

La viscoélasticité membranaire (la résistance élastique membranaire à la déformation) peut être évaluée par micropipettes de diamètres variables (1,2 à 1,5 $\mu\text{m}$ ). Une dépression d'aspiration variable (P, mesurée en mm d'eau) appliquée sur une surface constante oblige le globule à se déformer pour entrer dans la lumière de la pipette. La régression linéaire de la longueur du fragment de membrane érythrocytaire aspiré dans la pipette (appelée « langue », L) est rapportée au gradient de pression appliqué (dl/dP). Le résultat peut être exprimé en microNewton/cm. Il est de l'ordre de 5 $\mu\text{N/cm}$  pour des globules rouges sains [132]. On peut y ajouter la mesure du temps de récupération de la forme antérieure du globule une fois la dépression stoppée. Le produit des deux donne une mesure de la viscosité de la membrane (incluant manteau, feuillet lipidique et cytosquelette) [131].

La variation du ratio  $S/V$  peut être aussi évaluée par micropipettes. Les globules rouges sont mis en présence de pipettes de diamètres de 2  $\mu\text{m}$  dotée d'une aspiration à pression constante de 2 cm d'eau. La mesure de la partie aspirée qui prend une forme cylindrique (longueur de la portion cylindrique) et la mesure du diamètre de la partie restante à l'extérieur qui prend une forme sphérique, permet de calculer le volume et la surface du globule rouge considéré. Alternativement, l'ensemble du globule rouge est aspiré dans le cylindre de la micropipette (de diamètre connu) et se transforme en un cylindre central limité par deux hémisphères. Les rayons du cylindre et des hémisphères ainsi que la longueur du cylindre étant connus, la surface et le volume peuvent être calculés [131].

Les limitations de ces outils, auxquels on pourrait rajouter les microcapillaires [133], sont la nécessité d'une préparation extemporanée des micropipettes - nécessitant une microforge coûteuse et un savoir-faire spécifique - et le faible nombre d'évènements analysables. Cette approche, quoique très informative est donc peu maniable et les conclusions peuvent manquer de robustesse statistique.

Il existe aussi une mesure globale de la déformabilité mesuré par l'index d'élongation (EI). Par suspension dans un cylindre rotatif contenant un liquide visqueux, l'ektacytomètre de type LORCA (Laser Optical Rotational Cell Analyser) soumet une population de globules rouges à des niveaux croissants de cisaillement exprimés en Pascal (Pa). La diffraction elliptique d'un faisceau laser projeté au travers de cette population globulaire sur un écran définit une silhouette moyenne à partir de laquelle est calculé l'EI. La contrainte de cisaillement progressivement appliquée va de 0,3 à 30 Pa. Un régime de pression de 1,5 Pa à 15 Pa correspondrait au régime de pression rencontré du côté artériolaire du réseau capillaire. Le régime de pression du côté des veinules post capillaires est de l'ordre de 0,1 à 0,5 Pa. Un régime de 30 Pa correspondraient au régime de pression et de contrainte mécanique rencontré au travers des fentes interendothéliales spléniques [134, 135]. C'est une évaluation globale qui ne permet pas de différencier les populations globulaires au sein d'un prélèvement sanguin mais apprécie la capacité d'élongation moyenne de la population globale considérée. Ces résultats sont robustes et informatifs au plan clinique (cf. infra).

Un outil plus récent comme l'Amnis\* (Imagestream Technology) combine les avantages de la cytométrie en flux et du microscope. Il détermine sur des milliers de cellules, rendant les résultats robustes, les dimensions (diamètre, périmètre, surface projetée) et la morphologie (circularité, sphéricité, compacité) de différentes populations globulaires au sein d'un même échantillon [136]. Son utilisation peut être combinée à un dispositif qui reproduit la contrainte mécanique splénique et physiologique appliquée aux globules rouges (microsphiltre, cf. infra).

Il a été récemment montré que la perte de surface globulaire s'accompagne généralement d'une « sphérisation » progressive du globule rouge associé à une diminution de l'EI [136] à l'instar du vieillissement naturel de l'érythrocyte [104].

### **1.3.3.3 Interaction membranaire et cytoplasmique : un impact rhéologique de l'infection**

L'intégration et la fixation de nombreuses protéines parasitaires dans la paroi globulaire au cours du cycle vont entraîner de larges modifications de conformation érythrocytaire impactant directement sur sa déformabilité. Le globule rouge parasité est le lieu d'un intense trafic intra-cytoplasmique. Plus de 400 protéines différentes vont être produites par le parasite en maturation. Nombre d'entre elles après avoir été libérées dans le cytoplasme vont interagir avec le cytosquelette globulaire et la membrane. Le globule rouge infecté devient progressivement sphérique et sa surface se ponctue de « *knobs* », ces granules électrodenses au nombre de 10 000 en moyenne qui interviennent dans la cytoadhérence ultérieure [129]. Les protéines du cytosquelette vont interagir avec les protéines parasitaires : la spectrine avec RESA (« *Ring infected Erythrocyte Surface Antigen* ») [137], PfEMP1, KAHRP (« *Knobs Associated Histidin Rich Protein* ») et PfEMP3, l'actine avec PfEMP1, KAHRP et PfEMP3, l'ankyrine avec KAHRP, la protéine 4.1 avec PfEMP1, PfEMP3, MESA (« *Mature parasite infected Erythrocyte Surface Antigen* ») et d'autres encore (Pf332 dont l'expression modulerait la rigidité membranaire, la capacité adhésive au CD36 et l'expression en surface de PfEMP1) [129, 130, 132, 138]. KAHRP semble avoir une action sur la membrane plus rigidifiante que PfEMP3, tous deux constituants importants du matériel de soutien des « *knobs* ». L'évaluation de viscoélasticité membranaire de souches plasmodiales délétées alternativement pour ces gènes a montré que KAHRP contribuait pour 51% de la rigidité globale du globule rouge infecté contre 15% pour PfEMP3 [138]. L'étude de déformabilité d'une population de globules rouges infectés par des formes annulaires (exprimant le RESA) montre une diminution du ratio S/V [131, 139]. Cependant l'existence d'un seuil de rétention tissulaire permet d'expliquer la persistance de la circulation d'au moins une partie de la population de formes annulaires. Ce seuil a été évalué à 17% de perte de surface globulaire [139].

Ces interactions multiples réduisent la déformabilité érythrocytaire. Cette réduction est proportionnelle à l'âge parasitaire. Plus le parasite est âgé (trophozoïtes, schizontes), plus les modifications liées aux interactions protéiques membranaires et la taille du parasite entraînent une diminution de déformabilité [130-133, 138]. Elle s'accompagne d'une légère augmentation de rigidité membranaire [131]. Dans un premier temps le ratio S/V diminue au cours de la perte de surface globulaire entraînant une sphérisation érythrocytaire.

Un mécanisme de compensation a été décrit au cours de la sphérocytose héréditaire (maladie hétérogène caractérisée par un déficit ou modification en spectrine, ankyrine, protéine 4.2, bande 3 qui entraîne une perte de surface globulaire), constituée d'une contraction volumique (par déshydratation globulaire), maintenant le ratio S/V constant, au moins au début [136].

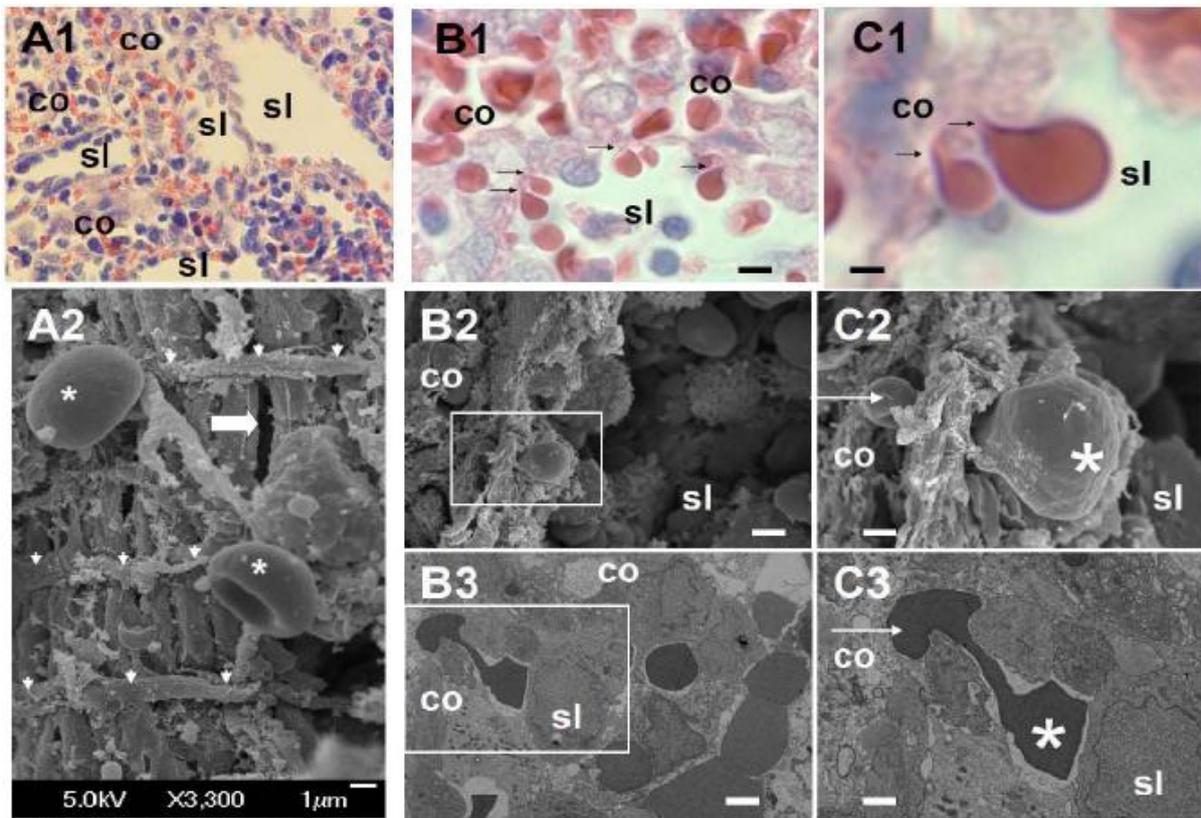
## **1.4 La rate au cours de l'infection à *P. falciparum***

### **1.4.1 Un rôle majeur**

De par ses fonctions immunologiques et ses capacités de filtration, la rate occupe un rôle central dans la physiopathologie de l'infection palustre et influence son déroulement. En témoigne la grande fréquence de la splénomégalie en zone d'endémie palustre [140], la survenue de ruptures spléniques pathologiques au cours ou au décours immédiat de l'infection [141] et surtout la gravité plus fréquente et plus marquée des premiers accès chez les patients splénectomisés [106]. Ses compétences peuvent être classées en deux fonctions complémentaires : la rate mécanique et ses compétences de filtration (rétention et « *pitting* ») et la rate immunologique, élément essentiel de la réponse immunologique innée et adaptative.

### **1.4.2 La rate mécanique : le filtre splénique, apprécie les compétences biomécaniques du globule rouge**

Un des rôles de la rate humaine est d'apprécier les capacités de déformation des globules rouges et d'épurer le sang des globules rouges altérés qu'il contient. Cette fonction est opérée par une structure micro-anatomique splénique unique et originale qui contrôle la déformabilité et le contenu des globules rouges : la fente interendothéliale (**Figure 1-15**). Celle-ci est responsable de la rétention (sélection ou « *culling* ») des globules rouges insuffisamment déformables et de l'épépinage (ou « *pitting* ») des résidus intra-érythrocytaires indéformables. Elles sont situées au niveau de la paroi sinusale, interface entre les cordons de Billroth et la circulation veineuse intra splénique (lumière des sinus veineux) de la pulpe rouge splénique.



**Figure 1-15.** Micro-anatomie de la fente interendothéliale (A2 Flèche blanche horizontale) que les globules rouges (\*) doivent traverser en se déformant B1-3, C1-3 lorsqu'ils circulent depuis les cordons de Billroth (co) jusqu'à la lumière sinusale (sl) dans la pulpe rouge splénique (A1) (Microscopie électronique à balayage (A2-C2) et à transmission B3-C3) de rates humaines) (tiré de [106, 125]).

#### 1.4.2.1 Rétention érythrocytaire

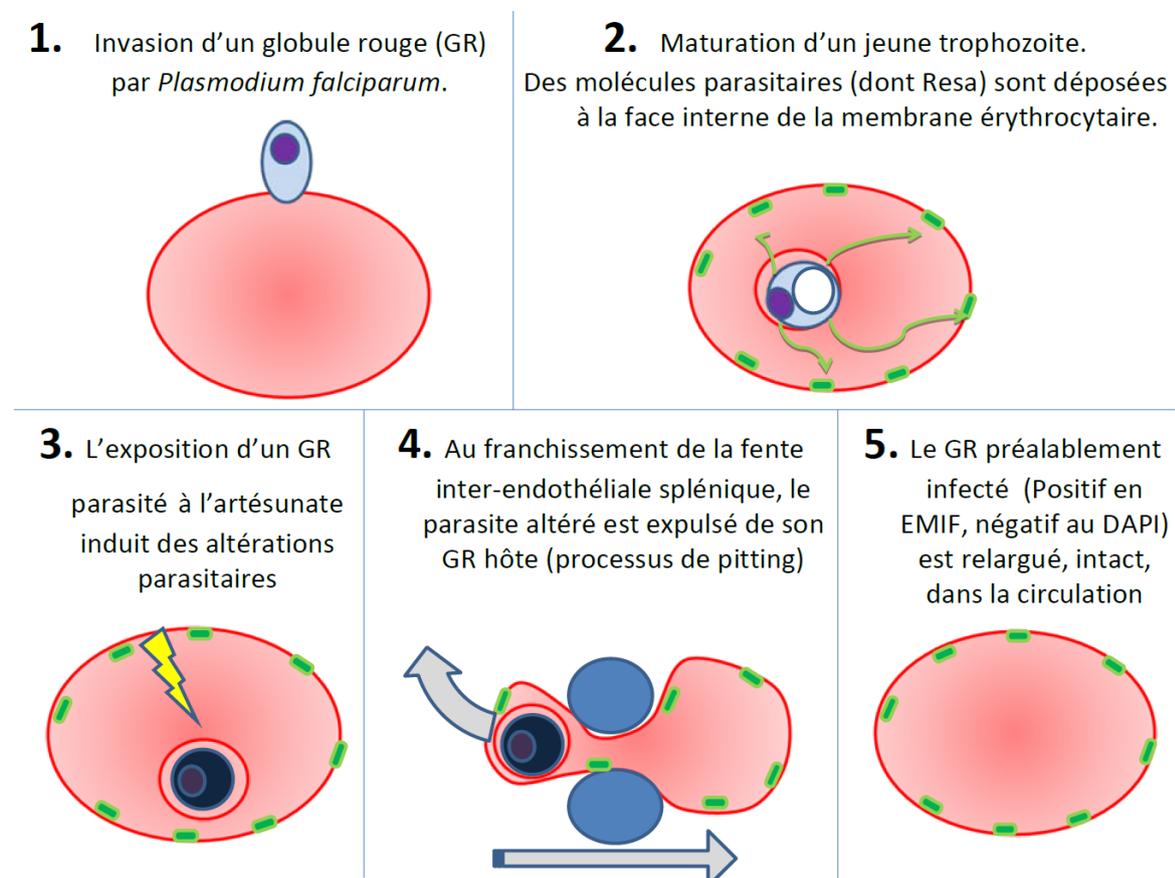
En théorie, avant que le globule rouge sénescé ou altéré ne puisse plus s'adapter aux contraintes de déformation imposées par le réseau capillaire (diamètre minimum 4-5  $\mu\text{m}$ ) il sera retenu en amont de la fente inter-endothéliale dont le diamètre est inférieur à 2  $\mu\text{m}$ . Cette fonction originale explique l'efficacité de la splénectomie dans le traitement de l'anémie au cours de certaines maladies héréditaires « rigidifiantes » du globule rouge (sphérocytose héréditaire). Après splénectomie, les globules rouges anormaux, trop rigides, ne sont plus retenus, et sont donc de nouveau présents dans la circulation d'où l'amélioration de l'anémie. En revanche, la circulation prolongée de globules rouges rigides est sans doute responsable d'une partie des complications chroniques observées chez les patients splénectomisés (thromboses, hypertension artérielle pulmonaire).

#### 1.4.2.2 Le pitting : un phénomène naturel original et unique

Cette fente est aussi à l'origine d'un processus original physiologique qui élimine du globule rouge les résidus nucléaires ou tout corps intra-érythrocytaire indéformable : le pitting [142]. A l'état

physiologique ce mécanisme de pitting est illustré par l'expulsion des résidus nucléaires érythroblastiques persistant parfois dans les réticulocytes [106]. En cas d'asplénie fonctionnelle ou anatomique, l'absence de pitting naturel des résidus nucléaires, est révélée par exemple par la présence de corps de Howell-Jolly et granulations de Pappenheimer<sup>B</sup> au sein du globule rouge, visible sur le frottis sanguin.

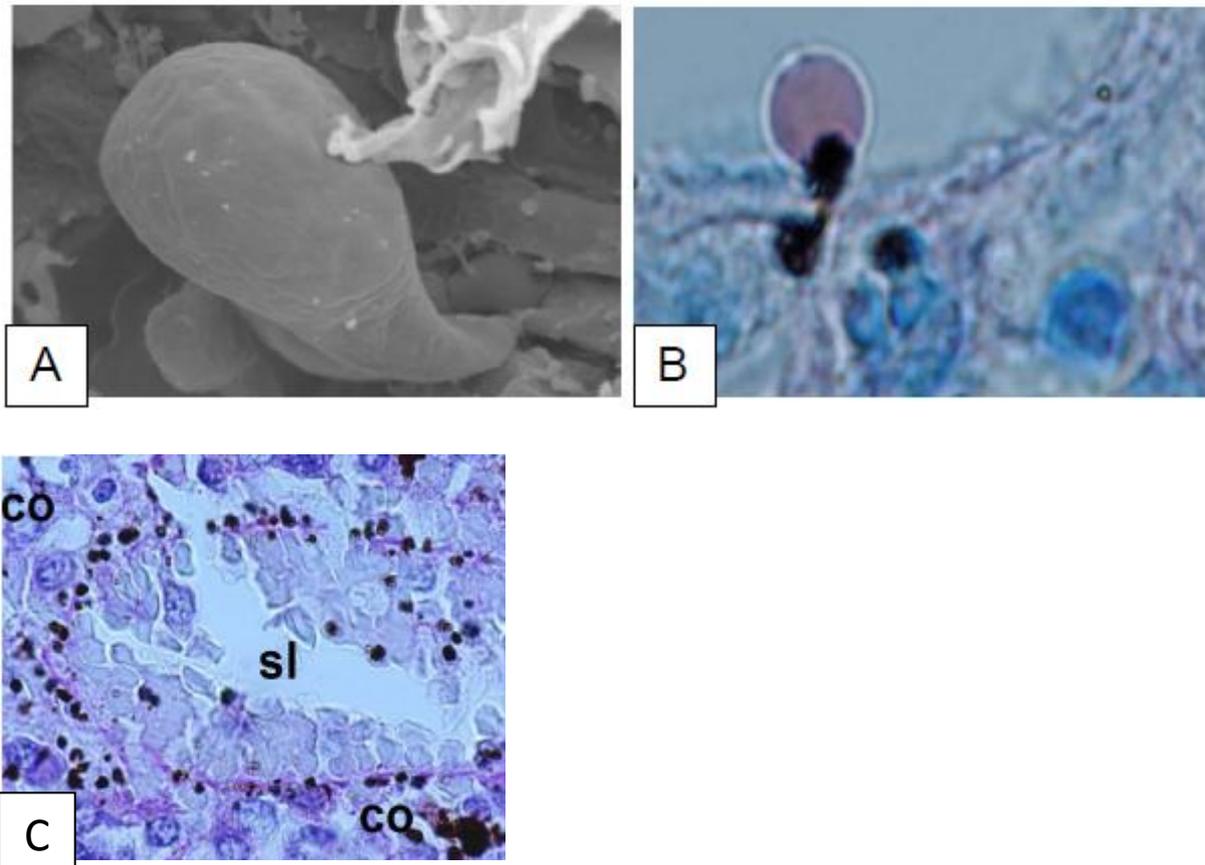
La rate joue aussi un rôle important dans la clairance parasitaire sous traitement antipaludique, particulièrement lorsque le traitement comporte un dérivé de l'artémisinine (artésunate, dihydroartémisinine-DHA) [143]. Lors du franchissement de la fente interendothéliale splénique, les corps figurés intra-érythrocytaires non déformables peuvent être expulsés du globule rouge sans que ce dernier soit lysé (**Figure 1-16**).



**Figure 1-16.** Représentation schématique du phénomène de pitting et de sa mise en évidence par utilisation de marqueur de protéine palustre RESA (*Pf155*) à la surface interne de la membrane globulaire. EMIF : Erythrocyte Membrane Immunofluorescence. DAPI : DiAmidino Phenyl Indole, marqueur d'ADN, ici parasite (figure de P. Buffet).

<sup>B</sup> Corps de Howell-Jolly : résidus d'ADN nucléaire d'érythroblaste ou de fragments de chromosomes isolés lors de la mitose, d'environ 1µm de diamètre situé à la périphérie de l'érythrocyte. Granulations de Pappenheimer : fins granules sombres riches en fer (coloration de Perls +) correspondant à des mitochondries anormales regroupées en amas de 2 à 5 éléments, elles sont plus petites que les corps de Howell-Jolly. L'érythrocyte riche en granulations de Pappenheimer s'appelle « sidérocyte ».

Les résidus parasitaires après traitement sont retenus par la rate (**Figure 1-17**). Ce phénomène naturel, amplifié dans le cas présent par le traitement anti infectieux, débarrasse le globule rouge parasité de son résidu parasitaire mort.



**Figure 1-17.** Illustration du processus de pitting. **(A)** Déformation d'un globule rouge lors de son passage dans une fente interendothéliale de la pulpe rouge splénique (microscopie électronique à balayage). La largeur d'une fente interendothéliale varie entre 0.2 et 2 $\mu$ m. **(B)** Processus de pitting. Résidu parasitaire en cours d'expulsion au moment où le globule rouge parasité (préalablement exposé aux dérivés de l'artémisinine) passe au travers d'une fente interendothéliale (coupe de rate humaine perfusée *ex vivo*, coloration au PAS, microscopie optique X 2000). **(C)** Couronne de résidus parasitaires après leur expulsion par pitting, restés bloqués par les fentes interendothéliales dans les cordons de la pulpe rouge (coupe de rate de patient décédé 4 heures après mise sous traitement par dérivés de l'artémisinine, coloration au PAS, microscopie optique X 400). A noter la rareté des résidus parasitaires dans la lumière du sinus illustrant le sens de la filtration : des cordons de Billroth (co) vers la lumière sinusale (sl). Dans un modèle de rate isolée-perfusée, la clairance des globules rouges parasités a eu une cinétique très proche de celle observée chez les patients traités par artésunate (tiré de [106, 123]).

Ainsi « déparasité » le globule rouge préservé par le phénomène de pitting est remis en circulation ; il devient « oiRBC » (« *once-infected red blood cell* »), terminologie que nous garderons par la suite [123, 144, 145]. Chez les patients splénectomisés traités par AS, la clairance des globules rouges parasités prend plusieurs jours à plusieurs semaines au lieu de quelques heures chez le patient à fonction splénique normale, confirmant le caractère spécifiquement splénique de ce phénomène [146].

### 1.4.3 La rate immunologique

#### 1.4.3.1 Un ganglion

La rate est aussi le plus gros organe lymphoïde du corps humain. Elle est constituée de diverses populations de cellules immunitaires intervenant dans la réponse immunitaire innée et adaptative. En cas de splénectomie ou d'asplénie fonctionnelle les patients sont à risque majeur d'infections fulminantes (OPSI pour *Overwhelming Post Splenectomy Sepsis* des Anglo-Saxons) à germes encapsulés (essentiellement *Streptococcus pneumoniae*), de babésiose, de certaines infections rares [147], et comme indiqué préalablement, de paludisme grave.

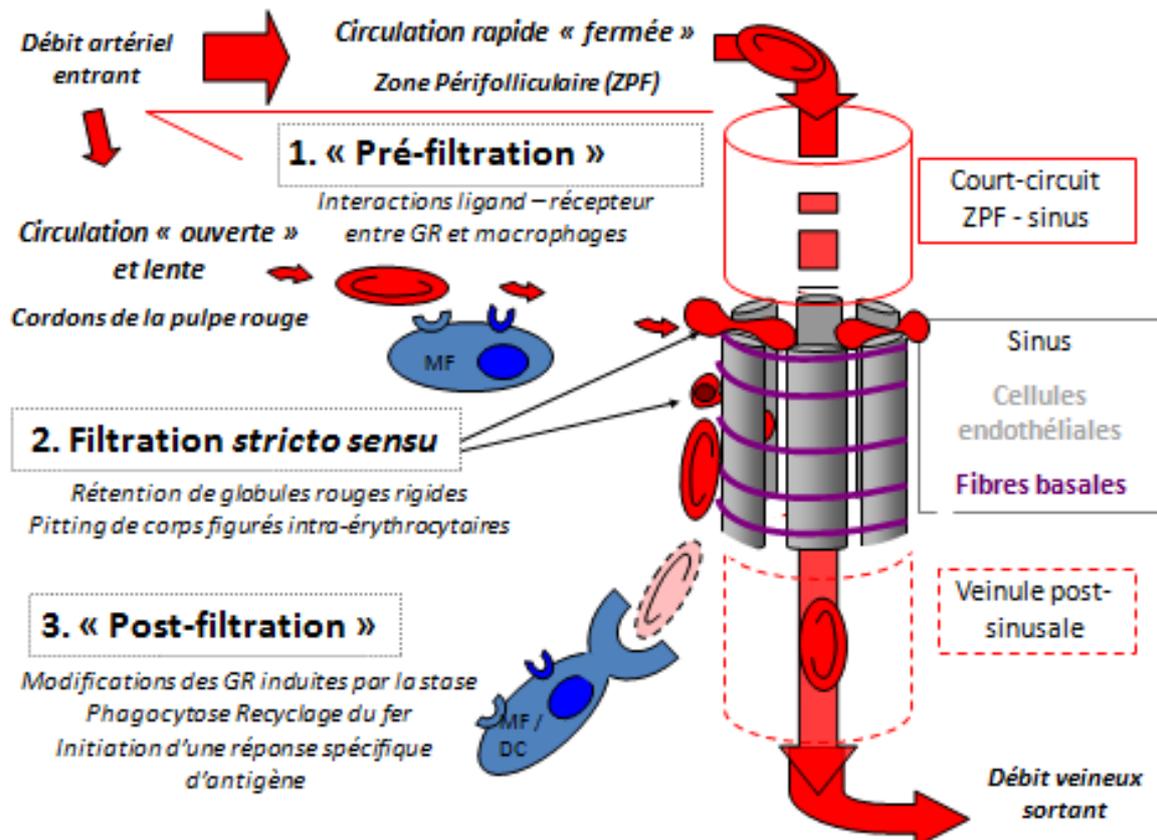
La pulpe rouge (cordons de Billroth) contient des plasmocytes et des macrophages qui occupent 50% de son volume. Les macrophages participent au stockage du fer (action anti bactérienne) et à son recyclage (érythropoïèse). Les plasmocytes sécrètent des anticorps spécifiques d'antigènes dans la circulation générale (réponse adaptative). La circulation sanguine y est lente permettant des interactions étroites entre les macrophages et les globules rouges. Lors de leur passage par la rate, les globules rouges entrent en contact étroit avec les macrophages de la pulpe rouge et sont alors phagocytés si leur surface est altérée ou opsonisée [148] (**Figure 1-18**). La pulpe rouge est aussi un lieu de stockage plaquettaire [149].

La pulpe blanche est constituée du lieu de zonage des lymphocytes T (gaine lymphatique péri-artérielle) et B (zone folliculaire) et de la zone marginale (lieu de phagocytose et de circulation lymphocytaire). Elle intervient dans la synthèse d'immunoglobulines spécifiques d'antigènes et dans la production d'opsonines au sens large.

#### 1.4.3.2 Intégration, modélisation et unité fonctionnelle : le splénon

Une approche intégrative des différentes fonctions de la pulpe rouge a permis de proposer un schéma fonctionnel [106]. Il résume, par analogie avec le néphron unité filtrante rénale, les différentes étapes franchies par le globule rouge (**Figure 1-18**). Celles-ci se décomposent en 3 parties : (i) la phase de préfiltration, (ii) la phase de filtration et (iii) la phase de post filtration. Les temps (i) et

(iii) sont des temps d'interactions entre les macrophages de la pulpe rouge et les globules rouges. Le temps (ii) et la phase de rétention/filtration proprement dite. Compte tenu de l'organisation du système vasculaire splénique (circulation lente-ouverte comptant pour 10% du débit et circulation rapide-fermée pour 90%) et que 5% du débit cardiaque part vers la rate, l'ensemble de la masse globulaire d'un individu passe par le splénon toutes les 2 à 3 heures [114].



**Figure 1-18.** Structure schématique et organisation de l'unité fonctionnelle filtrante splénique : le splénon (adapté de [106]). MF : macrophages. ZPF : zone périfolliculaire.

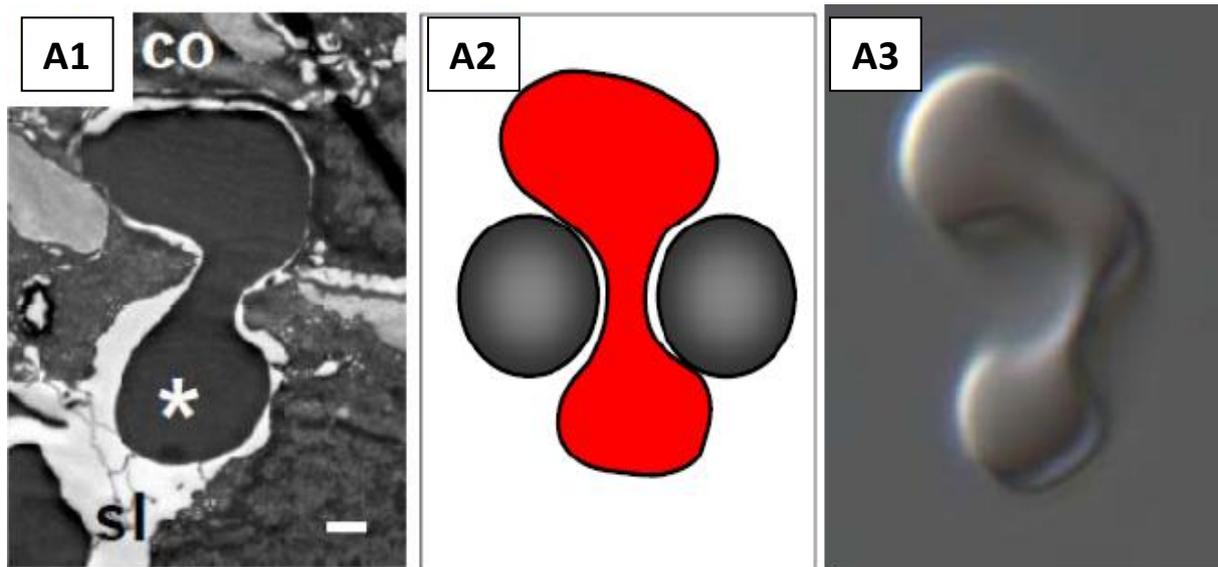
#### 1.4.4 Expériences et quantification *in vitro*, *ex vivo*

Certaines des phénomènes précédemment décrits ont pu être reproduits ou visualisés *in vitro* ou *in vivo*.

##### 1.4.4.1 Rétention mécanique des globules rouges *in vitro* : « microsphiltration »

L'équipe d'accueil a reproduit la rétention mécanique des globules rouges rigides dans un système de filtration *in vitro* qui mime la fente interendothéliale (Figure 1-19) [125]. Le « microsphiltrant » est un filtre constitué de microsphères métalliques de 5 à 25µm de diamètre qui reproduit la contrainte

mécanique splénique imposée au globule rouge quand celui-ci franchit la fente interendothéliale splénique. La « microsphiltration » reproduit *in vitro* la perception mécanique des globules rouges par la rate. Ce dispositif permet de déterminer les taux de rétention de globules rouges anormaux circulant dans le sang des patients, ou générés en culture. Ce système a été validé avec des globules rouges parasités par *P. falciparum* et avec des sphérocytes. Contrairement aux outils utilisés auparavant, la filtration au travers d'un filtre de microbilles peut quantifier séparément la rétention des globules rouges parasités et celle des globules rouges non parasités, permettant une analyse plus pertinente de la contribution de ces phénomènes à la sévérité générale de l'infection.



**Figure 1-19. (A1)** Déformation d'un globule rouge franchissant une fente interendothéliale splénique. CO : cordons de Billroth. SI : lumière du sinus. **(A2)** Déformation d'un globule rouge franchissant l'espace entre des microbilles. **(A3)** Un globule rouge fixé lors du passage entre des microbilles, confirme la grande similitude de déformation lors du phénomène naturel (A1) et de sa réplique expérimentale (A3) (tiré de [125]).

#### 1.4.4.2 Visualisation du pitting *ex vivo*

La microscopie à fluorescence conventionnelle et la cytométrie en flux des populations de globules rouges parasités et non parasités prélevés chez les patients atteints de paludisme permet de visualiser les différentes phases du pitting. La protéine RESA est exprimée très tôt au cours du stade érythrocytaire puisque déjà présente au sein des granules denses mérozoitaires [26]. Elle s'insère sur le réseau de spectrine de la face interne de la membrane érythrocytaire dès les premières minutes après l'invasion [137]. C'est une empreinte de l'infection parasitaire. En cas de pitting, alors que le parasite a disparu, le RESA persiste et peut être visualisé par immunofluorescence (**Figure 1-20**). Ainsi dans un prélèvement sanguin de patient il est possible de quantifier les globules rouges parasités (iRBC), les globules rouges pittés (oiRBC) et les globules non infectés (uRBC) en utilisant des

marqueurs d'ADN parasite et de RESA [145, 146]. Le phénomène peut être visualisé au microscope et quantifié au cytomètre en flux.



**Figure 1-20.** Un globule rouge parasité (flèche verticale) et un globule rouge « déparasité-oiRBC » (flèche horizontale) observés en immunofluorescence type EMIF visualisant des antigènes parasitaires sous-membranaires (RESA en vert). Le marqueur de l'ADN (ici DAPI) révèle le noyau parasite (bleu) dans le globule rouge parasité, et son absence dans le globule rouge « déparasité » ou « pité ». Cette méthode a montré le rôle dominant du « pitting » dans la clairance parasitaire sous artésunate [145, 146].

#### 1.4.5 La rate mécanique : une régulation innée de l'infection plasmodiale

La maturation du parasite entraîne une rigidification progressive de son globule rouge hôte. En explorant le devenir des globules rouges parasités dans un modèle de rate humaine isolée-perfusée [123], l'équipe d'accueil a montré que la perception subtile de la déformabilité érythrocytaire par la rate a un impact important sur la pathogénie de l'infection à *P. falciparum*. Dans ce modèle expérimental, une proportion des globules rouges parasités (stade annulaire) a été retenue par la rate selon un processus mécanique [114]. Cette capacité innée de la rate à retenir une partie des globules rouges parasités circulants constitue une modalité originale de contrôle de la charge parasitaire. Une rétention splénique importante de globules rouges rigides ralentirait l'augmentation de la charge parasitaire - du fait de la rétention d'une proportion importante des globules rouges parasités circulants à chaque cycle - mais augmenterait parallèlement le risque d'anémie du fait même de cette rétention d'une proportion élevée de globules rouges (parasités et non parasités). A l'inverse, une rétention faible des globules rouges rigides serait associée à une augmentation rapide

de la charge parasitaire donc à un fort risque de neuropaludisme, et à un faible risque d'anémie [39, 106, 114]. La grande fréquence de la splénomégalie en cas d'anémie palustre grave, et sa rareté en cas de neuropaludisme est en accord avec cette hypothèse [39]. De plus, cette nouvelle vision de la pathogénie du paludisme grave est cohérente avec la rigidité augmentée des globules rouges circulants chez les patients atteints de neuropaludisme ; une faible rétention des globules rouges rigides entraîne *de facto* une rigidité importante de la population de globules rouges circulants [53]. Par ailleurs l'âge du patient est un déterminant majeur de la gravité d'un premier accès [48, 102], possiblement par variation de la perception splénique de la déformabilité érythrocytaire liée à l'âge [39, 106]. La perception mécanique est très probablement un déterminant important de la circulation des gamétocytes matures et donc de la transmission de *P. falciparum* [37]. L'expression de la famille multigénique *stevor* est associée à ces modifications phénotypiques [37, 150].

Face à l'infection, les capacités de réponse filtrante et immune splénique, accélérant l'élimination des globules rouges parasités et non parasités augmentent chez le malade au moins dans un premier temps [106, 151]. Elle se traduit par l'apparition d'une splénomégalie. Cependant lors d'un accès palustre des parasitémiennes supérieures à 5% ne sont pas rares. Indépendamment des capacités de multiplication de la biomasse et de la synchronisation populationnelle parasitaire, ce fait illustre la saturation potentielle du phénomène de rétention splénique. Une charge parasitaire importante est susceptible de dépasser les capacités de filtration de la pulpe rouge. A l'homéostasie le processus d'élimination des globules rouges sénescents (1% par jour représentant une biomasse totale de 20 ml/j) occupera en volume, 20% de la pulpe rouge. Une biomasse parasitaire supérieure à ce seuil pourrait dépasser la capacité volumique de la pulpe rouge et sa capacité de filtration. On peut penser que cette congestion progressive et l'augmentation de pression secondaire modifie le régime circulatoire intra splénique au profit de la circulation rapide entraînant une diminution globale de rétention et de contrôle parasitaire. Ces mécanismes jouent sur la survenue d'une splénomégalie et l'issue de l'accès palustre en général [114].

#### 1.4.6 Résumé du chapitre

D'un point de vue fonctionnel la rate peut être considérée comme la fusion de deux organes : la rate mécanique et ses compétences de filtration (rétention et « *pitting* ») et la rate immunologique, élément essentiel de la réponse immunologique innée et adaptative. La fente interendothéliale (diamètre < 2  $\mu\text{m}$ ) est une structure micro-anatomique splénique unique et originale qui contrôle la déformabilité et le contenu des globules rouges. Celle-ci est responsable de la rétention des globules rouges insuffisamment déformables et de l'épépinage (ou « *pitting* ») des résidus intra-érythrocytaires indéformables, comme les résidus parasitaires lors du traitement par artésunate. Le *pitting* entraîne une expulsion des corps figurés intra-érythrocytaires non déformables sans que l'érythrocyte ne soit lysé. Des outils récents développés par l'équipe d'accueil permettent de suivre et de mimer *in vitro* et *ex vivo* ces phénomènes de rétention et, dans une moindre mesure, de *pitting*. La présence de globules rouges rigides (parasités ou non) en circulation est un marqueur fiable de rétention splénique mais aussi un mécanisme probable de détérioration du tableau clinique lors du paludisme grave. En effet, la circulation plus difficile de globules rouges rigides peut aggraver l'ischémie tissulaire déclenchée par la séquestration des globules rouges parasités dans les petits vaisseaux [54, 116]. A contrario la réduction de déformabilité des érythrocytes et leur rétention splénique sont des éléments déterminant du risque d'anémie au cours du paludisme grave.

## 1.5 L'Artésunate (AS) et le paludisme grave

### 1.5.1 De la quinine à l'AS : historique et pharmacodynamique de l'AS

Utilisée par les européens depuis 1630 la quinine était encore très récemment le traitement de référence du paludisme grave en France [41]. Elle est administrée par voie intraveineuse afin d'éviter les complications liées à une utilisation intramusculaire (douleur, abcès et lésions du nerf sciatique). Le neuropaludisme, complication la plus grave de l'infection à *P. falciparum*, est associé en zone endémique à une mortalité de 15-20%, s'élevant à 30% en cas de défaillance multiviscérale. Ces complications sont fortement corrélées à la présence d'une charge parasitaire corporelle totale élevée [46]. En France, en dépit d'une qualité de recours sanitaire élevée, la mortalité reste d'environ 10% [152]. L'état de choc, l'acidose métabolique, le coma et une coagulopathie sont associés à une surmortalité [45, 153]. Par ailleurs la quinine est pro-arythmique et peut s'accompagner d'hypoglycémie réfractaire dans 6 à 8% des cas chez l'adulte atteint de paludisme grave [154, 155]. La vitesse de clairance parasitaire - facteur pronostic important - est assez lente sous quinine, de l'ordre de 10 à 1000 par cycle (48 heures) [156].

Au cours des années 70, le professeur Tu Youyou a isolé de la plante *Artemisia annua*, une gamme d'alcaloïdes nommés quinghaosu (principe actif du quinghao), aux propriétés antipaludiques [47, 157]. En Chine, le « quinghao » est connu pour ses vertus antipyrétiques depuis plus de 1500 ans. Les dérivés de l'artémisinine ont pour structure chimique commune une sesquiterpène lactone avec un pont endopéroxyde. Par interaction avec le fer organique Fe<sup>2+</sup>, ce pont est clivé et libère des radicaux libres aux propriétés toxiques directes sur le parasite en développement et sur sa vacuole nutritive (inhibition des pompes calcium ATPase parasitaires) [4, 158]. Contrairement à la plupart des antipaludiques conventionnels (quinine, méfloquine, pyriméthamine), les dérivés de l'artémisinine (dihydroartémisinine [DHA] ou arténimol, artémether, artéether, artésunate [acide artésunique], artélate, artémotil) ont une action sur presque tous les parasites intra-érythrocytaires, des stades asexués précoces (stade annulaire) aux stades tardifs (vieux trophozoïtes et schizontes responsables de la cytoadhérence) et aux formes sexuées (gamétocytes) immatures. Cette classe réduit la parasitémie d'un facteur 10 000 à chaque cycle parasitaire [159]. L'activité sur les stades annulaires circulants empêche ainsi leur développement (parasitocidie rapide et puissante) et inhibe en quelques heures les phénomènes de séquestration (*rosetting* et cytoadhésion). Dans une étude menée chez 17 patients atteints de formes graves et 46 patients atteints de formes non compliquées *in vitro* et *in vivo*, l'AS a réduit de plus de 50 % la cytoadhérence et le *rosetting* après 2 heures d'utilisation. Dans les mêmes conditions, la quinine n'a eu aucune action sur la cytoadhérence alors que le *rosetting* était réduit de 50 % après 4 heures d'incubation [160].

L'effet thérapeutique semble être le fait d'un effet « pic » ( $C_{max}$ ) plutôt que lié à l'aire sous courbe (AUC) ; l'effet antiparasitaire dépend de la dose [161].

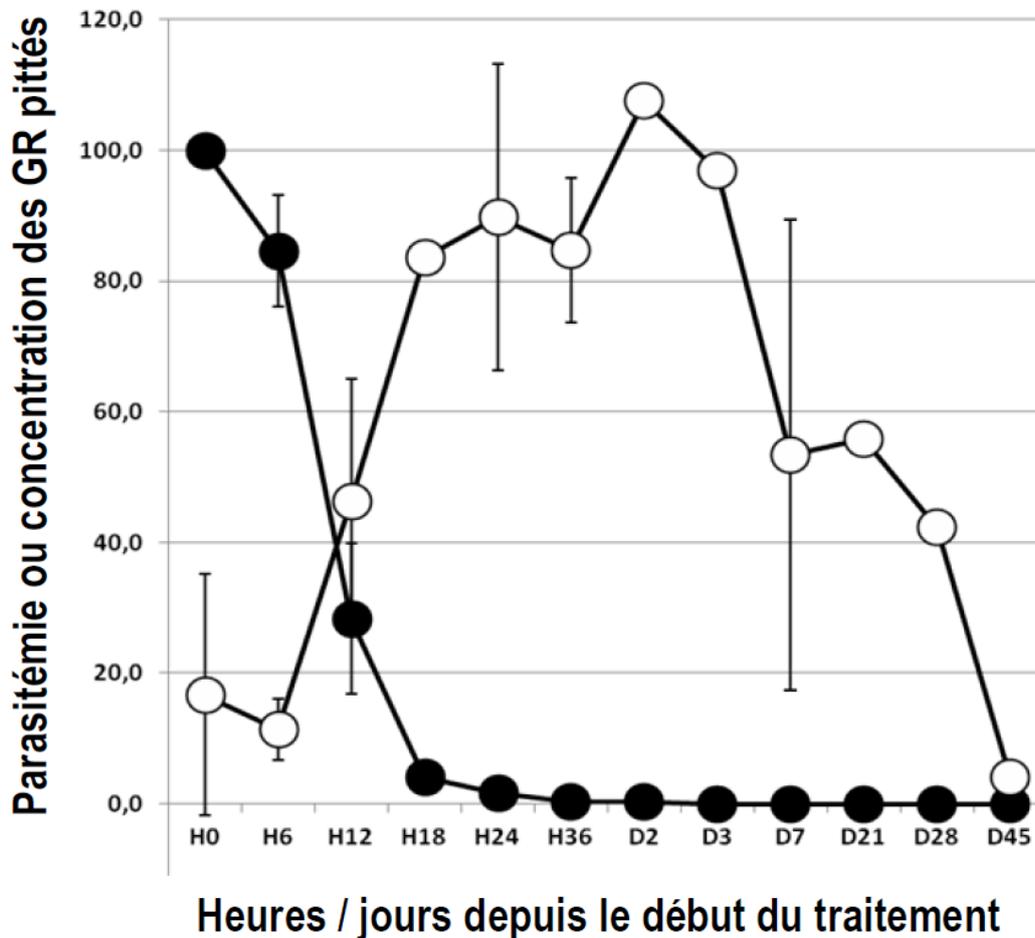
### 1.5.2 Pharmacocinétique de l'AS

L'AS est essentiellement administré par voie orale et intraveineuse mais les voies intramusculaire et intra-rectale peuvent également être utilisées. L'AS est transformé (hydrolyse) en dihydroartémisinine (DHA), métabolite actif contribuant à l'activité antipaludique, principalement par une estérase mais également via le cytochrome P450 2A6 [162]. La DHA est métabolisée par glucuroconjugaison via les UDP-glucuronosyltransférases (UGTs) 1A9 et 2B7 puis excrétée par voie biliaire. La demi-vie d'élimination de l'AS est en moyenne de 15 à 45 minutes selon les études et celle de la DHA de 30 à 100 minutes [161, 163, 164].

La biodisponibilité de la DHA après administration orale d'AS est supérieure à 80 % chez des adultes sains ou impaludés [164]. Après administration intraveineuse rapide d'AS, le pic de DHA survient en 25 minutes en moyenne. Après administration orale, les concentrations plasmatiques d'AS sont détectables environ 15 minutes après la prise et le pic est observé dans la première heure suivant la prise, témoignant d'une absorption rapide. Le pic de DHA est observé dans les deux heures suivant la prise d'AS. L'aire sous la courbe de la DHA, traduisant l'exposition systémique, est largement supérieure à celle de l'AS mais le pic est souvent inférieur. L'exposition systémique à l'AS et à la DHA est proportionnelle à la dose d'AS administrée (pharmacocinétique linéaire). L'AS et la DHA ne sont pas très fortement liés aux protéines plasmatiques (environ 80 %). Leur volume de distribution après administration intraveineuse est faible (< 1 l/kg).

### 1.5.3 Le « pitting » et le paludisme sous AS : une spécificité

La clairance parasitaire est beaucoup plus rapide sous dérivés de l'artémisinine que sous quinine [145, 165]. Le pitting explique cette rapidité (cf. supra). Le globule ainsi « nettoyé » est remis en circulation générale sans hémolyse immédiate. Le traitement par les dérivés de l'artémisinine induit donc une inhibition rapide de la cytoadhérence, accompagnée d'une baisse de la parasitémie, sans destruction (au moins à court terme) des globules rouges [144]. Le pitting est observé en l'absence de traitement mais à un taux généralement faible (<5%). Il existe aussi sous quinine mais à des taux significativement moindres que sous artésunate. Un travail préliminaire de l'unité mené sur les premiers patients traités par AS en France a montré que, à mesure que la clairance parasitaire se produit, les globules rouges parasités sont remplacés par des globules rouges « déparasités » ou « pittés » (Figure 1-21).



**Figure 1-21.** Évolution de la parasitémie (cercles noirs) et de la concentration de globules rouges pittés (cercles blancs) après mise en route du traitement par AS intraveineux chez les premiers patients français bénéficiant de ce traitement. Chaque point représente la moyenne (écart type) pour 5 patients. Les observations ont été effectuées par une nouvelle technique de cytométrie en flux (Ndour, Jauréguiberry *et al.* communications).

#### 1.5.4 Données d'efficacité : études comparatives en population humaine

Depuis leur redécouverte le quingaoshu et ses dérivés synthétiques se sont imposés comme le traitement de première intention du paludisme simple (thérapies combinées à base d'artémisinine) et du paludisme grave (monothérapie initiale). L'artemether, évalué initialement, n'a pas montré de réelle supériorité par rapport à la quinine [166], très probablement du fait d'une biodisponibilité médiocre et erratique liée à son administration intra-musculaire [167]. Chez le volontaire sain les concentrations de DHA obtenue par injection intramusculaire sont variables et inférieures aux concentrations obtenues par la prise orale d'artemether [168]. La biodisponibilité mesurée chez 8 sujets sains sur une période de 6 heures (AUC) par chromatographie après intramusculaire est de 75% inférieure à la biodisponibilité *per os* avec une biodisponibilité comparée intramusculaire de

25% (IC95% [9%-41%]). Par ailleurs l'effet cellulaire sur les formes parasitaires et sur la cytoadhérence bien que supérieure à la quinine s'avère moins efficace que celle de l'AS [160].

En revanche, l'AS intraveineux (IV) est plus efficace que la quinine IV dans le traitement du paludisme grave de l'adulte et de l'enfant africain [46, 169]. L'étude SEAQUAMAT [46], prospective et randomisée a comparé l'AS IV à la quinine IV chez 1461 patients souffrant de paludisme grave en Asie. L'artésunate a permis une réduction absolue de mortalité de 34,7% (IC95% [18,5 – 47,6%] ;  $p=0,0002$ ), soit une mortalité dans le groupe Artésunate de 15% contre 22% dans le groupe Quinine. La différence était encore plus marquée chez les patients hyperparasitémiqes (>10%) à l'admission avec une mortalité dans le groupe AS de 23% contre 53% dans le groupe quinine ( $p=0,0001$ ). Il y a eu moins d'hypoglycémie sous artésunate que sous quinine (risque relatif de 3,2 ; IC95% [1,3 – 7,8] ;  $p=0,009$ ). Une méta-analyse portant sur 1938 patients inclus dans 6 études a confirmé la réduction plus marquée du risque de décès sous artésunate que sous quinine (risque relatif de 0,62 ; IC95% [0,51 – 0,75]), ainsi que le raccourcissement du temps de clairance parasitaire, et la fréquence moindre d'hypoglycémie (risque relatif à 0,46 ; IC95% [0,25 – 0,87]) [170]. Toutes ces données ont été confirmées par une étude pédiatrique multicentrique africaine récente ayant inclus plus de 5000 patients par groupe [169]. Par son mode d'action original l'AS prévient la séquestration et les manifestations du paludisme grave ce que ne fait pas la quinine [160]. Dans le contexte du paludisme d'importation, la première série publiée date de 2008, 9 patients adultes ont été traités par artésunate IV en Norvège. Tous ont survécu, sans séquelles et sans effets secondaires [171].

L'AS est, depuis 2010, recommandé par l'OMS au plan mondial comme traitement de l'accès palustre grave [47].

### **1.5.5 Tolérance du médicament, études animales et humaines**

#### **1.5.5.1 Manifestations générales**

Le profil de tolérance est globalement bon. Dans une méta-analyse sur les dérivés de l'artémisinine regroupant 108 essais (9241 patients), les effets secondaires les plus fréquemment répertoriés ont été des troubles digestifs, une neutropénie dans 1,3 % des cas, une réticulocytopenie (0,6%), une altération du bilan hépatique (1,1%) [4, 172, 173]. L'incidence estimée d'une réaction allergique de type urticaire et plus sévère de type angio-oedème de Quincke est de l'ordre de 1 sur 3000 [165, 174, 175]. Des effets secondaires variés, mais rares, sont rapportés au moment de l'injection : vertiges, nausées, vomissements, anorexie, goût métallique.

#### **1.5.5.2 Neurotoxicité**

Les dérivés de l'artémisinine (artéether, artémether) à fortes doses (12,5 à 50 mg/kg/jour sur 28 jours) induisent des lésions cérébrales irréversibles chez le rongeur [176]. Un risque de surdité transitoire a été rapporté chez 50 volontaires sains traités par artémether-luméfantrine [177]. Dans une méta-analyse portant sur 2318 malades traités par différents antipaludiques [177], cet effet n'a pas été retrouvé statistiquement plus fréquent dans le groupe artémether que chez les comparateurs. Aucun effet neurologique grave n'a été attribué à l'AS au cours des études en population humaine [178], l'imputabilité pouvant être difficile à déterminer du fait des atteintes neurologiques liées au paludisme. Une méta-analyse portant sur 1919 patients n'a révélé aucun effet secondaire neurologique chez les patients traités par artémether [179] par rapport à la quinine. Le fabricant rapporte un risque non chiffré de vertige et de convulsion sous AS, sans autre indication (RCP Guilin®).

#### **1.5.5.3 Cardiotoxicité**

L'AS est cardiotoxique à fortes doses chez l'animal (allongement du QTc) [175]. Bien toléré au plan cardiaque en pratique clinique [175, 180] l'AS à très fortes posologies (15mg/kg) peut entraîner une bradycardie [172].

#### **1.5.5.4 Hépatotoxicité**

La toxicité hépatique de l'AS et des dérivés de l'artémisinine est connue [181]. Sa fréquence est rare (< 5%) et modérée, régressive dans 100 % des cas et sans s qu lle. Cette toxicité est mentionnée dans le RCP Guilin®.

#### **1.5.5.5 H matotoxicit **

L'hématotoxicité des dérivés de l'artémisinine est connue et documentée. Cette toxicité est mentionnée dans le RCP Guilin®. Depuis les années 80 une toxicité h matopo i tique sur les lignées rouge et blanche a été décrite, responsable de r ticulocytop nie (marqueur d'un défaut d' rythropo ese) et de leucopénie d'origine centrale. La toxicité semble directe sur les progéniteurs de la lignée  rythro ide. Il s'y ajoute une interaction négative sur les capacités de phagocytose des polynucléaires neutrophiles et une inhibition de la prolifération lymphocytaire (*in vitro*). Chez l'homme, cet effet est régulièrement rapporté. La fréquence de la r ticulocytop nie est de l'ordre de 0,5 % (25/4062 patients traités par dérivés d'artémisinine sur une méta-analyse des essais publiés et non publiés) [175]. Le taux de réticulocytes et d'érythrocytes se normalise rapidement à l'arrêt du médicament. Sa chute reste modérée et transitoire. Elle semble liée à la dose et à la durée d'utilisation du médicament. Une neutropénie (< 1000 polynucléaires neutrophiles/mm<sup>3</sup>) peut

survenir dans environ 20% des cas après un traitement de 7 jours à forte dose (6mg/kg/jour). Cette neutropénie est rapidement réversible en quelques jours [182].

#### **1.5.5.6 Embryo et foetotoxicité**

L'AS est embryotoxique chez l'animal, mais il n'y a pas de preuves de toxicité chez l'homme. L'administration orale entre le 10<sup>e</sup> et le 14<sup>e</sup> jour de gestation chez des rats femelles, entraînent des malformations cardiaques et des os longs, ainsi que le décès de l'embryon [183]. Le métabolite de l'artésunate, la dihydroartémisinine, (ou un catabolite commun) semble être l'effecteur toxique, puisque son administration engendre les mêmes effets. Sur 44 traitements reçus par des femmes au cours de leur premier trimestre de grossesse, la proportion de malformation n'était pas différente de celle attendue sans traitement [184]. Dans d'autres études, sur plus de 2045 femmes enceintes [172] ayant reçu de l'AS au second et dernier trimestre, aucun effet secondaire n'a été rapporté. Ainsi, en dépit de l'absence d'étude spécifique chez la femme enceinte et compte tenu de l'extrême gravité du paludisme chez celles-ci (paludisme grave, hypoglycémie, prématurité, complications néonatales) l'utilisation de l'AS est validée au cours du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre [47]. Elle se discute au cas par cas au cours du premier trimestre (AS ou quinine).

#### **1.5.6 AS France : mise en place du système, organisation de la dispensation**

Compte tenu du gain thérapeutique de l'AS par rapport à la quinine et des recommandations internationales concernant le traitement du paludisme il devint urgent de permettre à la France l'utilisation de ce médicament. La conférence de consensus française de 2007 [41] le suggérait déjà et l'OMS recommande son utilisation dans le traitement des accès graves depuis 2010 [47].

##### **1.5.6.1 Mise en place du dispositif**

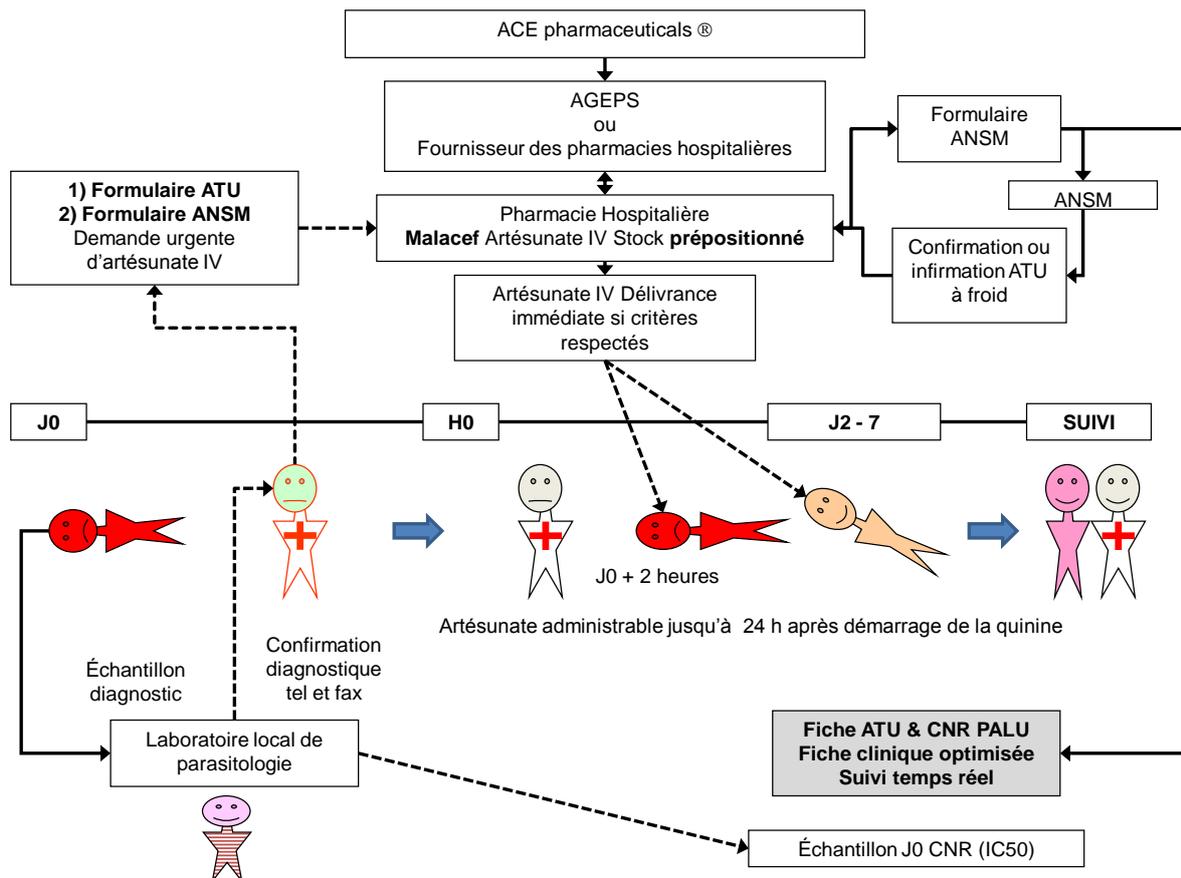
Dix huit mois d'interactions furent nécessaires entre le groupe expert mené par Pierre Buffet, (agissant sous l'égide de l'équipe INSERM Parasites Érythrocytes Physiopathologie et du Centre National de Référence du Paludisme pour la France métropolitaine) et l'équipe en charge à l'Agence Nationale de Sécurité de Médicament (ex-AFSSAPS), pour que l'artésunate intraveineux devienne disponible en France. En mai 2011, l'AS est devenu disponible en France pour le traitement des patients atteints de paludisme grave. Le médicament fabriqué par une firme chinoise (laboratoire Guilin®) a obtenu une pré-qualification de ses méthodes de fabrication par l'OMS en octobre 2010. Une firme néerlandaise (ACE Pharmaceuticals®) importe et conditionne l'artésunate pour l'Europe, après contrôle de qualité, et le vend aux Pays-Bas sous le nom de MALACEF®. L'artésunate n'a pas d'autorisation de mise sur le marché en France. Le MALACEF® a le statut de médicament

d'exception et de médicament orphelin au niveau européen. En conséquence l'AS est disponible en France par le truchement d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU nominative différée). Ce mécanisme de mise à disposition fait l'objet à la demande de l'ANSM, d'une surveillance renforcée, effectuée par le groupe dédié. Compte tenu du nombre assez faible de cas, et des frais inhérents à ce type de démarche, il est peu probable que le laboratoire ACE se lance dans une procédure d'AMM française. Le laboratoire Guilin en revanche est en cours de discussion avec l'ANSM afin d'optimiser les modalités de distribution.

#### 1.5.6.2 Modalités pratiques d'obtention et de prescription

Pour qu'un patient atteint de paludisme grave (critères OMS-SPLIF 2007 [41]) puisse bénéficier d'un traitement par AS IV, il est nécessaire de remplir une demande d'ATU d'une part et de compléter d'autre part 2 fiches de renseignements cliniques et biologiques à transmettre sans délai à l'ANSM, au CNR du Paludisme pour la France Métropolitaine-site Pitié Salpêtrière et au service de pharmacovigilance en début et en fin du traitement. Le médicament doit être obtenu sans aucun délai. Dans ce but, l'artésunate est pré-positionné au sein des centres hospitaliers prenant en charge des accès graves. Pour ce faire les pharmacies des hôpitaux doivent demander à l'ANSM l'autorisation de constituer un stock et s'approvisionner, une fois l'autorisation obtenue, auprès de l'importateur de leur choix. Le protocole d'utilisation thérapeutique et les fiches de recueil d'informations sont disponibles sur le site de l'ANSM (<http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/PUT-Specialites-soumises-a-un-protocole-d-utilisation-therapeutique/Liste-des-specialites-soumises-a-un-protocole-d-utilisation-therapeutique/MALACEF-60-mg-poudre-et-solvant-pour-solution-injectable>) et du CNR (<http://www.cnrpalu-france.org>).

Une boucle de rétro-information est organisée afin de d'assurer le suivi d'efficacité et de tolérance du médicament en France. La **figure 1-22** résume le parcours du malade, de son traitement et le suivi de l'information menée par le groupe expert.



**Figure 1-22.** Dispositif mis en place en France pour l'obtention de l'AS IV pour le traitement des patients atteints de paludisme grave (Protocole d'Utilisation Thérapeutique : [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/01d138a64031bcf9f37fa2737308ca5.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/01d138a64031bcf9f37fa2737308ca5.pdf)). Personnage rouge, orange ou rose : patient aux différents stades de la prise en charge, personnage avec une croix rouge : médecin, petit bagnard : biologiste en charge.

### 1.5.7 Résumé du chapitre

L'artésunate IV est un progrès thérapeutique majeur pour les patients atteints de paludisme grave, ce que reflètent les recommandations de l'OMS [47] et la plupart des recommandations nationales, conférence de consensus française comprise. En France, le médicament est désormais disponible (ATU). L'analyse prospective de ce traitement dans le contexte original du paludisme d'importation a permis d'évaluer plus précisément la tolérance et l'effet antiparasitaire de l'artésunate. Compte tenu des résultats publiés [46, 169], et des effectifs de patients incluables en France, il n'y avait pas lieu de répéter une étude comparative quinine – artésunate. En revanche, les bonnes conditions de prise en charge des patients en France ont permis une précision d'analyse thérapeutique et physiopathologique susceptible de bénéficier *in fine* aux patients et à la communauté médicale nationale et internationale. Par ailleurs la disponibilité d'outils expérimentaux récemment validés [185], ont permis une exploration originale des processus parasitaires et tissulaires jouant un rôle central dans la pathogénie du paludisme grave et dans l'efficacité antipaludique des dérivés de l'artémisinine (clairance parasitaire dépendante du « *pitting* »).

## **1.6 L'anémie au cours de l'infection à *Plasmodium falciparum***

L'anémie au cours du paludisme est en règle normocytaire, normochrome et arégénérative au moins durant les premiers jours de l'accès palustre [186]. Lorsque la prévalence des thalassémies (alpha ou beta) et/ou de la carence martiale est élevée dans une population, cette anémie peut être microcytaire et hypochrome. Lors d'un accès palustre 3 populations globulaires vont rapidement cohabiter : les globules rouges parasités (iRBC), les globules non parasités (uRBC) et les globules rouges épépinés ou « pittés » (oiRBC). Le pitting a lieu lors du passage au travers des fentes interendothéliales de la circulation lente splénique [145]. Chaque population globulaire aura un destin particulier participant de la perte globulaire totale et de l'anémie. Le deuxième élément qui entre en jeu est la chronologie de cette perte, différente selon les types globulaires. D'autres facteurs peuvent intervenir à des degrés divers. Une réponse dysimmunitaire associée (anémie hémolytique auto immune), la présence d'un traitement anti palustre ou d'autres cofacteurs médicamenteux (stress oxydatif, anémie hémolytique immunologique liée aux médicaments) peuvent participer de la destruction globulaire, et impactent directement sur le cours de l'infection et la destruction globulaire globale. Enfin l'état d'hydratation initial lors de la prise en charge du malade (déshydratation et hémococoncentration) pourra modifier l'hématocrite et le taux d'hémoglobine. Il s'agit d'une fausse augmentation initiale suivie d'une fausse baisse de l'hémoglobine lors du retour à un état d'hydratation normal.

### **1.6.1 L'anémie au cours du paludisme à *P. falciparum* : hémolyse, insuffisance de production et facteurs confondants**

L'anémie, fortement prévalente chez l'enfant en zone d'endémie est un facteur de gravité au cours du paludisme lorsque l'hémoglobine chute en dessous de 5 ou 7 g/dl selon les définitions (**Tableau 1-1**). L'anémie touche 97% des sujets infectés à un moment ou à un autre de l'évolution de l'accès dans les semaines qui suivent et 56% des patients sont toujours anémiques à 1 mois [187]. C'est l'une des manifestations clinico-biologiques les plus fréquentes de l'infection palustre. Quels qu'en soient les mécanismes, la répétition des accès palustres [188, 189] et la sommation de la perte globulaire et d'hémoglobine concourent à l'anémie sévère (« *Severe Malaria Anemia* »-SMA) [9]. La physiopathologie de cette anémie repose sur : (i) la perte globulaire en rapport avec l'infection palustre (hémolyse intra et extra vasculaire, corpusculaire et extra-corpusculaire) mais aussi pour certains patients, sur (ii) l'anémie chronique sous-jacente liée à la répétition des accès palustres, au terrain, aux coinfections, à l'activation splénique non spécifique [151, 190] et (iii) à l'insuffisance de production médullaire/dysérythropoïèse (défaut de régénération et réticulocytopenie [111]) au cours de l'infection palustre [191]. Des étiologies comme la coinfection par le VIH, des bactériémies

récurrentes et fréquentes dans ce contexte (salmonelloses), l'ankylostomose (perte sanguine et carence martiale), des carences alimentaires associées (fer, vitamine B12, vitamine A), et la présence d'un déficit en G6PD (mais pas la drépanocytose) s'associent à des degrés divers et participent de l'anémie [191, 192]. L'accès palustre ajoute une cause d'anémie sur un terrain potentiellement déjà anémique par ailleurs.

### **1.6.2 Approche populationnelle cellulaire : les populations globulaires au cours de l'accès palustre et leur devenir**

#### **1.6.2.1 iRBC et mécanismes de la perte**

La perte globulaire est liée en partie à la parasitémie (comme marqueur inexact de biomasse parasitaire) mais bien plus encore à la biomasse séquestrée et à la rupture des schizontes. Sur une série historique d'infection induite et contrôlée par l'administration régulière de totaquine, la perte hebdomadaire d'hémoglobine (et d'érythrocytes) étaient corrélée à la parasitémie moyenne journalière sur les 3 premières semaines d'infection [1]. Une parasitémie moyenne journalière de 0,2% s'accompagnait de la perte d'environ 1 g/dl d'hémoglobine par semaine d'évolution. Cependant, la parasitémie est un mauvais marqueur de l'impaludation globulaire totale et de sa dynamique. Compte tenu du fait qu'à un instant donné 25% de la biomasse est séquestrée [73] et que la parasitémie dépend du moment de sa réalisation (au regard de la synchronisation et de l'âge des populations parasites) il est estimé que la perte de globules rouges parasités ne rend compte que de 10 à 20% de la perte globulaire totale au cours de l'accès [116, 189].

Les mécanismes de cette perte pourraient être : (i) la rupture des schizontes arrivés à maturité à leur site de séquestration (hémolyse intravasculaire) et/ou (ii) la clairance splénique (hémolyse tissulaire ou extra vasculaire) des globules rouges infectés. Cette clairance splénique est de deux types : la rétention mécanique des formes annulaires et des formes plus matures (diminution de déformabilité) [114, 130] et la rétention par interaction ligand-récepteur entre globules rouges exprimant à leur surface des protéines d'origines parasites d'une part et le système monocyte-macrophage d'autre part [106, 126, 151, 193]. La séquestration tissulaire extra splénique (cerveau, rein, foie) des formes matures leur permet d'échapper au filtre splénique. Par contre certaines sous populations de formes jeunes (formes annulaires), bien que leur déformabilité soit très peu diminuée, sont probablement retenues en partie par le filtre splénique [114]. La rétention et l'hémolyse extravasculaire de ces formes jeunes entraînent indirectement une régulation de charge parasitaire, d'origine innée et splénique [39]. Cette diminution de déformabilité semble secondaire à la diminution du rapport surface/volume avec une sphérisation progressive de l'érythrocyte infecté

[139]. Celle-ci est possiblement en rapport avec l'intégration dans la paroi (cytosquelette) globulaire de protéines parasitaires qui modifient les qualités rhéologiques du globule rouge infecté et ce dès le plus jeune âge parasite (protéine RESA) [124, 131, 194].

Une autre situation est à envisager. Il s'agit de l'effet du traitement sur les globules rouges parasités et séquestrés. Il a été montré qu'après séquestration il n'y avait pas de recirculation de ces formes âgées. La mort parasite sous l'effet du traitement de formes séquestrées aboutit à la destruction du globule rouge hôte au même titre que la rupture des schizontes non traités [34]. La disparition rapide des iRBC traités du sang périphérique (aspect pycnotique du noyau parasite mort) suggère un processus tissulaire d'élimination phagocytaire, probablement splénique.

### **1.6.2.2 uRBC et mécanismes de la perte**

L'élimination des globules rouges non parasités dans ce contexte serait responsable de 90% de la perte globulaire totale au cours de l'accès et cela par différents mécanismes [116, 195]. Il a été montré chez 17 patients atteints de paludisme grave, en utilisant des tests aux globules rouges marqués au Cr<sup>51</sup>, que les uRBC ont une durée de vie moyenne réduite par rapport à la durée de vie moyenne de globules rouges témoins de sujet sains. La réduction est de l'ordre de 50% (44,1 jours +/- 21,7 et 89 jours +/- 13,1 respectivement) [190].

Les uRBC présentent une diminution de déformabilité qui corrèle avec le degré d'anémie [116] et qui peut être restaurée par transfusion sanguine [54]. A haut niveau de contrainte de cisaillement (30 Pa) testé à H0 chez 36 malades, la diminution de l'index d'élongation corrèle avec le nadir d'hémoglobine retenu durant les 7 premiers jours de prise en charge [116]. Les uRBC peuvent être « décorés » (au même titre que des précurseurs érythroïdes), par des protéines émises lors d'invasions parasitaires avortées (RAP-2/RSP-2) et contribuer à la perte globulaire par l'apparition d'anticorps spécifiques, opsonisation et phagocytose dépendante du complément [148, 196] ; ces mécanismes potentiels pouvant entraîner une hémolyse extravasculaire [121, 126, 193].

Une autre étude a évalué la durée de vie de globules rouges transfusés marqués au Cr<sup>51</sup> dans les suites d'un accès palustre chez des patients traités par quinine/cycline ou méfloquine. Il a été montré une réduction de la durée de vie de ces globules rouges transfusés. Chez 5 patients contrôles sains la durée moyenne de vie était de 89,6 jours. La transfusion autologue ou hétérologue chez 12 et 10 malades atteints de paludisme à *P. falciparum* après traitement (2 frottis négatifs) a révélé une durée de vie raccourcie à 56,8 jours et 64,4 jours respectivement [197]. Deux types de courbes d'élimination étaient visualisés. Pour 5 patients transfusés hétérologues et 11 patients transfusés autologues la décroissance était linéaire, faisant suspecter la présence d'une seule population globulaire. Cinq autres patients présentaient une courbe d'élimination curvilinéaire ou biphasique

traduisant la présence de 2 populations globulaires. L'une s'éliminait en 3 à 8 jours en moyenne, alors que la deuxième population s'éliminait en 35 jours en moyenne. La recherche d'anticorps opsonisants et de complément (IgG et C3) s'avérait négative faisant suspecter l'intervention d'un mécanisme extrinsèque mais non immun expliquant la destruction de ces uRBC exogènes.

Le devenir des uRBC centrés sur un iRBC au sein des rosettes lors de la séquestration tissulaire demeure en partie obscur. On peut penser que la lyse de l'iRBC entraîne une lyse et/ou une invasion des uRBC de contiguïté responsable d'une perte globulaire. Un travail récent a montré que la rupture du schizonte libérait la vacuole digestive parasitaire qui avait la particularité d'activer la voie alterne du complément. La C3-C5 convertase activée par l'organelle entraînerait des dépôts de C3b à la surface de uRBC de contiguïté (« *bystander RBC* ») activant leur phagocytose dépendante du complément [56].

### 1.6.2.3 oiRBC et mécanismes de la perte

Les iRBC soumis au mécanisme de pitting deviennent des oiRBC (abréviation de l'expression « Once-infected RBC » en anglais). Ils sont donc, dans un premier temps au moins, épargnés de la destruction rapide qui caractérise les iRBC. On parle d'épargne globulaire immédiate. Le « *pitting* », mécanisme original de clairance parasitaire, laisse le globule rouge hôte fonctionnel à défaut d'être « intact ». L'oiRBC peut poursuivre ses fonctions d'oxygénation et de décarboxylation ce qui limite l'impact de l'infection [145]. Son devenir est étroitement lié à l'évolution de l'iRBC dont il est issu. La concentration des oiRBC a été quantifiée chez 48 patients atteints de paludisme grave ou simple, avant tout traitement anti infectieux. Le nombre absolu d'oiRBC était plus élevé dans le groupe paludisme grave que chez les patients contrôles atteints de paludisme simple (21720/ $\mu$ L et 7200/ $\mu$ L respectivement) et suivait linéairement la parasitémie [144]. Une corrélation positive existait entre la concentration des iRBC et des oiRBC ( $r^2=0,52$ ,  $p=0,0004$ ). Dans cette cohorte environ 50% des iRBC disparaissant de la circulation sous traitement étaient remplacés par des oiRBC. Le nombre d'oiRBC généré augmente à mesure que la parasitémie augmente. L'existence d'oiRBC détectables après disparition des iRBC (clairance parasitaire) témoigne de l'absence d'hémolyse immédiate de cette sous population globulaire et du décalage temporel de leur apparition.

Leur nombre est étroitement corrélé au traitement utilisé, les dérivés d'artémisinine et l'artésunate en particulier étant un puissant pourvoyeur d'oiRBC (cf. supra). Cependant la durée de vie de ces oiRBC est réduite par rapport à celle de populations globulaires contrôles et ce quel que soit le traitement utilisé. Dans une étude portant sur 17 patients atteints de paludisme simple (10 traités par artésunate et 7 par quinine) la demi-vie d'élimination des oiRBC était de 2 jours et la décroissance était exponentielle. Dans le groupe de paludisme grave de la même étude (65 traités

par artésunate et 10 par quinine) la demi vie semblait allongée par rapport aux iRBC mais aucun oiRBC n'était détecté après 21 jours de suivi [146]. Une évaluation plus précise (sur 21 patients graves et simples) a déterminé la durée moyenne de vie des oiRBC à 187 heures (IC95% [136-246]) soit environ 7 jours, contre 66 heures (IC95% [30-108]) pour les iRBC et 1087 heures (IC95% [840-1213]) pour la durée moyenne de vie des uRBC (45 jours environ) [145]. Ces résultats, groupant les patients traités par DHA, artésunate ou quinine, montraient une durée de vie raccourcie de toutes les populations globulaires. De plus le traitement en lui-même semblait avoir un impact sur la durée de vie des oiRBC. La durée moyenne de vie des oiRBC des patients traités par DHA ou artésunate était de 145 heures (IC95% [102-205]) contre 282 heures (IC95% [181-440]) pour la durée de vie des oiRBC des patients traités par quinine. L'explication n'est pas univoque. La DHA pourrait, en interagissant avec la spectrine globulaire, en altérer les propriétés membranaires [198]. Plus probablement la création très rapide d'un grand nombre d'oiRBC dans cette phase aiguë infectieuse et le contexte oxydatif et immunologique dans lequel ils sont générés entraineraient des dommages sur ces oiRBC, réduisant leur durée de vie. Le seuil splénique se trouve aussi modifié dans cette situation, avec une diminution du seuil de détection des anomalies globulaires [151]. Enfin la grande charge de globules infectés se présentant pour le processus de *pitting* pourrait dépasser les capacités splénique d'une filtration de qualité et entrainer des dommages globulaires lors du franchissement des fentes interendothéliales [145]. Tous ces phénomènes pouvant concourir à la réduction de durée de vie des globules traités et pittés sous artémisinine.

Il est important de retenir que la durée de vie des oiRBC est nettement plus longue que la durée de vie des globules rouges parasités, écartant de fait l'hypothèse d'une hémolyse précoce de ces oiRBC.

Nombre de travaux publiés anciens ne font pas la différence entre uRBC et oiRBC, puisqu'ils ne comparent bien souvent que les globules rouges parasités aux globules rouges non parasités sans marquages spécifiques permettant de différencier les globules rouges pittés des globules rouges jamais infectés persistant après traitement. Dans une étude au Cr51 portant sur 8 malades (dont 5 infectés à *P. falciparum*), il a été montré que l'hémolyse pouvait perdurer pendant 5 semaines après la fin du traitement (qui était de 14 jours par chloroquine). L'importance de l'hémolyse était corrélée à l'importance de la parasitémie initiale [199]. La demi-vie d'élimination des globules marqués (uRBC et probablement des oiRBC, même si leur nombre n'est pas possible à évaluer) était de 11,6 jours. Il est permis de penser que certains mécanismes de destruction des oiRBC sont les mêmes que pour les uRBC (réduction de déformabilité et piégeage splénique, anticorps dirigés contre RSP-2 ou d'autres déterminants antigéniques « décoration », opsonisation, activation macrophagique). Cependant les travaux précis le démontrant manquent à ce jour. La reproduction *in vitro* du « *pitting* » est rarement décrite car il est difficile de reproduire la contrainte mécanique exercée par la fente interendothéliale

sur les iRBC menant au processus de *pitting*. Dans une expérience utilisant des microcapillaires en verre de 2 µm de diamètre, il a été noté une modification de forme du globule rouge pité après que celui-ci ait été débarrassé de son parasite. Mais, ici, les formes obtenues après passage dans le microcapillaire correspondraient plutôt à une rupture de l'érythrocyte hôte qu'un réel processus de *pitting* reproduit (aspect de forme « fantôme ») [133].

#### **1.6.2.4 Résumé de l'approche populationnelle globulaire**

La destruction des iRBC, mise à part la rupture du schizonte, des uRBC et des oiRBC dépend au final de 2 mécanismes génériques : (i) une rétention splénique mécanique, variable selon la capacité du globule infecté, non infecté ou pité à se déformer suffisamment pour franchir les fentes interendothéliales et (ii) une clairance immunologique, à laquelle la rate contribue de façon importante, mettant en jeu des interactions ligands-récepteurs reposant sur les macrophages et touchant les 3 sous-populations érythrocytaires (iRBC, uRBC, oiRBC). La durée de vie des uRBC et des oiRBC est raccourcie par rapport à celle de populations témoins mais plus longue que la durée de vie des iRBC. Cela sous-entend une clairance retardée de ces deux dernières sous-populations globulaires au-delà du 7<sup>ème</sup> jour (par convention), seuil déterminant un peu arbitrairement la fin de la phase infectieuse de l'accès palustre.

Les facteurs discutés ci-après peuvent influencer le devenir des 3 sous-populations érythrocytaires décrites précédemment. Il n'est pas toujours possible de préciser quelles sont les populations globulaires concernées par ces facteurs d'hémolyse. On peut considérer pour certains facteurs décrits que l'ensemble des globules rouges peuvent être concernés.

#### **1.6.3 Impact de l'âge du patient sur la survenue de l'anémie**

Si l'anémie sans gravité touche quasiment tous les malades, la SMA touche essentiellement les enfants en bas âge. En zone africaine 7,6/1000 enfants de 0 à 4 ans sont hospitalisés pour SMA avec une mortalité de 9,7% [200]. Le pic d'incidence de la SMA est de 1 an en zone de haute transmission, de 2 ans en zone de transmission modérée et faible. Elle diminue avec l'âge devenant rare chez les adultes [201]. La prévalence globale chez les enfants africains est de l'ordre de 21% avec une mortalité de 8,4% (étude multicentrique). La SMA a été rapportée par certains à un déséquilibre de la réponse immune au cours de l'infection pérennisant l'anémie par insuffisance de production et dysérythropoïèse [202] mais cette phase d'acquisition immunitaire anti palustre est contemporaine du risque le plus important d'anémie. La théorie immuno-pathologique de l'anémie palustre grave ne fait pas l'unanimité.

#### **1.6.4 Impact de la température corporelle (fièvre)**

La fièvre et l'inflammation réduisent la durée de vie érythrocytaire en général (diminution de déformabilité) mais l'impact de cette fièvre sur la durée de vie globulaire est débattue au cours du paludisme [116, 203]. Une température augmentée entraînerait une augmentation de cytoadhérence (hyperexpression d'ICAM-1), diminuerait la croissance parasitaire intraglobulaire et augmenterait la rigidité globulaire (diminution de déformabilité). Une étude réalisée *in vitro* a montré que l'effet de la température sur la rigidité globulaire variait selon l'âge parasitaire. Plus la température augmentait (gradient progressif de 20°C à 41°C) plus la rigidité augmentait et ce d'autant que le parasite était plus âgé (nette augmentation pour les stades trophozoïtes et schizontes). Par ailleurs il était noté un bond dans la rigidité entre 39°C et 41°C [204]. Une autre expérience a été menée utilisant un modèle de parasites (âgés de 14 à 20h) exprimant ou pas la protéine RESA (invalidation génique) et soumis à différentes températures (25°C, 37°C et 41°C). Il a été montré que la température influait directement sur la rigidité des érythrocytes infectés par des formes jeunes (stade « annulaire ») exprimant le RESA par rapport à une population invalidée pour le gène codant pour RESA (n'exprimant pas cette protéine). Ce gain de rigidité est proportionnel à l'augmentation de température [194]. A 37°C les érythrocytes contenant des anneaux présentent un module de cisaillement de 17,6  $\mu\text{N/m}$  contre 11,0  $\mu\text{N/m}$  pour des globules infectés par des parasites de même âge n'exprimant pas le RESA. A 41°C les érythrocytes contenant des anneaux présentent un module de cisaillement de 29,9  $\mu\text{N/m}$  contre 11,2  $\mu\text{N/m}$  pour des globules infectés par des parasites de même âge n'exprimant pas le RESA [194].

*In vivo* l'impact de la fièvre, probablement liée à son caractère intermittent, semble plus difficile à mettre en évidence [116].

#### **1.6.5 Autres causes inconstantes d'anémie hémolytique dans ce contexte**

##### **1.6.5.1 Anémie hémolytique auto immune (AHAI) induite par le paludisme**

La présence d'auto-anticorps au cours du paludisme est connue mais leur impact physiopathologique est difficile à déterminer. Une série de 100 patients indiens atteints de paludisme aigu, a été systématiquement évaluée à H0 et 4 semaines plus tard [205]. Une recherche d'auto anticorps, un dosage du complément (C'), la recherche de complexes immuns et le test de Coombs<sup>C</sup> direct ont été

---

<sup>C</sup> Test de Coombs direct et « *Direct Antiglobuline Test* » (DAT) : test qui met en évidence la présence d'auto ou d'alloanticorps à la surface des globules rouges. Un sérum polyspécifique pan globulinique anti IgG, M, parfois

réalisés. Des anticorps anti ssDNA, dsDNA ou facteur rhumatoïde ont été isolés à H0 dans 51%, 30% et 38% des cas respectivement. La présence de complexes immuns a été mise en évidence chez 32% des malades dans cette série et 3/8 dans une autre publication [199]. Les fractions C3 et C4 du complément étaient basses dans 8% et 31% des cas respectivement. Il s'y associait une gammopathie polyclonale touchant les IgM, IgG et IgA dans environ 25% des cas traduisant une activation polyclonale B dans ce contexte. Un mois plus tard les immunoglobulines, la fraction C4 et des complexes immuns étaient toujours présents à titre élevé, par contre les auto-anticorps avaient disparu.

Un test de Coombs positif est trouvé dans 3%, 6%, voire 94% des cas dans certaines études [115, 205, 206]. Sa responsabilité dans la survenue d'une hémolyse auto-immune est difficile à démontrer. Quatre soldats américains sur 131 de retour du Vietnam ont présenté une anémie hémolytique à Coombs positif en IgG. Chez 3 patients le Coombs semblait être en rapport avec l'administration de quinine pour rechute palustre. Deux patients présentaient une dermatite, et l'un une fièvre bilieuse hémoglobinurique. Le troisième présentait une pan-agglutination d'un éluat de globules rouges débarrassé de quinine. Le quatrième patient présentait une hémolyse compensée et la positivité du Coombs n'était pas rapportée à la quinine [206]. Tous avaient un test de Coombs indirect<sup>D</sup> négatif écartant l'hypothèse d'anticorps libres dans le sérum et la recherche d'anticorps spécifiques anti-quinine était négative. Chez 17 enfants Gambiens, le Coombs était positif chez 16 d'entre eux ; 9 présentaient un Coombs à IgG dont le titre était corrélé positivement à la parasitémie initiale [115]. Par contre l'anémie était précoce et ne semblait pas être en rapport avec la positivité et l'évolution des tests de Coombs. A contrario un travail ancien mené sur 160 enfants, en Gambie également, retrouvait plus de 50% de positivité du test de Coombs. Par contre seul un test de Coombs positif à la fraction C3d seul du complément était associé au risque d'anémie accompagnée d'hémolyse extravasculaire (image d'érythrophagocytose monocyttaire de globules non infectés (uRBC) exprimant le récepteur au C3b) [207]. Les autres types de Coombs étaient parfois positifs (IgG seules, IgG+C3d, IgG+C3d+C4b+C3b) mais ne semblaient pas être associés à l'anémie profonde. La sensibilisation des globules rouges à des Ig ou au C' ne dépendrait pas de la parasitémie ; des titres élevés sont trouvés

---

A et/ou anti complément (C') est mis en contact des globules rouges du malade. Si une agglutination est notée, une phase d'élution permet de déterminer le type et la spécificité de l'anticorps isolé. Il existe des faux négatifs : erreurs techniques, trop peu d'anticorps à la surface du globule rouge (il faut un minimum de 100 à 150 molécules d'immunoglobuline fixées par globule rouge), une AHAI à IgA (3%). Le test doit être répété.

<sup>D</sup> Test de Coombs indirect et « *Indirect Antiglobuline Test* » (IAT) : test qui met en évidence la présence d'auto ou d'alloanticorps circulant dans le sérum du malade. Des globules rouges sont incubés dans le sérum du malade. L'agglutination immédiate traduit la présence d'IgM dans le sérum du malade. En l'absence d'agglutination, les globules tests sont incubés avec un sérum anti-panglobulinique ou anti-spécifique (IgG). L'agglutination révèle alors la présence d'anticorps IgG dans le sérum du malade.

à parasitémie faible, des résultats positifs sont retrouvés à parasitémie nulle. Cette sensibilisation et la phagocytose qui en découle touche essentiellement les uRBC, puisque *in vivo* des images dans le sang périphérique d'érythrophagocytose monocyttaire ne montrent pas d'images d'iRBC [207]. Le type de réaction dans ces authentiques AHAI serait de type complexe-immun. La sensibilisation des érythrocytes résulterait de l'attachement passif de fraction du complément et de complexes antigènes parasitaires-anticorps [208]. La mise en évidence fréquente de complexes immuns dans les différents travaux va dans ce sens. Enfin la persistance de positivité de ces tests pouvant aller allant jusqu'à 6 semaines, donne les arguments d'une destruction d'origine immunologique prolongée dans le temps et intéressant les uRBC et probablement les oiRBC.

Une autre publication a rapporté 10 patients atteints de paludisme grave dont 4 avaient une AHAI au cours du suivi [209]. Il s'agissait d'une AHAI à IgM anti-triosephosphate isomérase (enzyme glycolytique), responsable d'une hémolyse prolongée, avec anémie, à test de Coombs négatif. Le type et le taux d'anticorps, étaient déterminés par immunofluorescence et immunoblot. L'anticorps était dépisté dès J0 (jour du diagnostic de paludisme) chez les 4 malades et son taux, corrélé à l'importance de l'hémolyse, variait au cours du temps : pour certains les taux les plus élevés existaient en début d'accès (J0 à J7) allant décroissant, pour d'autres le pic d'anticorps survenait au cours de la deuxième ou troisième semaine [209].

Au cours de l'accès palustre il existe une activation polyclonale B qui peut positiver nombre de tests immunologiques. Par contre l'existence d'AHAI palustres induites est possible, quoique probablement assez rare, et nécessite pour être confirmée une exploration complète du test de Coombs (élution<sup>E</sup>, sérum spécifique, titre). Parfois la mise en évidence d'anticorps spécifiques dirigés non pas contre des protéines membranaires globulaires mais des enzymes nécessitent des techniques non réalisées en pratique courante [209]. La seule positivité du Coombs dans ce contexte ne suffit pas à retenir le diagnostic formel d'AHAI secondaire à l'infection. Un élément intéressant est la cinétique de la positivité de ces tests. Positifs dès le début du traitement ou apparaissant plus tard au cours de l'accès, leur positivité est probablement en rapport avec la durée d'évolution de la maladie avant le diagnostic, la durée d'exposition du patient aux antigènes parasitaires durant le traitement, la libération d'antigènes parasitaires par le traitement pouvant entraîner des modifications du Coombs [207], et le temps d'apparition de ces anticorps (habituellement 10 à 15 jours en moyenne).

---

<sup>E</sup> Éluât et élution : manipulation qui consiste à décrocher les anticorps fixés sur les globules rouges et à en déterminer la spécificité. Technique peu sensible, elle est en revanche très spécifique.

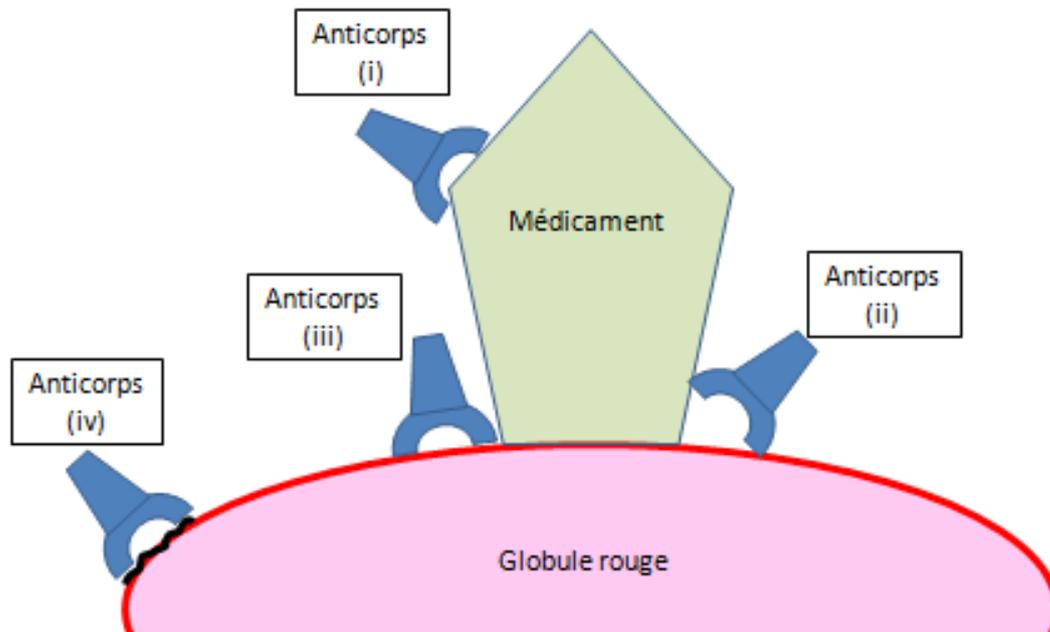
### 1.6.5.2 Anémie hémolytique immune induite par les médicaments (AHIM)

Les AHIM sont rares, évalués à 1/1000000, soit dix fois plus rares que les thrombocytopénies médicamenteuses immunologiques [210]. Parmi les 127 médicaments responsables d'anémie hémolytique prouvées depuis plus de 30 ans, 42% sont des antimicrobiens, essentiellement des bêtalactamines. Parmi les antipaludiques, seuls la quinine, la méfloquine et la doxycycline semblent être responsables d'AHIM [211]. Les observations étayées rapportées sont rares [212]. C'est à dire que l'AHIM lié à un antipaludique semble exceptionnelle.

Quatre mécanismes sont décrits au cours des AHIM (**Figure 1-23**). Le test de Coombs agit comme un test de dépistage qui met en évidence des anticorps anti-érythrocytaires. Pour prouver l'AHIM il faut mettre en évidence le médicament responsable de l'interaction antigène-anticorps. Ces différents mécanismes ne sont pas exclusifs les uns des autres et peuvent s'additionner pour un médicament donné.

- (i) Le mécanisme « haptène-cellule » : l'anticorps se fixe sur le médicament, ou un métabolite, adsorbé sur la paroi globulaire. La mise en évidence de l'anticorps nécessite la mise en contact du plasma du malade avec une solution de globules rouges sensibilisés par le médicament incriminé. L'éluât est négatif.
- (ii) Le mécanisme « complexes immuns » : l'anticorps se fixe sur le médicament, ou un métabolite, et une protéine de la paroi globulaire. La mise en évidence de l'anticorps nécessite la mise en contact du plasma du malade avec une solution de médicament à l'état libre et des globules rouges non sensibilisés. L'éluât est négatif.
- (iii) Le mécanisme « auto-immun » : l'interaction est ici non dépendante du médicament directement, dite AHAI-*like* puisque impossible à différencier d'une authentique AHAI au plan sérologique. L'anticorps agit comme un auto-anticorps qui se fixe sur une protéine de la paroi globulaire essentiellement, et très peu sur le médicament. Le médicament n'est pas nécessaire à l'interaction contrairement au type (ii). Seule l'évolution à l'arrêt du médicament permettra de faire la différence avec une authentique AHAI. Dans les deux cas l'éluât sera positif. Dans le cas d'une AHIM, il sera noté une régression des symptômes en 15 jours après l'arrêt du médicament suspecté. La négativation du test de Coombs par contre, peut prendre plusieurs mois.
- (iv) L'adsorption non immunologique de protéine (ANIP) : le médicament modifie et dévoile des composants membranaires qui vont interagir avec des immunoglobulines, des fractions du complément, mais de manière non spécifique au médicament considéré. En général le test de Coombs direct et indirect sont positifs par contre l'éluât est négatif.

Les types (i) et (ii) sont aussi appelés « Anémie Hémolytique Immuno-Allergique » (dépendant du médicament), par opposition au type (iii) indépendant du médicament.



**Figure 1-23.** Schéma récapitulatif des différents mécanismes des AHIM (inspiré de [210]).

Le **tableau 1-3** résume les données du Coombs dans les principaux cas de figure d’AHIM.

Type de mécanisme	Type d’hémolyse	Médiation	Coombs
<b>Type (i) : haptène-cellule</b>	Extravasculaire	IgG	IgG
<b>Type (ii) : complexes immuns</b>	Intravasculaire	IgM, complément	C3
<b>Type (iii) : indépendant</b>	Extravasculaire	IgG	IgG, rarement C3

**Tableau 1-3.** Les différents types d’hémolyse, de médiation et de résultats du Coombs direct en fonction du type d’AHIM suspecté. (i) haptène-cellule, (ii) complexes immuns, (iii) indépendante du médicament, de type AHAI-like.

### 1.6.5.3 Stress oxydatif et/ou AHIM : fièvre bilieuse hémoglobinurique (FBH- « Blackwater Fever ») et déficit en G6PD

La FBH est définie officiellement par la survenue brutale d’une hémolyse intravasculaire, s’accompagnant d’une hémoglobinurie dans les heures qui suivent la mise en route d’un traitement anti paludique (après une ou deux doses) chez un patient à faible parasitémie [45]. Elle est donc en règle à distinguer d’une hémolyse d’origine parasitaire exclusive accompagnée d’hémoglobinurie secondaire, critère de gravité en lui-même et précédant tout traitement antipaludique (**Tableau 1-1**). Son incidence semble être de l’ordre de 1 à 3% au cours du paludisme grave après début du

traitement [46, 169]. La couleur des urines (Coca-Cola\* ou Porto\* selon le contexte culturel) très particulière et peu fréquente dans les cas de paludisme grave en a fait une entité à part. Initialement décrite chez des patients à très faible parasitémie, la gravité de l'hémolyse et des signes accompagnateurs (insuffisance rénale, anémie sévère) a fait suspecter une origine médicamenteuse à la FBH. Elle survenait dans les heures suivant la prise de quinine chez des patients suspects de sensibilisation à la quinine (auto médication depuis des années par quinine chez des expatriés essentiellement) [45]. L'hypothèse d'une origine immunologique prévaut alors avec la présence d'anticorps induits par la présence de quinine dirigés contre les globules rouges mais aussi la nécessité d'une infection palustre. L'interaction des deux phénomènes n'est pas expliquée mais semble obligatoire. L'absence de cet effet secondaire lors de l'utilisation de quinine (traitement des crampes nocturnes, mais il est à noter que les doses utilisées dans ce cadre ne sont pas les mêmes) en l'absence de paludisme plaide pour une interaction immunologique entre l'individu susceptible, le médicament et l'infection [213]. Rarement mis en évidence le type d'AHIM strictement secondaire à la quinine est lié à la présence de complexes immuns (type (ii)) [211]. Sur une étude de 25 patients avec FBH testés, le Coombs était positif en IgG et/ou complément seul chez 70% des malades sans que le diagnostic d'AHIM ne soit retenu devant la faible spécificité des taux et leur fugacité [214]. La présence de l'infection et d'un traitement anti-infectieux pouvant l'un et l'autre être responsable de manifestations dysimmunitaires rend difficile la discussion étiologique.

Devant la multiplication des cas y compris en zone d'endémie, touchant aussi des enfants non spécialement sensibilisés par la quinine [215, 216], les publications récentes incriminent plutôt une moindre résistance des globules de ces malades au stress oxydatif induit par certains médicaments. En effet des cas ont été décrits faisant suite au traitement par quinine, méfloquine, halofantrine, artésunate, artemether-luméfántrine, DHA-pipéraqúine [214-219]. Une publication récente a mis en évidence que le métabolisme de la quinine (par le biais du cytochrome P4503A4) libérait des métabolites toxiques (stress oxydatif dose dépendant) pour les globules rouges les rendant d'autant plus à risque d'hémolyse en cas d'impaludation et/ou de déficit en G6PD [220]. La survenue de FBH peut être associée au déficit en G6PD dans plus de 50% des cas dans certaines publications [213], confirmant un substratum « oxydatif » au syndrome.

La G6PD est une enzyme fondamentale du métabolisme d'oxydoréduction des cellules aérobies. Au sein du globule rouge son rôle est encore plus important puisque c'est la seule source de NADPH qui protège la cellule contre le stress oxydatif (radicaux libres oxygénés toxiques), via la glutathion réductase. Ce stress oxydatif peut être secondaire aux infections, à certains médicaments, aux fèves (favisme). Le déficit enzymatique, qui touche plus 400 millions de personnes dans le monde, est exprimé en pourcentage d'activité de l'enzyme par rapport à la normale. Il est plus ou moins profond

en fonction des mutations géniques [221]. La maladie peut être asymptomatique ou mener au décès par hémolyse aiguë et ses complications, avec tous les intermédiaires d'expression possible. Certains médicaments antipaludiques (primaquine, bleu de méthylène, acide nalidixique) peuvent entraîner une hémolyse extra et intravasculaire en cas de déficit en G6PD (si le déficit est < 50%).

#### **1.6.6 Défaut de production : un déséquilibre immuno-inflammatoire**

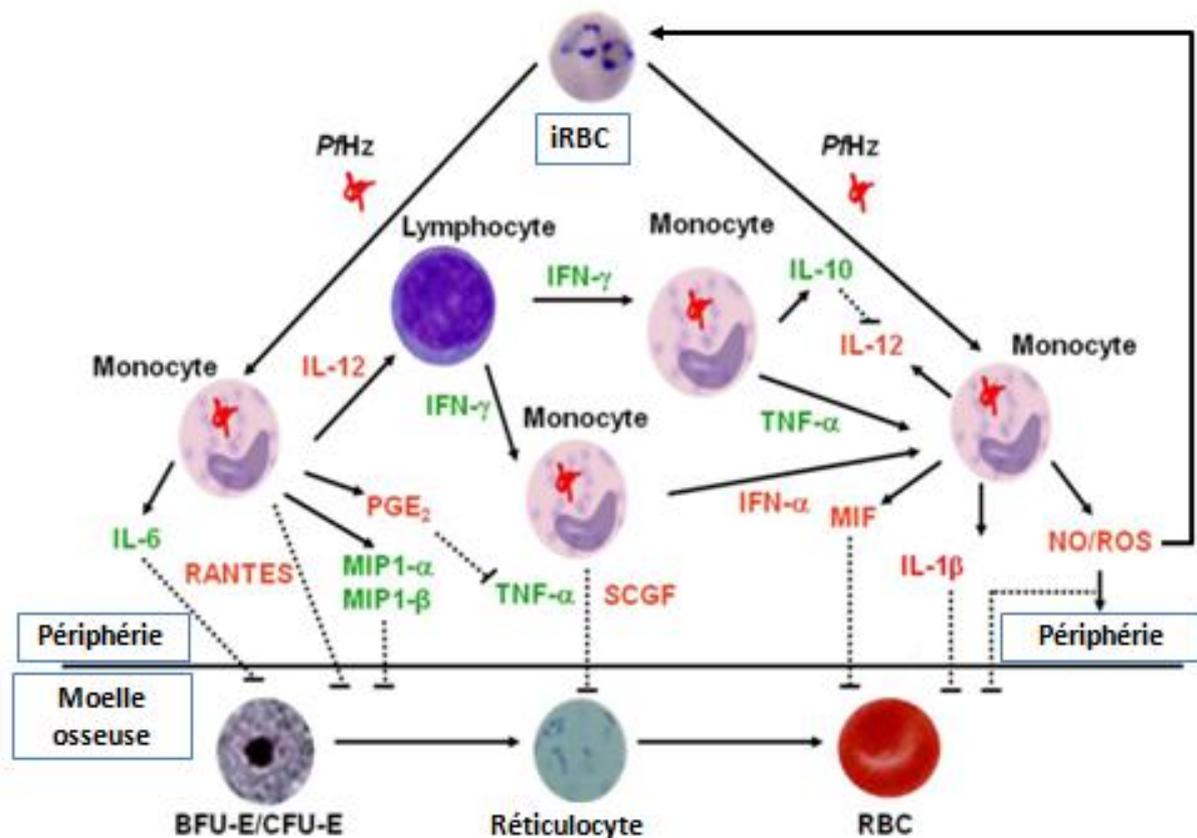
Au cours de l'accès palustre et a fortiori si il y a répétition des accès, la moelle osseuse présente un certain degré d'insuffisance de production et/ou de dysérythropoïèse. Ceci a pour conséquences une production de réticulocytes insuffisante au regard du niveau d'anémie (index de production réticulocytaire ou RPI insuffisant) ce qui contribue à la pérenniser [111]. Les médiateurs inflammatoires et anti-inflammatoires (cytokines), les chémokines, les facteurs de croissance, les molécules effectrices et l'activation cellulaire engendrée pour le contrôle de l'infection entraîne une altération de l'érythropoïèse [202]. Ce déséquilibre de la réponse inflammatoire engendré par l'infection palustre est quasi constant. Nombre d'accès palustre s'accompagnent d'une sidération médullaire d'une durée de plusieurs jours. La production réticulocytaire adaptée au niveau d'anémie, afin de remplacer la perte globulaire, survient à mesure que la parasitémie disparaît en général au cours de la première semaine sous traitement [222]. De nombreux états inflammatoires s'accompagnent de dysérythropoïèse et d'une diminution de la production médullaire touchant la lignée érythroïde. La **figure 1-24** résume la dysrégulation de la réponse immune innée au cours de la SMA et son action inhibitrice sur la production de réticulocytes et de globules rouges. Le *primum movens* serait la phagocytose de l'hémozoïne parasitaire par les monocytes, ce qui dérègle la production de médiateurs inflammatoires. On note une diminution de la production d'IL-12 (qui stimule la production de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$  des cellules T et active les cellules NK et sert au contrôle de la parasitémie) à la suite de la phagocytose des iRBC et/ou de l'hémozoïne. Cette diminution entraîne une synthèse accrue d'IL-10 (anti inflammatoire) plus tardivement au cours de l'accès palustre. Cependant les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, MIP) sont en excès, s'accompagnant d'un ratio IL-10/TNF abaissé ce qui inhibe la production médullaire [223]. Le NO et ROS, radicaux libres toxiques, en concentration élevée inhibe l'érythropoïèse et active la destruction parasitaire. Dans cet état d'activation les concentrations de NO et ROS diminuent progressivement entraînant une réduction de leur action antiparasitaire et prolongeant la présence du parasite et l'activation inflammatoire.

### **1.6.6.1 Une dysérythropoïèse associée**

Au cours de l'infection chronique les érythroblastes présentent des anomalies de maturation nucléaires [115]. Ils sont phagocytés par les macrophages [224] activés par l'élévation des taux de certaines cytokines comme l'IFN- $\gamma$ . L'anémie est associée à la persistance de taux élevé d'IFN- $\gamma$  et des taux abaissés d'IL-4 par effet suppresseur sur les progéniteurs érythroïdes [225]. Des protéines mérozoitaires (RSP2) peuvent aussi décorer les érythroblastes et entraîner une phagocytose et activation du complément [196].

### **1.6.6.2 Une insuffisance médullaire associée**

Lors de l'infection, le taux d'érythropoïétine plasmatique est adapté au niveau d'anémie par contre la réponse médullaire est insuffisante [226]. Il s'ensuit une insuffisance de production au regard du niveau de la perte (RPI insuffisant). Cette absence de réponse est rapidement réversible (3 jours) en cas d'infection aiguë et le taux de production globulaire est rapidement adapté [227]. Bien que la production d'EPO augmente au cours du temps il semblerait qu'au cours du paludisme grave cette production bien que présente, demeure insuffisante dans 50% des cas à J28, pérennisant l'anémie [228, 229]. Certains auteurs considèrent le RPI comme insuffisamment élevé durant les 14 premiers jours de l'accès palustre [230]. Toutefois, les valeurs seuils de RPI ont été établies dans le contexte d'hémolyses chroniques stables au cours desquelles l'adaptation de la réponse médullaire a eu des semaines ou des mois pour se mettre en place. L'interprétation du RPI est sans doute différente au décours immédiat d'épisodes anémiques aigus. Un taux très faible de réticulocytes 48 heures après une baisse brutale de l'hémoglobine ne traduit en rien une insuffisance médullaire mais reflète le temps nécessaire (3 à 5 jours) pour qu'une réponse adaptée se mette en place. Le RPI est fréquemment calculé inadéquat et insuffisant ( $RPI < 2$  ou  $3$ ) dans les situations de SMA [231] mais semble être un marqueur peu adapté pour rendre compte de la dynamique de régénération dans les circonstances d'un accès palustre unique.



**Figure 1-24.** Modélisation de la dysrégulation de la réponse immunitaire innée au cours de l'anémie palustre (adapté de [202]). A lire en partant du haut de la figure. Les flèches pleines indiquent un effet stimulateur. Les traits hachurés indiquent un effet inhibiteur. Les médiateurs avec taux élevé sont en vert. Les médiateurs avec un taux abaissé sont en rouge. *Pfhz* : hémotoïne de *Plasmodium falciparum*. PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E2. RANTES : « *regulated on activation normal T cell expressed and secreted* », d'origine plaquettaire, stimule l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et le développement. MIF : « *macrophage migration inhibitory factor* ». MIP : « *macrophage inflammatory protein* ». SCGF : « *human stem cell growth factor* », facteur de croissance des progéniteurs érythroïdes. BFU-E/CFU-E : « *burst forming unit – erythroid / colony forming unit-erythroid* ». NO/ROS : NO et « *Reactive Oxygen Species* », action délétère sur le parasite et l'érythropoïèse.

### 1.6.7 Hémostase différée et AS : un nouveau profil évolutif de l'hémoglobine au cours de l'infection plasmodiale traitée par AS

#### 1.6.7.1 Une nouvelle anémie ?

L'artésunate intraveineux est généralement bien toléré [232] mais depuis la disponibilité du médicament en Europe, un travail récent a révélé l'apparition retardée d'épisode d'anémie

hémolytique parfois très profonde survenant entre le 14<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour après le début du traitement [233]. Sa physiopathologie semble d'emblée complexe. Ces épisodes surviennent dans environ 10 à 15% des cas (**Tableau 1-4**) chez des voyageurs traités par AS [108, 230, 233-236]. Cette hémolyse est différée ; elle survient 2 à 3 semaines après le début du traitement alors que la clairance parasitaire est depuis longtemps achevée. Elle s'accompagne d'une anémie requérant une transfusion sanguine dans 40% des cas. Ces caractéristiques temporelles et qualitatives (hémolyse s'accompagnant d'anémie) nous ont fait proposer le terme de « PADH » pour « *Post Artesunate Delayed onset Hemolysis* » [108]. La PADH se résout en 3 à 6 semaines après la première dose d'AS intra veineux [233]. Le mécanisme prédominant de destruction semble hémolytique avec un taux de LDH sérique élevé et un taux d'haptoglobine effondré. Il est à noter que l'expérience de l'AS hors zone d'endémie a confirmé son efficacité antipaludique et qu'aucun patient n'est décédé de cet effet secondaire.

Les causes classiques d'anémie associées dans ce contexte (AHAI, AHIM, enzymopathie) ne sont pas retrouvées [230, 235, 237-239]. Dans la seule étude comparative existante la PADH a été diagnostiquée chez 5/8 patients hyperparasitémiqes traités par AS seul ou en combinaison et jamais retrouvés chez les patients traités par quinine seule ou en combinaison [236]. Cette donnée semble confirmer que cet effet secondaire est propre à l'AS et probablement aux artémisinines [240] et n'est pas retrouvé avec d'autres traitements [236]. L'existence d'une forte parasitémie à l'introduction du traitement a été incriminée dans la survenue de la PADH [233, 235]. Par contre une dose cumulée importante d'AS ne semble pas nécessaire à la survenue d'une PADH. L'utilisation d'un produit de mauvaise qualité et ne répondant pas aux critères de bonne méthode de fabrication (GMP), évoqué un temps, est peu probable compte tenu de la détection de cas chez des patients traités avec de l'AS préparé par différents laboratoires pharmaceutiques [237, 238]. L'anémie liée à la PADH n'a jamais été mise en évidence auparavant dans les méta-analyses [232] ou les grands essais thérapeutiques [46, 169]. Il est à noter que dans ces essais, le suivi des malades n'excédait pas 7 jours. Les dernières publications en date ont retrouvés des anémies de type PADH chez des enfants africains traités par AS [241, 242].

Le **tableau 1-4** présente les études publiées à ce jour décrivant des cas d'anémie différée probablement secondaire à l'AS (ou de diagnostic différé) survenant chez des patients atteints de paludisme (grave en général) et d'importation. La lecture des travaux met en évidence deux problèmes majeurs : (i) il n'y a pas de consensus sur la définition de cette hémolyse tardive et (ii) certains travaux présentent deux types de phénotypes d'hémolyse l'une persistante au cours du temps et l'autre, *de novo*, brutale non décrite auparavant [233, 235]. Compte tenu de la chronologie les deux types d'anémie sont rapportés à l'utilisation de l'AS dans ce contexte (PADH au sens large).

Cependant le phénotype d'hémolyse persistante (cf. supra) est déjà connu au cours du paludisme. Ce qui est nouveau est l'hémolyse différée, à test de Coombs négatif ou non spécifique. C'est ce phénotype différé, nouvellement décrit qui semble être propre à l'AS et jamais décrit auparavant (PADH au sens strict) [108].

**Tableau 1-4.** Récapitulatif des études publiées de cas de paludismes graves d'importation traités par AS avec suivi de tolérance (incidence de l'hémolyse retardée sous AS).

Auteur, référence	Année	N avec suivi d'anémie	Conception	Détail du TTT	Descriptif	PADH <i>sensu lato</i>	Transfusion	Note
Itoda, [234]	2002	1	CC, Japon, PG, importation	AS	hémolyse persistante	1 (100%)	1(100%)	1er cas mondial rapporté, article en japonais
Morch, [171]	2008	9	PG, importation, rétrospectif, descriptif	AS+D, AS+Clinda, AS	Ok	0 (0%)	0 (0%)	pas d'effets rapportés
Bartoloni, [243]	2010	8	PG, importation, rétrospectif, descriptif	AS+Q	Ok	0 (0%)	0 (0%)	pas d'effets rapportés
CDC, [244]	2010	39	PG, USA, importation	AS, parfois Q avant	Ok	0 (0%)	dm	9 décès sur 176 PG, 4 décès traités par Q puis relais / AS
Kano, [239]	2010	4	Revue des cas japonais	AS, ACT	hémolyse différée	2 (50%)	2 (100%)	
Zoller, [233]	2011	25	PG, importation, rétrospectif, descriptif	AS	hémolyse 3 persistantes et 3 différées	6 (24%)	5 (83%)	AS première ligne 22/25
Callender, [245]	2011	1	CC, PG, importation	AS	Ok	0 (0%)	0 (0%)	pas d'effets rapportés
Kreeftmeijer-Vegter, [235]	2012	55	PG et PS, importation, rétrospectif, descriptif	AS, AS+D, AS+Clinda, parfois Q avant	hémolyse 1 persistante et 6 différées (7/55)	7 (13%)	4 (57%)	monothérapie d'AS 63% des cas
Dournon, [246]	2012	1	CC, PG, myasthénie, importation	AS	Ok	0 (0%)	0 (0%)	pas d'effets rapportés
Rolling, [230]	2012	3	CC, PG, importation	AS	hémolyse différée	3 (100%)	1 (33%)	
Eder, [247]	2012	24	PG, rétrospectif, comparatif, importation	AS IV vs. Q IV	hémolyse différée	1 (4%)	dm	que le résumé, pas pu avoir l'article
Caramello, [238]	2012	1	CC, PG, importation	AS	hémolyse différée	1 (100%)	1 (100%)	
Jarvis, [248]	2013	1	CC, PG, importation	AS	hémolyse différée	1 (100%)	1 (100%)	cas douteux dans sa nosologie
Rolling, [236]	2013	8	PG, rétrospectif, comparatif, importation	AS IV ou intra rectal vs. Q	hémolyse différée	5 (63%)	3 (60%)	premier papier qui prouve PADH lié à l'AS
Rolling, [249]	2014	72	PG, <b>prospectif</b> , enfants africains	AS	hémolyse différée	5 (7%)	1 (20%)	premier papier qui trouve des PADH en zone d'endémie
Burri, [242]	2014	201	PG, <b>prospectif</b> , enfants africains	AS	hémolyse différée et persistante	23 (11%)	4 (17%)	marqueurs d'hémolyse absents de la définition
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>453</b>				<b>55 (12%)</b>	<b>23 (42%)</b>	

N : nombre de patients de l'étude. CC : cas clinique. PG : paludisme grave. AS : artesunate. PS : paludisme simple. Q : quinine. Clinda : clindamycine. D : doxycycline. dm : donnée manquante

### **1.6.8 Approche chronologique de la perte et signification clinique des profils évolutifs de l'hémoglobine au cours de l'infection**

Une étude clinique a montré que la chronologie de la perte n'était pas uniforme. Il est estimé, au regard du taux d'hématocrite à l'état stable, après convalescence, que  $\frac{1}{4}$  de la perte survient avant traitement et les  $\frac{3}{4}$  après [189]. D'autre part, la cinétique de perte n'est pas non plus uniforme. Une partie des sous populations globulaires disparaissent rapidement, d'autres mettent plus longtemps à disparaître (uRBC, oiRBC, cf. supra). Enfin s'ajoute un facteur quantitatif (hémolyse à bas bruit ou brutale selon les mécanismes en cause) à cette perte qui module son expression clinique. Une hémolyse qui réduit de plus d'un facteur 6 la durée de vie globale des globules rouges donnera une hémolyse déclarée et cliniquement (et biologiquement) détectable. Enfin les mécanismes de production s'intensifient et concourent au remplacement de la perte globulaire. Cette phase de restauration dure 6 semaines en moyenne [189].

#### **1.6.8.1 Perte précoce**

L'analyse de la littérature permet de proposer un canevas temporel d'évolution du taux d'hémoglobine. Avant traitement une perte est déjà notée. Cette perte précoce concerne probablement les iRBC et les uRBC mais pas les oiRBC puisqu'ils semblent épargnés au début et qu'en l'absence d'artémisinine leur nombre est probablement faible (pitting naturel faible, < 5%). Par ailleurs il apparaît sous traitement que la perte en hémoglobine liée à la rupture des schizontes (iRBC), compte tenu de la durée du cycle parasitaire et de la durée des traitements, n'excède pas 7 jours au maximum [34] c'est-à-dire que l'ensemble de la perte en hémoglobine liée à la destruction des iRBC traités ou pas survient avant le 7<sup>ème</sup> jour.

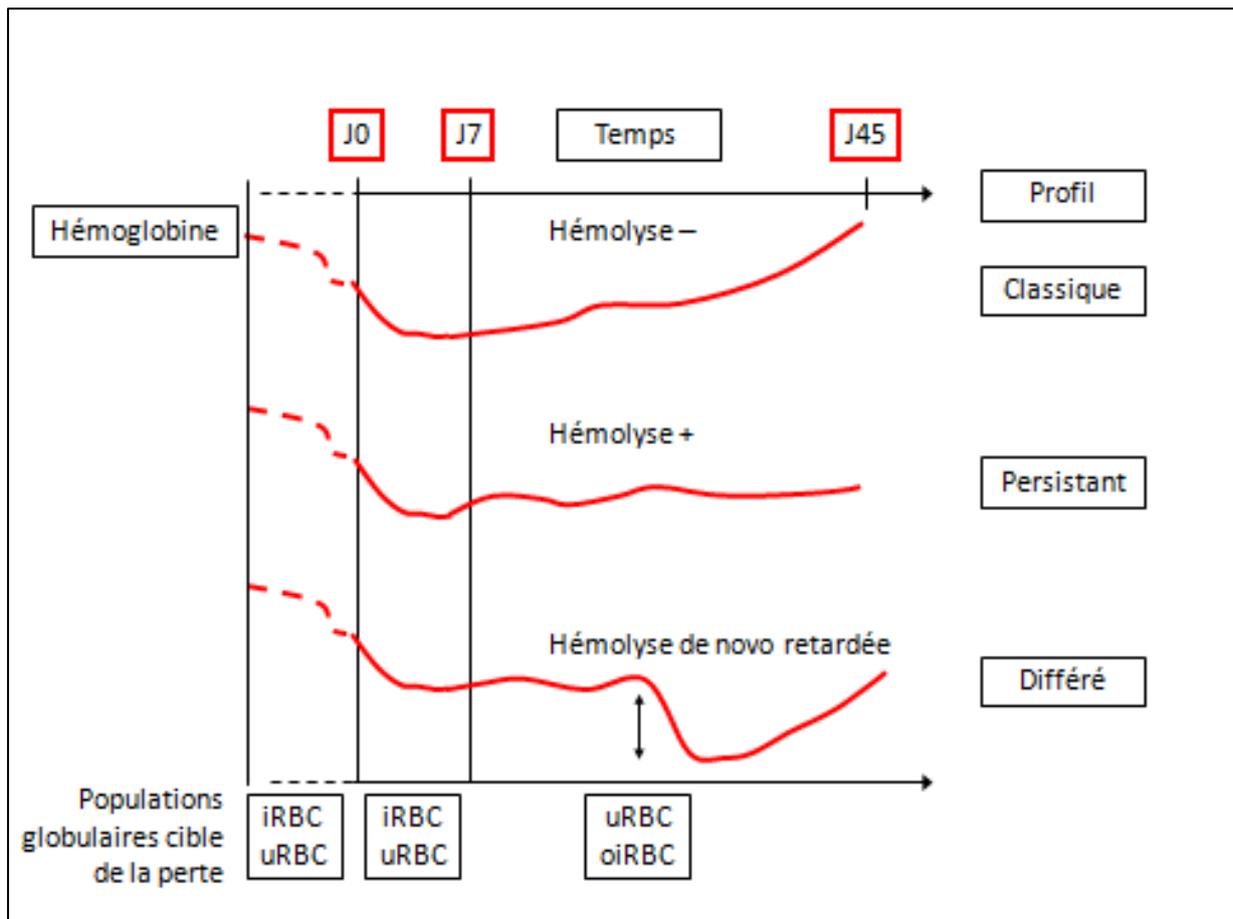
#### **1.6.8.2 Perte tardive et profils « persistant » et « différé »**

L'évolution de l'hémoglobine au cours des jours suivants sera variable selon les mécanismes de destruction globulaire et permet de définir 3 profils évolutifs :

- (i) Le profil « classique » : l'absence de facteurs surajoutés (cf. supra), de carence et une régénération médullaire adaptée faisant suite à la perte précoce (iRB, uRBC) et compensant les pertes de la phase tardive (uRBC, oiRBC) qui passeront inaperçues entrainera une récupération progressive du niveau d'hémoglobine nécessitant plusieurs semaines [189]. C'est en fait le profil le plus fréquent d'évolution. Le nadir d'hémoglobine survient au plus tard aux alentours de J7, l'ensemble de la perte globulaire ayant eu lieu auparavant.

- (ii) Le profil « persistant » : la persistance d'une hémolyse montrera une stabilité du taux d'hémoglobine puis une remontée progressive de son niveau à mesure que la production compensera la perte due à l'hémolyse de l'ensemble des populations à durée de vie raccourcies (uRBC, oiRBC). L'hémolyse dans ce cas est de type extra vasculaire à bas bruit [187, 199, 212, 233, 235]. La perte la plus importante est due à la perte précoce (nadir d'hémoglobine) et a lieu avant J7 mais la perte se poursuit après par la disparition progressive des autres populations globulaires.
- (iii) Le profil « différé » : durant l'un des deux profils précédent, la survenue d'une hémolyse intravasculaire brutale à un moment ou à un autre de l'évolution de l'accès après traitement (origine médicamenteuse, origine immunologique, rétention mécanique) montrera une baisse brutale de l'hémoglobine avec apparition ou réapparition de marqueurs d'hémolyse en rapport avec cet épisode aigu (effondrement de l'haptoglobine, montée des LDH) [210, 212, 233, 235]. Elle correspond au canevas de la PADH. C'est aussi le profil d'une AHAI tardive.

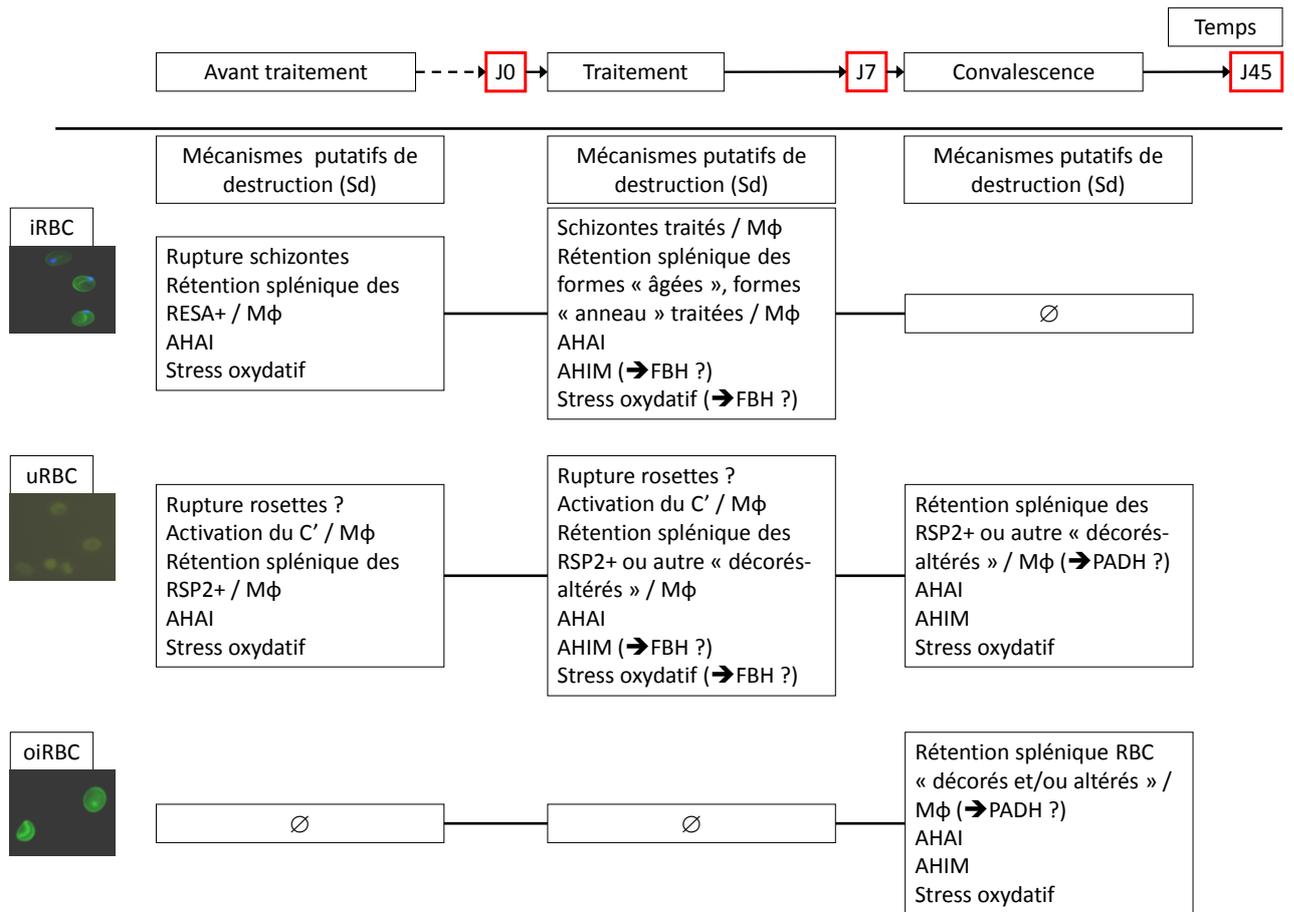
Cette dissociation descriptive permet de rendre compte des différents profils évolutifs de l'hémoglobine au cours de l'accès palustre rencontré en pratique clinique. La **figure 1-25** présente les différents profils et leur évolution temporelle.



**Figure 1-25.** Profils évolutifs d'hémoglobine et de marqueurs d'hémolyse au cours et au décours de l'accès palustre.

### 1.6.9 Analyse mécanistique et populationnelle de la perte en globules rouges

En complément de la **figure 1-25**, la **figure 1-26** présente un résumé analytique des mécanismes qui président à la perte et destruction de chaque sous-population érythrocytaire. Il est entendu que dans une perspective physiopathologique les différents évènements ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent donc coexister chez un patient donné. Les iRBC détruits initialement sont des érythrocytes infectés qui n'ont pu être pitéés. Les iRBC pitéés (devenus de fait oiRBC) sont épargnés de toute destruction, au moins au début (épargne globulaire).



**Figure 1-26.** Schéma récapitulatif des mécanismes responsables de la perte globulaire au cours de l'anémie palustre en fonction des différents types globulaires et des différentes phases de l'accès. (Sd) : syndrome. (→...): syndrome accolé à leur mécanisme supposé. C' : complément et phagocytose indépendante des anticorps. « / Mφ » : processus de destruction par interaction ligand-récepteur par les monocytes-macrophages responsables d'une hémolyse extravasculaire de globules rouges « altérés », « décorés », opsonisés. ∅ : pas de destruction globulaire de cette population. RBC : globule rouge. AHAI : anémie hémolytique auto immune. AHIM : anémie hémolytique induite par les médicaments.

## **1.7 Résumé de la problématique scientifique au démarrage de la thèse**

### **1.7.1 Points clés**

Dans une lecture holistique du problème ce nouveau phénotype d'anémie s'intègre parmi les nombreuses causes d'anémie évoquées précédemment survenant au cours du paludisme. La PADH donne naissance à une anémie hémolytique, retardée et généralement brutale (survenant en quelques jours) correspondant nécessairement à la perte de globules rouges non infectés et/ou pittés car il n'y a plus de globules rouges parasités lorsqu'elle survient (**Figure 1-25 et 1-26**). Elle ne semble pas d'origine immunologique dans la mesure où les résultats de la recherche d'AHAI/AHIM sont parfois positifs sans certitude et parfois négatifs selon les patients, en résumé non définitifs.

L'AS est supérieur à la quinine car il est actif sur les parasites vieux ou jeunes au contraire de la quinine qui n'est efficace que sur les formes âgées. L'AS tue les parasites avant leur séquestration réduisant ainsi la mortalité globale. Par ailleurs l'AS réduit la perte érythrocytaire immédiate par le phénomène d'épargne globulaire secondaire au pitting.

La PADH, n'ayant pas été décrite avec d'autres traitements, est probablement liée à l'artémisinine et à l'AS et donc très probablement à ses spécificités d'action (activité sur formes jeunes et pitting).

### **1.7.2 Impact de la PADH en santé publique à l'échelle mondiale**

L'hémolyse retardée faisant suite à un traitement par artésunate peut être responsable d'une anémie profonde et nécessiter des transfusions sanguines. Ce nouvel effet secondaire pose problème à différents niveaux. Alors que l'AS est dorénavant recommandé à l'échelle mondiale comme traitement du paludisme grave [47] la découverte de cet effet risque de ralentir voire de stopper la transition thérapeutique au détriment de la survie des malades. Le caractère tardif du phénomène entraîne des retards diagnostics pouvant avoir des conséquences médicales sérieuses, en particulier chez les patients âgés ou présentant des comorbidités. La survenue de cet effet secondaire alors que les malades ont depuis longtemps quitté l'hôpital pose problème en termes de dépistage des cas rendant leur prise en charge plus complexe surtout dans les pays à faible niveau de recours sanitaire. Par ailleurs le taux élevé de transfusions jusqu'à présent rapporté, est un risque médical surajouté dans les pays où la sécurité transfusionnelle n'est pas assurée (HBV, HIV, HCV).

L'OMS dans une note d'octobre 2013 appelle l'ensemble de la communauté médicale et scientifique à se mobiliser afin de décrire plus précisément cet effet secondaire, son épidémiologie et sa physiopathologie [250].

Par ailleurs la survenue de ce nouvel effet secondaire, à la lumière des avancées récentes sur la compréhension de la physiologie érythrocytaire et splénique au cours du paludisme pose des questions théoriques conceptuelles et techniques, sur la destruction de ces globules rouges responsables de l'anémie. La mise en évidence d'un (de) facteur(s) prédictifs et pronostics de la survenue de cet effet secondaire, reposant sur la compréhension des mécanismes à l'œuvre devient une nécessité. La mise au point d'un marqueur de risque précoce (durant les premiers jours de traitement) aura l'avantage de permettre le repérage des patients en danger de PADH. Seuls les patients à risque et non pas l'ensemble des patients pourront alors bénéficier d'un suivi rapproché et d'une prise en charge adaptée permettant un allègement du cout du suivi de tous les malades traités, à fortiori dans les pays à faible niveau de recours sanitaire.

### **1.7.3 Fréquence, gravité ?**

Les données actuellement disponibles sur la PADH sont essentiellement issues de cas cliniques et de petites séries rétrospectives (**Tableau 1-4**), sans définition précise, sans suivi médical et biologique clairement établi. Il en résulte que l'incidence réelle du phénomène, sa gravité et les facteurs prédisposants restent pour le moment mal connus. Seule l'hyperparasitémie semble associée au risque de PADH. Les deux dernières publications menées en zone d'endémie avec observation prospective semblent montrer une incidence de la PADH moindre que celle indiquée par les premières publications centrées sur les cas les plus graves survenant chez des voyageurs. Le taux de transfusion, marqueur indirect de gravité, est établi aux alentours de 40% (**Tableau 1-4**). Reposant sur le traitement des formes les plus graves et bien souvent en approche rétrospective, ce taux n'est sans doute pas conforme à la réalité et il est inconnu à l'heure actuelle.

### **1.7.4 Hémolyse chez certains : pourquoi ?**

Cette anémie hémolytique survient chez certains patients guéris de leur accès palustre traité par artésunate. La question reste posée de savoir pourquoi seuls certains patients (environ 15 à 20% des patients traités) vont pâtir de cette hémolyse et pas d'autres. Quels sont les facteurs propres aux malades, à l'infection et sa régulation, à l'action du médicament, à l'environnement qui déterminent le risque de survenue de cet effet secondaire ?

### 1.7.5 Objectifs et questions posées

L'objectif principal de mon travail de thèse a été de faire progresser la compréhension des mécanismes de la PADH. Lorsque cette démarche a démarré il était déjà clair que l'impact négatif de la PADH ne remettait pas en question la supériorité de l'artésunate IV sur la quinine, déjà prouvée par ailleurs. Une meilleure compréhension du phénomène pouvait donc aider à préserver le gain thérapeutique que constitue l'AS dans le traitement du paludisme grave. Mon travail a comporté deux approches complémentaires afin de tenter de répondre aux questions exposées ci-dessus, correspondant à une requête récente de l'OMS [250].

Quatre questions/objectifs résument la problématique :

- (i) Quelle est **l'incidence de la PADH** et son évolution au cours du temps dans une population de voyageurs traités par AS pour paludisme grave ?
- (ii) Quelle est sa **gravité et son impact** ?
- (iii) **Quel(s) sont le(s) mécanisme(s)** de cette hémolyse retardée en retenant l'hypothèse que cet effet secondaire est en rapport étroit avec le mode d'action original de la molécule mais qu'il ne se manifeste pas chez tous les patients traités par AS ?
- (iv) Quel pourrait être le **facteur prédictif de survenue** de cette hémolyse afin de sélectionner les patients les plus à risque qui pourront bénéficier d'un suivi rapproché et adapté ?

## 2 RESULTATS OBTENUS

Afin de répondre aux questions posées, le projet de thèse débuté en janvier 2011 s'est développé selon deux approches complémentaires. L'une fut épidémiologique, avec le suivi d'une population de voyageurs atteints de paludisme et traités par AS, l'autre cognitive avec l'utilisation des outils de recherche développés au sein de l'équipe d'accueil. Il s'est agi de préciser, de clarifier et d'expliquer les observations phénotypiques observées lors du suivi épidémiologique par les outils de recherche.

### 2.1 Organisation générale du travail de thèse : deux approches complémentaires

#### 2.1.1 Une approche épidémiologique

Elle a visé à identifier des facteurs prédictifs d'évolution vers les complications graves chez les patients souffrant de paludisme d'importation aigu et traités par dérivés de l'AS. Cette approche a reposé sur la mise à disposition et la diffusion de l'AS pour le traitement des accès graves, en France, sous l'égide de l'ANSM à partir de mai 2011. Au sein de l'association synergique de mon équipe d'accueil et du Centre National du Paludisme – et soutenu dans cette action par mon service clinique (Maladies Infectieuses et Tropicales dirigé par le Pr. François Bricaire puis par le Pr. Éric Caumes) – j'ai participé activement à la mise à disposition de l'AS, après accord de l'ANSM, à partir des phases opérationnelles (<http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/PUT-Specialites-soumises-a-un-protocole-d-utilisation-therapeutique/Liste-des-specialites-soumises-a-un-protocole-d-utilisation-therapeutique/MALACEF-60-mg-poudre-et-solvant-pour-solution-injectable>) ([251], **Chapitre 1.5.6**, **Annexe 4.1**). Adossé à la plateforme du CNR du Paludisme-site Pitié Salpêtrière (Dr. Thellier) nous avons mené un suivi de cohorte de ces patients sur le plan de l'efficacité et de la tolérance de ce nouveau traitement. La confirmation de la fréquence de survenue de la PADH (2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> semaine) au décours du paludisme grave traité par AS a renforcé la nécessité d'affiner le suivi épidémiologique et expérimental afin d'en clarifier le mécanisme.

#### 2.1.2 Une approche expérimentale cognitive : « pitting » et rétention splénique des globules rouges

L'accès aux données biologiques des malades en cours de traitement a permis d'explorer plus finement le comportement des populations globulaires au cours de l'accès palustre grave d'importation traité par AS par l'utilisation des outils développés par l'équipe d'accueil. Le phénomène de pitting (action d'expulsion des résidus parasitaires intraglobulaires dans ce contexte) est mis en évidence par la révélation de la présence d'une protéine membranaire Pf155 (RESA),

précocement associée à la membrane interne du globule rouge parasité, qui représente l’empreinte d’une infection récente. Le pitting naturel est déterminé *ex vivo* sur des prélèvements de patients traités par AS (**Chapitre 1.4**).

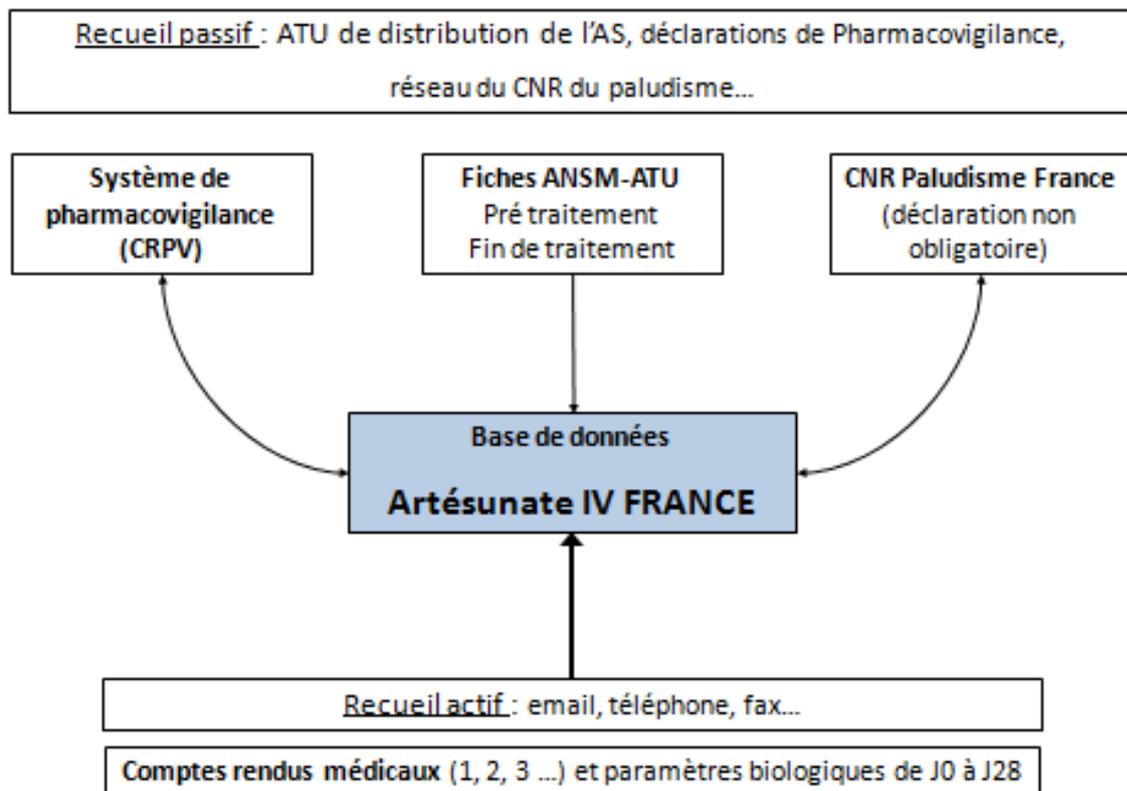
Le microsphiltre est un filtre constitué de microsphères métalliques de 5 à 25 microns de diamètre qui reproduit la contrainte mécanique imposée au globule rouge quand celui-ci franchit la fente interendothéliale splénique. La « microsphiltration » reproduit *in vitro* la perception mécanique des globules rouges par la rate. Ce dispositif permet de déterminer les taux de rétention de globules rouges (GR) anormaux circulant dans le sang des patients, ou générés en culture. L’approche, ici, vise à déterminer la valeur pronostique du taux de rétention des globules rouges parasités et non parasités prélevés avant traitement chez des patients atteints de paludisme aigu, et du taux de pitting de ces mêmes GR exposés à l’AS *in vivo* et *in vitro*. On peut quantifier en microscopie à fluorescence conventionnelle et/ou par cytométrie en flux la proportion des différentes sous populations en amont et en aval du filtre (filtrat), et calculer ainsi leur taux de rétention ou de pitting respectifs (**Chapitre 1.4**).

## 2.2 Organisation spécifique du travail de thèse

### 2.2.1 Système de recueil de l’information clinique et biologique

La **figure 2-1** résume les aspects organisationnels que nous avons mis en place depuis mai 2011 permettant un suivi de cohorte prospectif de malades traités par AS pour paludisme grave en France (**Chapitre 1.5**). Cette organisation nous a permis de constituer une base de données cliniques et biologiques de surveillance de l’AS en France. L’obtention d’échantillons biologiques via le réseau des correspondants du CNR a permis l’utilisation des outils cognitifs du laboratoire. Cette surveillance repose sur un double système de recueil d’information passif et actif. Passif, via les déclarations spontanées des informations et l’envoi des prélèvements biologiques parasitaires au CNR du Paludisme-Site Pitié Salpêtrière et des formulaires d’ATU nominative différée, de traitement, nécessaire pour l’obtention du médicament (**Figure 1-22**). Il s’y associe le cas échéant les déclarations spontanées au Centre National de Pharmacovigilance (Bénédicte Lebrun-Vignes) de tout effet secondaire ou indésirable. Actif, par la recherche complémentaire en temps réel des données cliniques et biologiques de suivi et d’évolution des malades (efficacité et tolérance). Des boucles de rétro-informations et le contrôle des doublons ont permis d’implémenter les données des différentes bases de données partenaires, au cours du temps.

Ces informations recueillies, en complément du travail de thèse, ont permis de générer des rapports de tolérance et de pharmacovigilance a destinée de la communauté médicale et des autorités de tutelle (ANSM, HCSP) [251, 252].



**Figure 2-1.** Système de recueil d'information des malades traités par AS en France.

### 2.2.2 Recueil et analyse des données cliniques, traitement utilisé

Reposant sur le système de l'ATU les données sont prospectivement collectées sur les fiches ANSM (**Annexe 4.1**) au début et à la fin de chaque traitement par les médecins en charge des malades et complétées par les compte rendus d'hospitalisation (CRH) et de consultation via l'organisation mise en place (**Figure 2.1**). Des données additionnelles sont obtenues de la part du centre de pharmacovigilance. L'âge, le sexe, le pays de naissance, le lieu de contamination, le statut immun (VIH), la grossesse, la chimioprophylaxie utilisée, l'objectif du voyage, la durée de la maladie avant traitement, le lieu de prescription de l'AS, la première ligne de traitement, la durée moyenne et la

dose totale d'AS reçue, la durée de séjour à l'hôpital, le devenir, les données cliniques et biologiques de l'accès palustre grave (**Annexe 4.1**) et les données de suivi et de tolérance ont été enregistrées. La constitution des différentes bases de données repose sur la réglementation des Centres Nationaux de Références :

(<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000810056&dateTexte=>). Les données sont collectées et enregistrées de manière anonyme.

En mai 2011 l'AS intraveineux (flacon de 60mg + solvant) devient disponible via une ATU nominative différée pour le traitement des malades atteints de paludisme grave en France (**Chapitre 1.5.6**). Le produit fabriqué en Chine (Guilin Pharmaceutical Shanghai Co., Ltd.), est importé en Europe par ACE Pharmaceuticals BV, Netherlands. Tous les patients ont reçu de l'AS intraveineux (2.4 mg/kg) à H0, H12, H24 puis une fois par jour jusqu'à la possibilité d'un relai *per os* selon les recommandations édictées en France par le groupe expert [253]. Si le patient est traité par 7 jours complets d'AS (soit 9 doses) aucun relai *per os* n'est administré.

### **2.2.3 Recueil et analyse des données biologiques standards et des marqueurs d'hémolyse**

Les résultats des prélèvements réalisés par les équipes en charge des malades traités par AS pour paludisme grave ont été recueillis. Selon les recommandations des prélèvements sanguins ont été réalisés à J0, J2(+/-1), J7(+/-2), J14(+/-3), J21(+/-3) et J28(+/-3) [251, 253]. Les données spécifiques biologiques suivantes ont été enregistrées : hémoglobine, taux de réticulocytes, bilirubine totale, glycémie, bicarbonates plasmatiques ( $\text{HCO}_3^-$ ), taux de lactates, créatinine plasmatique, urée plasmatique, taux de LDH, haptoglobine et parasitémie. D'autres variables biologiques ont pu être obtenues selon disponibilité comme les enzymes hépatiques (ASAT, ALAT), le ionogramme sanguin, des marqueurs d'inflammation (CRP, PCT), les gaz du sang (pH) mais n'ont pas fait l'objet d'une étude particulière pour le moment.

### **2.2.4 Recueil et analyse des prélèvements biologiques spécialisés au sein de l'unité : pitting *ex vivo* et évaluation du ratio S/V**

#### **2.2.4.1 Dénombrement populationnel**

Chaque fois que possible la clairance parasitaire et le taux de pitting a été déterminé pour les malades traités par AS et pour les malades encore traités par quinine intraveineuse. Pour une

homogénéité de comparaison des résultats, les différents taux (parasitémie, pitémie) ont été rapportés à une base 100. La cinétique de parasitémie est exprimée en proportion de la parasitémie initiale : (nombre de iRBC au jour Jn / nombre d'iRBC au jour J0) x 100. La cinétique des oiRBC (taux de pitting) est exprimée de manière similaire après normalisation sur la parasitémie initiale : (nombre d'oiRBC au jour Jn / nombre d'iRBC au jour J0) x 100). Cela donne une unité unique de représentation à la fois pour la parasitémie et la pitémie (pourcentage de la valeur initiale ramenée à 100% à J0).

Le nombre d'oiRBC au jour considéré a été déterminé en se basant sur le nombre d'érythrocytes totaux à H0, la parasitémie à H0 et le taux de pitting du jour considéré en utilisant la formule suivante : [Pi à H0 (%)] x [Nb de GR (giga/l) à H0] x [Taux de pitting (%) à Jn]. Pi : parasitémie initiale.

#### **2.2.4.2 Marquage et dénombrement sur lame**

Les oiRBC ont été quantifiés par technique conventionnelle sur lame utilisant l'érythrocyte membrane immunofluorescence (EMIF-mise en évidence de RESA) et la coloration de l'ADN parasite par coloration de Hoechst. Les lames d'immunofluorescence (IFA) ont été préparées selon des techniques déjà publiées [123].

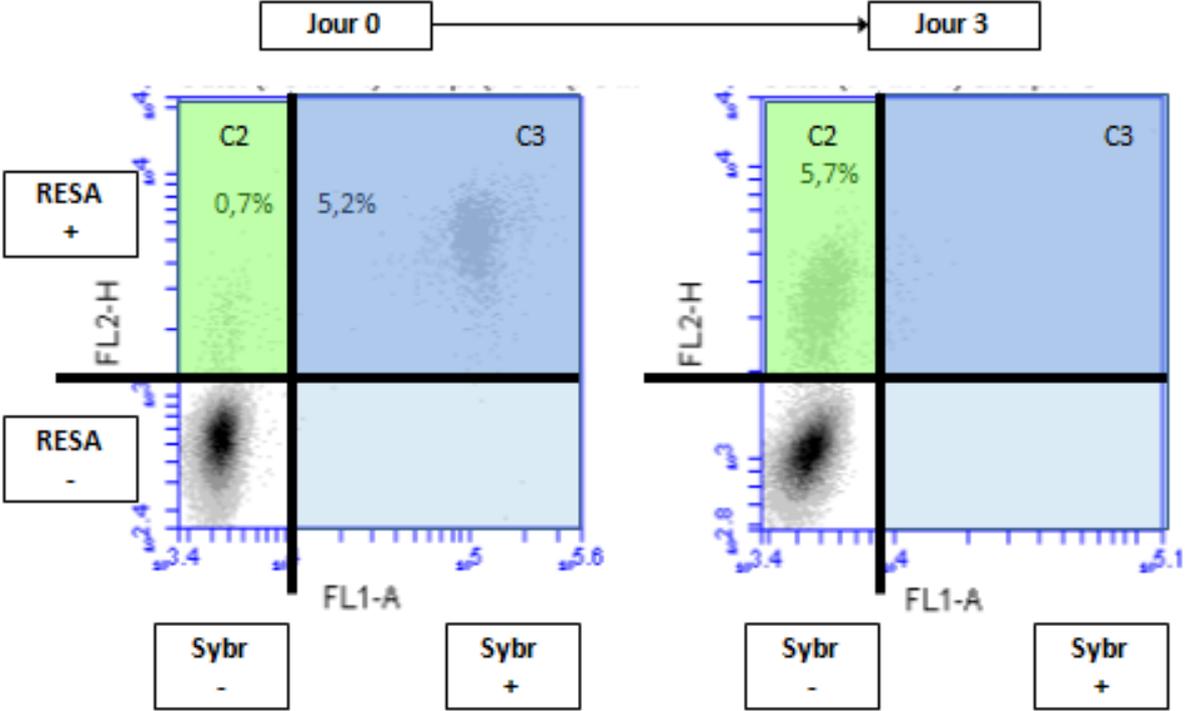
Les érythrocytes sont lavés à 3 reprises par une solution de Hanks et de tampon de Tris (TBH: 10ml 1M Tris Buffer, pH 7.2 + 90ml 0.9%NaCl + 100ml de solution de Hanks). Les érythrocytes sont déposés sur des lames d'IF préalablement cotées (coating buffer), puis fixés par une solution de glutaraldéhyde 1% dans du tampon de type PBS1X sans calcium ni magnésium. Les lames sont congelées pour conservation.

Les érythrocytes fixés sur lames sont marqués par un sérum hyper-immun polyclonal poolé d'origine africaine (concentration de 20mg/ml, Peter David, Institut Pasteur, France). Une fixation secondaire est réalisée par un anticorps anti-IgG humain d'origine animale (chèvre) couplé à un fluorochrome (Alexa-Fluor 488, Life Technology, France). L'ADN parasite est marqué par coloration de Hoechst 33342 (dilué 1/1000, Invitrogen) [114, 123]. Les images sont vues et enregistrées sur un microscope Leica DMI3000 et une caméra Leica (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France).

#### **2.2.4.3 Marquage et dénombrement par cytométrie en flux**

La parasitémie et la concentration des oiRBC ont été aussi évaluées par cytométrie en flux (Accuri C6, BD Biosciences, France). Les érythrocytes lavés sont fixés par de la glutaraldéhyde 1%, puis incubés 30 minutes dans du sérum hyper immun (1/10) dans une suspension de PBS/ALBUMAX II à 1% (Life technologies) après perméation par du Triton X100 (SIGMA). Les échantillons sont alors lavés puis mis en incubation avec un anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti IgG humaine) couplé à de l'Alexa-Fluor 568 (Life Technology) qui marque et révèle le RESA. L'ADN est marqué par du SYBR

green (Life Technology). Entre 1 et 8 prélèvements par patient ont pu être techniqués pour la détermination du pitting *ex vivo* et de la parasitémie par cytométrie en flux durant le suivi de 28 jours (Figure 2-2). Toutes les manipulations ont été réalisées à température ambiante.



A



de surface projetée des uRBC]) x 100.

### **2.2.5 Outils statistiques utilisés**

Les données démographiques, cliniques, et les données de laboratoires ont été analysées. Les variables quantitatives ont été exprimées par leur médiane et l'intervalle interquartile (IQR) ou par l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les variables qualitatives ont été exprimées en pourcentage. Les différences entre les groupes étudiés (profils d'anémie) ont été testées par test exact de Fisher pour les variables catégorielles et par test de Kruskal–Wallis pour les variables continues (test non paramétriques du fait des faibles effectifs étudiés). Le cas échéant si une différence globale était mise statistiquement en évidence, une comparaison deux à deux par test U de Mann Whitney était réalisée en appliquant une correction de Bonferroni ( $p=0,019$ ). Les études ont été réalisées sur le logiciel SPSS, version 20 pour Windows. Le seuil de significativité était entendu au seuil  $\alpha=5\%$  en hypothèse bilatérale.

## **2.3 Efficacité et tolérance de l'AS au cours du traitement du paludisme grave 2011-2013 (Annexe 4.2, article accepté à *Emerging Infectious Diseases*)**

Nous avons évalué de manière prospective durant 28 jours, l'efficacité et la tolérance de l'AS (Équipe INSERM, CNR Paludisme et ATU nominative-ANSM) chez une cohorte de voyageurs hospitalisés en France pour paludisme sévère à *Plasmodium falciparum* entre mai 2011 et mai 2013. Les données anamnestiques, cliniques, biologiques d'efficacité et de tolérance ont été recueillies avec une analyse détaillée de l'hémolyse tardive.

### **2.3.1 L'anémie au cours du paludisme grave traité par AS : une définition large**

Basé sur l'évolution de l'hémoglobine au cours du paludisme (**Figure 1-25**) nous avons utilisé une définition opérationnelle large de l'anémie dans ce contexte. L'idée a été de classer les différents phénotypes rencontrés dans une optique de simplicité, de robustesse (seuils standards) et de sensibilité, prenant en compte les patients transfusés. L'anémie est définie par une hémoglobine < 12g/dl chez la femme et < 13g/dl chez l'homme. L'hémolyse est définie par un taux d'haptoglobine plasmatique < 0.1 g/l, et/ou des LDH plasmatiques > 390 UI/l.

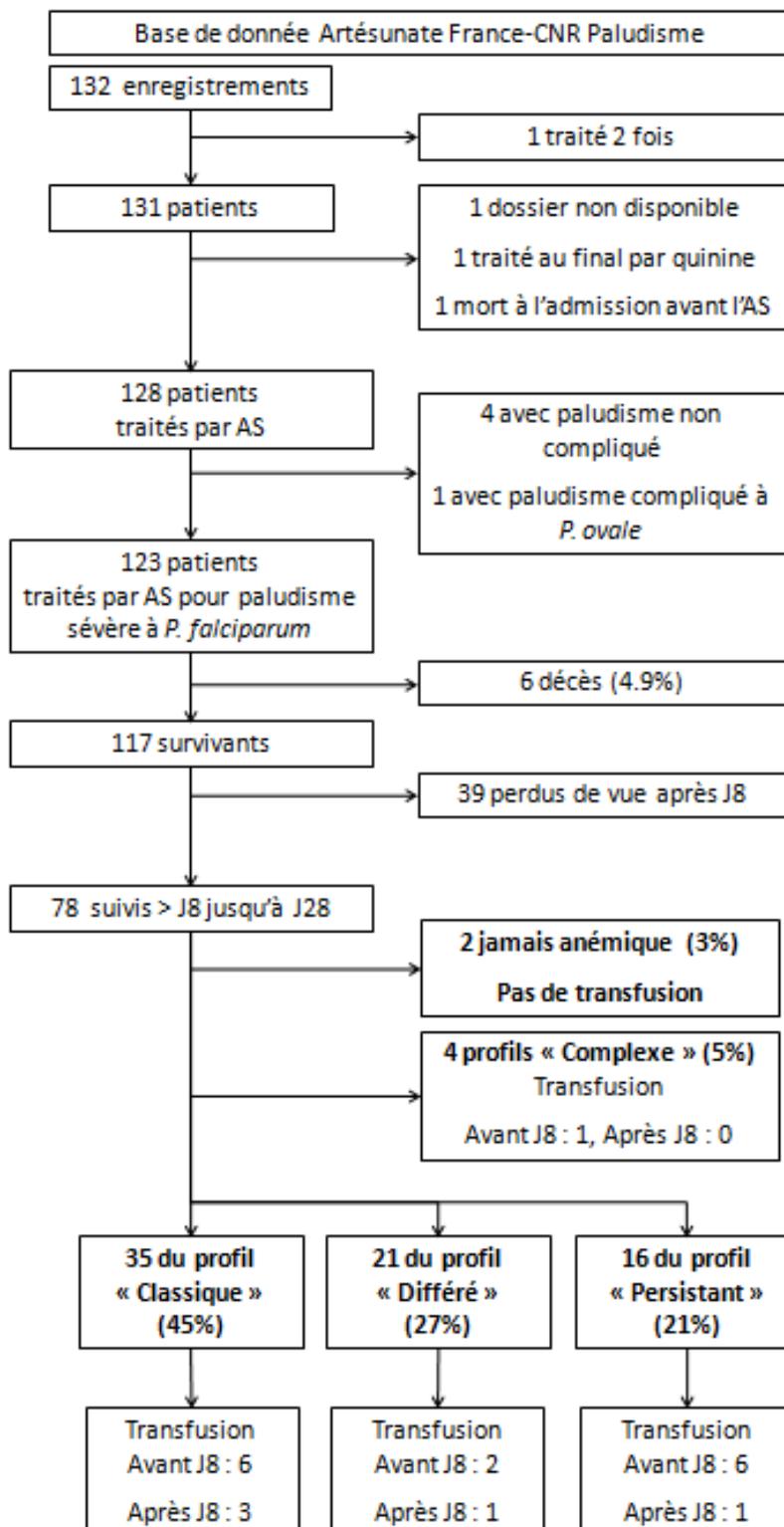
Plusieurs profils évolutifs ont été définis. Le profil « Classique » est défini par un nadir d'hémoglobine et un pic d'hémolyse survenant tous les deux avant J7 et par l'absence de marqueurs d'hémolyse après J7 ou quelque information relatant un épisode hémolytique persistant postérieur à J7 durant le suivi (compte rendu d'hospitalisation). Le profil différé (« PADH ») est défini par une chute du taux d'hémoglobine survenant après J7 et l'apparition ou la réapparition de marqueurs d'hémolyse de manière contemporaine et/ou une information écrite qualitative décrivant un épisode hémolytique *de novo* allant dans ce sens (compte rendu d'hospitalisation). Le profil « Persistant » est défini par la présence d'une anémie et de marqueurs d'hémolyses avant et après J7, et dont le profil ne cadre pas avec la définition de la PADH. Le profil « Complexe » rassemble tous les profils évolutifs ne pouvant être classés dans les 3 précédents profils ou par manque de données.

### **2.3.2 Principaux résultats d'efficacité et de tolérance générale (Annexe 4.2)**

Le logigramme de l'étude est présenté dans la **figure 2-3**. Sur 123 malades suivis, 6 sont décédés (mortalité 4,9%, IC95% [2,0%-10,8%]). Il n'y a pas eu d'effets secondaires graves. Nous avons enregistré 8 cas de cytolyse hépatique aiguë (ALAT > 250 UI/l), un prurit sous traitement, un effluvium télogène dans les suites, 2 cas de bradycardie transitoire et un allongement du QTc.

Une anémie a été diagnostiquée à un moment ou un autre chez les patients durant le suivi chez 97,4% d'entre eux, (IC95% [91,0%-99,7%]).

Le détail de données cliniques et biologiques des cas suivis et de la tolérance générale du médicament sont exposés en annexe (**Annexe 4.2**).



**Figure 2-3.** Logigramme des patients traités pour paludisme grave par AS (mai 2011-mai 2013).

### 2.3.3 Confirmation des profils évolutifs de l'hémoglobine

Le suivi de l'hémoglobine de ces patients a permis de confirmer les différents profils évolutifs au cours du temps (**Figure 2-4 A, B, C**). Tous profils confondus, 75% des transfusions sanguines (**Figure 2-3**) ont eu lieu durant les 7 premiers jours lors de la phase aiguë infectieuse. L'hémolyse tardive est survenue durant les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaines. La réticulocytose des patients au profil « Différé » est survenue de manière retardée, durant la 3<sup>ème</sup> semaine. Le taux d'hémoglobine est demeuré > 7 g/dl pour 85% des patients.

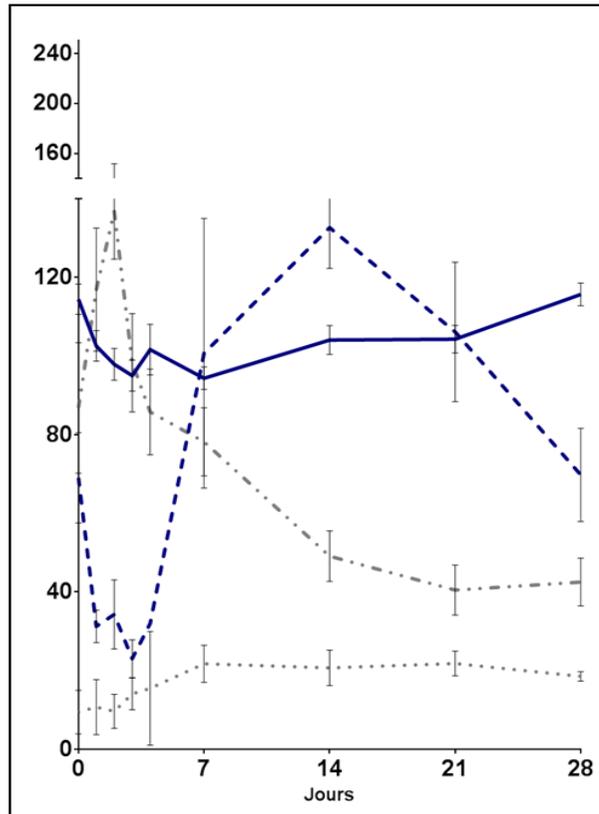
Les profils « Classique », « Persistant » et « PADH » ont été observés respectivement chez 35/78 (44,9%, IC95% [33,8%-55,9%]), 16/78 (20,5%, IC95% [11,6-29,5]) et 21/78 (26,9%, IC95% [17,1-36,8]) des patients avec un suivi clinique et/ou biologique avec ou sans transfusions au-delà de J8.

Aucun paramètre démographique, clinique ou biologique initial ne semblait associé au profil d'anémie rencontré en post-thérapeutique sauf le taux médian d'hémoglobine à H0. Celui-ci a été mesurée à 11,3 g/dl (10-13), 11,2 g/dl (9-13) et 13,6 g/dl (12-15) pour les profils « Classique », « Persistant » et « PADH » respectivement (p=0.009). En particulier, dans cette analyse, ni la dose d'artésunate ou la parasitémie initiale ne semblaient associés à un profil quelconque.

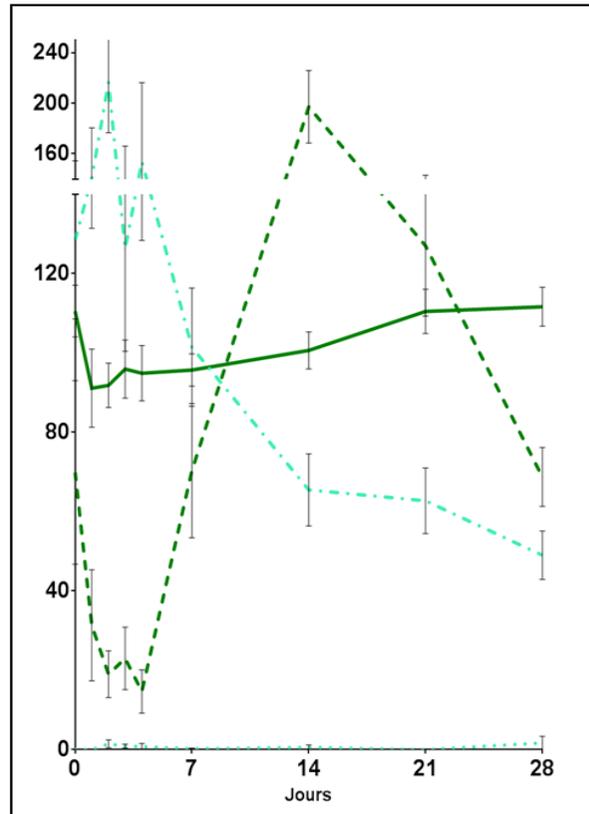
Profil « Classique » N= 35

Profil « Persistant » N=16

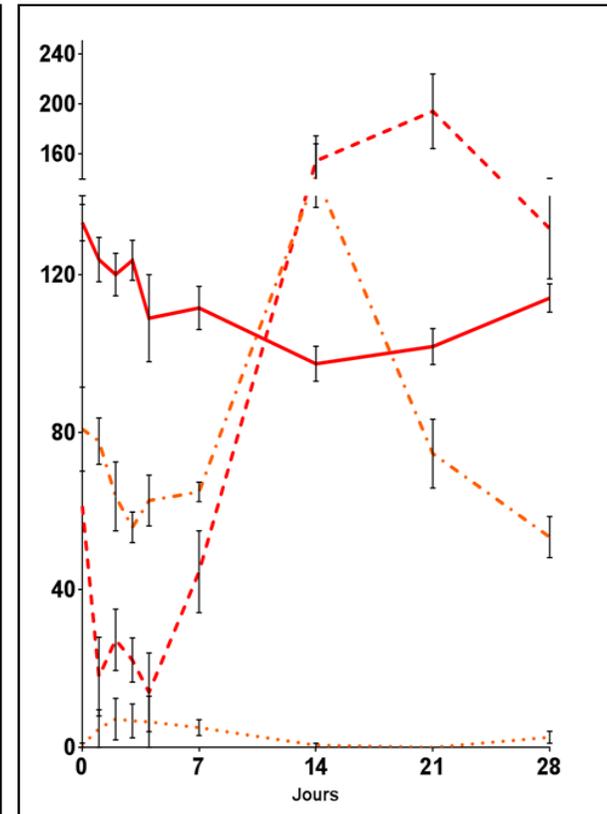
Profil « Différé » N=21



A



B



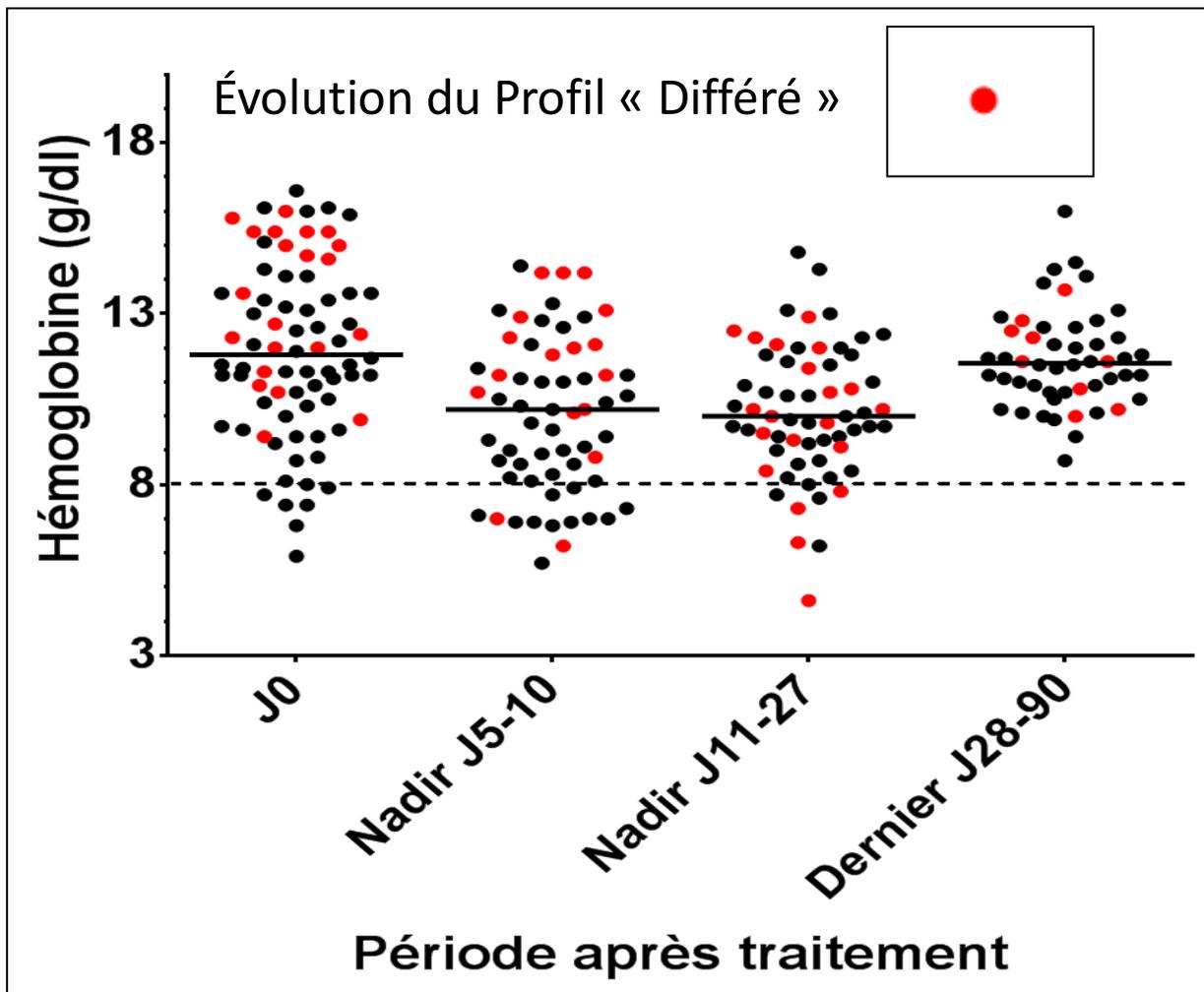
C

— Hémoglobine      -- Réticulocytes      - - LDH      ... Haptoglobine

**Figure 2-4.** Profils évolutifs de l'hémoglobine, du taux de LDH, du taux d'haptoglobine, et du nombre de réticulocytes en fonction du temps pour les différents profils d'anémie chez une cohorte de patients traités pour paludisme grave par AS (France 2011-2013). Hémoglobine (dg/l) en moyenne (SEM), Réticulocytes (giga/l) en moyenne (SEM), LDH/10 (UI/l) en moyenne (SEM), Haptoglobine x 15 (g/l) en moyenne (SEM).

### 2.3.4 Clarification de la PADH : fréquence, importance et impact

Sur 78 patients suivis au-delà de 8 jours, l'anémie hémolytique différée de type PADH (**Figure 2-4 C**) a été diagnostiquée 21 fois (27%). Elle a requis 1 transfusion (4,8%, IC95% [0,1%-23,8%]) après J8 pour un patient au chiffre d'hémoglobine de 6,3 g/dl. Le taux d'hémoglobine a été < 7 g/dl dans environ 15% des cas (14,3%, IC95% [3,1%-36,3%]). La perte médiane d'hémoglobine au cours de cette hémolyse entre J7 (+/-2) et J14 (+/-3) est de 1,3g/dl mais avec des valeurs extrêmes d'hémoglobine résultantes allant de 4,6 à 12,9 g/dl à J14 (+/-3). Aucun patient n'est décédé de cet effet secondaire. Parmi les patients qui auront un nadir d'hémoglobine entre J11 et J27 inférieur à 8g/dl, 50% appartenaient au groupe différé (4/8 patients, **Figure 2-5**).



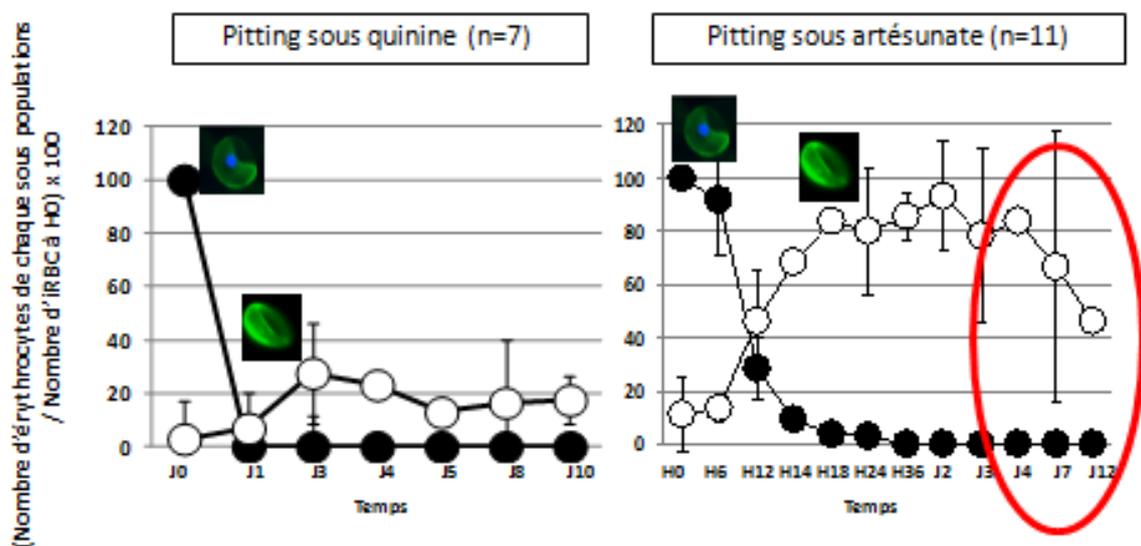
**Figure 2-5.** Évolution au cours du temps du taux d'hémoglobine (N=72). Les points rouges représentent les nadirs des taux d'hémoglobine des patients (chaque point = une mesure de patient) du groupe différé (PADH), par période de temps. Les points noirs représentent les nadirs des taux d'hémoglobine des patients non-PADH.

### 2.3.5 En résumé de cette 1<sup>ère</sup> étude

Bien que non comparative, cette étude observationnelle a confirmé le bénéfice thérapeutique général de l'artésunate intraveineux. Nous avons proposé l'individualisation de trois profils évolutifs du taux d'hémoglobine et de marqueurs d'hémolyse au décours du paludisme grave traités par artésunate intraveineux et proposé des seuils quantitatifs objectifs du profil PADH. Nous avons confirmé que les épisodes d'hémolyse différée, fréquents, ne sont potentiellement graves que chez 15% des patients ne remettant pas en cause la supériorité de l'artésunate sur la quinine. Par ailleurs la baisse médiane d'hémoglobine demeure faible (-1,3 g/dl) et le taux de transfusion a été beaucoup plus rare que précédemment décrit (5%).

## 2.4 Premiers résultats de l'évaluation du pitting *ex vivo* en 2011 : l'hypothèse principale de la perte

La comparaison de l'évolution de la parasitémie et de la pittance des tous premiers patients pris en charge, traités par quinine ou AS (**Figure 2-6**) a fait constater deux éléments : (i) le taux de pitting n'atteint des valeurs importantes (> 40%) que sous AS en comparaison de la quinine et ce avant 48h-72h de traitement (le pic du nombre de pittés survient avant 48h-72h), et (ii) le profil de disparition des pittés entre J7 et J12 (ellipse rouge) correspond grossièrement au moment de survenue de l'hémolyse tardive (PADH). Cette observation a fait supposer que la disparition différée des globules rouges pittés pouvait expliquer pour tout partie la perte globulaire observée lors de l'anémie post AS.



**Figure 2-6.** Suivi de la parasitémie et de la pittance (« pitting » *ex vivo*) des tous premiers patients traités pour paludisme grave par artésunate ou quinine en France (données préliminaires non publiées, UMRs945, 2011-2012). Cercles noirs : parasitémie. Cercles blancs : pittance.

## 2.5 Explications physiopathologiques de la perte globulaire lors de la PADH (Annexe 4.3, article publié [254])

Utilisant le même canevas d'étude et l'organisation mise en place, nous avons évalué de manière prospective durant 28 jours, l'évolution du taux d'hémoglobine (avec une définition stricte de l'anémie) et du pitting chez une cohorte de voyageurs hospitalisés en France pour paludisme sévère à *P. falciparum* et traité par AS entre mai 2011 et mai 2013. Le travail s'est focalisé sur l'évolution de la parasitémie, du taux de pitting et de la variation du nombre d'oiRBC sous traitement par AS en fonction du profil d'anémie.

### 2.5.1 Approche physiopathologique : une définition stringente

Dans une optique physiopathologique nous avons utilisé ici une définition dite « stringente » ou stricte par opposition à la définition dite « large » précédemment utilisée pour définir les différents profils d'anémie (**Chapitre 2.3.1**). L'idée a été de classer les différents phénotypes d'anémie rencontrés dans une optique de gain de spécificité (pour le phénotype PADH) en ne prenant pas en compte les patients transfusés d'une part et en utilisant systématiquement une définition chiffrée de la perte globulaire et de l'hémolyse d'autre part. Nous n'avons pas pris en compte les patients transfusés afin de comprendre les variations quantitatives des différentes sous-populations globulaires des différents groupes sans être perturbés par l'apport d'érythrocytes exogènes.

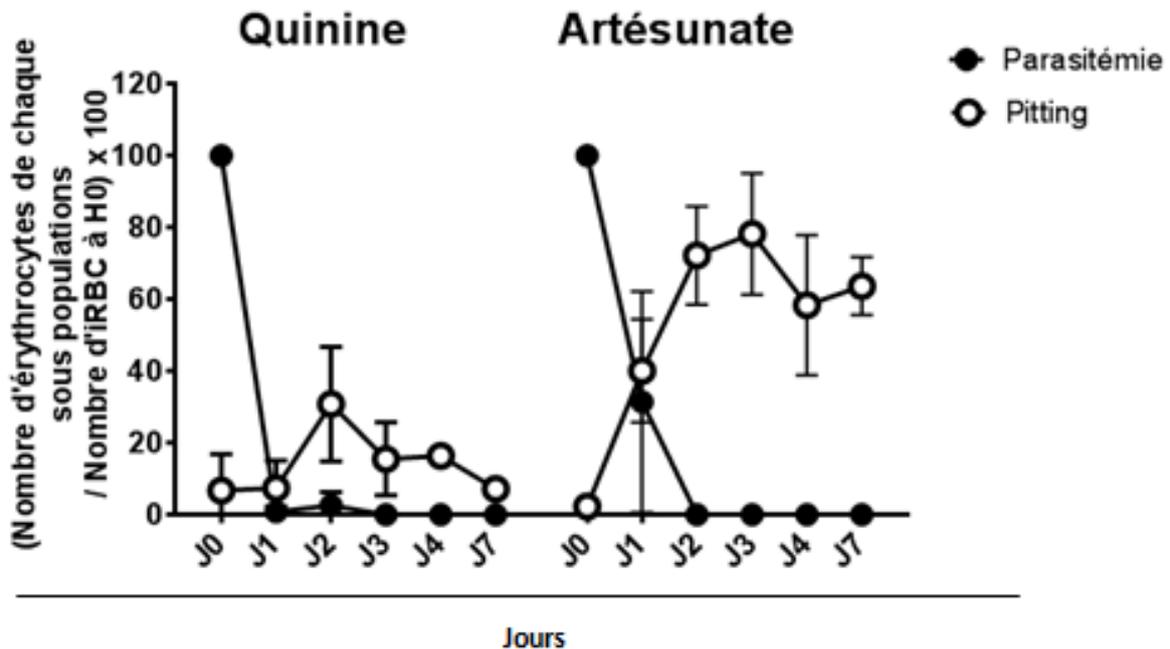
L'anémie est définie par une hémoglobine < 12g/dl chez la femme et < 13g/dl chez l'homme. L'hémolyse est définie par un taux d'haptoglobine plasmatique < 0,1 g/l, et/ou des LDH plasmatiques > 390 UI/l. Le profil « Classique » est défini par un nadir d'hémoglobine et un pic d'hémolyse avant J8 et l'absence de marqueurs d'hémolyse après J8. Le profil différé et par extension le profil « PADH » est défini par une chute du taux d'hémoglobine > 10% et/ou l'augmentation du taux de LDH > 10% survenant à n'importe quel moment entre J8 et la fin du suivi. Le profil « Persistant » est défini par la présence d'une anémie et l'existence de marqueurs d'hémolyses avant et après J8, et dont le profil ne cadre pas avec la définition de la PADH. Le profil « Complexe » rassemble tous les malades dont le profil d'anémie ne peut être classé dans les 3 précédents profils.

### 2.5.2 Population étudiée et facteurs associés à la PADH

Sur les 60 patients suivis jusqu'à J28 et sans transfusions, le profil « Classique », « Persistant » et la PADH ont été diagnostiqués dans 32% (19/60), 17% (10/60), et 22% (13/60) des cas respectivement. L'analyse comparative des données démographiques, cliniques, et biologiques a montré que l'importance de la parasitémie était associée au phénotype PADH. La médiane de parasitémie à l'admission de ce groupe est de 8% comparativement à 3,9% et 2,4% pour les profils « Persistant » et « Classique » respectivement ( $p=0,013$ ) (**Figure 2-8**). La proportion des patients hyperparasitémiques (> 4%) dans le groupe PADH (92%) est plus élevée que dans le groupe « Classique » (37%) et « Persistant » (50%) ( $p= 0,006$ ). Le taux d'hémoglobine à l'admission du groupe PADH est plus élevé que dans les autres groupes hémoglobine (13,6 g/dl vs. 11,4 g/dl et 11,8 g/dl pour les groupes PADH, « Classique » et « Persistant » respectivement).

### 2.5.3 Confirmation d'un effet propre à l'AS par rapport à la quinine

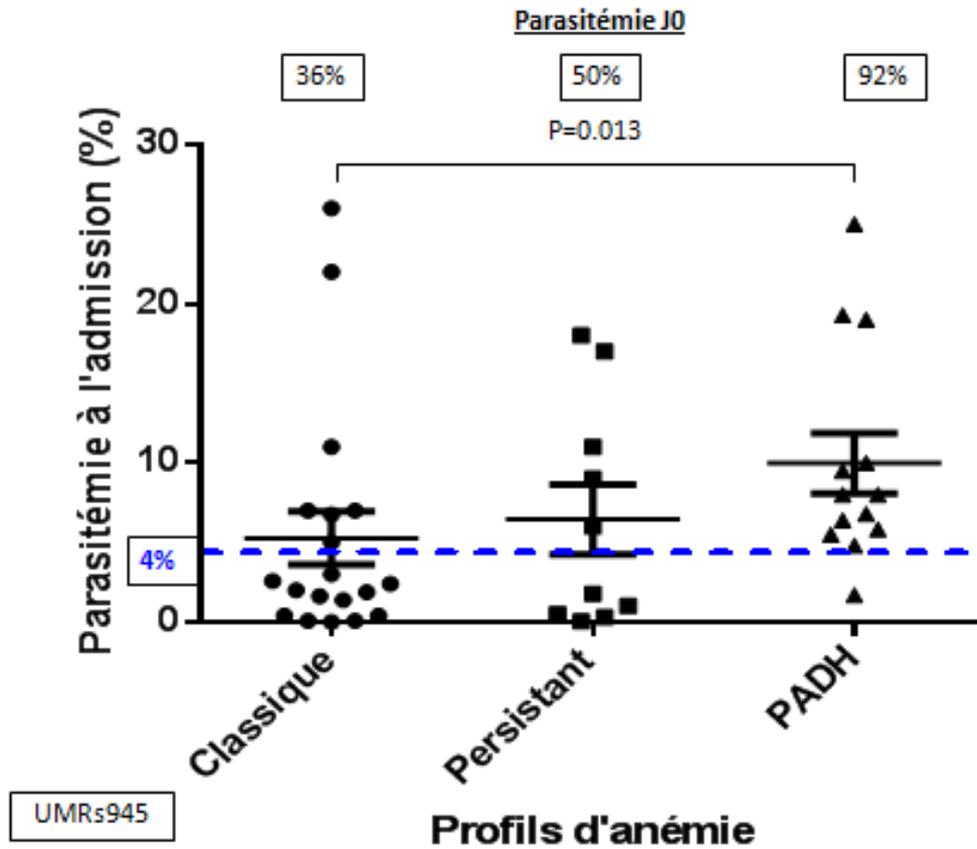
La **figure 2-7** montre le taux pitting comparé entre 11 patients traités par quinine (environ 40% des patients en France au moment de l'étude) et 16 traités par AS. Le pitting est un effet beaucoup plus marqué sous artésunate que sous quinine. Bien que plus élevé en moyenne dans le groupe sous artésunate, le taux de pitting est éminemment variable (comme en témoigne l'erreur standard à la moyenne-SEM).



**Figure 2-7.** Évolution de la parasitémie et de la pitiéme chez 11 patients traités par quinine et 16 patients traités par AS. Moyennes de taux et SEM. Le taux de pitiéme atteint son maximum à J3 pour une valeur de 80% sous AS. Il ne dépasse pas 35% sous quinine.

### 2.5.4 Hyperparasitémie à l'admission : une condition nécessaire pour le risque de PADH mais non suffisante

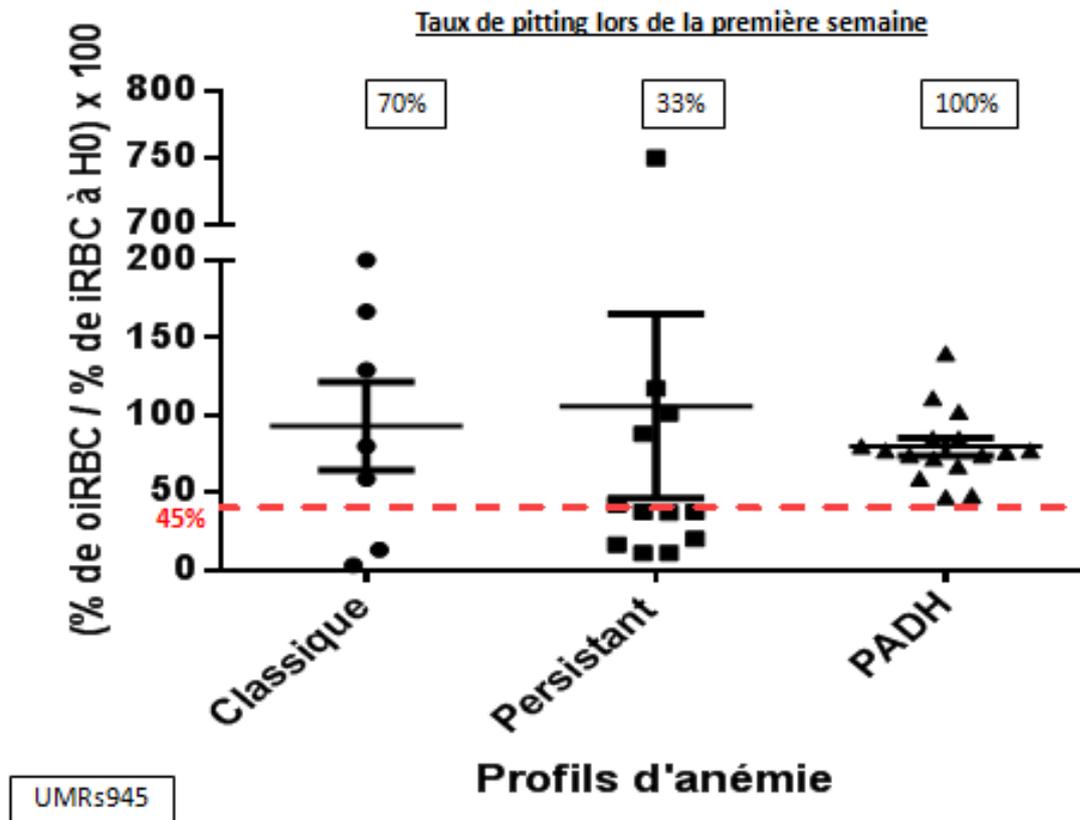
La **figure 2-8** montre que si 92% des patients avec une PADH ont eu une parasitémie importante (>4%) à l'admission, certains patients des autres groupes peuvent aussi avoir des parasitémies élevées à H0, sans hémolyse tardive. La parasitémie semble liée au risque de PADH mais ne semble pas être le facteur unique de risque.



**Figure 2-8.** Répartition des parasitémies à l'admission avant traitement en fonction des profils d'anémie. « Classique » N= 19, « Persistant » N=10, PADH N=13. La parasitémie dépasse 4% dans 36%, 50% et 92% des cas dans les groupes d'anémie « Classique », « Persistant » et PADH, respectivement.

### 2.5.5 Taux de pitting élevé à l'admission : une condition nécessaire pour le risque de PADH mais non suffisante

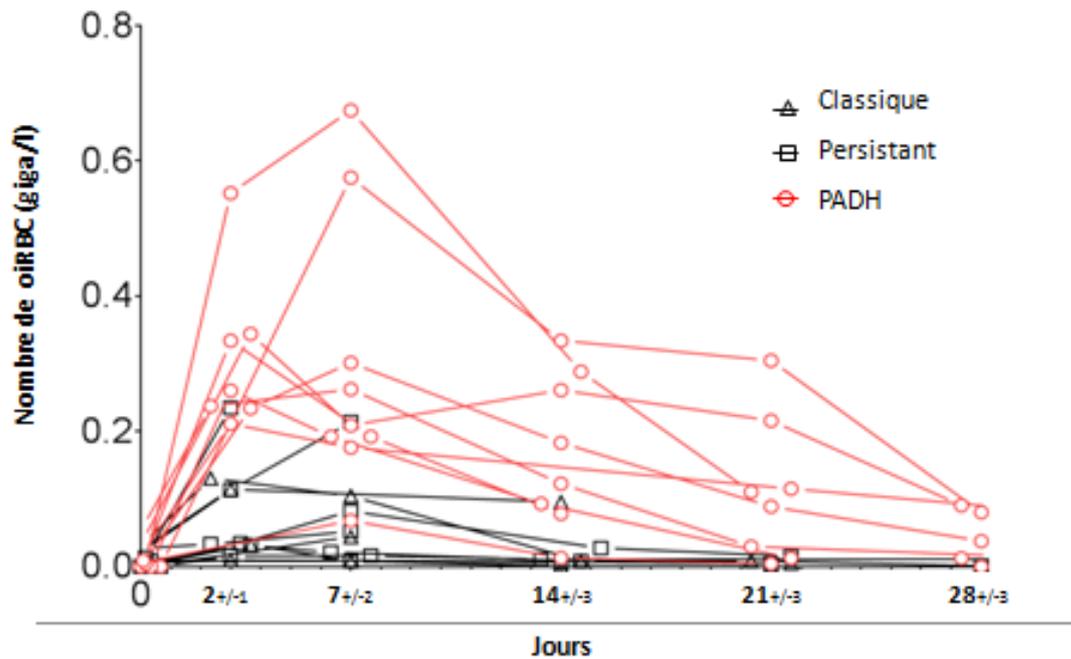
La **figure 2-9** montre les taux de pitting des différents groupes d'anémie. Des taux élevés sont retrouvés dans les différents profils évolutifs d'anémie. Dans le groupe PADH, 100% des taux de pitting ont été supérieurs à 45%. Ce taux constitue un seuil probablement nécessaire au risque de survenue de la PADH mais non suffisant.



**Figure 2-9.** Taux de pitting de la première semaine en fonction des différents profils d'anémie. Le taux de pitting dépasse 45% dans 70%, 33% et 100% des cas dans les groupes d'anémie « Classique », « Persistant » et PADH, respectivement.

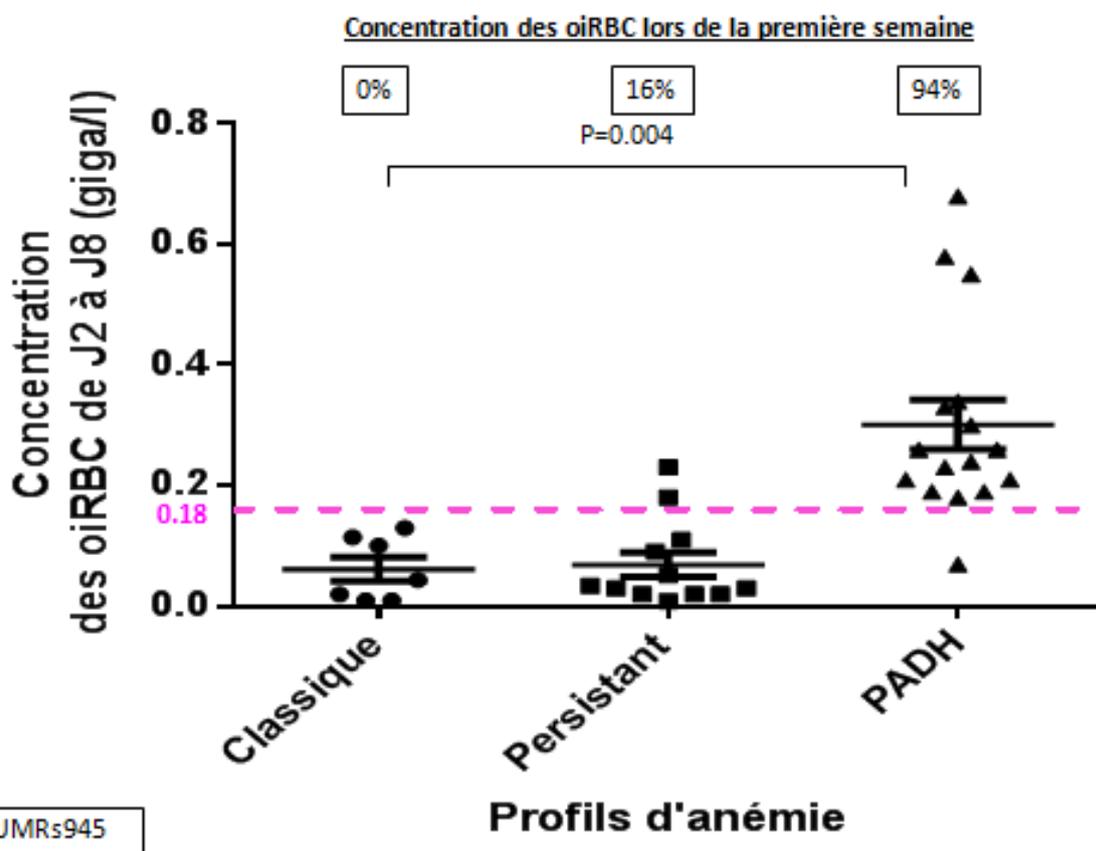
### 2.5.6 Le nombre en valeur absolu d'oiRBC est corrélé au risque de PADH

La détermination du nombre en valeur absolue (concentration) des oiRBC au cours du temps a révélé deux éléments importants : (i) la période d'élimination prédominante des oiRBC était contemporaine de l'apparition de l'hémolyse de type PADH ce qui n'était pas observé au cours des autres profils évolutifs (**Figure 2-10**) et, (ii) le pic d'oiRBC généré semblait étroitement corrélé au risque de PADH. Il était systématiquement supérieur à 0,18 giga/l durant la première semaine.

Suivi des oiRBC au cours du temps

**Figure 2-10.** Évolution au cours du temps de la concentration des oiRBC. La courbe d'évolution des oiRBC du groupe PADH suit la disparition des globules rouges lors de l'hémolyse tardive (2<sup>ème</sup>-3<sup>ème</sup> semaines). Le plus grand nombre d'oiRBC générés (pic et aire sous courbe) appartient au groupe PADH.

En analyse populationnelle, les plus fortes concentrations d'oiRBC durant la première semaine sont systématiquement (à 94%) retrouvées associées au phénotype PADH (**Figure 2-11**). Une concentration d'oiRBC supérieure à 180 millions d'oiRBC par litre de sang au cours de la première semaine post-traitement aurait prédit le risque de survenue PADH avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 83%.



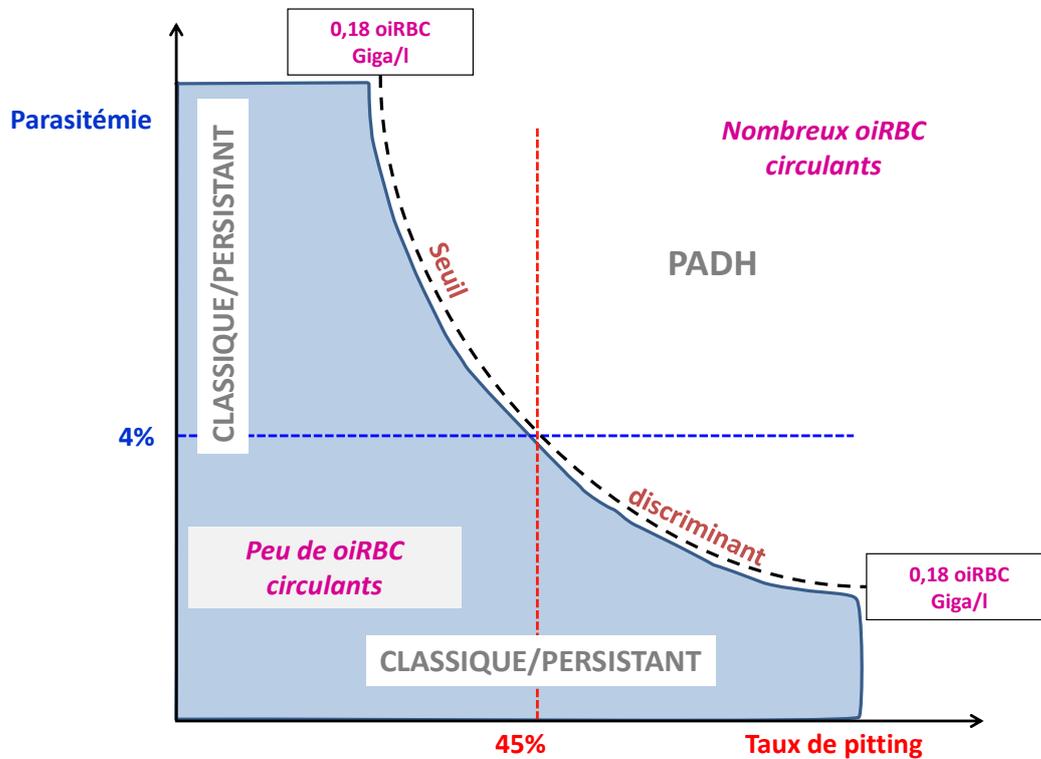
**Figure 2-11.** Concentration des oiRBC durant la première semaine en fonction des différents profils d’anémie. La concentration d’oiRBC dépasse 0,18 giga/l dans 0%, 16% et 94% des cas dans les groupes d’anémie « Classique », « Persistant » et PADH, respectivement.

## 2.5.7 Canevas général explicatif du risque de PADH (Figure 2-12)

### 2.5.7.1 Synthèse des résultats de notre étude

Le taux maximum de pitting sous AS est atteint en moins de 48h. Les valeurs du taux de pitting et de la parasitémie semblent corrélées au risque de survenue d’une anémie de type PADH. L’analyse de la décroissance de l’hémoglobine et des globules rouges pittés chez des patients traités montre un parallélisme temporel contemporain de l’élévation des marqueurs d’hémolyse comme l’augmentation des LDH et l’effondrement de l’haptoglobine. La détermination de la pitiéme au cours du temps et du nombre d’oiRBC générés en regard des différents phénotypes d’anémie a montré que le risque de PADH était étroitement lié au nombre en valeur absolue d’oiRBC générés lors du traitement du patient par AS. Deux éléments interviennent dans la génération des oiRBC : la parasitémie initiale et la proportion d’iRBC pittés. Nos observations suggèrent donc fortement que la PADH survient si un grand nombre de globules rouges pittés ont été générés en début de traitement.

La **figure 2-12** résume les différents éléments intervenant dans la genèse de la PADH et rend compte des différentes situations cliniques d'anémie.



**Figure 2-12.** Canevas général explicatif du risque de PADH. Deux éléments sont nécessaires pour la génération de nombreux oiRBC : une parasitémie initiale > 4% et un taux de pitting > 45%. Zone bleue : toute situation de faible génération d'oiRBC donnant lieu à des phénotypes d'anémie non-PADH. La PADH est caractérisée par un nombre d'oiRBC > 180 millions/l durant la première semaine, dans ce travail.

### 2.5.7.2 Une hypothèse de la cause de la clairance des oiRBC : une surface cellulaire réduite

L'analyse en AMNIS (réalisée par le Dr Roussel) a montré sur 4 prélèvements (issus de 4 patients différents), que la diminution moyenne de surface projetée des iRBC était de 3% (de 1,7% à 4,5%) par rapport aux uRBC. Au troisième jour après le début du traitement, la réduction de surface des oiRBC, comparée aux uRBC du même échantillon, était de 8,9% (de 4,6% à 12,5%). Sur ce petit échantillon, l'infection globulaire en elle-même (-3%) puis le pitting ont entraîné respectivement une réduction de surface globulaire totale de 8,9%.

### 2.5.8 En résumé de cette 2<sup>ème</sup> étude

Cette deuxième partie de travail apporte des informations sur le lien entre l'hémolyse différée (perte post-thérapeutique retardée d'érythrocytes) et la perte des globules rouges pittés (oiRBC). Ces deux phénomènes ont semblé au moins en partie synchrones. Le nombre d'oiRBC généré sous traitement par AS dépend de la parasitémie initiale et du taux de pitting (efficacité du pitting) lors de la première semaine (le maximum étant atteint en général vers J2-J3). La perte de surface représente une hypothèse explicative de cette perte, amenant à une réduction de S/V et une rétention splénique mécanique survenant aux alentours de la 2<sup>ème</sup>-3<sup>ème</sup> semaine.

## 2.6 Une étude de rétention sur « microsphiltre »

En marge de l'approche principale nous avons observés le comportement biomécanique de différentes populations globulaires parasitées ou non, *in vitro* (culture) et *ex vivo* (sang de patient) au travers du filtre de microbilles (**Chapitre 1.4.4.1**), avant traitement anti paludique. L'objectif était de mesurer le taux de rétention de populations globulaires parasitées (iRBC) ou non (uRBC) mais issues d'un même environnement (uRBC prélevés de manière contemporaine aux iRBC issus soit de la culture de la lignée parasitaire FUP ou de sang de patient souffrant d'un accès à *P. falciparum*).

### 2.6.1 Plan de manipulation

Nous avons utilisés du sang de culture plasmodiale (souche FUP, N=9), du sang de patient (fond de tube) pris en charge pour paludisme (grave ou non, N=12). Le sang contrôle était constitué de sang O<sup>-</sup> de donneur sain, daté de moins de 7 jours (Convention EFS).

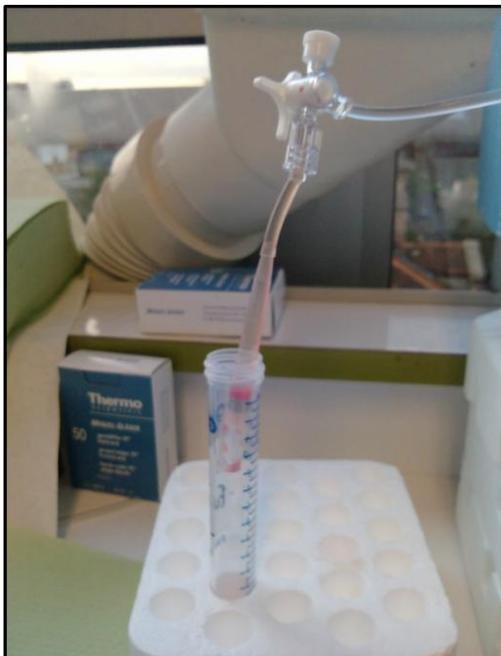
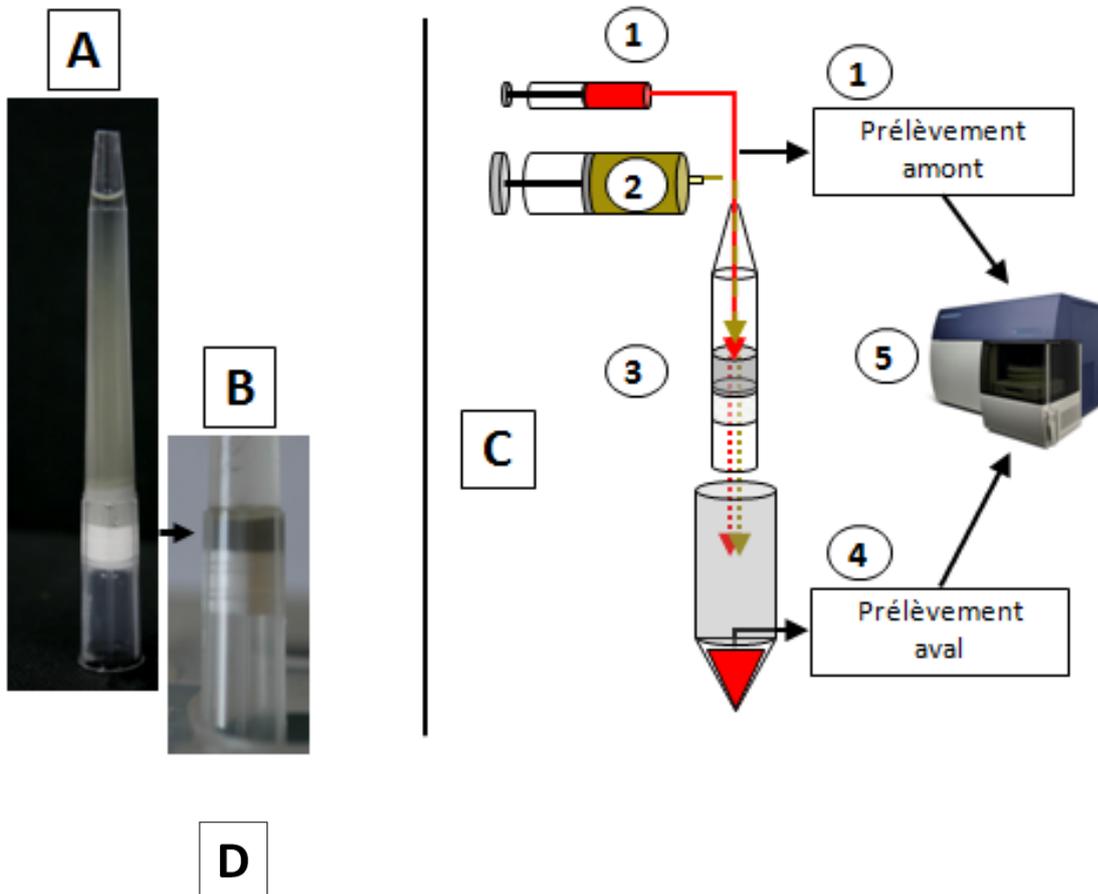
#### 2.6.1.1 Marquage globulaire

Les globules rouges après lavage et déleucocytation (RPMI), issus de culture, de patient ou de contrôles sont marqués par du PKH67 (marqueur de membrane cellulaire). Les populations globulaires (iRBC et uRBC) ainsi marquées sont mélangées à une population d'érythrocytes de donneur sain non marqués dans une proportion de 1/9. Après la phase de filtration (microsphiltre) les mélanges sont marqués par coloration de Hoechst 33342 (dilué 1/100, Invitrogen) afin de révéler l'ADN parasite (au sein des iRBC), après une phase de fixation et perméation par une solution de glutaraldéhyde à 1%. Après incubation (5 minutes), et lavages (PBS) on procède à la lecture des prélèvements d'amont et filtrats d'aval par cytométrie en flux (FACSDiva, plateforme de cytométrie, Pitié Salpêtrière).

#### 2.6.1.2 Microfiltration sur billes

Selon la méthode de fabrication publiée [125, 150], une filtration en *duplicate* a été réalisée. Les filtres ont été constitués d'un mélange 50/50 de billes métalliques (constituées d'étain 95,5%, d'argent 3%, de cuivre 0,5%) calibrées (IPS Industrie des Poudres Sphériques) de diamètre 5-15 µm et 15-25µm déposé sur un filtre anti-aérosol de pointes de pipettes commerciales de 1000 µl. Le filtre est d'une épaisseur de 5 mm. L'échantillon (hématocrite 1% dans du PBS Albumax1%) est introduit dans le cône inversé de la pointe de pipette et poussé à débit constant (60 ml/h) au travers du filtre de microbilles par une seringue électrique (Syramed sp6000, Arcomed). La récupération des filtrats d'amont et d'aval permet leur analyse au cytomètre en flux (**Figure 2-13**). Le contenu du filtre de microbilles après expériences n'a pas été analysé.

## Microfiltration : assemblage



**Figure 2-13.** Système de microfiltration sur billes métalliques qui reproduit la contrainte mécanique des fentes interendothéliales spléniques (adapté de [125]). **(A)** Filtre constitué d'une pointe de pipette. **(B)** Filtre de microbilles de 5 mm d'épaisseur formé d'un mélange 50/50 de billes d'un diamètre de 5-15 µm et 15-20 µm (détail). **(C)** Système monté. Il permet l'analyse du contenu de l'échantillon en amont du filtre (①-avant le passage splénique) et en aval (④-après le passage splénique), ② débit propulsif entrant, ③ filtre à microbilles, ⑤ cytomètre. **(D)** Système en fonctionnement (photos).

### 2.6.1.3 Mode calculatoire

En utilisant le dénombrement populationnel par cytométrie de l'échantillon d'amont et d'aval (proportions relatives des iRBC et des uRBC marqués ou non en amont et en aval), il est possible de calculer les différents taux de rétention des sous populations. La formule utilisée a été la suivante :

Taux de rétention (TR) en % pour chaque population globulaire considérée =

$$[(\%GR^* \text{ en amont du filtre} - \%GR^* \text{ en aval du filtre}) / (\%GR^* \text{ en amont du filtre})] \times 100,$$

avec GR\* = globule rouge marqué (PKH67 ou Hoechst).

Le taux normalisé de rétention est défini par le taux de rétention de la population considérée diminué du taux de rétention du contrôle négatif (marge d'erreur de la mesure du TR du contrôle négatif systématiquement retranchée pour chaque expérience).

### 2.6.1.4 Contrôles positifs et négatifs

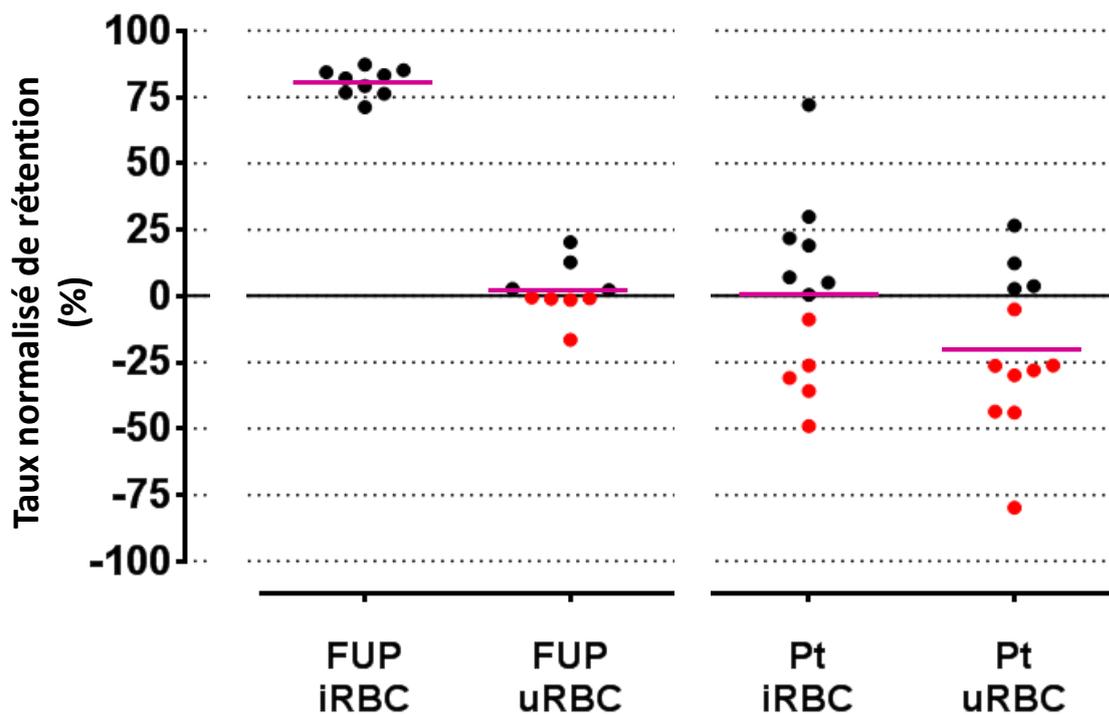
Le contrôle négatif était constitué d'uRBC sains de donneur. Le TR attendu pour cette population est < 10% en valeur absolue. Le contrôle positif était constitué d'uRBC sains de donneur, chauffés à 50° pendant 30 minutes (rigidification irréversible). Le TR attendu est > 90%. Seules les expériences vérifiant ces deux critères de validité, en *duplicate*, ont été conservés pour l'analyse.

## 2.6.2 Résultats

Sur les 12 patients étudiés, 7 présentaient un accès palustre grave et 5 un accès simple. Les migrants rendant visite à leur famille, les expatriés vivant en zone d'endémie et les touristes étaient au nombre de 8, 3 et 1 respectivement. La parasitémie initiale moyenne déterminée par cytométrie en flux a été de 9,5% (IC95% [4,3%-14,6%]) pour les prélèvements de cultures FUP et de 5,5% (IC95% [0,2%-10,8%]) pour les prélèvements de patients. Les formes parasitaires étaient essentiellement au stade trophozoïte pour prélèvements issus de FUP et stade annulaire pour les prélèvements issus de patients. Le coefficient de corrélation  $r^2$  entre la parasitémie des patients déterminée par cytométrie

et la parasitémie déterminée par lecture classique sur lame après coloration (Giemsa) a été estimée à 0,94. La cytométrie a tendance à sous-estimer la parasitémie par rapport à la lecture sur lame.

La **figure 2-14** montre les taux normalisés de rétention par type d'échantillon. La moyenne du taux normalisé de rétention des iRBC de patient est calculée à 0,4% (IC95% [-20,9% - +21,7%]). Ce qui traduit l'absence de rétention ou l'enrichissement du prélèvement d'aval (rétention négative). La moyenne du taux normalisé de rétention des uRBC de patient est calculée à -19,7% (IC95% [-1,7 - -38,7%]). Cela traduit un enrichissement relatif de l'aval en uRBC provenant de patients infectés.



**Figure 2-14.** Taux normalisé de rétention des iRBC et des URBC de culture plasmodiale (FUP, N=9) et de patients impaludés (N=12). Point noir : rétention positive. Point rouge : rétention négative (= enrichissement de la population d'aval). Barre violette : moyenne de rétention.

### 2.6.3 En résumé de cette 3<sup>ème</sup> étude

Les iRBC de culture sont retenus (taux normalisé de rétention-TNR > 70%), les uRBC de culture ne sont pas retenus (TNR < 10%), les iRBC de patients sont peu retenus en moyenne (TNR variables, moyenne à 0,41%), les uRBC de patients passent plus facilement le filtre, il existe un enrichissement (TNR en moyenne à -19,7%). La rate du malade exerce une sélection phénotypique des uRBC (ceux qui doivent être bloqués vont l'être), et les uRBC demeurant circulants dans le sang périphérique (ceux qui seront prélevés) ont déjà franchi (statistiquement) le filtre splénique naturel. L'expérience de microfiltration sur billes révèle la sélection phénotypique effectuée par la rate, de ces uRBC, en montrant une facilitation de passage du filtre à microbilles (enrichissement) par rapport aux érythrocytes de donneur.

## **2.7 Valorisation écrite, orale et projets congruents et parallèles**

L'ensemble du travail de thèse et l'interaction avec les différents partenaires de recherche a donné naissance à des travaux congruents générés dans le contexte du travail en équipe. Ils sont résumés en **Annexe 4.4**.

## 3 DISCUSSION

### 3.1 Synthèse et discussion des résultats

Mon travail de thèse a permis de répondre en partie aux 4 questions/problèmes exposés en introduction (**Chapitre 1.7**).

#### 3.1.1 Quelle est l'incidence de la PADH et son évolution au cours du temps auprès d'une population de voyageurs traités pour paludisme grave par AS ?

L'organisation de la dispensation de l'AS en France (cohorte nationale et ATU nominative différée) par le système de recueil d'information mis en place (**Chapitre 1.5** et **2.2**) nous a permis de proposer l'individualisation de différents profils évolutifs d'anémie et/ou d'hémolyse rencontrés après traitement du paludisme (profil « Classique », « Persistant » et « Différé »). De plus l'observation fine des cas, de manière prospective a permis de dissocier le mécanisme de la PADH (l'hémolyse) de sa conséquence (la perte d'hémoglobine et l'anémie). *Stricto sensu* on devrait parler de PADH (survenue d'une hémolyse tardive telle que définie) et de PADHA en présence d'une anémie associée à l'hémolyse tardive. Dans la mesure où la quasi-totalité des patients est anémique au cours du paludisme (97%), la PADH se confond en pratique avec la PADHA. Si la distinction est peu importante en terme opérationnel (gestion clinique des malades), celle-ci l'est en termes de compréhension physiopathologique. En effet, l'hémolyse post artésunate est fréquente et touche environ 30% des patients traités par AS pour paludisme grave dans notre travail. Cette hémolyse est fréquente car elle est directement liée à l'effet du traitement par la génération d'oiRBC, mécanisme caractéristique de l'action de l'artémisinine et de ses dérivés dont l'AS. Cependant l'importance (quantitative) de cette hémolyse et son corollaire l'anémie, est éminemment variable. L'anémie qui en résulte, elle, semble rarement grave (diminution d'hémoglobine de 1,3 g/dl en médiane). Elle ne semble profonde que dans 15% des cas et cette profondeur dépend très probablement du niveau d'hémoglobine précédent le phénomène.

L'hémolyse est détectée de manière indirecte par des marqueurs sensibles mais peu spécifiques (haptoglobine et LDH). Ils permettent cependant de conférer une temporalité aux différents types d'hémolyse, y compris la PADH, et a permis de leur donner un cadre chronologique de définition et d'évolution par leur variation au cours du temps (**Figure 2-4**).

#### 3.1.2 Quelle est sa gravité et son impact ?

Dans la droite ligne de la requête OMS [250], le travail accompli a pu donner un niveau de gravité de cet effet secondaire et contrebalancer l'impression première de gravité alarmante issue des travaux

antérieurs. Ceux-ci basés sur des données rétrospectives et focalisés sur les cas les plus graves diagnostiqués pour anémie ont pu majorer son importance (**Tableau 1-4**). Notre approche, prospective et sans a priori a pu donner un relief plus « physiologique » aux conditions de survenue de la PADH et de sa gravité. En médiane, la chute d'hémoglobine dans ce groupe de patients a été de 1,3 g/dl entre les jours 7 et 14 ; une diminution relativement modérée. Cependant cette médiane de diminution cache des disparités importantes. Certains patients ont atteints des niveaux d'anémie profonde, compris entre 4,6 et 12,9 g/dl. Sur l'ensemble de la cohorte, parmi les 8 patients présentant un degré d'anémie le plus grave lors des semaines de suivis 2, 3 et 4, la moitié présentait un profil de PADH (**Figure 2-5**). Autrement dit, parmi les anémies tardives les plus graves, 50% étaient due au phénomène PADH. Bien que rare la PADH profonde représente la moitié des cas d'anémies les plus sévères au cours du paludisme grave traité par AS, toutes causes confondues.

L'impact de la gravité est représenté par le taux de transfusion. Il est ici rassurant. Tous profils confondus, 75% des transfusions sanguines ont lieu durant les 7 premiers jours c'est-à-dire durant la phase post-infectieuse immédiate de destruction globulaire (iRBC et uRBC) et 85% des taux d'hémoglobine sont demeurés > 7 g/dl. Le taux de transfusion directement lié à l'épisode de PADH semble être de 5% (1 patient sur les 21). Ce chiffre que l'on peut discuter compte tenu des limites du recueil d'information, est bien loin du taux de transfusion des publications antérieures (plutôt de l'ordre de 40 à 60%).

Enfin aucun décès n'a été à déplorer en rapport avec la PADH confirmant les données publiées antérieurement.

### **3.1.3 Quel(s) sont le(s) mécanisme(s) de cette hémolyse retardée en retenant l'hypothèse que cet effet secondaire est en rapport étroit avec le mode d'action original de la molécule mais qu'il ne se manifeste pas chez tous les patients traités par AS ?**

Notre approche physiopathologique a utilisé une définition stricte de la PADH [254]. Ainsi une sous-population de patients a été étudiée pour cette partie du travail de thèse. Il ne s'agit pas d'une étude sur la PADH au cours du paludisme grave en tant que tel puisque les malades transfusés à un moment ou à un autre (probablement les patients ayant les formes les plus graves) ont été exclus. Cependant l'aspect « caricatural » des phénotypes d'anémie de patients sélectionnés a permis d'observer le comportement fin des différentes populations globulaires à l'œuvre sans apport exogène de nouveaux globules rouges par la transfusion. L'étude de l'évolution des oiRBC au cours de l'infection a montré que leur nombre généré au cours de la première semaine, faisant suite au

traitement par AS, était fortement lié à la perte des érythrocytes lors de l'épisode de PADH (**Figure 2-10** et **2-11**). La réduction de S/V de ces globules rouges pitéés semble être un facteur explicatif convaincant, menant à leur rétention et leur destruction, probablement au niveau de la rate. L'anémie au cours de la PADH est due à la rétention et la destruction des oiRBC générés lors de première semaine. La concentration de ces oiRBC (leur nombre en valeur absolue) dépend de 2 éléments (i) la parasitémie initiale et (ii) le taux de pitting. Une parasitémie élevée associée à un taux de pitting élevé génèrera un grand nombre de oiRBC qui seront détruits dans un second temps, expliquant l'épisode de PADH [254]. La nécessité d'une parasitémie élevée confirme ici les données publiées qui retrouvaient des parasitémies élevées au cours de la PADH [233, 235]. Le taux de pitting élevé est la donnée explicative majeure qui soulève en elle-même une question : pourquoi ce taux varie-t-il et quels sont les déterminants de cette variation ? La variation de ce taux (efficacité du pitting) et la variabilité de la parasitémie initiale, qui dépend d'autres facteurs explicités par ailleurs (**Chapitre 1.2**), expliquent pourquoi seuls 30% des patients traités par AS vont être frappés de PADH dans les suites de leur traitement et non pas l'ensemble des malades traités.

La revue de littérature de la première partie de ce travail de thèse a montré que les mécanismes d'anémie sont multiples au cours du paludisme à *P. falciparum*. Il n'est donc pas exclu que des mécanismes autres que la rétention des pitéés, puissent contribuer à l'anémie, en particulier une destruction immunologique (**Figure 1-26**). La recherche de marqueurs immunologiques conventionnels de destruction (test de Coombs) s'avère non contributive dans notre travail à l'instar des données déjà publiées. Mais compte tenu des limites de ce type d'examens (sensibilité du Coombs, nécessité de technique d'élution systématique, répétition des examens, etc.), des résultats douteux ou négatifs n'excluent pas formellement la présence d'une auto-immunité ou allo-immunité associée.

Une responsabilité immunologique médicamenteuse (AHIM) est par contre très improbable, du fait des réserves ci-dessus décrites d'une part et de la demi-vie très courte de l'AS et de la DHA. Seule la recherche urinaire de métabolites tardifs (produit de dégradation) pourrait définitivement clore ce débat et éliminer définitivement la responsabilité du médicament ou de ses métabolites dans le cadre d'une AHIM [210].

Deux questions supplémentaires surgissent à ce stade : le moment de survenue de la perte et sa chronologie et la participation d'une réponse immune spécifique (cf. infra).

### **3.1.4 Quel pourrait être le facteur prédictif de survenue de cette hémolyse afin de sélectionner les patients les plus à risque qui pourront bénéficier d'un suivi rapproché et adapté ?**

Le travail publié a montré que le nombre de pîtés durant la première semaine au-delà d'un certain seuil était fortement corrélé au risque de PADH. Le seuil de 180 millions d'oiRBC/l discrimine les patients à risque de PADH avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 83%. Ce nombre en valeur absolue (concentration) constitue donc une piste intéressante de marqueur prédictif de risque. Il se heurte pour le moment à la difficulté de sa détermination. Afin de déterminer ce nombre maximum de pîtés il est nécessaire d'avoir plusieurs prélèvements durant la première semaine et de pouvoir déterminer les nombre d'oiRBC par cytométrie (robustesse de la mesure). Peu de laboratoires et à fortiori en zone d'anémie palustre sont à même de réaliser cette mesure.

## **3.2 Les limites de l'approche et des questions soulevées**

Les résultats présentés et les deux publications principales issues du travail de thèse (**Annexe 4.2**, [254]) posent des questions sur la robustesse des conclusions et sur des éléments physiopathologiques.

### **3.2.1 Limites intrinsèques du travail**

Les limites du travail ici présenté sont principalement dues à deux facteurs : (i) le faible nombre de patients étudiés et (ii) la qualité et l'exhaustivité des données.

#### **3.2.1.1 « Faible » nombre de patients mais conclusions robustes**

Les conclusions des travaux ici présentés reposent sur tout au plus 78 et 60 patients pour les parties épidémiologiques et expérimentales. Bien que ces nombres soient petits, il s'agit cependant de la plus grosse cohorte publiée à ce jour dans ce contexte, avec cette durée de suivi (28 jours) et de manière prospective. Ainsi si la robustesse statistique des résultats peut être discutée, les conclusions de ces travaux ont permis de préciser des éléments d'évolution, d'impact et de physiopathologie de cette PADH, dotés d'une valeur opérationnelle. Une réponse est apportée à une partie des requêtes de l'OMS [250].

Les données de tolérance de nos travaux confirment les données connues et déjà publiées lors de grands essais antérieurs (à l'exception des 3 cas de manifestations cardiaques qui demeurent obscures à l'heure actuelle, cf. **Annexe 4.2**). Il apparaît peu probable que des manifestations graves ou une évolution péjorative sous un médicament sans AMM comme l'AS puisse passer inaperçue dans un pays comme la France ou à priori un effet secondaire grave finira par être dépisté.

Cependant, il est estimé que moins de 10% des effets indésirables, y compris les plus sévères, sont dépistés par le système de pharmacovigilance, lors de la phase d'exploitation d'un médicament (phase 4) [255] et que cela soit en ville ou à l'hôpital. La déclaration d'un effet indésirable suspect d'être en relation avec un traitement administré est de l'obligation du médecin, du dentiste ou de la sage-femme prescripteur ou non, selon l'article R-5144-19 du code de la Santé Publique [256]. Notre approche a capté des effets indésirables non déclarés par le système passif. Sans prétendre à une exhaustivité parfaite, elle a complété le panorama des manifestations observées sous AS. Par ailleurs la mise en évidence d'une hémolyse très fréquente (30% des cas traités environ) mais avec finalement peu d'anémie très profonde est un élément rassurant sur la qualité et la précision de l'information recueillie sur la donnée anémie. Malheureusement d'autres variables n'ont pu faire l'objet d'une telle attention et précision compte tenu des contraintes inhérentes à ce type d'approche.

Nous n'avons pu trancher la question de la causalité effective des effets indésirables dépistés. En effet, la question de la causalité repose sur des éléments anamnestiques et cliniques qu'il n'a pas été possible de documenter pour tous les effets indésirables enregistrés. Les différentes échelles utilisées au plan international (WHO-Uppsala), ou échelle de « Naranjo », nécessitent une précision très importante des informations recueillies dans le temps. Par exemple l'échelle WHO-Uppsala repose sur 4 éléments fondamentaux qui juge de la causalité : (i) la séquence temporelle, (ii) une autre cause médicamenteuse éliminée (sous-entend une exploration approfondie voire exhaustive des diagnostics différentiels du problème présenté par le patient), (iii) l'amélioration à l'arrêt du médicament suspecté (en sachant que compte tenu de certaines longues demi-vies de médicament ou de certains mécanismes incriminés, l'amélioration peut prendre plusieurs semaines), (iv) une ré-aggravation à la reprise du médicament suspecté (test de réintroduction parfois extrêmement risqué pour le malade et rarement effectué en pratique si il existe une alternative thérapeutique) [257]. Ces éléments permettent de classer la causalité en « certaine », « probable », « possible » ou « improbable ». Dans notre travail, seule la survenue d'effets indésirables a été documentée sans analyse complète de leur causalité en rapport avec l'AS : elle a reposé essentiellement sur une évaluation intuitive des séquences et des éléments de notoriété extrinsèque et intrinsèque. Néanmoins, malgré l'option prise du « *plus mauvais scénario* » (c'est-à-dire tous les effets indésirables répertoriés sont considérés comme secondaires à l'AS) la tolérance reste bonne et la balance bénéfice risque est maintenue en faveur du traitement, y compris les épisodes de PADH.

### 3.2.1.2 Exhaustivité incomplète mais conclusions exploitables

Basé sur une double approche passive et active et un suivi de cohorte, le travail ne peut prétendre à une exhaustivité de type « essai thérapeutique ». Néanmoins le taux de récupération des informations peut apparaître encourageant voire satisfaisant permettant d'apporter des conclusions robustes. A titre d'exemple sur la cohorte ici exploitée (N=123) le taux de récupération des fiches de déclaration initiale et finale de l'ANSM a été de 93% et 66% respectivement. Il a été possible d'obtenir au moins 1 compte rendu d'hospitalisation pour chacun des malades dans 76% des cas. La médiane du nombre de bilans biologiques contenant un dosage d'hémoglobine a été de 5 (IQR [2-7]), les extrêmes allant de 0 à 11. La médiane du nombre de détermination de la parasitémie a été de 3 (IQR [2-5]) avec des extrêmes allant de 0 à 8. Enfin la durée de suivi dans le temps, élément fondamental dans notre approche dépasse de loin le suivi moyen de la plupart des études. La durée moyenne de suivi par rapport à J0, avec une information biologique disponible (hémoglobine et parasitémie) a été de 19 jours (IC95% [16-22]) et 15 jours (IC95% [12-18]) respectivement. L'information, certes parfois disparate, a permis dans une approche globale de fournir une évaluation relativement exacte du suivi d'une population de paludisme grave pris en charge en France. A cet égard certains des résultats ici fournis ont confirmé des données antérieures sur le paludisme grave d'importation (**Annexe 4.2**, [152]), validant a posteriori leur robustesse.

### 3.2.2 Les questions soulevées : création et destruction des oiRBC

La baisse du taux sanguin d'hémoglobine lors du phénomène de PADH est de l'ordre de 12% et le pic de concentration d'oiRBC est de l'ordre de 8% (de 1,6% à 17,5%). Ces chiffres concordent raisonnablement et nous permettent d'avancer l'idée que tout ou partie de la perte globulaire lors de la PADH est due à la perte de oiRBC. Cependant l'existence d'une perte conjointe d'autres types cellulaires (uRBC) n'est pas exclue et même probable. Les éléments discutés dans la première partie donnent des pistes de réflexion (**Figure 1-26**).

De nombreuses questions restent en suspens : pourquoi le début synchronisé de la perte à la deuxième semaine ? Pourquoi cette variabilité importante du processus de pitting (certains patients pignent et d'autres non) et par ailleurs quels sont les déterminants d'un taux de pitting élevé (seuil de 45% par exemple) amenant à la production de nombreux oiRBC ?

#### 3.2.2.1 Pourquoi la PADH survient-elle deux à trois semaines après traitement ?

L'on ne peut être que frappé par l'aspect synchronisé du début de la perte (à partir de la deuxième semaine) et du prolongement de celle-ci parfois pendant plusieurs semaines ensuite (pendant 2 voire 3 à 4 semaines). Cela fait suspecter un élément déclencheur de la destruction qui surviendrait à partir

de la deuxième semaine et non avant. Notre travail apporte des éléments convaincants pour incriminer la destruction des oiRBC mais quel est le mécanisme déclencheur de cette destruction ?

La temporalité de celle-ci plaide pour une destruction liée à la présence d'anticorps (2 semaines en moyenne pour la mise en place une réponse immune spécifique). Cependant une étude préliminaire utilisant des sérums de patients convalescents traités par AS, menée au sein de l'équipe n'a pas mis en évidence une réponse humorale dirigée contre les oiRBC (Ndour, Roussel données non publiées) [254]. Par ailleurs la disparition des oiRBC se prolongeant sur plusieurs semaines ne plaide pas en faveur d'une interaction ligand-récepteur qui devrait entraîner une destruction complète des oiRBC sensibilisés et donc une disparition du sang circulant beaucoup plus rapide. Enfin, l'hypothèse d'une réaction immunologique dirigée contre la principale protéine parasitaire observée chez les oiRBC (RESA) est peu probable compte tenu de sa localisation sur la face interne érythrocytaire probablement associée au réseau de spectrines [137, 146]. Les cas récents d'hémolyse tardive chez des enfants africains ont montré que celle-ci survenait plutôt chez des jeunes enfants hyperparasitémiqes non ou peu immuns face au paludisme (âge médian de 24 mois) [249] ; deux éléments retrouvés dans notre cohorte de sujets voyageurs peu ou non immuns (migrants vivants en France depuis longtemps et sujets caucasiens n'ayant pas vécu en Afrique). Un travail récent de l'équipe a montré en zone d'endémie, que la clairance parasitaire secondaire au pitting (action de l'AS) était rare chez les enfants plus âgés dont la clairance est ultra rapide et indépendante du pitting. Elle était l'apanage des enfants les plus jeunes (peu ou non immuns) [258]. Le pitting et sa conséquence (l'apparition d'oiRBC) semble être un processus propre aux sujets non ou peu immuns vis-à-vis du paludisme.

Ainsi l'hypothèse d'une destruction des oiRBC par rétention mécanique est considéré comme plus probable qu'une destruction à médiation immunologique. Cette destruction débute lors de la deuxième semaine (et non pas avant), et se poursuit pendant plusieurs semaines. La réduction de surface de l'érythrocyte est ici l'hypothèse actuellement dominante. Il a été montré qu'une perte de l'ordre de 14%, au minimum, de la surface d'érythrocytes sains entraînait leur rétention sur filtre à microbilles (rétention splénique) [139]. Une modélisation du vieillissement globulaire normal a montré que cette perte de surface (et de contenu d'hémoglobine par ailleurs) n'était pas linéaire mais suivait une fonction sigmoïde. La perte de surface serait due à des phénomènes de vésiculation plus importants au début (excès de membrane) et plus rare à la fin de vie de l'érythrocyte à mesure que celui devient petit, sphérique et dense, tendant vers une limite asymptotique [259]. Il en résulte que la perte de surface de ces érythrocytes âgés, précèdent de peu leur disparition de la circulation générale (captation splénique présumée) est de l'ordre de 16 à 17% par rapport aux réticulocytes de 2 jours d'âge. Ces chiffres sont relativement comparables aux 14% de perte de surface mesurés

entraînant une rétention sur filtre à microbilles. Lors du vieillissement naturel des érythrocytes d'une durée de vie de 120 jours, l'érythrocyte aurait perdu environ 14 à 16% de sa surface au terme de cette durée (réduction de surface entraînant une sphérisation) et se trouverait bloqué par le filtre splénique, lieu supposé de destruction des globules rouges sénescents [104].

Nous avons montré que l'infection et le processus de pitting entraînent une perte de surface projetée de 9%. Entre le moment du début du traitement par AS et le début de l'hémolyse tardive (2 semaines environ), l'érythrocyte par le seul fait de son vieillissement naturel va continuer de perdre de la surface. En ce qui concerne les oiRBC, une perte de surface supplémentaire liée au vieillissement naturel semble nécessaire pour atteindre le seuil de 14 à 16 % menant à une rétention. Ceci expliquerait pourquoi le déclenchement de la perte ne survient pas immédiatement après le processus de pitting (qui survient lui dans les premières heures de traitement, le pic d'oiRBC étant atteint en moyenne à J2+/-1). En résumé, l'infection, le traitement et le pitting pourrait entraîner une modification accélérée des globules rouges parasités puis pittés leur conférant en 2 ou 3 semaines la morphologie et la déformabilité (réduite) d'un érythrocyte beaucoup plus âgé. Dans une formulation très simplifiée, les processus imposés à l'érythrocyte correspondraient à un « vieillissement » accéléré de l'érythrocyte générant une perte de surface comparable à celle observée chez un érythrocyte sénescents destiné à être bientôt retenu dans la rate.

Comment expliquer la relative synchronicité du début de la perte des oiRBC (J15 en moyenne) ? Une hypothèse serait que tous les érythrocytes ne sont pas à même d'être infectés, puis pittés. Seuls les érythrocytes assez jeunes avant infection, traitement et pitting c'est à dire ayant perdu moins de 5 % de leur surface environ pourront être la cible du pitting et de l'hémolyse tardive (au seuil de rétention de 14 %,  $[x \leq (5-y)]$ , ou « x » est la perte de surface déjà subie par l'érythrocyte avant infection et « y » la perte de surface d'un érythrocyte survenant lors du vieillissement naturel sur 15 jours. Autrement présenté  $[x+y+9\% = 14\%]$ , soit le seuil de rétention ici retenu). C'est-à-dire que la somme de la perte de surface de l'érythrocyte avant infection, traitement et pitting, et du vieillissement naturel surajouté sur 15 jours pourrait être égale à la perte de surface menant à la rétention (soit 14% par exemple). Les érythrocytes en deçà d'un âge qu'il reste à déterminer, au moment de l'infection seront les pourvoyeurs des oiRBC dont la destruction par rétention splénique débutera lors de la deuxième semaine post AS.

Cette hypothèse permet d'expliquer le début différé et assez brutal ou « synchrone » de l'hémolyse et son prolongement dans le temps au-delà de la deuxième semaine ; le temps pour chaque oiRBC d'arriver par vieillissement naturel surajouté à la perte liée au processus d'infection, de traitement et de pitting, à la perte de surface nécessaire à sa rétention mécanique dans la rate.

Cette notion d'âge optimum de l'érythrocyte à même d'être pité pose directement la question de l'âge optimum de l'érythrocyte à être infecté, appelée aussi sélectivité parasitaire (cible érythrocytaire préférentielle pour le parasite). Il est communément admis que tous les érythrocytes, peuvent être la cible de *P. falciparum* sans sélectivité concernant l'âge globulaire. Pourtant des publications anciennes ont montré une sélectivité accrue pour les jeunes globules rouges et les réticulocytes par rapport aux érythrocytes plus âgés [260, 261]. Cette sélectivité diminue lors du paludisme grave et une faible sélectivité globulaire est associée avec les plus fortes parasitémies [262], mais la réciproque n'est pas retrouvée. A parasitémie équivalente l'index de sélectivité varie en fonction de la gravité de l'accès. Cette donnée peut paraître dans notre cas contre intuitive. Cette donnée semble s'opposer à l'existence d'un optimum d'âge globulaire favorisant le pitting et l'hémolyse tardive. Pourtant deux explications non exclusives sont possibles : (i) la présence d'un plus grand nombre d'érythrocytes le plus susceptible à l'infection et d'un âge restreint (jeune érythrocyte ayant perdu peu de surface érythrocytaire au moment de l'infection) et (ii) des parasites capables d'envahir tous types de globules rouges (jeunes et âgés) [262].

### **3.2.2.2 « L'hémoglobine à H0 est plus élevée dans le groupe PADH » : l'hypothèse d'un plus grand nombre de cibles pour le pitting ?**

Dans notre travail les patients qui vont être touchés par un épisode de PADH avaient à H0 une hémoglobine en moyenne plus élevée que les autres groupes d'anémie (**Annexe 4.2** et [254]). Comment expliquer cette particularité ? D'une manière générale il est licite de considérer qu'à parasitémie équivalente, le nombre absolu d'iRBC, et de fait le nombre d'oiRBC potentiels générés faisant suite au pitting, sera plus important à mesure que le taux d'hémoglobine est élevé (biomasse parasitaire plus importante infectant des érythrocytes candidats au pitting). Le groupe PADH s'est caractérisé par un plus grand nombre d'oiRBC générés en valeur absolue. Ceux-ci sont issus d'iRBC. C'est-à-dire que l'on peut supposer qu'un plus grand nombre d'érythrocytes a été la cible de l'infection et du processus de pitting afin de générer un grand nombre d'oiRBC. Dans la mesure où un sujet à taux d'hémoglobine plus élevé possède en valeur absolue un nombre plus élevé d'érythrocyte, il n'est pas illogique de retrouver dans le groupe PADH un chiffre d'hémoglobine plus élevé à H0. Il est probable que l'hémoglobine de départ et le nombre d'érythrocytes correspondant soit un facteur de risque du nombre d'iRBC et de fait d'oiRBC dont la perte mène à la PADH.

L'existence dans le groupe PADH d'un taux plus élevé d'hémoglobine à H0 renforce l'hypothèse d'un plus grand nombre de cibles potentielles globulaires pour l'infection et le pitting, d'un âge synchronisé, en accord avec les publications antérieures.

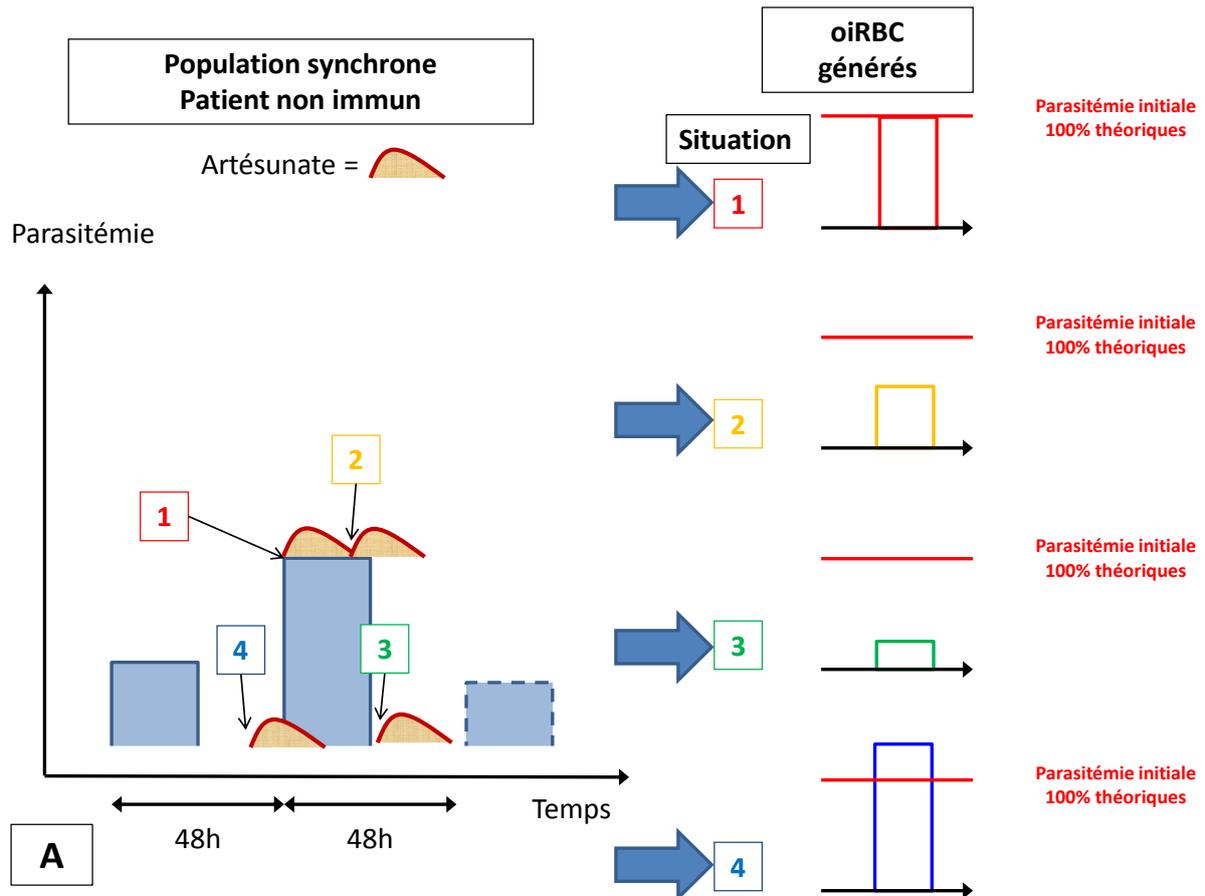
### 3.2.2.3 Taux de pitting et « pittance » : les raisons d'un taux de pitting élevé

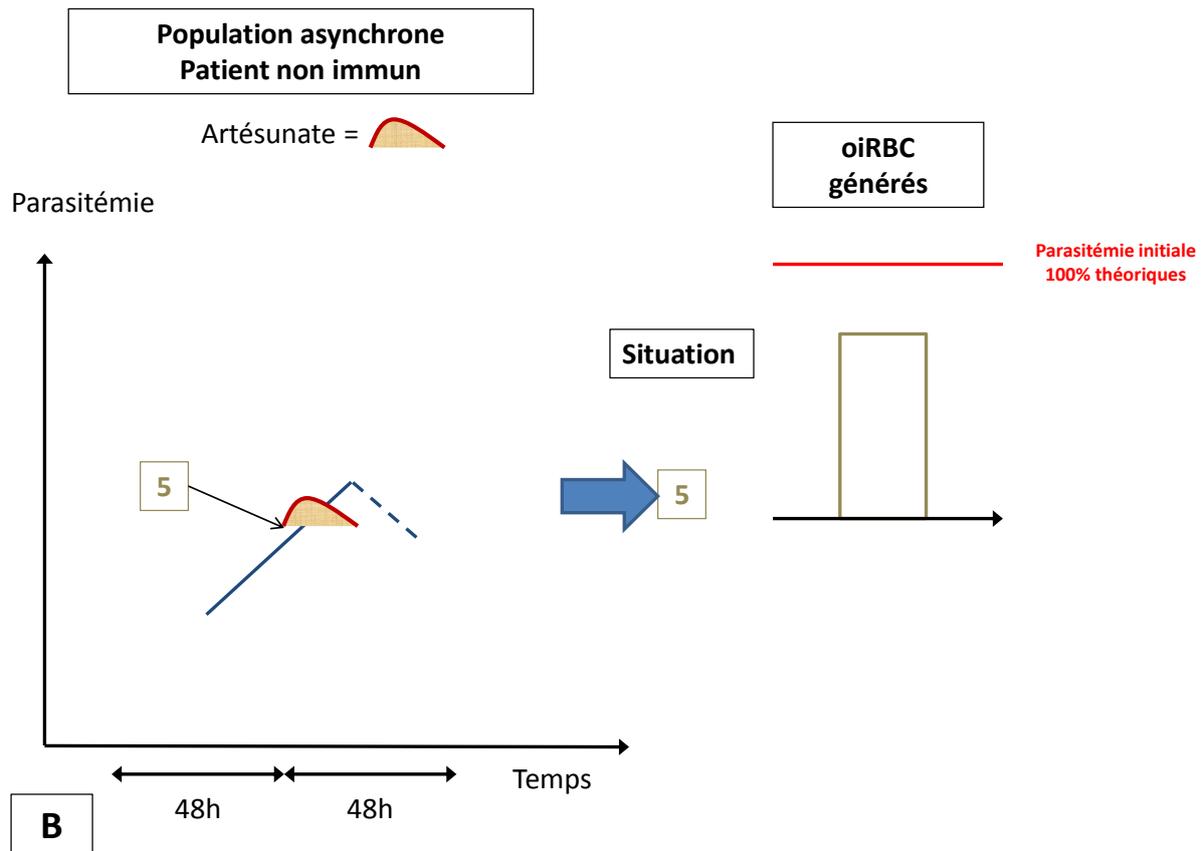
Nous avons mis en évidence la grande variabilité du taux de pitting chez les sujets traités par AS pour paludisme grave (**Figure 2-9**). Tous les patients ne pissent avec la même intensité. Le splénon, unité fonctionnelle splénique [106] permet de définir une fonction dite de « pitting » des érythrocytes infectés (par analogie avec la clairance rénale de la créatinine), variable selon les personnes infectées. Quatre éléments pourraient influencer directement la « pittance » des érythrocytes infectés : (i) l'âge érythrocytaire et la capacité de l'érythrocyte à franchir la fente interendothéliale, (ii) l'âge parasitaire et la susceptibilité du parasite mort à être expulsé de l'érythrocyte, (iii) l'activation splénique et la capacité de la rate à plus ou moins bien pitter les iRBC au cours du temps et (iv) la durée d'exposition à l'artémisinine, facteur nouvellement mis en évidence et nécessaire au processus de pitting [258].

Les éléments discutés ci-dessus peuvent suggérer que les érythrocytes jeunes sont le plus à même d'être pités (les plus déformables). L'âge parasitaire optimum semble être un âge en rapport avec un petit parasite plus facilement expulsable du globule rouge sans entraîner la rétention ou la destruction immédiate de l'érythrocyte, c'est-à-dire un stade jeune ; le stade annulaire. L'assomption est ici faite que le résidu parasitaire mort, à l'instar du pitting naturel de petits éléments intraglobulaires (corps de Howell-Jolly, de l'ordre du micromètre), est facilement expulsable de l'érythrocyte sans destruction de celui-ci. Par ailleurs des données *in vitro* et *ex vivo* ont mis en évidence une relation proportionnelle importante entre rétention et âge parasitaire (**Chapitre 2.6** et [106, 125]). Une expérience récente de l'équipe visant à évaluer le pitting *in vitro* sur filtres à microbilles a montré qu'une durée minimale de 6 heures d'exposition à l'AS semblaient nécessaires pour entraîner un phénomène de pitting [258]. Aussi les érythrocytes parasités par des formes plus âgées échapperont au pitting par séquestration tissulaire et/ou rétention splénique. Ainsi il est possible d'avancer que le maximum de pitting et la création d'un maximum d'oiRBC (taux de pitting élevé) se produira lors de la présence d'une biomasse parasitaire circulante importante (les oiRBC sont des iRBC qui ont été pités), synchronisée, jeune (résidu parasitaire plus facilement expulsable de l'érythrocyte) et d'un traitement par artémisinine et dérivés (avec un temps d'exposition au médicament suffisant pendant la maturation du parasite avant que celui-ci n'arrive au stade de séquestration ; le processus de pitting n'étant pas instantané).

La **figure 3-1** montre dans une optique chronologique et évolutive les paramètres qui président à la variation du taux de pitting et l'apparition des oiRBC chez un sujet non immun (pas d'action de réduction/contrôle de la charge parasitaire d'origine immunitaire par le malade à type d'opsonisation rapide). Les éléments de fonctionnalité splénique sont discutés plus bas.

Selon que le traitement est initié en début de cycle parasitaire (parasite jeune-sensibilité maximale au processus de pitting) ou plus tardivement au cours du cycle (moins de sensibilité au pitting pour les formes plus âgées et/ou séquestrées), le nombre d'oiRBC générés varie, et cela dans les deux modèles de développement parasitaire synchronisé ou asynchronisé.





**Figure 3-1.** Schéma d'apparition des oiRBC en fonction du début du traitement par AS par rapport à l'âge parasitaire. **(A)** Modèle synchronisé de multiplication parasitaire (toute la population parasitaire a le même âge [73]). Les situations 1, 2, 3, 4 correspondent au début du traitement par AS en fonction du moment du cycle parasitaire. (1) début du traitement sur des formes annulaires, (2) début du traitement sur des formes annulaires plus âgées et trophozoïtes (début de disparition des parasites de la circulation périphérique-cytoadhérence), (3) début du traitement sur formes parasitaires séquestrées, (4) début du traitement avant même l'apparition des nouvelles formes de réinvasion dans le sang périphérique. Ligne rouge : pitié rapportée à une parasitémie de 100% théorique. **(B)** Dans une représentation asynchrone de la multiplication parasitaire, la population parasitaire est constituée à tout moment de formes annulaires (75-80%) [73]. Les formes annulaires âgées de 0h à 14h (70% de la population annulaire) sont pittables à 100%, les formes annulaires âgées de 14h à 18h (20% de la population annulaire) sont partiellement pittables et les formes annulaires âgées de 18h à 20h (10% de la population annulaire) sont non pittables. Chez un patient non immun infecté par une population parasitaire asynchrone, un taux d'environ de pitting de 80% est attendu (situation 5). Par ailleurs, et dans toutes les situations, la fièvre pourrait avancer l'heure de la cytoadhérence et pourrait modifier, de fait, la proportion de cellules pittées [77].

#### 3.2.2.4 La rate au cours de l'accès palustre

Interviennent aussi les qualités intrinsèques de la rate. Une rate hyper « activée » dans ce contexte pourrait présenter un seuil diminué de détection des anomalies érythrocytaires ce qui pourrait peut-être influencer le nombre d'oiRBC générés et le taux de rétention [151]. Il semblerait que les

phénomènes de rétention et probablement de pitting sont d'une part variables dans le temps et dans leur intensité au cours de l'infection palustre, dépendant aussi du statut immunitaire vis-à-vis du paludisme du sujet (lié à l'âge). Il s'agit aussi, probablement, de phénomènes saturables [106]. Une surcharge d'érythrocytes candidat à la filtration splénique pourrait être responsable d'une modification du taux de pitting, du taux de rétention et de sa qualité. Il a déjà été montré qu'une augmentation de filtration splénique pouvait entraîner des dommages membranaires [151]. A l'instar de la phagocytose splénique, dont les capacités peuvent être dépassées par un excès antigénique en présence d'une forte parasitémie [148], les fonctions de rétention et de pitting pourraient être aussi altérées dans le temps en fonction de l'activation splénique (modification du diamètre des fentes interendothéliales par contraction/relâchement de cellules réticulaires dépendant du débit artériolaire splénique) [151]. Un élément complémentaire pourrait intervenir aussi comme la pression artérielle systolique. Le processus de pitting (la phase de filtration proprement dite) repose sur le gradient de pression décroissant entre le débit artériel entrant et le débit veineux sortant splénique. Toute modification de pression artérielle (hypotension, sepsis sévère associé, état de choc) qui peut survenir lors d'un accès grave pourra avoir un impact sur le taux de pitting entraînant une réduction du nombre de pités.

Les oiRBC générés pendant la phase infectieuse de la maladie pourraient être aussi endommagés par l'environnement métabolique oxydatif associé à la phase aiguë de la maladie [263] et par le traitement [198]; environnement métabolique qui pourrait affecter aussi les uRBC (« *bystander uRBC* »). Dans l'hypothèse où la présence d'un deuxième pic d'oiRBC est généré plus tardivement (le 2<sup>ème</sup> pic de J7+/-2 dans notre étude, **Figure 2-10**) ; ces oiRBC pourraient être moins touchés par ces éléments oxydatifs présents au début du traitement [145].

Ces différents éléments de discussion pourraient impacter le taux de pitting et sont probablement des éléments majeurs, extrinsèques à l'érythrocyte, au parasite et au traitement, de la variabilité du processus de pitting dans le temps (qualitativement et quantitativement).

### **3.2.2.5 L'épargne globulaire : un effet de l'AS**

Le taux de pitting et la nécessaire « *pittabilité* » érythrocytaire qui l'accompagne est un facteur probable d'épargne globulaire initiale. Les iRBC qui auraient dû être détruits de suite ne vont pas l'être car devenant oiRBC ils échappent à une destruction précoce. Nous n'avons cependant pas pu le démontrer clairement dans notre travail. La perte sur les 7 premiers jours est identique dans les 3 groupes (de l'ordre de 2,2 g/dl d'hémoglobine) en sachant que les taux d'hémoglobine de départ ne sont pas les mêmes (hémoglobine à 13,6 g/dl pour le groupe PADH). A J14 les 3 groupes ont le même niveau d'hémoglobine de l'ordre de 10g/dl. On peut en déduire que la perte globale est plus

importante dans le groupe PADH et le moment de cette perte diffère ; elle survient plus tardivement dans ce groupe que dans les autres groupes. Cela n'est pas illogique si l'on retient que le groupe PADH se caractérise par une parasitémie initiale plus importante en moyenne. Un oiRBC n'est qu'un iRBC qui a été pitié. Au lieu d'être détruit précocement (iRBC), la destruction survient plus tard (oiRBC) ; ce qui doit être détruit le sera. Nous avons montré, et en cela confirmé les études antérieures, que ces oiRBC ont une demi vie raccourcie et une destruction différée. L'épargne initiale sera soldée en deuxième semaine avec potentiellement une perte globulaire importante (quoique rare). Cependant le cap aigu, celui se grevant de la plus forte morbi-mortalité, sera franchi du fait de l'efficacité de l'AS, confirmant ainsi le positionnement de ce nouveau traitement dans le paludisme grave.

### **3.2.3 Anémie au cours du paludisme : une sélection phénotypique des uRBC ?**

La perte des uRBC serait responsable de plus de 80% à 90% de la perte globale lors de l'anémie palustre (**Chapitre 1.6.2.2**). Les uRBC présentent une diminution de déformabilité qui corrèle avec le degré d'anémie [116].

#### **3.2.3.1 Une sélection phénotypique**

L'expérience de microfiltration sur billes semble montrer 2 éléments intéressants. Les uRBC de patient passent plus facilement le filtre à microbilles (TNR négatif) que les uRBC issus de cultures plasmodiales (TNR quasi nul) et il existe un enrichissement du contenu d'aval en uRBC issus du patient par rapport aux uRBC de donneurs sains (TNR négatif) (**Figure 2.14**). Cette expérience pourrait révéler une sélection phénotypique effectuée par la rate du malade, de ces uRBC. En montrant une facilitation de passage du filtre à microbilles (enrichissement) par rapport aux érythrocytes de donneur, nous avons montré que la rétention mécanique était moins importante pour ces érythrocytes que pour les uRBC issus de la culture parasitaire (uRBC contigus des iRBC) qui eux n'ont pas eu à franchir le filtre naturel splénique. Ainsi l'existence d'un facteur uniquement parasitaire à même de modifier le comportement rhéologique des uRBC ne semble pas suffisant. D'autres éléments liés à l'infection mais non présents *in vitro* (stress oxydatif, interaction macrophagique splénique) sont nécessaires pour modifier le comportement rhéologique des uRBC. On pourrait supposer que les uRBC impropres au franchissement ont déjà été retenus chez le malade et ne sont pas retrouvés dans le prélèvement soumis au filtre à microbilles lors de l'expérience ; ne demeurent dans celui-ci que les uRBC sélectionnés dont les capacités de déformabilité permettent le franchissement du filtre. Il s'agit d'une indication indirecte en faveur de la rétention des uRBC à la déformabilité diminuée (ayant atteint un certain seuil de déformabilité entraînant la rétention) chez

le patient. Des travaux antérieurs ont montré que la diminution de déformabilité des uRBC prélevés à H0 étaient corrélée au degré d'anémie de H0 et à la mortalité globale [53, 116]. Mais il s'agit dans ce cas là d'érythrocytes encore circulants ; probablement les futurs candidats à une rétention et une séquestration rapide, d'où la corrélation positive entre le taux d'hémoglobine mesuré à cet instant (mais qui traduit une perte érythrocytaire survenue antérieurement) et la diminution de déformabilité des uRBC circulants à cet instant et non encore détruits ou séquestrés.

### **3.2.3.2 Limites de ce travail**

Cependant ces conclusions sont fragilisées par des faiblesses de l'expérience. L'âge parasitaire des parasites de culture et de patients ne sont pas comparables. Il s'est agit de parasites âgés et pas toujours très bien synchronisés pour les parasites de cultures, avec des taux de rétention importants, et des parasites jeunes (stade annulaire) pour les malades. La gravité clinique des patients est variable (environ 60% de cas graves) pouvant impacter sur la déformabilité érythrocytaire globale. Enfin peu d'expériences ont été menées (9+12). Une étude au Lorca aurait été nécessaire afin de mesurer les différents index d'élongation des différentes sous populations afin de les comparer aux résultats des publications antérieures sur le sujet [53, 54, 116] et de confirmer l'hypothèse de sélection phénotypique. Elle n'a pas été réalisée.

### **3.3 Perspectives**

Les résultats et questions du travail de thèse ici présentés nous permettent de proposer des éléments de développement futurs.

#### **3.3.1 Confirmation du modèle explicatif dans une population vivant en zone d'endémie et pré immune (essai DHART, collaboration Mahidol Oxford Research Unit 2014-2016)**

La PADH a surtout été décrite chez des voyageurs non ou anciennement pré immuns pour le paludisme (migrants). Une question majeure demeure pour l'ensemble de la communauté médicale et scientifique mondiale. Existe-t-il comme chez les voyageurs un risque de PADH (et les risques induits, tolérance et transfusions) chez les populations vivant en zone d'endémie et qui sont de fait les plus consommatrices d'AS ?

##### **3.3.1.1 PADH en population vivant en zone endémique : l'essai DHART**

Fruit d'une collaboration en cours initiée entre l'équipe d'accueil et la Mahidol Oxford Research Unit basée à Bangkok (Pr. Arjen Dondorp) nous avons participé à l'élaboration et participons à la conduite d'un essai qui vise à déterminer l'existence d'une anémie tardive après traitement par AS dans une population vivant en zone endémique pour le paludisme et le cas échéant de confirmer le mécanisme suspecté de la perte en hémoglobine (disparition des oiRBC). Le promoteur est l'université d'Oxford, Royaume Uni et le bailleur de fond Guilin Pharmaceuticals, Chine.

##### **3.3.1.2 Rationnel de l'étude**

Nous avons, basés sur nos travaux, émis l'hypothèse que :

- (i) Le risque de développer une PADH (après 7 jours) est plus élevé chez les patients recevant de l'AS comparés à ceux recevant de la quinine
- (ii) La PADH est due à la clairance des oiRBC 2 à 3 semaines après le traitement par AS
- (iii) La proportion d'oiRBC en circulation à J3 prédit le risque de PADH
- (iv) Il existe une réduction du risque d'anémie précoce (avant 7 jours) sous AS comparé à la quinine, déterminé par la chute précoce de l'hémoglobine et le besoin précoce de transfusion (initialement les iRBC devenus oiRBC sous AS échappent à une destruction immédiate : l'épargne globulaire)

Nous avons proposé un essai afin d'évaluer l'incidence de la PADH après traitement par AS comparé à la quinine, afin d'identifier les patients à risque de PADH et d'élucider les mécanismes explicatifs sous jacents.

### 3.3.1.3 Objectifs primaire et secondaires

L'objectif primaire est de comparer l'incidence de la PADH chez des patients atteints de paludisme à *P. falciparum* non compliqué hyperparasitémique (parasitémie compris entre 2% et 10% sans critères de gravité) dans une population d'enfants vivant en zone de haute endémie, traités par AS IV ou quinine IV. La définition de la PADH dans cette étude reprend la définition stringente (diminution  $\geq$  10% du taux d'hémoglobine à n'importe quel moment entre J7 et J42 après le début du traitement).

Dans le prolongement du travail de thèse les objectifs secondaires sont de déterminer la contribution respective de l'hémolyse, de la dysérythropoïèse et de la clairance des oiRBC dans l'anémie différée par groupe de traitement. D'autres objectifs sont poursuivis comme la détermination de l'anémie précoce (chute d'hémoglobine et transfusions avant le 7<sup>ème</sup> jour) par type de traitement, la description du profil évolutif de l'hémoglobine entre J7 et J42, la détermination de marqueurs pronostics précoces de PADH incluant le traitement reçu, la parasitémie d'admission et la proportion des oiRBC à J3 après le début du traitement. L'objectif final est de définir des recommandations pour la pratique clinique de suivi de l'hémoglobine dans ce contexte.

En résumé la première question est de savoir s'il existe une anémie tardive (en utilisant les outils habituels : chronologie des taux d'hémoglobine, de réticulocytes et marqueurs d'hémolyse) d'une part et d'autre part d'utiliser les outils de recherche spécialisée sur le terrain (détermination du pitting par cytométrie, évaluation de la déformabilité par Lorca) afin de confirmer ou d'infirmer les données issues des études précédentes menée sur des populations de voyageurs.

### 3.3.1.4 Site et design de l'étude

L'étude est conduite à Kinshasa, République Démocratique du Congo (RDC), l'un des 5 pays les plus touchés au monde par le paludisme. Le centre de recherche KIMORU, qui dépend de la MORU est basé à Kingasani (banlieue pauvre et surpeuplée de l'est de Kinshasa) et travaille en collaboration avec l'hôpital général de Kingasani. L'essai se déroule en collaboration avec l'université d'Oxford et l'université de Kinshasa (École de santé Publique de Kinshasa). Il s'agit d'un essai thérapeutique randomisé sur deux bras, ouvert et contrôlé. Les enfants inclus ayant satisfait aux critères d'inclusions et après obtention du consentement (parents ou ayant droit) reçoivent au hasard de l'AS ou de la quinine. Les patients sont hospitalisés 3 jours ou plus si nécessaire. Après sortie de l'hôpital le suivi est hebdomadaire et assuré pendant 42 jours pour les visites de contrôle et les prélèvements sanguins. Un total de 216 sujets est nécessaire (108 par bras de traitement).

### **3.3.1.5 Cytométrie de terrain : adaptation de la technique, contraintes rencontrées**

L'un des objectifs a été d'adapter la technique de cytométrie utilisée dans le laboratoire (expérience sur Accuri) au cytomètre disponible sur le terrain le Cyflow SL. Celui-ci ne possède qu'un laser bleu (20mW à 488nm) ce qui limite les marquages disponibles du fait du recouvrement de longueurs d'onde d'émission ou de longueur d'onde insuffisante pour l'excitation des fluorochromes. Après 3 mois de tentative nous avons conclu au procédé suivant : l'expérience serait menée sur 2 tubes en parallèle avec une méthode soustractive (détermination des oiRBC de manière indirecte). Un tube est utilisé pour le marquage de l'ADN parasitaire déterminant la parasitémie et un tube pour le marquage du RESA déterminant la résamie (iRBC + oiRBC). La pitémie est de fait calculée par soustraction :  $\text{Pitémie (\%)} = \text{Résamie (\%)} - \text{Parasitémie (\%)}$ . Le choix s'est porté sur l'utilisation du Sybrgreen (Life technology) et de l'Alexafluor488 (Life technology anticorps de chèvre anti IgG humaine) comme anticorps secondaire couplé. Le détail est présenté en **Annexe 4.5**.

L'étude a débuté en juillet 2014. Elle est en cours à l'heure actuelle.

### **3.3.2 Marqueur pronostic : « pitémie de J3 »**

Le seuil de 180 millions d'oiRBC/l atteint au cours de la première semaine suivant le début du traitement pas AS, discrimine les patients à risque de PADH avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 83% dans notre étude [254]. La détermination de ces oiRBC repose pour le moment sur l'utilisation de techniques pointues, non disponibles partout et nécessitant un savoir faire spécifique.

#### **3.3.2.1 Mise au point test diagnostic simple sur le terrain**

La question qui se pose est donc la mise au point d'un test simple, peu onéreux, robuste utilisable par tous (médecin, biologiste de garde) y compris en zone de faible recours sanitaire (PED) qui puisse déterminer le nombre ou plus simplement la présence ou l'absence d'oiRBC générés au cours de la première semaine et le risque de survenue de la PADH.

#### **3.3.2.2 Test rapide de type bandelette**

L'idée d'un test rapide de type bandelette s'impose. La persistance de la protéine RESA, solidement ancrée au réseau de spectrine pourrait être la cible d'un anticorps monoclonal marqué d'un chromogène fixé sur une bandelette dont le seuil de réactivité reste à déterminer. Elle permettrait dans une approche simplement qualitative de déterminer la présence ou l'absence d'oiRBC dans l'échantillon d'un patient à J3. Les patients présentant un résultat positif (présence d'oiRBC au-delà d'une certaine concentration limite) seraient potentiellement à risque d'avoir une PADH 15 jours plus

tard. Un résultat négatif permettrait d'exclure, avec une bonne valeur prédictive négative du risque de PADH, les malades d'un suivi lourd et prolongé. Ce test permettrait de sélectionner les patients à risque afin de concentrer sur eux la surveillance recommandée par l'OMS (contrôle hebdomadaire pendant 28 jours). Les patients à test négatif bénéficieraient alors du suivi standard (J7 et J28).

### **3.4 Conclusion générale**

#### **3.4.1 Mécanisme unique et original d'épargne et de perte : une nouvelle anémie**

L'observation critique et analytique de l'évolution clinique et biologique d'une cohorte de patients peu ou non immuns atteints de paludisme grave et traités par AS a permis de clarifier l'évolution du cours de l'hémoglobine lors de l'infection palustre. La distinction des différents profils d'anémie et l'évaluation des oiRBC au décours du traitement, par des outils de recherche moderne, nous permet de confirmer l'existence de la PADH. Celle-ci peut être considérée comme une entité séparée au sein des anémies du paludisme à la physiopathologie très particulière. Habituellement au cours de l'anémie palustre la cible de destruction érythrocytaire vise les iRBC et les uRBC. Ici ce sont les oiRBC qui sont une cible importante de la perte survenant lors de la 2<sup>ème</sup>-3<sup>ème</sup> semaine post thérapeutique. Il s'agit d'un nouveau mécanisme d'anémie lié à la forte présence quantitative des oiRBC directement induit par le mode d'action original de l'AS et de l'artémisinine en général.

#### **3.4.2 Effet secondaire ou effet thérapeutique ?**

La survenue de cette anémie différée par la perte des oiRBC dépend directement de l'un des mécanismes d'action de l'AS (processus de pitting). Il s'agit d'un effet secondaire fréquent lié au médicament qui par ailleurs est supérieur à la quinine dans le traitement du paludisme grave. Compte tenu des avantages de l'AS dans la prise en charge de ces malades, l'incidence de l'hémolyse et de l'anémie qui en découle, sévère dans moins de 15% des cas, ne remet pas en cause cette avancée thérapeutique. Le message d'ores et déjà transmis à la communauté internationale se veut rassurant. L'épargne initiale globulaire par le processus de pitting est un effet particulièrement original de ce traitement, reposant sur une microstructure anatomique splénique unique : la fente interendothéliale. Mais cette épargne n'est que transitoire. Les érythrocytes ainsi générés (oiRBC) fragilisés par les remaniements morphologiques endurés par ce mécanisme original seront détruits plus tard au cours de la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> semaine.

Cependant les premiers éléments d'étude semblent montrer que tous les patients ne sont pas à risque de PADH.

#### **3.4.3 Un effet indésirable en partie expliqué : sélection des patients à risque**

Nos découvertes proposent un canevas explicatif de l'anémie post-thérapeutique liée à l'AS et ouvrent la voie à la mise au point de tests prédictifs du risque de PADH reposant sur la quantification/qualification des oiRBC durant la première semaine. Les éléments décrits ici révèlent

qu'un certain nombre de facteurs non indépendants entre eux influencent le risque d'anémie différée. Une forte parasitémie, une pitémie élevée, un taux d'hémoglobine de départ élevé chez des patients peu ou non immuns semblent être des facteurs constitutifs importants du risque d'hémolyse différée. L'impact respectif de ces différents facteurs reste à définir chez les populations de voyageurs et vivant en zone endémique.

#### **3.4.4 Une transition thérapeutique préservée au bénéfice des malades**

En réponse à la « saisine » de l'OMS, nous avons apporté des éléments d'efficacité et de tolérance de l'AS dans ce contexte d'anémie nouvellement décrite renforçant le bien-fondé de la transition thérapeutique (abandon de la quinine) initiée au plan mondial dans le traitement du paludisme grave.

## 4 ANNEXES

### 4.1 Fiche de recueil et de suivi ANSM

<b>ATU nominative</b> <b>MALACEF® (artésunate) 60mg, poudre et solvant pour solution injectable</b> <b>Fiche de demande initiale de traitement 1/2</b>
--

<b>Identification du patient</b>
----------------------------------

Nom (3 premières lettres) : ..... Prénom (2 premières lettres) : .....

Date de Naissance : ...../...../..... Pays de naissance : .....

Poids : .....kg Sexe  M  F

Pays de contamination : .....

Date d'arrivée dans ce pays : .....

Date de retour en France : .....

<b>Situation clinique</b>
---------------------------

**1- Diagnostic de paludisme** Température : .....°C

Le diagnostic du paludisme à *P. falciparum* est-il formel?  oui  non  
 La méthode ayant permis la confirmation du diagnostic :  Test de diagnostic rapide (TDR)  
 (plusieurs choix possibles)  Goutte épaisse  
 Frottis mince

**2- Forme grave de paludisme :**

Au moins 1 des 13 critères de gravité suivants (signalés en gras) est requis pour l'utilisation du MALACEF®

Critères de gravité (1 seul critère formel suffit)	Détail de l'examen
<b>1 <input type="checkbox"/> Défaillance neurologique</b> <input type="checkbox"/> obnubilation, confusion, somnolence, prostration <input type="checkbox"/> coma avec score de Glasgow < 11	Confusion Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Non renseigné <input type="checkbox"/> Convulsion Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Non renseigné <input type="checkbox"/> Nombre depuis 24h : ..... Score de Glasgow : ...../15
<b>2 <input type="checkbox"/> Convulsions répétées</b> : au moins 2 par 24 h	
<b>3 <input type="checkbox"/> Défaillance respiratoire</b> <input type="checkbox"/> PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> < 300 mmHg, si VM ou VNI <input type="checkbox"/> PaO <sub>2</sub> < 60 mmHg et/ou SpO <sub>2</sub> < 90 % en air ambiant et/ou FR > 32/mn si non ventilé <input type="checkbox"/> signes radiologiques : images interstitielles et/ou alvéolaires	Saturation : .....% FR : ...../mn PaO <sub>2</sub> : .....mmHg O <sub>2</sub> nasal : .....l/mn PCO <sub>2</sub> : .....mmHg FiO <sub>2</sub> : .....% Bruits surajoutés à l'auscultation (préciser) : .....
<b>4 <input type="checkbox"/> Défaillance cardio-circulatoire</b> : <input type="checkbox"/> pression artérielle systolique < 80 mmHg en présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire <input type="checkbox"/> patient recevant des drogues vasoactives quel que soit le chiffre de pression artérielle <input type="checkbox"/> signes périphériques d'insuffisance circulatoire sans hypotension	TA : ...../..... Pouls : ...../mn Drogues vasopressives Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Non renseigné <input type="checkbox"/>
<b>5 <input type="checkbox"/> Hémorragie</b> : définition clinique	Saignement spontané Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Non renseigné <input type="checkbox"/>
<b>6 <input type="checkbox"/> Hémoglobinurie macroscopique</b>	Purpura Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Non renseigné <input type="checkbox"/>
<b>7 <input type="checkbox"/> Ictère</b> : clinique ou bilirubine totale > 50 µmol/l	Ictère clinique Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Non renseigné <input type="checkbox"/> Splénomégalie Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Non renseigné <input type="checkbox"/> Splénectomie Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Non renseigné <input type="checkbox"/> Bilirubine T (micromol/l) : ..... PA : .....GGT..... AST/ALT (UI/l) : ...../.....
<b>8 <input type="checkbox"/> Anémie profonde</b> : hémoglobine < 7 g/dl, hématocrite < 20%	Ht (%) : ..... Taux d'Hb (g/dl) : ..... Plaquettes : .....giga/l GB : .....giga/l
<b>9 <input type="checkbox"/> Hypoglycémie</b> : glycémie < 2,2 mmol/l	Glycémie (avant traitement) : .....(g/l ou mmol/l)
<b>10 <input type="checkbox"/> Acidose</b> : <input type="checkbox"/> bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/l <input type="checkbox"/> acidémie avec PH < 7,35	pH : ..... HCO <sub>3</sub> - : .....mmol/l Diurèse (ml/24h) : .....
<b>11 <input type="checkbox"/> Insuffisance rénale</b> : <input type="checkbox"/> créatininémie > 265 µmol/l ou urée sanguine > 17 mmol/l <input type="checkbox"/> diurèse < 400 ml/24 h malgré réhydratation	Créatininémie (micromol/l) : ..... Urée sanguine (mmol/l) : .....
<b>12 <input type="checkbox"/> Toute hyperlactatémie</b>	Lactates (mmo/l) : .....
<b>13 <input type="checkbox"/> Hyperparasitémie</b> : > 4%	Parasitémie : .....% d'hématies parasitées

VM : ventilation mécanique ; VNI : ventilation non invasive ; FR : fréquence respiratoire

Commentaires :

.....

**ATU nominative**  
**MALACEF® (artésunate) 60mg, poudre et solvant pour solution injectable**  
**Fiche de demande initiale de traitement 2/2**

**Traitements antérieurs**

Date des premiers symptômes : ...../...../.....

- Chimio prophylaxie utilisée :  OUI  NON  NSP  
 Si oui, laquelle :  atovaquone proguanil (MALARONE®)  
 doxycycline (DOXYPALU®, ou autre)  
 méfloquine (LARIAM®)  
 chloroquine proguanil (SAVARINE®)  
 autre (à préciser) :

● Traitement curatif initié depuis moins d'1 mois :  OUI  NON  NSP

Si oui, lequel : .....

● Traitement en cours lors de l'admission  OUI  NON  NSP

Si oui, lequel : .....

Posologie.....Date et heure de début.....

*Si le patient reçoit de la quinine depuis moins de 24 heures, un relai par MALACEF® est possible*

**Traitement par MALACEF®**

Posologie envisagée : .....Durée envisagée : .....

**Je soussigné Dr \_\_\_\_\_ m'engage à fournir à l'ANSM et au CNR du paludisme de la Pitié Salpêtrière la fiche de fin de traitement ainsi que la fiche de suivi post-traitement dès que possible.**

<b>Nom de l'établissement :</b>	
<b>Médecin prescripteur</b>	<b>Pharmacien</b>
Nom : .....	Nom : .....
Service : .....	Nombre de flacons délivrés : .....
.....	Date/heure : .....
Tél : .....	Date et signature:
mail : .....	
Date et signature:	

Merci de bien vouloir adresser la fiche de demande initiale avec le formulaire Cerfa de demande d'ATU nominative au pharmacien de l'établissement qui se chargera de l'envoyer par fax à :

**Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé**  
**Direction des médicaments anti-infectieux**  
 143, 147 boulevard Anatole France  
 93285 Saint Denis Cedex  
 Fax : 01.55.87.36.12 Tél. : 01.55.87.36.11

**Une copie de cette fiche doit également être adressée au Centre de Référence du Paludisme (site Hôpital Pitié Salpêtrière) dans les meilleurs délais par fax au 01 42 16 13 28**

**ATU nominative  
MALACEF® (artésunate) 60mg, poudre et solvant pour solution injectable  
Fiche de fin de traitement 1/2**

**Identification du patient**

Nom (3 premières lettres) : ..... Prénom (2 premières lettres) : ..... ATU N° : .....  
 Date de Naissance : ...../...../..... Poids : .....kg Sexe  M  F  
 Date de la consultation de suivi : ...../...../.....

**Traitement par MALACEF®**

Date du diagnostic : ...../...../.....  
 Date de début de traitement : ...../...../..... Posologie : .....  
 Date de fin de traitement : ...../...../....., si arrêt prématuré, motif : .....  
 Nombre de doses de MALACEF® reçues au total : .....

**Évolution sous traitement par MALACEF®**

✳ Résultat de la recherche de *Plasmodium falciparum* à la fin du traitement par MALACEF® :  
 date : ...../...../.....  négatif  positif, préciser la valeur de la parasitémie : .....

✳ Complications du paludisme après le début du traitement par MALACEF® : (Cocher tous les choix qui s'appliquent et préciser la date de survenue)

	date
<input type="checkbox"/> Troubles de la conscience ou coma avec Score de Glasgow :	
<input type="checkbox"/> Prostration	
<input type="checkbox"/> Convulsions généralisées répétées (plus de 2 crises/24heures)	
<input type="checkbox"/> Défaillance respiratoire ou Œdème pulmonaire (radiologique)	
<input type="checkbox"/> Ictère clinique ou taux de bilirubine totale > 50 µmol/l	
<input type="checkbox"/> Hémorragie clinique ou hémoglobinurie macroscopique	
<input type="checkbox"/> Défaillance cardio-circulatoire	
<input type="checkbox"/> Insuffisance rénale (créatinémie > 265µmol/l et diurèse < 400 ml/24h),	
<input type="checkbox"/> Acidose (HCO3 plasmatique < 15 mmol/l ou pH < 7,35)	
<input type="checkbox"/> Hyperlactatémie	
<input type="checkbox"/> Hypoglycémie (<2.2 mmol/l ou < 40 mg/dl),	
<input type="checkbox"/> Anémie grave (Hb < 7 g/dl, hémocrite < 20%)	
<input type="checkbox"/> Autre :	

✳ Présence de complications résiduelles au jour 7?  Oui  Non  
 Si oui, préciser : .....

✳ Survenue d'effet(s) indésirable(s) lié(s) au MALACEF® ?  OUI\*  NON  
 Si oui, préciser :

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

(\*Remplir également la fiche de déclaration d'effet indésirable)



**4.2 Article : “Delayed hemolysis does not undermine the life-saving impact of artesunate. A prospective study of 123 patients with imported *P. falciparum* severe malaria” (article accepté à *Emerging Infectious Diseases*).**

1 Delayed hemolysis does not undermine the life-saving impact of artesunate.

2 A prospective study of 123 patients with imported *P. falciparum* severe malaria

3

4 Stéphane Jauréguiberry,<sup>1, 2, 3</sup> Marc Thellier,<sup>2, 3, 4</sup> Papa Alioune Ndour,<sup>2</sup> Flavie Ader,<sup>4</sup> Camille

5 Roussel,<sup>2</sup> Romain Sonnevile,<sup>5</sup> Julien Mayaux,<sup>6</sup> Sophie Matheron,<sup>7</sup> Adela Angoulvant,<sup>8, 9, 10</sup>

6 Benjamin Wyplosz,<sup>11</sup> Christophe Rapp,<sup>12</sup> Thierry Pistone,<sup>13</sup> Bénédicte Lebrun-Vignes,<sup>14</sup> Eric

7 Kendjo,<sup>3</sup> Martin Danis,<sup>2, 3, 4</sup> Sandrine Houzé,<sup>15</sup> François Bricaire,<sup>1</sup> Dominique Mazier,<sup>2, 3, 4</sup>

8 Pierre Buffet,<sup>2, 3, 4</sup> Eric Caumes,<sup>1</sup> and the FrAWG (French Artesunate Working Group).

9 1. AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service des maladies infectieuses et médecine  
10 tropicale, Paris, F-75013, France

11 2. Centre d’Immunologie et des Maladies Infectieuses de Paris, CIMI-PARIS, U 1135  
12 INSERM/UPMC Université Paris VI, Paris F-75005, France

13 3. Centre National de Référence du Paludisme-site Pitié Salpêtrière, Paris, F-75013,  
14 France

15 4. AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de parasitologie-mycologie, Paris, F-75013,  
16 France

17 5. AP-HP, Hôpital Bichat, Service de réanimation médicale, Paris, F-75018, France

18 6. AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de réanimation médicale, Paris, F-75013,  
19 France

20 7. AP-HP, Hôpital Bichat, Service des maladies infectieuses et tropicales, Paris, F-  
21 75018, France

22 8. AP-HP, Hôpital de Bicêtre, Laboratoire de parasitologie-mycologie, le Kremlin  
23 Bicêtre, F-94275, France

- 24 9. Université Paris-Sud, Faculté de médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276,  
25 France
- 26 10. Université Paris-Sud, UMR 8621, Orsay, F-91405, France
- 27 11. AP-HP, Hôpital de Bicêtre, Service des maladies infectieuses, Kremlin Bicêtre, F-  
28 94270, France
- 29 12. HIA Begin, Service des maladies infectieuses et tropicales, St Mandé, F-94160,  
30 France
- 31 13. CHU Hôpital Pellegrin, Service des maladies infectieuses et tropicales, Bordeaux, F-  
32 33000, France
- 33 14. AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Centre de Pharmacovigilance, Paris, F-75013,  
34 France
- 35 15. AP-HP, Hôpital Bichat, Servie de parasitologie, Paris, F-75018, France

36

37 Corresponding author: Stéphane Jauréguiberry (stephane.jaureguiberry@gmail.com)

38 Abstract word count: 148

39 Manuscript word count: 3163

40 Number of figures: 2

41 Number of tables: 4

42 Number of supplemental tables: 2

43 Running head line: **Artesunate and delayed hemolysis**

44

45 **Abstract**

46 Artesunate is the most effective treatment in patients with severe malaria. However post  
47 artesunate delayed onset hemolytic (PADH) anemia has been observed in approximately 20%  
48 of artesunate-treated travelers and led to transfusion in about 60%. This could discourage  
49 physicians for using artesunate. We prospectively evaluated a cohort of 123 travelers with  
50 severe malaria treated with artesunate focusing on outcome, adverse events and PADH. Six  
51 patients died (5%). Overall there were 97 adverse events. Among the 78 patients who  
52 received follow-up beyond day 8, 76 (97%) had anemia and PADH was recorded in 21  
53 patients (27%). In 85% of the PADH cases, the anemia remained mild. The median drop of  
54 hemoglobin was 1.3g/dl. However 15% had hemoglobin <7g/dl (1/21 patients was  
55 transfused). Despite the high incidence of PADH, the resulting anemia remained mild in 85%  
56 of the cases. This reassuring result confirms the safety and therapeutic benefit of artesunate.

57

58 **Introduction**

59 Intravenous artesunate (AS) is the recommended first-line treatment for severe malaria  
60 worldwide since 2010 (1). Two large randomized trials showed 35% and 22.5% reductions in  
61 mortality rates when AS was compared with parenteral quinine in the treatment of severe  
62 malaria in adults and children in Asia and Africa (2, 3). Four case series performed in  
63 Western countries, including 97 travelers returning from endemic countries (mainly Africa)  
64 and treated with AS, reported death rates below 4% (4-7).

65 AS is generally considered to be safe (8). However its use in Western countries has shown  
66 that delayed hemolytic events occur in approximately 20% of travelers with severe malaria  
67 treated with artesunate, 60% of whom require blood transfusion (4, 6, 7, 9-11). Delayed onset  
68 episodes of anemia, named here Post Artesunate Delayed onset Hemolysis (PADH) anemia,  
69 typically occur 2 to 3 weeks after treatment initiation, long after all parasites have been  
70 cleared. PADH episodes then resolve 3 to 6 weeks after the first dose of intravenous AS (7).  
71 The mechanism is hemolytic with high serum lactate dehydrogenase (LDH) levels and low  
72 plasma haptoglobin. No common conventional cause of hemolysis was identified across  
73 studies (4, 6, 12-14). In the only comparative study available so far, PADH anemia episodes  
74 were described in 5 of 8 hyperparasitemic patients treated with AS, alone or in combination  
75 with quinine, but not in patients treated with quinine alone, supporting the assumption that  
76 this side effect is related to AS (11). PADH anemia has not been recorded in meta-analyses  
77 (8) neither observed in large clinical trials in which post-treatment follow-up was not  
78 prolonged (2, 3). However PADH has been reported recently in African children (15).

79 This recently described adverse event is a matter of concern for the medical community. It  
80 could slow down the ongoing therapeutic change in favor of AS rather than quinine, a less  
81 efficient treatment for severe malaria. WHO recently recommended increased vigilance for

82 PADH anemia and called for a more precise description of its incidence, time course and  
83 severity (16). The goal of the present work was to describe the efficacy and the safety of AS,  
84 with a focus on PADH anemia, in a cohort of travelers with imported severe malaria.

85

86 **Materials and methods**

87 This was a prospective analysis of clinical and safety characteristics in patients receiving  
88 intravenous artesunate for severe malaria through an existing artesunate surveillance program  
89 in France.

90 **Named-patient program and treatment**

91 In May 2011, intravenous artesunate (vial of 60 mg powder and solvent) became available in  
92 France through the ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament), the French drug  
93 agency. The product, manufactured by Guilin laboratories (Guilin Pharmaceutical Shanghai  
94 Co., Ltd.), was imported from China to Europe by ACE Pharmaceuticals BV, Netherlands.  
95 Within the framework of a named-patient program, data were prospectively collected from  
96 ANSM forms completed by attending physicians at the beginning and the end of treatment,  
97 and from medical charts. Both were retrieved by a dedicated team at the National Reference  
98 Center for Malaria (NRCM). Additional data were obtained from the national  
99 pharmacovigilance system and from the database at the NRCM as previously described (17).  
100 Age, sex, native country, place of acquisition, immune status (HIV), pregnancy status,  
101 chemoprophylaxis appropriateness, purpose of travel, disease duration before treatment,  
102 location where AS was prescribed, first-line treatment use, median duration and dose of AS  
103 treatment, length of stay in the medical setting, outcome, clinical and biological criteria for  
104 severe malaria (see below) and follow-up were retrieved. The AS database was implemented  
105 and informed patient consent obtained in accordance with a procedure common to all French  
106 National Reference Centers  
[107 \(\[http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000810056&dateTe\]\(http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000810056&dateTexte=\)  
108 \[xte\]\(http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000810056&dateTexte=\)=\). Data were collected and analyzed anonymously. All patients received intravenous AS  
109 \(2.4 mg/kg\) at H0, H12, H24 and daily thereafter until a relay of oral anti-malarial treatment](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000810056&dateTexte=)

110 could be administered to complete treatment, as recommended in France (18). When the  
111 patient was treated with a full 7-day course of IV AS, no other treatment was administered.

### 112 **Case definitions**

113 Selected clinical and biological criteria relevant to the diagnosis of severe malaria were  
114 retrieved (19, 20). A severe case was defined as a positive blood smear with asexual parasite  
115 forms of *P. falciparum* associated with at least 1 criterion of severity (Supplemental Table 1).  
116 Patients with mixed species infections were not included in the analysis.

117 Anemia was defined as blood hemoglobin below 12g/dl in women and below 13g/dl in men.  
118 Hemolysis was defined as plasma haptoglobin below 0.1 g/l, and/or plasma lactic  
119 dehydrogenase (LDH) above 390 IU/l. We defined 4 patterns of anemia based on previous  
120 proposals (7, 10, 11). The “rising” pattern was defined by a nadir of hemoglobin and a peak of  
121 hemolysis occurring before day (D) 8 without positive markers of hemolysis after D8 and/or  
122 without any information for a hemolytic component for persisting anemia in the medical  
123 chart. The “delayed” onset hemolysis and anemia pattern (PADH anemia) was defined by a  
124 new drop of the hemoglobin level after D8 and an appearance or reappearance of hemolytic  
125 markers occurring after D8 and/or any information in the medical chart referring to acute  
126 hemolysis occurring after D8. The “persistent” pattern was defined by the presence of anemia  
127 and positive hemolytic markers both before and after D8, and a pattern not fitting the PADH  
128 pattern definition. The “complex” pattern was defined as all other cases of anemia for which  
129 information was lacking or with an evolution pattern that did not fit any of the previously  
130 defined patterns.

### 131 **Sample collection**

132 Blood samples were routinely collected from artesunate-treated patients as per recommended  
133 medical care by the attending team at D0, D2(+/-1), D7(+/-2), D14(+/-3), D21(+/-3) and

134 D28(+/-3) (18, 21). The samples were routinely analyzed for hemoglobin, reticulocyte count,  
135 total bilirubin, glucose, plasma bicarbonate, lactate, serum creatinine, blood urea nitrogen,  
136 LDH, haptoglobin and parasitemia.

137 **Cure, evolution and side effects**

138 The death rate at day 28 was the main clinical endpoint. Parasitological cure was defined as a  
139 negative smear at D7, possibly confirmed later during follow-up. Relapse was defined as the  
140 reappearance of fever and a positive blood smear with asexual parasite forms of *P. falciparum*  
141 at any time after a first negative result, within the 28-day follow-up period. All side effects  
142 reported on medical charts were recorded and graded using the NIH classification for side  
143 effects

144 ([http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/resources/DAIDSClinRsrch/Documents/daidsa\\_egradingtable.pdf](http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/resources/DAIDSClinRsrch/Documents/daidsa_egradingtable.pdf)).

146 **Statistical analysis**

147 Travel characteristics and demographic, clinical, and laboratory variables were evaluated.  
148 Quantitative variables were expressed as medians and quartiles (Q1-Q3) or as means with  
149 standard errors of the mean (SEM) when appropriate. Qualitative variables were expressed as  
150 percentages. Differences between groups (survived vs. deceased, different patterns of anemia)  
151 were analyzed with the Fisher's exact test for categorical variables and the Kruskal–Wallis  
152 test for continuous variables. Statistical analyses were performed using SPSS software,  
153 version 20 for Windows. All reported *P* values are two tailed.

154

155 **Results**

156 **General presentation of the cohort**

157 A study flow chart is provided in Figure 1 and demographic and clinical characteristics of the  
158 123 patients treated with AS are summarized in Supplemental Table 2.

159 **Efficacy**

160 Among the 123 patients, 117 fully or partially recovered and 6 died from severe malaria  
161 (4.9% death rate, 95% CI [2.0-10.8]). All deaths were related to severe multi-organ failure.  
162 On admission, the following characteristics were more frequently seen in the patients who  
163 died: lower median (Q1-Q3) GCS (10 (3-13) versus 14 (14-15) in the survivors  $P=0.001$ ),  
164 respiratory distress (50% (3/6) vs. 9% (11/117),  $P=0.019$ ), higher median parasitemia (11%  
165 (8-26) vs. 6% (2-10),  $P=0.05$ ), higher median lactatemia (mmol/l) (10 (3-12) vs. 2 (2-3),  
166  $P=0.002$ ), higher total bilirubin concentration ( $\mu\text{mol/l}$ ) (98 (98-209) vs. 49 (26-75),  $P=0.007$ ),  
167 lower glycemia (mmol/l) (found below 2.2 in 50% (3/6) vs. 3% (4/117),  $P=0.002$ ), and renal  
168 insufficiency (80% (5/6) vs. 9% (11/117),  $P<0.001$ ). Age, sex, immunocompromised state,  
169 place of acquisition, cardiocirculatory impairment ( $P=0.098$ ) and severe anemia at D0 were  
170 not significantly associated with death. The median lag-time between onset of symptoms and  
171 initiation of treatment with AS was 1.5 (1-5) days in the 6 patients who died vs. 4 (2-5) days  
172 in those who survived ( $P=0.13$ ). AS was used as a second-line treatment after quinine in 2 of  
173 the 6 patients who died versus 49 of the 117 patients who survived ( $P=1$ ). All survivors had  
174 complete parasite clearance before D7. Only one case of relapse was observed during follow-  
175 up, occurring 26 days after a 3-day course of IV AS not followed by the recommended oral  
176 course of antimalarial therapy.

177 **Safety**

178 Safety data were available up to D8 in 123 patients and beyond D8 (to D28) in 78 patients.  
179 All reported adverse events resolved during follow-up.

180 Table 1 summarizes severity resulting from a comprehensive analysis of all adverse events  
181 considered as being potentially related to AS (NIH grading). Liver enzymes increased in  
182 8/117 survivors, including 6 patients who received one or more concomitant medications with  
183 potential liver toxicity, i.e., paracetamol or a non-steroidal anti-inflammatory drug. All these  
184 episodes occurred before D8. Rash, telogen effluvium and mild pruritus were recorded in one  
185 case each: the rash occurred several days after the end of AS administration and was  
186 considered unrelated to AS; the telogen effluvium was diagnosed during the 28-day follow-up  
187 period; and the pruritus occurred during AS treatment and disappeared without any specific  
188 intervention. One episode of vision loss was considered to be related to a hypertensive  
189 retinopathy by the attending ophthalmologist. There were two cases of acute cerebellar  
190 syndrome, both thought to be related to a post-malaria neurological syndrome. One case of  
191 tinnitus was recorded in a patient who received quinine just before AS. One patient  
192 experienced continuous tremors that resolved spontaneously. QTc lengthening and transient  
193 bradycardia were recorded in 1 and 2 patients respectively. One of the transient bradycardia  
194 episodes (54bpm) occurred between two injections of AS and resolved spontaneously. In the  
195 patient with QTc lengthening (460ms) AS (total dose administered 480mg) was changed to  
196 artemether-lumefantrine (4 tablets), then atovaquone-proguanil (4 tablets per day for 3 days)  
197 due to persistence of the QTc lengthening (560ms) accompanied by hypokalemia below  
198 3mmol/l. These two patients were young (13 and 15 years) and weighted 62 and 40kg  
199 respectively. One patient suffered of severe disseminated intravascular coagulation. The  
200 consequences were arterial ischemia of extremities and central nervous system ischemia  
201 (caudate nuclei, corona radiata and white matter). Amputation of fingers and lower limb  
202 (both) was necessary. All signs were considered related to severe malaria. One patient with

203 myasthenia gravis received AS with no worsening of the underlying disease (22). Four  
204 patients were pregnant, with one of the pregnancies discovered during therapy. One  
205 miscarriage occurred with hemorrhage leading to a blood transfusion. AS was well tolerated  
206 in two female patients during the second and the third trimesters, and in one during labor. No  
207 cases of hypoglycemia were recorded during AS treatment.

#### 208 **Anemia, hemolysis and transfusion**

209 Anemia was nearly constant, slow to resolve, and followed variable patterns (Figure 1 and 2).  
210 Of the 78 patients with appropriate follow-up, 76 (97.4%, 95%CI [91.0-99.7]) had anemia at  
211 some point (Figure 1). The “rising”, “persistent” and “PADH” patterns were observed  
212 respectively in 35/78 (44.9%, 95%CI [33.8-55.9]), 16/78 (20.5%, 95%CI [11.6-29.5]) and  
213 21/78 (26.9%, 95%CI [17.1-36.8]) of the patients with or without transfusion who received  
214 follow-up (clinical and/or biological) beyond D8 (78). The median drop of hemoglobin in the  
215 “PADH” group was 1.3 g/dl between day 7 (+/-2) and day 14 (+/-3) but lower and upper  
216 limits of hemoglobin range from 4.6 to 12.9 g/dl at day 14 (+/-3). Of the 8 patients with  
217 intense/potentially severe anemia between D11 and D27, 4 (50%) had a typical PADH  
218 episode ( $P=0.4$ ) (Figure 2a). Of the 21 patients with PADH, 3 (14.3%, 95% CI [3.1-36.3]) had  
219 blood hemoglobin <7g Hb/dl during the second post-treatment week (6.2, 4.6 and 6.3 g/dl).

220 We found no parameter significantly associated with a particular pattern (Tables 2 and 3)  
221 except the median hemoglobin level (g/dl) at D0, which was estimated at 11.3 (10-13), 11.2  
222 (9-13) and 13.6 (12-15) for the “rising”, “persistent” and “PADH” patterns, respectively  
223 ( $P=0.009$ ) (Table 4). During the second post-treatment week, the rise in LDH levels and the  
224 drop in haptoglobin levels were consistent with hemolytic anemia (Figure 2b) lasting  
225 approximately one to two weeks. At day 21 and 28, median LDH levels remained high at 724  
226 IU/l (344 to 1564) and 497 IU/l (177 to 922), respectively. Haptoglobin remained

227 undetectable during weeks 2 and 3 (Table 4, Figure 2b). During subsequent weeks,  
228 hemoglobin levels rose slowly in the rising group with normalized hemolysis markers (Table  
229 4). Maximum reticulocyte production occurred during week 2 for the “rising” and “persistent”  
230 pattern and during week 3 for the “PADH” pattern (Figure 2b, Table 4). At D28, all 3 groups  
231 had reached similar hemoglobin levels (~11.3 g/dl).

232 Overall, 15 (19.3%, 95%CI [10.5-28.0]) of the 78 patients received a total of 20 blood  
233 transfusions (Figure 1). Fifteen of the 20 transfusions (75%) were performed before D8,  
234 during the acute phase of the disease (Figure 1). Among all the patients with delayed  
235 hemolysis, one (4.8%, 95%CI [0.1-23.8]) had a blood transfusion after D8 (nadir of  
236 hemoglobin at 6.3 g/dl). All patients were cured, and no deaths were related to any side  
237 effects including anemia.

238

239 **Discussion**

240 In this cohort of 123 travelers treated for severe malaria in high-care settings, intravenous  
241 artesunate was very effective and generally safe. The mortality rate was 5% and blood  
242 transfusion was necessary in less than 20% of all the patients and less than 5% of the patients  
243 with “PADH”. Our prospective approach based on a named-patient program reduced bias  
244 toward severe cases and provided a robust evaluation of artesunate safety, particularly as  
245 concerns post-artesunate delayed hemolysis (PADH) and anemia.

246 The death rate of 5% in this cohort is lower than those observed in artesunate-treated adults  
247 managed in field conditions (2, 3) and similar to those in previous, smaller cohorts of  
248 travelers treated with artesunate in high-care facilities (23, 24). A retrospective study in the  
249 UK comparing 143 quinine-treated patients to 24 artesunate-treated patients reported no  
250 deaths, fewer ICU admissions and shorter hospitalization in these latter (25). In a study of 400  
251 severe imported *P. falciparum* malaria cases treated with quinine (10% death rate), the major  
252 factors associated with death were low GCS, respiratory failure, severe renal impairment,  
253 hyperlactemia or hypoglycemia (23) during the first 24 hours. Despite differing data capture  
254 methods and severity scores, we found the same factors associated with death in this cohort of  
255 artesunate-treated patients.

256 “PADH” was frequent (27%), but rarely associated with severe anemia (i.e., hemoglobin <  
257 7g/dl), and never fatal. Previous observations (7) may have been partially biased toward the  
258 most severe cases; in contrast our prospective approach efficiently captured mild or moderate,  
259 often asymptomatic episodes. In our study the median delayed drop in hemoglobin levels was  
260 1.3 g/dl. Although “PADH” accounted for the majority of severe anemia episodes (Figure 2a),  
261 only 3 patients (15%) had hemoglobin levels below 7g/dl, and only 1 of these 3 patients was  
262 transfused. This transfusion rate below 5% is thus markedly lower than that found in previous

263 reports on delayed anemia in severe imported malaria which was about 60% (4, 6, 7, 11, 13).  
264 Taken together, our results demonstrate that in the setting of imported severe malaria, delayed  
265 hemolysis does not alter the life-saving impact of intravenous artesunate, but it does need  
266 focused attention and follow-up.

267 With the exception of the pre-treatment hemoglobin level, no parameters – including the  
268 cumulative dose of AS and initial parasitemia – were correlated with the risk of delayed  
269 hemolysis in our study. Some authors have associated high parasitemia with intense delayed  
270 hemolysis (6, 7, 11) while others (4) have demonstrated that not all patients with high  
271 parasitemia develop late onset hemolysis. Other factors are related to the peculiar mode of  
272 action linked to artemisinin derivatives and probably involved in delayed hemolysis (4, 26).  
273 Indications pointing to the involvement of “pitting” (27, 28) a process whereby dead parasites  
274 are expelled from infected erythrocytes, has been reported elsewhere (29, 30). We have  
275 shown that the risk of “PADH” is linked to the peak number of pitted erythrocytes rather than  
276 the absolute initial parasitemia (31).

277 Side effects of AS are generally considered mild. The most frequently described side effects  
278 are gastrointestinal disturbances, neutropenia (1.3%), reticulocytopenia (0.6%) and elevation  
279 of liver enzymes (1.1%) (32-34). In studies of travelers treated in non-endemic countries, no  
280 severe hemodynamic, cardiac or allergic reactions were attributed to AS (4, 5, 7, 11). AS is  
281 considered potentially cardiotoxic for doses over 15 mg/kg (32). However in our study, 3  
282 patients treated with the recommended dosage (2.4 mg/kg) developed mild to moderate  
283 cardiotoxicity. They were rapidly switched to another therapy and the signs and symptoms  
284 disappeared. The cases were not explored further by the attending physicians. Whether these  
285 cardiac episodes were related to artesunate is not entirely clear. In a study performed in  
286 Bangladesh involving 21 adults with severe malaria treated with AS, two of the patients  
287 experienced QTc interval lengthening >500ms, but, as observed in one of our patients,

288 hypokalemia was present (35). None of the other side effects reported as potentially  
289 attributable to AS in other studies, such as dizziness, nausea, diarrhea, anorexia and metallic  
290 taste in the mouth, were recorded in this cohort, and furthermore the neurologic episodes were  
291 considered to be related to malaria rather than AS by the attending physicians.

292 This study is not devoid of weaknesses. The prospective surveillance system implemented in  
293 France relies on the motivation of attending physicians and parasitologists to report data to the  
294 NRCM dedicated team. Also case declaration is not compulsory. Thus some adverse events  
295 might have been overlooked. Patients with delayed hemolysis but who tolerate anemia well  
296 may not have been reported. Furthermore, symptoms of delayed anemia may be confused  
297 with slow clinical recovery from the severe malarial episode and thus remain undetected until  
298 spontaneous recovery. Nevertheless, it is unlikely that severe cases of delayed hemolysis or  
299 other severe side effects would be overlooked in a named-patient program implemented at  
300 high-level facilities and, as mentioned, this study captured a fairly high proportion of mild to  
301 moderate episodes of delayed hemolysis. The study was furthermore not randomized, but in  
302 the setting of imported severe malaria, it is considered unethical to repeat artesunate versus  
303 quinine trials already performed in endemic countries (3, 36).

304 To our knowledge this work is the largest to date focusing on hemolysis and anemia in  
305 travelers receiving AS for severe malaria. Our prospective analysis joins other reports (16, 37)  
306 in confirming the very favorable risk-to-benefit ratio of intravenous AS in the treatment of  
307 severe imported malaria despite “PADH” and anemia. Our results show that in this setting,  
308 delayed hemolysis did not alter the life-saving impact of intravenous artesunate. Delayed  
309 hemolysis was frequent but resulted in very low levels of hemoglobin in about 15% of the  
310 cases. WHO and national entities recommend assessing hemoglobin levels every week for  
311 one month after AS administration for appropriate diagnosis and treatment of severe anemia  
312 should it occur (16, 18, 21). Further studies are now needed to find predictive markers of

313 hemolysis and anemia, so as to facilitate post-treatment follow-up in travelers and in children  
314 in endemic countries (10-12, 31).

315

316 *Dr Jauréguiberry is a physician in the Department of Infectious and Tropical diseases at the*  
317 *Pitié Salpêtrière University Hospital in Paris. His research interests include pathophysiology*  
318 *and treatment of malaria and epidemiology of imported diseases.*

319

#### 320 **FrAWG List**

321

#### 322 **Funding**

323 This work was supported by grants from the DIM Mal Inf Région Ile de France, the  
324 Worldwide Antimalarial Resistance Network, the Bill and Melinda Gates foundation, and the  
325 Follereau Foundation. Further support was provided by an Inserm-APHP France interface  
326 contract. Stéphane Jauréguiberry has a grant from the Collège des Universitaires des Maladies  
327 Infectieuses et Tropicales (CMIT).

#### 328 **Conflict of interests**

329 SJ and PB are engaged in a collaboration with Guillin laboratories. PB provided expertise to  
330 Sigma-Tau laboratories and Sanofi Aventis Group Research & Development. TP provided  
331 expertise to Sigma-Tau laboratories in France. MD has provided expertise to Sigma-Tau and  
332 Sanofi laboratories.

333 Other authors declare no competing interests.

#### 334 **Acknowledgements**

335 We also thank Ipsita Sinha and Charlie Woodrow from Mahidol Oxford Research Unit and  
336 Muriel Vray from Pasteur Institute for the fruitful discussions. We are grateful to Elsa Boher  
337 and Françoise Mancel from the Agence Nationale de Sécurité du Médicament for constructive  
338 interactions.

339

340 **References**

341

- 342 1. WHO. The treatment of malaria, 2nd edn. Geneva, Switzerland. 2010.
- 343 2. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N. Artesunate versus quinine for  
344 treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet* 2005; 366: 717-725.
- 345 3. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, et al.  
346 Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children  
347 (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet* 2010; 376: 1647-1657.
- 348 4. Kreeftmeijer-Vegter AR, van Genderen PJ, Visser LG, Bierman WF, Clerinx J, van  
349 Veldhuizen CK, et al. Treatment outcome of intravenous artesunate in patients with severe  
350 malaria in the Netherlands and Belgium. *Malar J* 2012; 11: 102.
- 351 5. Morch K, Strand O, Dunlop O, Berg A, Langeland N, Leiva RA, et al. Severe malaria and  
352 artesunate treatment, Norway. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1816-1818.
- 353 6. Rolling T, Schmiedel S, Wichmann D, Wittkopf D, Burchard GD, Cramer JP. Post-  
354 treatment haemolysis in severe imported malaria after intravenous artesunate: case report  
355 of three patients with hyperparasitaemia. *Malar J* 2012; 11: 169.
- 356 7. Zoller T, Junghans T, Kapaun A, Gjorup I, Richter J, Hugo-Persson M, et al. Intravenous  
357 artesunate for severe malaria in travelers, Europe. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 771-777.
- 358 8. Sinclair D, Donegan S, Isba R, Lalloo DG. Artesunate versus quinine for treating severe  
359 malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 6: CD005967.
- 360 9. Itoda I, Yasunami T, Kikuchi K, Yamaura H, Totsuka K, Yoshinaga K, et al. Severe  
361 falciparum malaria with prolonged hemolytic anemia after successful treatment with  
362 intravenous artesunate. *Kansenshogaku Zasshi* 2002; 76: 600-603.
- 363 10. MMV. Experts Group Meeting on delayed anaemia following treatment with injectable  
364 artesunate, Wien Austria.  
365 [http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/events/2013/InjectableArtesunateEx](http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/events/2013/InjectableArtesunateExpertGroupMeeting.pdf)  
366 [pertGroupMeeting.pdf](http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/events/2013/InjectableArtesunateExpertGroupMeeting.pdf). ed:  
367 [http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/events/2013/InjectableArtesunateEx](http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/events/2013/InjectableArtesunateExpertGroupMeeting.pdf)  
368 [pertGroupMeeting.pdf](http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/events/2013/InjectableArtesunateExpertGroupMeeting.pdf); 2013.
- 369 11. Rolling T, Wichmann D, Schmiedel S, Burchard GD, Kluge S, Cramer JP. Artesunate  
370 versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of  
371 adverse events focussing on delayed haemolysis. *Malar J* 2013; 12: 241.
- 372 12. Briggs M, Arguin PM. Published reports of delayed hemolytic anemia after treatment with  
373 artesunate for severe malaria-Worldwide, 2010-2012. *MMWR* 2013; 62: 5-8.
- 374 13. Caramello P, Balbiano R, De Blasi T, Chiriotto M, Deagostini M, Calleri G. Severe  
375 malaria, artesunate and haemolysis. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2053-2054.
- 376 14. Kano S. Artemisinin-based combination therapies and their introduction in Japan. *J Infect*  
377 *Chemother* 2010; 16: 375-382.
- 378 15. Rolling T, Agbenyega T, Issifou S, Adegnika AA, Sylverken J, Spahlinger D, et al.  
379 Delayed Hemolysis After Treatment With Parenteral Artesunate in African Children  
380 With Severe Malaria--A Double-center Prospective Study. *J Infect Dis* 2014.
- 381 16. WHO, GMP. Information Note on Delayed Haemolytic Anaemia following Treatment  
382 with Artesunate October 2013.  
383 [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who\\_note\\_delayed\\_haemolytic\\_anaemia\\_o](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_note_delayed_haemolytic_anaemia_oct13.pdf?ua=1)  
384 [ct13.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_note_delayed_haemolytic_anaemia_oct13.pdf?ua=1) World Health Organization; 2013.

- 385 17. Seringe E, Thellier M, Fontanet A, Legros F, Bouchaud O, Ancelle T, et al. Severe  
386 imported *Plasmodium falciparum* malaria, France, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 2011;  
387 17: 807-813.
- 388 18. ANSM. Protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations Malacef®  
389 (artésunate) 60mg, poudre et solvant pour solution injectable laboratoire ACE  
390 Pharmaceuticals BV // ARTECEF BV. 2013. Available from:  
391 [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/01d138a64031bcf9f37fa27](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/01d138a64031bcf9f37fa2737308caa5.pdf)  
392 [37308caa5.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/01d138a64031bcf9f37fa2737308caa5.pdf).
- 393 19. SPILF. Recommendations for clinical practice. Management and prevention of imported  
394 *Plasmodium falciparum* malaria. (Revision 2007 of the 1999 Consensus conference).  
395 Short text. *Med Mal Infect* 2008; 38: 54-67, 39-53.
- 396 20. WHO. Severe *falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94 (suppl): 1-90.
- 397 21. HCSP. Place de l'artésunate injectable dans le traitement du paludisme grave de l'adulte  
398 et de l'enfant en France. 2013 [cited 2013. Available from:  
399 [http://www.hcsp.fr/explore.cgi/telecharger/hcspr20130201\\_palugraveartésunate.pdf](http://www.hcsp.fr/explore.cgi/telecharger/hcspr20130201_palugraveartésunate.pdf).
- 400 22. Dournon N, Buffet P, Caumes E, Clair B, Jaureguiberry S. Artesunate for severe acute  
401 *Plasmodium falciparum* infection in a patient with myasthenia gravis. *Am J Trop Med*  
402 *Hyg* 2012; 87: 435-436.
- 403 23. Bruneel F, Tubach F, Corne P, Megarbane B, Mira JP, Peytel E, et al. Severe imported  
404 *falciparum* malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PLoS One* 2010; 5: e13236.
- 405 24. Legros F, Bouchaud O, Ancelle T, Arnaud A, Cojean S, Le Bras J, et al. Risk factors for  
406 imported fatal *Plasmodium falciparum* malaria, France, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*  
407 2007; 13: 883-888.
- 408 25. Eder M, Farne H, Cargill T, Abbara A, Davidson RN. Intravenous artesunate versus  
409 intravenous quinine in the treatment of severe *falciparum* malaria: a retrospective  
410 evaluation from a UK centre. *Pathogens and global health* 2012; 106: 181-187.
- 411 26. Corpolongo A, De Nardo P, Ghirga P, Gentilotti E, Bellagamba R, Tommasi C, et al.  
412 Haemolytic anaemia in an HIV-infected patient with severe *falciparum* malaria after  
413 treatment with oral artemether-lumefantrine. *Malar J* 2012; 11: 91.
- 414 27. Angus BJ, Chotivanich K, Udomsangpetch R, White NJ. In vivo removal of malaria  
415 parasites from red blood cells without their destruction in acute *falciparum* malaria.  
416 *Blood* 1997; 90: 2037-2040.
- 417 28. Buffet PA, Milon G, Brousse V, Correas JM, Dousset B, Couvelard A, et al. Ex vivo  
418 perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions. *Blood* 2006;  
419 107: 3745-3752.
- 420 29. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The  
421 pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic  
422 physiology. *Blood* 2011.
- 423 30. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Dondorp A, Williams T, Angus B, Simpson JA, et al.  
424 The mechanisms of parasite clearance after antimalarial treatment of *Plasmodium*  
425 *falciparum* malaria. *J Infect Dis* 2000; 182: 629-633.
- 426 31. Jaureguiberry S, Ndour PA, Roussel C, Ader F, Safeukui I, Nguyen M, et al. Post-  
427 artesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the live-saving effect of  
428 artemisinins. *Blood* 2014.
- 429 32. Hess KM, Goad JA, Arguin PM. Intravenous artesunate for the treatment of severe  
430 malaria. *Ann Pharmacother* 2010; 44: 1250-1258.
- 431 33. Ribeiro IR, Olliaro P. Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and  
432 unpublished clinical trials. *Med Trop (Mars)* 1998; 58: 50-53.
- 433 34. Rosenthal PJ. Artesunate for the treatment of severe *falciparum* malaria. *N Engl J Med*  
434 2008; 358: 1829-1836.

- 435 35. Maude RJ, Plewes K, Faiz MA, Hanson J, Charunwatthana P, Lee SJ, et al. Does  
436 artesunate prolong the electrocardiograph QT interval in patients with severe malaria?  
437 *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 126-132.
- 438 36. Shanks GD. For severe malaria, artesunate is the answer. *Lancet* 2010; 376: 1621-1622.
- 439 37. WHO. Malaria Policy Advisory Committee to the WHO: conclusions and  
440 recommendations of September 2012 meeting. *Malar J* 2012; 11: 424.

441

442

443 **Table 1.** Grading severity of comprehensive analysis of all potential adverse events

444 considered as potentially related to AS on 117 patients.

<b>Item</b>	<b>Grade 1 Mild toxicity</b>	<b>Grade 2 Moderate toxicity</b>	<b>Grade 3 Severe toxicity</b>	<b>Grade 4 Life threatening toxicity</b>	<b>Total</b>
<b>Cutaneous</b>	2	1	0	0	3
<b>Ataxia/Tremor/CNS ischemia</b>	0	2	1	1	4
<b>Tinnitus</b>	1	0	0	0	1
<b>Cardiac and arterial ischemia</b>	1	1	1	1	4
<b>Hypertension*</b>	0	0	1	0	1
<b>ALT (SGPT)</b>	2	2	3	1	8
<b>Hyperkalemia</b>	1	0	0	0	1
<b>Anemia**</b>	20	11	27	17	75
<b>Total</b>	27	17	33	20	97

445 \*: regressive retinopathy.

446 \*\*: grading using available nadir of hemoglobin during the follow-up.

447 HIV-negative patient anemia severity grading: Grade 1: 10-10.9 g/dl, Grade 2: 9-9.9 g/dl,

448 Grade 3: 7-8.9 g/dl, Grade 4: < 7 g/dl.

449 HIV-positive patient anemia severity grading: Grade 1: 8.5-10 g/dl, Grade 2: 7.5-8.4 g/dl,

450 Grade 3: 6.5-7.4 g/dl, Grade 4: < 6.5 g/dl.

451

452 **Table 2.** Association between selected variables and the “rising”, “persistent” and “PADH”  
 453 patterns of anemia in 72 patients.

<b>Characteristics</b>	<b>Rising pattern N=35</b>	<b>Persistent pattern N=16</b>	<b>PADH pattern N=21</b>	<b>P</b>
<b>Male gender n(%)</b>	19(54)	10(63)	11(52)	0.8 <sup>(a)</sup>
<b>Age median (Q1-Q3)</b>	44 (30-52)	39 (24-50)	41 (31-53)	0.6 <sup>(b)</sup>
<b>Area of birth n(%)</b>				
Africa	24(69)	7(44)	10(48)	0.1 <sup>(a)</sup>
Europe, North America	9(26)	9(56)	11(52)	
South, Central America	2(6)	0	0	
Asia	0	0	0	
<b>Time of illness before AS (days) Median (Q1-Q3)</b>	4(3-5)	4(1-7)	4(3-5)	0.9 <sup>(b)</sup>
<b>Hyperparasitemia (&gt; 4%), n(%)</b>	18(51)	10(63)	16(76)	0.1 <sup>(a)</sup>
Hyperparasitemia > 10%	8(23)	5(31)	5(24)	0.8 <sup>(a)</sup>
Median parasitemia at D0 (% of infected red blood cells) (Q1-Q3)	5 (1-7)	8 (1-16)	7 (4-15)	0.1 <sup>(b)</sup>
<b>Total dose of AS (mg)</b>				
Median total dose (Q1-Q3)	780 (540-1030)	882 (615-1046)	800 (676-955)	0.7 <sup>(b)</sup>
<b>First line treatment for the current SM episode, n(%)</b>				
AS first	20(57)	9(56)	15(71)	0.5 <sup>(a)</sup>

454 <sup>(a)</sup> Fisher exact test, <sup>(b)</sup> Kruskal-Wallis test, AS: artesunate, SM: severe malaria

455

456

457 **Table 3.** Complementary qualitative features when stated for the “rising”, “persistent” and  
 458 “PADH” patterns of anemia during follow-up in 72 patients.

	<b>Rising pattern</b>	<b>Persistent pattern</b>	<b>PADH pattern</b>
<b>All DAT + / DAT realized</b>	1/2*	1/3**	3/5***
<b>DAT+ and HIV+</b>	0	1	1
<b>G6PD deficiency / G6PD realized</b>	1/3 <sup>#</sup>	0/0	0/5
<b>Abnormal Hb electrophoresis / Hb electrophoresis realized</b>	3/5 <sup>¥</sup>	0/1	0/6
<b>Persisting renal insufficiency</b>	3	2	1
<b>Renal insufficiency and HIV+</b>	1	0	0
<b>HIV+</b>	2	1	1
<b>Iron deficiency / Assay of iron realized</b>	1/5	0/0	1/1

DAT: direct antiglobulin test.

G6PD: Glucose 6 phosphate dehydrogenase.

Hb: hemoglobin.

\*: specification missing.

\*\* : DAT + for IgG.

\*\*\*: 2 DAT + for IgM with one patient treated for a period of time with corticosteroid, one specification missing.

#: 2U/gHb.

¥: A/S sickle disease hemoglobin, A/C disease hemoglobin, minor alpha thalassemia, one case each.

459

460

461 **Table 4.** Levels of hemoglobin, reticulocyte count, LDH and haptoglobin in 72 patients with “rising”, “persistent” and “PADH” anemia pattern  
 462 during 28 days of follow-up. Results are expressed in median (upper and lower limits).

		Median (upper-lower limits)										
		D0	N	D7+/-2*	N	D14+/-3	N	D21+/-3	N	D28+/-3	N	
<b>Rising pattern</b>	Hemoglobin (g/dl)	<b>11.3 (17-7)</b>	<b>35</b>	<b>9.2 (13-7)</b>	<b>43</b>	<b>10.2 (13-8)</b>	<b>16</b>	<b>10.6 (12-8)</b>	<b>15</b>	<b>11.6 (14-9)</b>	<b>22</b>	
	Reticulocyte (Giga/l)	61 (183-3)	14	65 (444-6)	12	133 (171-91)	8	94 (178-56)	6	73 (100-38)	5	
	LDH (IU/l)	615 (2242-161)	16	672 (1601-312)	13	519 (728-312)	6	444 (574-201)	5	402 (798-269)	8	
<b>Persistent pattern</b>	Hemoglobin (g/l)	<b>11.2 (16-6)</b>	<b>16</b>	<b>9.1 (13-6)</b>	<b>19</b>	<b>9.9 (14-6)</b>	<b>16</b>	<b>10.7 (13-9)</b>	<b>7</b>	<b>11.3 (13-8)</b>	<b>8</b>	
	Reticulocyte (Giga/l)	70 (93-47)	2	58 (175-2)	13	190 (412-75)	12	118 (204-88)	6	73 (92-34)	7	
	LDH (IU/l)	1018 (3003-794)	8	863 (2722-337)	15	596 (1139-261)	11	626 (905-262)	7	476 (766-240)	7	
<b>PADH pattern</b>	Hemoglobin (g/dl)	<b>13.6 (16-9)</b>	<b>21</b>	<b>11.2 (14-6)</b>	<b>20</b>	<b>9.9 (13-5)</b>	<b>24</b>	<b>10.0 (13-7)</b>	<b>15</b>	<b>11.1 (15-10)</b>	<b>17</b>	
	Reticulocyte (Giga/l)	61 (61-61)	1	34 (132-8)	12	124 (315-63)	15	162 (431-90)	12	127 (223-63)	13	
	LDH (IU/l)	846 (1195-293)	9	634 (793-510)	14	112 (4000-554)	17	724 (1564-344)	13	497 (922-177)	14	
	Haptoglobin (g/l)	0.0 (0.2-0.0)	5	0.0 (1.5-0.0)	15	0.0 (0.6-0)	18	0.0 (0.0-0.0)	13	0.0 (1.5-0.0)	15	

463  
464

465 ‘N’: number of biological results available for the period.

466 \*: the median drop of hemoglobin during the first week is 2.1, 2.1 and 2.4 g/dl for the rising, persistent and PADH patterns respectively. D0: day

467 0.

469 **Supplemental Table 1.** Case definition for severe malaria according to French 2008 and  
 470 WHO 2000 definition [19, 20].

<b>Neurological impairment</b>
Lethargy
Confusion
Multiple convulsion (>2 episodes/24h)
Glasgow Coma Scale (GCS) < 11
<b>Respiratory distress</b>
Respiratory rate > 32/mn
Crackles
Pulmonary infiltrates (chest x-ray)
PaO <sub>2</sub> < 60 mmHg
SpO <sub>2</sub> < 91%
<b>Cardiocirculatory impairment</b>
Shock (systolic blood pressure ≤ 80 mHg)
Peripheral signs of hypotension
Vasopressive supportive drug
<b>Spontaneous bleeding</b>
<b>Purpuric lesions</b>
<b>Macroscopic hemoglobinuria</b>
<b>Jaundice and/or bilirubin &gt; 50 μmol/l</b>
<b>Anemia (Hb &lt; 7 g/dl or hematocrit &lt; 20%)</b>
<b>Hypoglycemia (glucose &lt; 2.2 mmol/l)</b>
<b>Acidosis</b>
Plasma bicarbonate < 15 mmol/l
Acidemia pH < 7.35
<b>Renal impairment</b>
Serum creatinine > 265 μmol/l and/or Blood urea > 17 mmol/l
Diuresis < 400ml/24h
<b>Hyperlactatemia (arterial lactate &gt; 1.8 mmol/l)</b>
<b>Hyperparasitemia (&gt; 4%)</b>

471

472

473 **Supplemental Table 2.** Baseline (Day 0) demographics, travel characteristics, clinical and biological data of 123 patients with imported severe

474 malaria treated by artesunate (AS) in France (2011-2013).

475

Characteristics	N	Value	Additional information when stated	Value N or Median (Q1-Q3)
<b>Male Gender, n (%)</b>	<b>123</b>	74(60)		
<b>Age and age groups</b>	<b>123</b>	42 (30-55)		
Median age (Q1-Q3)		9 (7)		
0-15 years, n(%)		22 (19)		
16-30 years, n(%)		48 (39)		
31-49 years, n(%)		45 (36)		
>50 years, n(%)				
<b>Area of birth, n (%)</b>	<b>123</b>	65 (53)		
Africa		54 (44)		
Europe, North America		3 (2)		
South, Central America-Caribbean		1 (1)		
Asia				
<b>Place of acquisition, n (%)</b>	<b>123</b>	116 (94)		
West Africa		6 (5)		
East and Austral Africa		1 (1)		
South America				
<b>Immunocompromised status, n (%)</b>	<b>123</b>	9 (7)		
HIV		1 (1)		
Cirrhosis		113 (92)		
None				
<b>Pregnancy, n (%)</b>	<b>49</b>	4 (8%)		

27

<b>Chemoprophylaxis during travel, n (%)</b>	<b>123</b>		<b>Chemoprophylaxis used</b>	<b>N</b>
Yes		24 (20)	Chloroquine (CQ)	3
Inadequate for the country of travel		5 (28)	CQ+Proguanil (PG)	2
			Mefloquine	2
			Atovaquone+PG	7
			Doxycycline	7
			Unknown prophylaxis	3
<b>Reason of stay in endemic zone, n (%)</b>	<b>123</b>		<b>Median length of stay in days (Q1-Q3)<sup>1</sup></b>	
VFR		61 (50)	VFR	33 (23-61)
Tourism		17 (14)	Tourism	21 (13-34)
Tourists from endemic zone		14 (11)	Tourists from endemic zone	na
Business in endemic zone		11 (9)	Business in endemic zone	25 (11-81)
Expatriate		9 (7)	Expatriate	832 (377-1189)
Military		4 (3)	Military	18 (5-56)
Humanitarian		3 (2)	Humanitarian	95 (22-na)
Cryptic malaria		1 (1)	Cryptic malaria	na
Unknown		3 (2)	Unknown	18 (16-na)
<b>Time of illness before treatment by AS in days, Median (Q1-Q3)</b>	<b>123</b>	4 (2-5)		
<b>Clinical data, n (%)</b>				
Temperature > 40°C	118	9 (8)	Temperature (°C)	39 (39 -40)
Pulse rate > 115/min	102	30 (29)	Pulse rate (b/min)	104 (90-118)
Weight > 130kg	121	1 (1)	Weight (kg)	72 (61-81)
<b>Severe malaria criteria at D0, n (%)</b>				
<b>Neurological impairment (any signs)</b>	<b>123</b>	<b>54 (44)</b>		
Lethargy	123	46 (37)		
Confusion	123	39 (32)		
Multiple convulsion (>2 episodes/24h)	123	1 (1)		
GCS < 11	113	16 (14)	GCS	15 (14-15)
<b>Respiratory distress (any signs)</b>	<b>123</b>	<b>14 (11)</b>		
Respiratory rate > 32/min	63	9 (14)	Respiratory rate (cycles/min)	20 (18-28)

28

Crackles	85	9 (11)	PaO <sub>2</sub> (mmHg) <sup>2</sup>	90 (83-107)
Pulmonary infiltrates (chest x-ray)	112	1 (1)	PcO <sub>2</sub> (mmHg) <sup>2</sup>	34 (31-37)
PaO <sub>2</sub> < 60 mmHg	115	13 (11)	FiO <sub>2</sub> > 21% (mechanical ventilation) <sup>3</sup>	8 (10)
SpO <sub>2</sub> < 91%	98	3 (3)	SpO <sub>2</sub> (%) <sup>4</sup>	97 (96-99)
<b>Cardiovascular impairment (any signs)</b>	<b>123</b>	<b>25 (20)</b>		
Shock (systolic blood pressure ≤ 80 mmHg)	102	9 (9)	Sbp (mmHg)	110 (92-125)
Peripheral signs of hypotension§	114	3 (3)	Dbp (mmHg)	64 (53-72)
Vasopressor supportive drug	112	10 (9)		
<b>Spontaneous bleeding</b>	<b>123</b>	<b>1 (1)</b>		
<b>Purpuric lesions</b>	<b>113</b>	<b>2 (2)</b>		
<b>Macroscopic hemoglobinuria</b>	<b>123</b>	<b>17 (14)</b>		
<b>Jaundice and/or bilirubin &gt; 50 µmol/l</b>	<b>122</b>	<b>66 (54)</b>	<b>Total bilirubin (µmol/l)<sup>5</sup></b>	<b>50 (26-81)</b>
Splenomegaly	110	14 (13)	SGPT (UI/l) <sup>6</sup>	47 (29-83)
Splenectomy	113	0 (0)	SGOT (UI/l) <sup>7</sup>	66 (37-103)
			GGT (UI/l) <sup>8</sup>	65 (39-111)
			PAL (UI/l) <sup>9</sup>	80 (63-121)
<b>Anemia (Hb &lt; 7 g/dl or hematocrit &lt; 20%)</b>	<b>123</b>	<b>4 (3)</b>	<b>Hemoglobin (g/dl)<sup>10</sup></b>	<b>12 (11-14)</b>
			Hematocrit (%) <sup>11</sup>	36 (30-41)
			Platelets count x 10 <sup>9</sup> cells/l <sup>12</sup>	42 (25-66)
			Leukocytes count x 10 <sup>9</sup> cells/l <sup>13</sup>	6 (4-8)
<b>Hypoglycemia (glucose &lt; 2.2 mmol/l)</b>	<b>123</b>	<b>7 (6)</b>	<b>Glycemia (mmol/l)<sup>14</sup></b>	<b>6 (5-7)</b>
<b>Acidosis</b>	<b>120</b>	<b>14 (12)</b>		
Plasma bicarbonate < 15 mmol/l	91	9 (10)	Plasma bicarbonate	22 (19-24)
Acidemia pH < 7.35	69	10 (15)	Acidemia (pH)	7.4 (7.4-7.5)
<b>Renal impairment</b>	<b>123</b>			
Creatinine > 120 µmol/l	122	35 (26)	Serum creatinine (µmol/l) <sup>1</sup>	99 (75-143)
Creatinine > 265 µmol/l and/or blood urea > 17 mmol/l	123	16 (13)	Blood urea (mmol/l) <sup>5</sup>	7 (5-12)

29

<b>Hyperlactatemia (arterial lactate &gt; 1.8 mmol/l)</b>	<b>120</b>	<b>58 (48)</b>	<b>Plasma lactate (mmol/l)<sup>15</sup></b>	<b>2 (2-4)</b>
<b>Hyperparasitemia (&gt; 4%)</b>	<b>122</b>	<b>77 (63)</b>	<b>Parasitemia (% of infected red blood cells)</b>	<b>7 (2-11)</b>
Hyperparasitemia > 10%		33 (27)		
<b>Ward of AS prescription, n (%)</b>	<b>123</b>			
Intensive care unit (ICU)		67 (55)		
Infectious disease/internal medicine unit		24 (20)		
Emergency unit		22 (18)		
Unknown		10 (8)		
<b>First-line treatment for the current SM episode, n (%)</b>	<b>123</b>			
AS first		72 (59)		
Other treatment before AS		51 (41)		
Quinine		37		
Atovaquone+PG		6		
Artemether+Lumefantrine		3		
Mefloquine		4		
Other: ceftriaxone		1		
<b>Treatment by AS, median (Q1-Q3)</b>				
Median treatment length in days	112	2 (2-3)		
Median number of doses for each patient	109	5 (4-5)		
Median total doses (mg)	109	824 (600-990)		
<b>Issue, n (%)</b>	<b>123</b>			
Death		6 (5)		
<b>Length of stay in days, median (Q1-Q3)</b>				
ICU	114	1 (0-4)		
Hospital	103	6 (4-8)		
<b>AS Post treatment</b>	<b>123</b>		<b>AS Post treatment used</b>	<b>N</b>
Yes		89 (72)	Artemether+lumefantrine	58

30

No		18 (15)	Atovaquone+PG	27
Unknown		16 (13)	DHA+piperazine	3
			Quinine IV	1

476 N: number of patients for whom data or qualitative information were available, na: not available, AS: artesunate, VFR: visiting friends and  
477 relatives, GCS: Glasgow Coma Scale, Sbp: systolic blood pressure, Dbp: diastolic blood pressure, Q: quartile, ICU: intensive care unit, SM:  
478 severe malaria, §: peripherals signs of hypotension with PAS > 80 mmHg  
479 <sup>1</sup>N=106, <sup>2</sup>N=61, <sup>3</sup>N=84, <sup>4</sup>N=98, <sup>5</sup>N=105, <sup>6</sup>N=101, <sup>7</sup>N=99, <sup>8</sup>N=94, <sup>9</sup>N=91, <sup>10</sup>N=116, <sup>11</sup>N=88, <sup>12</sup>N=114, <sup>13</sup>N=109, <sup>14</sup>N=85, <sup>15</sup>N=83.  
480

481

482

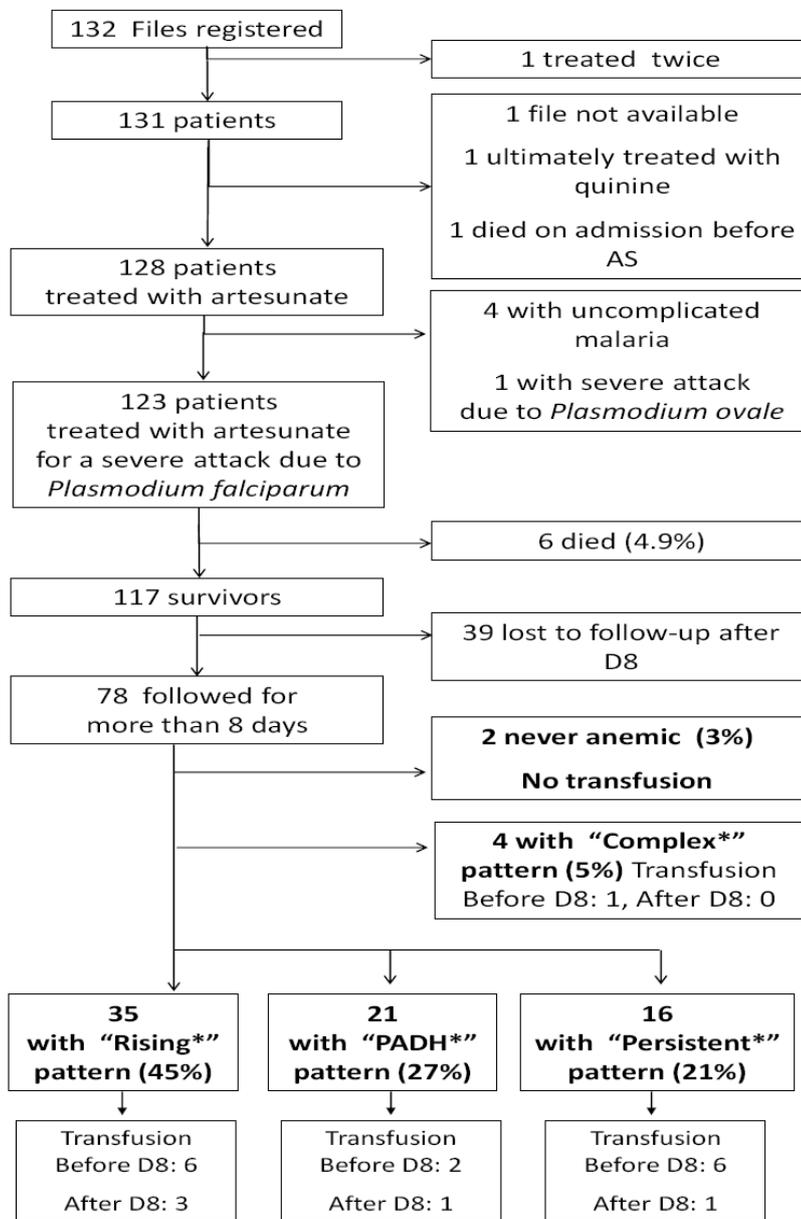
483

484 **Figure 1. Observational study flow chart and anemia flow chart.** Clinical and biological  
485 information for 39 patients could not be retrieved after day (D) 8. 78 patients had enough  
486 information, clinical (in medical chart) and/or biological, to fulfill anemia definition criteria  
487 for classification. AS: artesunate.

488 **Figure 2a. Nadir of hemoglobin (Hb) during sequential periods of time and last level of**  
489 **hemoglobin available for patients (N=78).** Level of hemoglobin is represented by red circles  
490 for the delayed onset hemolysis group (PADH) and black circles for all other patterns of  
491 anemia. Dotted lines represent hemoglobin level thresholds of 8 or 7 g/dl. D: day.

492 **Figure 2b. Typical features of PADH-pattern hemolysis and anemia (21 patients).** Mean  
493 (SEM) blood hemoglobin level (dg/l) (red circle), blood reticulocyte count (Giga/l) (red  
494 empty circle), mean (SEM) plasma LDH/10 (IU/l) (black empty triangle) and haptoglobin (x  
495 15, g/l) (black square) levels in the same subgroup at D0, D2+/-1, D7+/-2, D14+/-3, D21+/-3,  
496 D28+/-3. Drop of hemoglobin during late hemolytic anemia occurs during the second and  
497 third weeks with the reappearance of markers of hemolysis (drop of haptoglobin and rise of  
498 LDH) at the same time. Reticulocyte regeneration occurs during the third week and is delayed  
499 regarding the other patterns of anemia. Usually it occurs during the second week (not shown).

500



(\*) See M and M's part for definition

Figure 1.

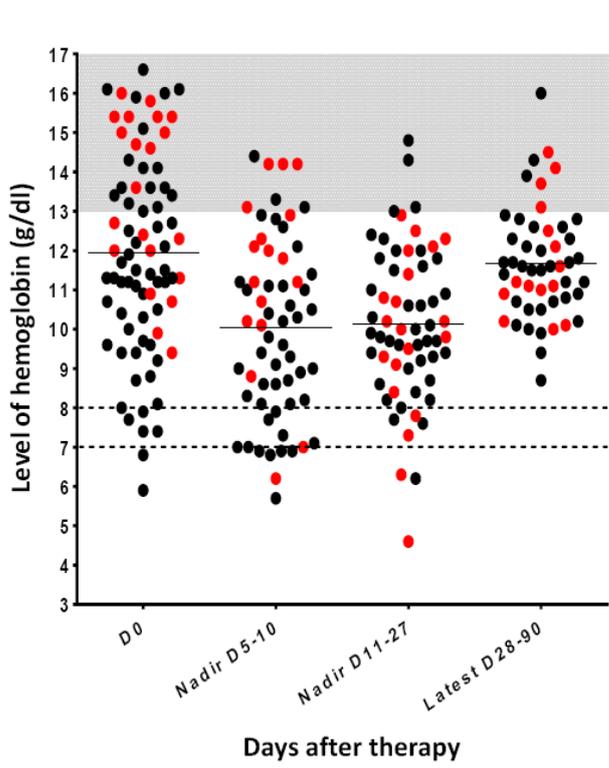


Figure 2a

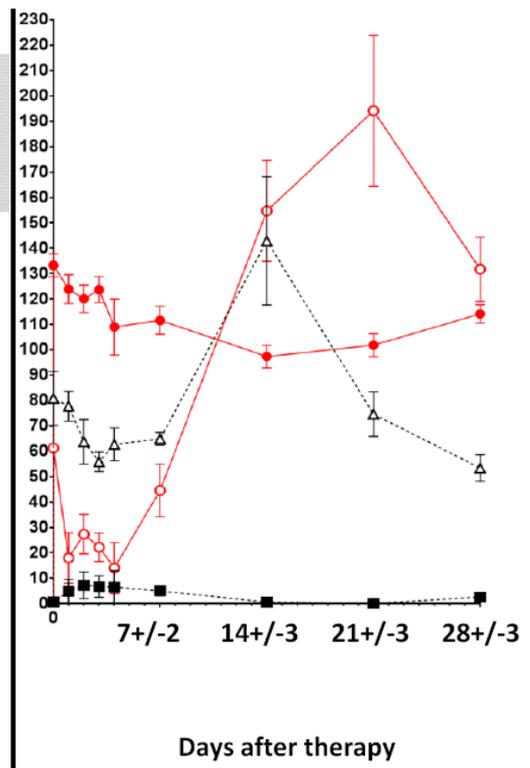


Figure 2b

Figure 2.

## 4.3 Article : “Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins” (article publié)

### Plenary Paper

#### RED CELLS, IRON, AND ERYTHROPOIESIS

### Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins

Stéphane Jauréguiberry,<sup>1-3</sup> Papa A. Ndour,<sup>2</sup> Camille Roussel,<sup>2</sup> Flavie Ader,<sup>4</sup> Innocent Safeukui,<sup>5</sup> Marie Nguyen,<sup>6</sup> Sylvestre Billigui,<sup>2</sup> Liliane Ciceron,<sup>2</sup> Oussama Mouri,<sup>2</sup> Eric Kendjo,<sup>2,3</sup> François Bricaire,<sup>1</sup> Muriel Vray,<sup>7</sup> Adéla Angoulvant,<sup>8</sup> Julien Mayaux,<sup>9</sup> Kasturi Haldar,<sup>5</sup> Dominique Mazier,<sup>2,4</sup> Martin Danis,<sup>2-4</sup> Eric Caumes,<sup>1</sup> Marc Thellier,<sup>2-4</sup> Pierre Buffet,<sup>2-4,10</sup> and the French Artesunate Working Group

<sup>1</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service des Maladies Infectieuses et Médecine Tropicale, Paris, France; <sup>2</sup>Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses de Paris, U 1135 INSERM/Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, Paris, France; <sup>3</sup>Centre National de Référence du Paludisme-site Pitié Salpêtrière, Paris, France; <sup>4</sup>Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Parasitologie, Paris, France; <sup>5</sup>Center for Rare and Neglected Diseases, University of Notre Dame, Notre Dame, IN; <sup>6</sup>Institut Pasteur, Plate-forme de Cytométrie, Imagopole, Paris, France; <sup>7</sup>Institut Pasteur, Unité d'Épidémiologie des Maladies Émergentes, Paris, France; <sup>8</sup>Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital de Bicêtre, Service de Parasitologie, Paris, France; <sup>9</sup>Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Réanimation Médicale, Paris, France; and <sup>10</sup>Laboratory of Excellence GRex

#### Key Points

- After being killed by artesunate, malaria parasites are expelled from red cells and then these pitted red cells reenter the circulation.
- When many pitted red cells are produced during therapy, their delayed clearance a few weeks later triggers hemolytic episodes.

Patients with severe malaria treated with artesunate sometimes experience a delayed hemolytic episode. Artesunate (AS) induces pitting, a splenic process whereby dead parasites are expelled from their host erythrocytes. These once-infected erythrocytes then return to the circulation. We analyzed hematologic parameters in 123 travelers treated with AS for severe malaria. Among 60 nontransfused patients observed for more than 8 days, 13 (22%) had delayed hemolysis. The peak concentration of circulating once-infected erythrocytes was measured during the first week in 21 patients and was significantly higher in 9 patients with delayed hemolysis than in 12 with other patterns of anemia (0.30 vs 0.07;  $P = .0001$ ). The threshold of 180 million once-infected erythrocytes per liter discriminated patients with delayed hemolysis with 89% sensitivity and 83% specificity. Once-infected erythrocyte morphology analyzed by using ImageStream in 4 patients showed an 8.9% reduction in their projected area, an alteration likely contributing to their shorter lifespan. Delayed clearance of infected erythrocytes spared by pitting during AS treatment is an original

mechanism of hemolytic anemia. Our findings consolidate a disease framework for posttreatment anemia in malaria in which delayed hemolysis is a new entity. The early concentration of once-infected erythrocytes is a solid candidate marker to predict post-AS delayed hemolysis (*Blood*. 2014;124(2):167-175)

#### Introduction

Parenteral artesunate (AS) is the first-line treatment for severe malaria worldwide.<sup>1</sup> Compared with quinine, AS further reduces mortality resulting from severe malaria by 22.5% to 35%<sup>2,3</sup> and induces fewer adverse cardiac events or hypoglycemic episodes.<sup>2-5</sup> However, delayed anemic episodes were recently reported in 20% to 25% of travelers with severe malaria treated with AS,<sup>6-12</sup> a high, and possibly overestimated, proportion. All of these patients survived, but 60% of them required transfusions.<sup>6-12</sup> Hence, although it does not jeopardize the lifesaving effect of AS, post-AS anemia does complicate patient management. Furthermore, being currently unpredictable, this delayed post-AS hemolysis and anemia require close monitoring for all patients with severe malaria treated with AS, although it will occur in only 20% to 25% of them. It may also negatively affect the clinical utility of AS,

particularly in medically underserved endemic areas, and it creates preapproval regulatory concerns in nonendemic countries. Because both of these potentialities might threaten the control of malaria-induced mortality, it is crucial to understand the mechanisms of post-AS anemia and to identify an early predictive marker to optimize patient follow-up.<sup>13</sup>

Although AS can cause reversible bone marrow depression,<sup>14</sup> transient dyserythropoiesis probably contributes only mildly to post-AS anemia. Most episodes have included a marked extravascular hemolysis component with high lactate dehydrogenase (LDH) and low plasma haptoglobin.<sup>6-12</sup> Conversely, intense, acute intravascular hemolysis (as in blackwater fever) has been equally infrequent in quinine- and in AS-treated patients.<sup>2,3</sup> The search for conventional causes or markers of

Submitted February 14, 2014; accepted May 5, 2014. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, May 23, 2014; DOI 10.1182/blood-2014-02-555953.

S.J. and P.A.N. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2014 by The American Society of Hematology

immune-mediated or drug-induced hemolytic anemia, such as glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency or the direct antiglobulin test, has been generally inconclusive so far.<sup>6,9,12</sup> Post-AS delayed hemolysis (PADH) has attracted attention because it often occurs well after resolution of malaria-related symptoms and at least several days after complete parasite clearance.<sup>6</sup> Erythrocyte loss during post-AS hemolysis is therefore not directly related to active infection or to the presence of parasites. Typical delayed episodes are defined by a greater than 10% decline in hemoglobin levels associated with markers of hemolysis occurring more than 7 days after the initiation of treatment.<sup>12</sup> Their incidence is significantly higher in AS- than in quinine-treated patients.<sup>5</sup>

Because PADH is AS related,<sup>5</sup> its mechanism may be linked to a specific effect of the artemisinin class of drugs. The rapid parasite clearing action of AS is based on pitting,<sup>15-19</sup> a process whereby artemisinin-exposed rings are expelled from their host erythrocytes in the spleen. The erythrocytes then reseal rather than lyse.<sup>15,19</sup> As a mechanism of microbial clearance, pitting is unique because it initially spares the host cell.<sup>20</sup> After being pitted, once-infected erythrocytes reenter the circulation, now parasite free but with a reduced lifespan.<sup>15,17,18</sup> Thus, although pitting initially spares ring-hosting erythrocytes, this positive effect is not sustained.<sup>18</sup> The delayed clearance of once-infected erythrocytes would explain major features of PADH, specifically the syndrome's delayed occurrence in parasitologically cured patients and the observed hemolytic profile.

The major goal of this study was to assess the potential link between the clearance of once-infected erythrocytes and PADH.

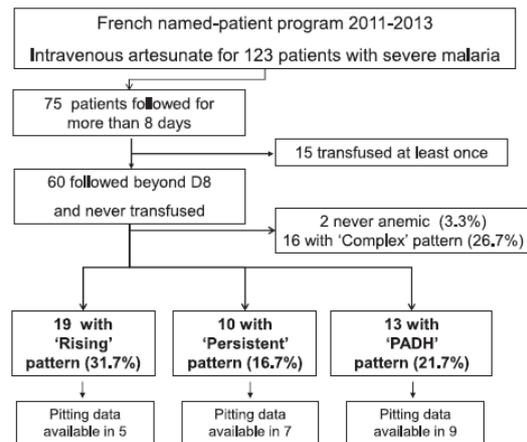
## Materials and methods

### General description of the program

This program is a prospective analysis of clinical and hematologic characteristics in patients receiving AS through an existing AS surveillance process in France.

### Patient surveillance program and treatment

Intravenous AS has been available in France since May 2011 as part of a named-patient program for patients with imported severe malaria. Quinine remains available for treatment of severe malaria; it is still used according to standard procedures in approximately 40% of patients. AS (vial of 60 mg of powder and solvent; Guilin Laboratories, Shanghai, China) was stocked and then released in real time by pharmacists in hospitals that participated in the named-patient program upon receipt of forms completed by attending physicians that confirmed the presence of at least one criterion of severe malaria in patients with proven *Plasmodium falciparum* infection. AS was administered in the next few hours from the local stock. A post hoc control for the accuracy of the indication was performed on the next working day by the National Agency of Medicine and Health Product Safety (ANSM [L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé]) based on the form filled out by the attending physician.<sup>21</sup> Forms, data, and samples from all patients were collected in the setting of an observational program (called here the "named-patient program") implemented by the National Reference Center for Malaria (CNR [Centre National de Référence]), on the behalf of the ANSM. The Ile de France II Institutional Review Board has approved this approach as a non-research process (Article L1121-1 of the French Code for Public Health) embedded in the surveillance missions of the CNR, officially empowered to collect information and biological samples (Article L1413-5 of the French Law No. 2004-806 9th of August 2004-<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000025055544&dateTexte=&categorieLien=id>). Patients provided consent according to a procedure common to all French National Reference Centers (<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT00000810056&date%20Texte=>). The analysis of



**Figure 1. Program flowchart.** Named-patient program 2011-2013; 123 patients with severe malaria treated with artesunate. D, day.

pre- and posttreatment forms was completed by a proactive review of medical charts by the CNR team. Laboratory parameters were retrieved by phoning or e-mailing health care providers directly. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

### Case definitions

Within the setting of the French AS surveillance program, we selected patients who had received both an appropriate initial clinical evaluation at day 0 and follow-up that included the analysis of two sets of laboratory parameters, both before and after day 8. Selected clinical and biological criteria relevant to the diagnosis of severe malaria (as previously defined) were retrieved.<sup>22,23</sup> Briefly, a severe case was defined by a positive blood smear with asexual parasite forms of *P. falciparum* associated with at least 1 of the following criteria of severity: neurologic impairment (lethargy, confusion, multiple convulsions, and/or coma [with Glasgow coma scale]),<sup>24</sup> respiratory distress, cardiocirculatory impairment, spontaneous bleeding, purpuric lesions, macroscopic hemoglobinuria, jaundice and/or plasma bilirubin >50  $\mu\text{mol/L}$ , hypoglycemia (glucose <2.2 mmol/L), acidosis (plasma bicarbonate <15 mmol/L and/or acidemia pH <7.35), hyperlactatemia (arterial lactate >1.8 mmol/L), renal impairment, anemia (hemoglobin <7 g/dL or hematocrit <20%), or hyperparasitemia (>4% parasitized red cells).

Anemia was defined as blood hemoglobin below 12 g/dL for females and 13 g/dL for males. Hemolysis was defined as plasma haptoglobin below 0.1 g/L, and/or plasma LDH above 390 IU/L. For an accurate interpretation of the patterns and mechanisms of anemia, transfused patients were excluded from the analysis. We defined 4 patterns of anemia based on previous proposals including a median follow up of 28 days interquartile range (Q1-Q3 = 25 to 31).<sup>5,6,12</sup> The "rising" pattern was defined by a nadir of hemoglobin and a peak of hemolysis occurring before day 8 without positive markers of hemolysis from day 8 to the end of follow-up. The delayed "PADH" pattern was defined by a >10% drop in hemoglobin level or a >10% rise in LDH concentrations occurring anytime between day 8 and the end of follow-up. The "persistent" pattern was defined by the presence of anemia and positive hemolysis markers both before and after day 8 and a pattern not fitting the definition of PADH patterns. All other cases of anemia that lacked information or that did not fit any of the 3 previously defined patterns so they could be strictly classified into one of them were defined as "complex" pattern. The complex group (16 patients; Figure 1) was excluded from further analyses.

### Sample collection

Small blood samples from quinine- and AS-treated patients were retrieved following collection in the setting of medical care at day 0, day 2  $\pm$  1, day 7  $\pm$  2, day 14  $\pm$  3, day 21  $\pm$  3, and day 28  $\pm$  3 per the recommendations of

the French High Committee for Public Health and ANSM.<sup>21,25</sup> These samples were routinely analyzed by attending teams for hemoglobin, reticulocyte count, total bilirubin, glucose, plasma bicarbonate, lactate, plasma creatinine, blood urea nitrogen, LDH, haptoglobin, and parasitemia.

### Parasite clearance and pitting rates

Parasite clearance and pitting rates were determined for AS-treated patients and for a subset of quinine-treated patients (when available) as a control group. For homogeneity, the kinetics of parasitemia were expressed in all patients as a proportion of the initial parasitemia (number of infected erythrocytes/number of infected erythrocytes at day 0 × 100). The kinetics of once-infected erythrocytes (pitting rate) were expressed similarly, after normalization against initial parasitemia (number of once-infected erythrocytes/number of infected erythrocytes at day 0 × 100). Once-infected erythrocytes were quantified by conventional fluorescence microscopy and flow cytometry using erythrocyte membrane immunofluorescence and Hoechst staining. Immunofluorescent assay (IFA) slides were prepared as previously described.<sup>19</sup> Briefly, erythrocytes were washed with tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-buffered Hanks solution, deposited in IFA slide wells previously coated with coating buffer, washed, fixed in a 1% glutaraldehyde solution in phosphate-buffered saline (PBS), and then frozen until use. Erythrocytes fixed in IFA wells were stained by using an African polyclonal hyperimmune serum (from Dr. David, Institute Pasteur, Paris, France) and a goat anti-human immunoglobulin G coupled with Alexa-Fluor 488 (Life Technologies, Saint Aubin, France) as a secondary antibody, as previously described, and Hoechst dye for parasite DNA detection.<sup>19,26</sup> Images were acquired by using a Leica DMI3000 microscope and Leica camera (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France). Parasitemia and concentrations of once-infected erythrocytes were also assessed by flow cytometry (Accuri C6, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Briefly, samples were fixed as above with PBS and 1% glutaraldehyde and incubated with the polyclonal hyperimmune serum at 1:10 in a suspension of PBS 1% AlbuMAX II (Life Technologies) after permeation with Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Samples were then washed and incubated with secondary antibody (goat anti-human immunoglobulin G coupled with Alexa-Fluor 568 [Life Technologies] and SYBR green [Life Technologies]) for DNA labeling before analysis. For each patient, 1 to 3 samples were collected during the first week of treatment and analyzed to assess early concentrations of once-infected erythrocytes.

### Erythrocyte dimension

Fluorescence flow microscopy using ImageStream technology (Inspire v4.0 and Ideas v4.0, Amnis Corporation, Seattle, WA) was performed to determine the projected surface area of erythrocytes by using bright filter images processed with Ideas software (Ideas v4.0), as previously described.<sup>27,28</sup> Infected, once-infected, and uninfected erythrocytes were identified by combining membrane- and DNA-staining methods as described for flow cytometry (SYBR green was replaced by Hoechst for DNA staining). Projected surface area was determined for infected, once-infected, and never-infected erythrocytes. The percentage of reduced projected surface area of infected erythrocytes or once-infected erythrocytes compared with uninfected erythrocytes from the same sample was then calculated by using the formula  $(1 - [\text{median values of projected surface area of infected erythrocytes or once-infected erythrocytes} / \text{median values of projected surface area of uninfected erythrocytes}] \times 100)$ .

### Statistical analysis

Demographic, clinical, and laboratory variables were evaluated. Quantitative variables were expressed as the median and interquartile ranges or by the mean with standard error of the mean when appropriate. Qualitative variables were expressed as percentages. Differences among the anemia patterns were analyzed with the Fisher's exact test for categorical variables and the Kruskal-Wallis test for continuous variables. When a significant difference was detected among the patterns, two-by-two comparisons were performed, applying the Bonferroni correction. Statistical analyses were

performed by using SPSS software, version 20 for Windows. All reported *P* values are two-tailed.

## Results

From May 2011 through June 2013, 123 patients were involved in our surveillance program, of whom 75 could be observed for more than 8 days.

### PADH occurred in 21% of analyzable patients

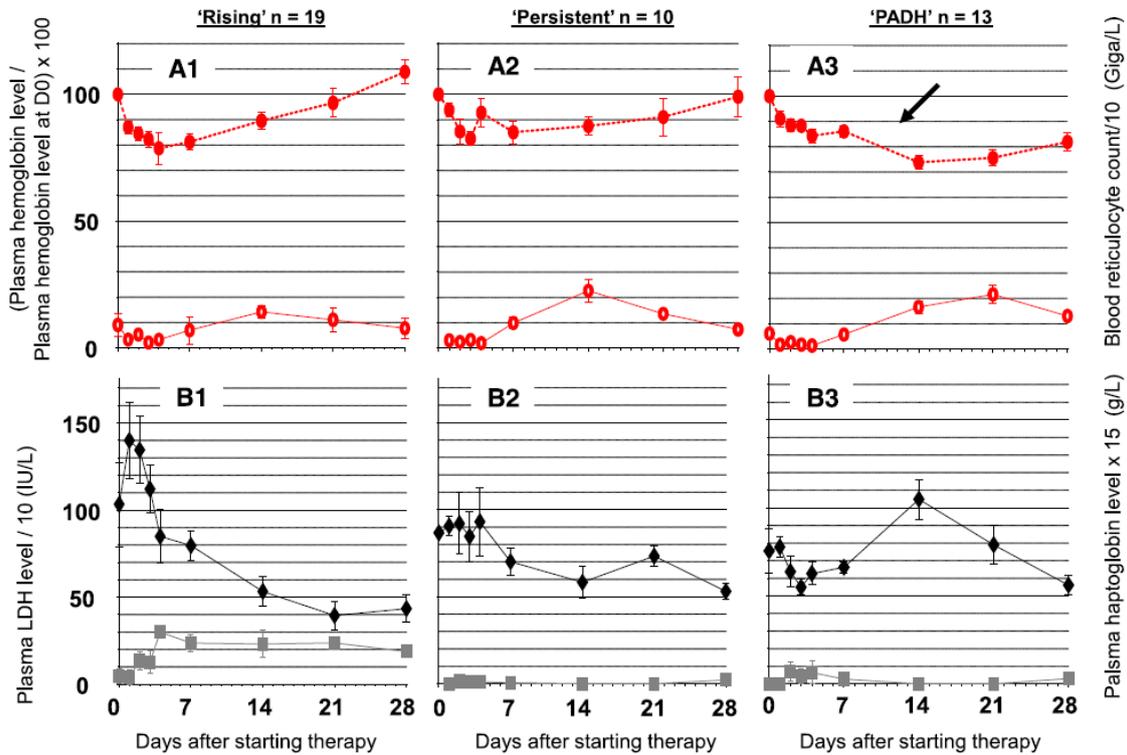
In 60 patients without transfusion and with follow-up biological data beyond day 8, the rising, persistent, and PADH patterns were observed in 32% (19 of 60), 17% (10 of 60), and 22% (13 of 60) of patients, respectively (Figure 1). The rising pattern was characterized by a 21% decline in red blood cell (RBC) hemoglobin levels with marked hemolysis until day 4. Blood reticulocyte count then increased, and RBC hemoglobin levels rose to 109% of pretreatment values at day 28 (Figure 2). The persistent pattern was characterized by a 17% decline in plasma hemoglobin levels until day 4, associated with moderate hemolysis. Beyond day 8, mean hemoglobin levels rose at a rate of 5% per week. Hemolysis persisted until day 28 (Figure 2). The PADH pattern was characterized by a 16% mean decline in hemoglobin levels until day 4 (Figure 2A3), then stabilization, and finally a 12% renewed decline between day 7 and day 14, with this drop being accompanied by relapsing hemolysis. Comparative analysis of demographic, clinical, and laboratory features in the different patterns showed that PADH patients had the highest median parasitemia on admission: 8% vs 3.9% and 2.4% for the persistent and rising anemia patterns, respectively (Table 1). The proportion of patients with hyperparasitemia was higher in the PADH group (92%; 12) than in the rising (37%; 7) or persistent (50%; 5) groups (*P* = .006 for Fisher exact test among the 3 groups).

### Pitting rates were higher in AS-treated travelers than in quinine-treated travelers

The kinetics of once-infected erythrocytes was established in 11 quinine-treated and 16 AS-treated patients with severe malaria (Figure 3A). At day 3, the mean concentration of once-infected erythrocytes was significantly higher in AS-treated patients (78% vs 15% of initial parasitemia in AS-treated and quinine-treated patients, respectively; *P* = .01 for Mann-Whitney *U* test). A wide range of pitting rates (10% to 160% at day 3; Figure 3A) was observed in AS-treated patients.

### PADH is related to pitting

The kinetics of once-infected erythrocytes could be established before and after day 8 in 5, 7, and 9 patients with rising, persistent, and PADH patterns of anemia, respectively (for whom at least two blood samples were received in a timely manner by the central laboratory for this specialized analysis). The number of once-infected erythrocytes peaked before day 8 in all patients: in 12 on day  $2 \pm 1$  and in 9 on day  $7 \pm 2$ . In patients with PADH, the number of circulating once-infected erythrocytes and hemoglobin levels declined simultaneously during the second and/or third weeks after initiation of AS (Figures 2A3 and 3B). The peak pitting rate (normalized against initial parasitemia) was higher than 45% in 100% and 47% of samples from patients with PADH and non-PADH patterns of anemia,



**Figure 2.** Three typical patterns of posttreatment anemia in 42 nontransfused patients with severe malaria treated with AS and monitored for more than 8 days. (A1-A3). Mean and standard error of the mean (SEM; vertical bars) of (solid red circles) blood hemoglobin level and (empty red circles) blood reticulocyte count per 10 g/L on day 0, day 2  $\pm$  1, day 7  $\pm$  2, day 14  $\pm$  3, day 21  $\pm$  3, and day 28  $\pm$  3 in subgroups of patients categorized according to their evolution pattern as (A1) rising, (A2) persistent, or (A3) PADH, as defined in the "Materials and methods" section. At least 2 samples were collected before and after day 8 in each patient. (B1-B3) Mean and SEM of (solid black diamonds) plasma LDH 10 IU/L and (solid grey squares) haptoglobin levels ( $\times 15$  g/L) in the same subgroups. The blood hemoglobin level was normalized against the hemoglobin level on day 0. The delayed drop in hemoglobin levels in patients with PADH is indicated by a black arrow.

respectively (Figure 4B). During the first week after initiation of therapy, the concentration of circulating once-infected erythrocytes (in billions of cells per liter) was significantly higher in patients with PADH than in those with other patterns of anemia (0.30 vs 0.07;  $P = .0001$  for Mann-Whitney  $U$  test). Indeed, in samples collected between day 2 and day 8, this concentration was higher than 0.18 g/L in all PADH patients except 1 (8 of 9 patients; 15 of 16 samples) and lower than this threshold in all patients with non-PADH patterns except 2 (2 of 12 patients; 2 of 19 samples) (Figure 4C). In patients with PADH, the mean peak in once-infected erythrocytes was 7.93% (range, 1.6% to 17.5%) of circulating RBCs.

#### Once-infected erythrocytes are smaller than uninfected erythrocytes in AS-treated patients

Upon treatment initiation, assuming that the fixation-permeation process used to label RBCs induces similar modifications on the different RBC subpopulations processed in the same way in the same sample, the mean reduction in projected surface area of parasitized erythrocytes compared with uninfected erythrocytes (ie, erythrocytes that had never been infected) was 3% (range, 1.7% to 4.5%; 4 patients; Figure 3D). At day 3  $\pm$  1 after initiation of therapy, the mean reduction in projected surface of once-infected erythrocytes again compared with uninfected erythrocytes (ie, erythrocytes that

had never been infected) in the same sample, was 8.9% (range, 4.6% to 12.5%; 4 patients; Figure 3D).

## Discussion

In this study, we linked typical PADH events to the delayed loss of once-infected erythrocytes. Compared with patients with other patterns of anemia, those with PADH indeed had a higher peak concentration of circulating once-infected erythrocytes; this concentration then declined a few weeks later as PADH developed. In keeping with this observation, the level of once-infected erythrocytes circulating during the first week of follow-up was the best predictor of subsequent PADH. Thus, circulating infected erythrocytes spared by pitting during AS treatment were subsequently cleared a few days or weeks later, a process that contributed to PADH. This observation is in line with the hemolytic component of PADH and with its occurrence in asymptomatic, parasite-free patients a few weeks after effective treatment. The link between pitting and PADH is also consistent with the occurrence of typical episodes in patients treated with artemisinin but not in those treated with quinine.<sup>5</sup> Pitting rates are indeed generally high in AS-treated patients and low in quinine-treated patients (Figure 3).<sup>15-19</sup> PADH is thus related to the original cellular mechanism (pitting) that contributes to the superior efficacy

**Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients with 3 typical patterns of post-AS anemia**

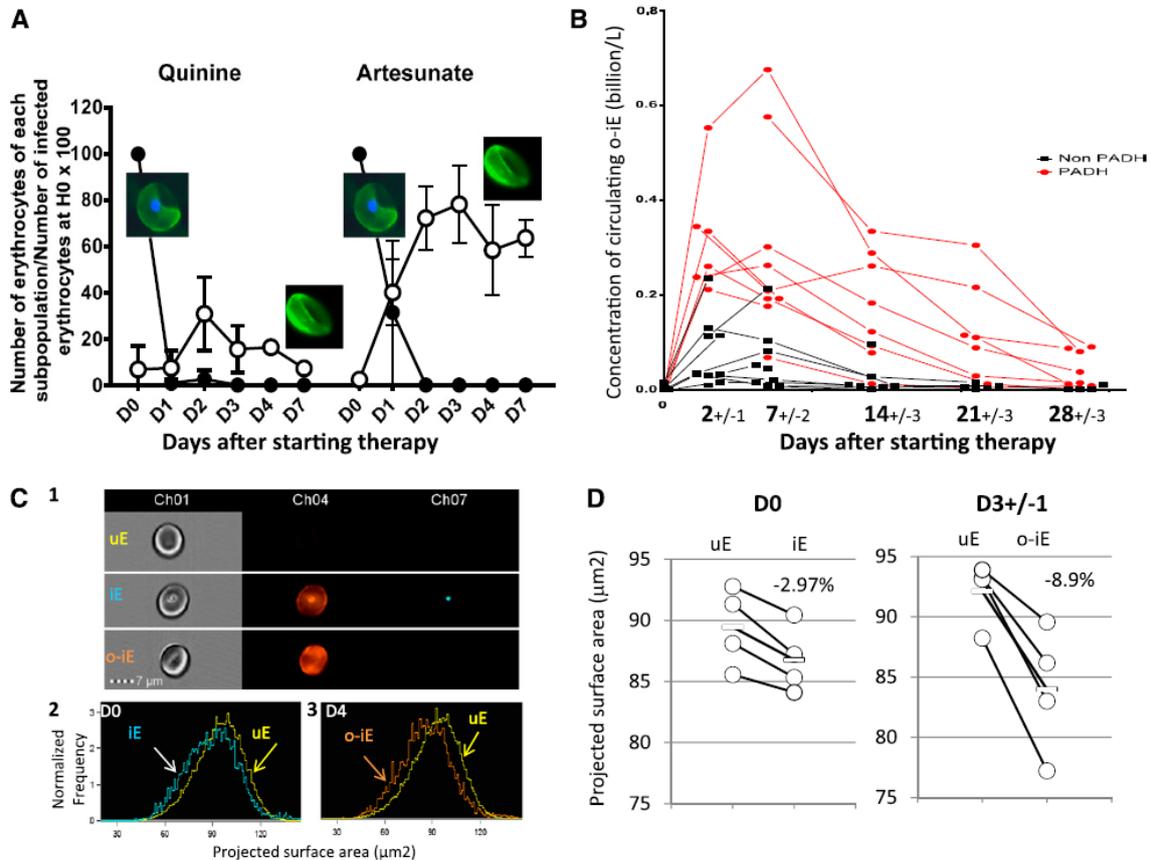
Characteristic	Rising pattern n = 19		Persistent pattern n = 10		PADH pattern n = 13		P
	No.	%	No.	%	No.	%	
Male gender	12	63	8	80	7	54	.46
Median (IQR) age, years	38 (21-49)		39 (25-47)		42 (34-53)		.58
<b>Area of birth</b>							.48
Africa	13	68	6	60	6	46	
Europe and North America	5	26	4	40	7	54	
South and Central America	1	5	0	0	0	0	
Asia	0	0	0	0	0	0	
Median (IQR) time of illness before AS, days	4 (3-5)		4 (3-9)		4 (3-4)		.65
<b>Selected severe malaria criteria at day 0</b>							
Neurologic impairment (any signs)	8	42	4	40	4	31	.84
At least lethargy, confusion, multiple convulsion, coma Glasgow Scale <11	4	21	0	0	0	0	.13
Respiratory distress (any signs)	0	0	0	0	1	8	.54
At least respiratory frequency >32/mn, crackles, pulmonary infiltrates (chest x-ray), PaO2 <60 mmHg, SpO2 <91%							
Cardiocirculatory impairment (any signs)	3	16	1	10	4	31	.53
At least shock (systolic blood pressure ≤80 mmHg), peripheral signs of hypotension*							
Vasopressive supportive drug	0	0	0	0	0	0	
Spontaneous bleeding	0	0	0	0	0	0	
Purpuric lesions	0	0	0	0	0	0	
Macroscopic hemoglobinuria	3	16	1	10	0	0	.33
Jaundice and/or bilirubin >50 μmol/L	9	47	7	70	7	54	.57
Hypoglycemia (glucose <2.2 mmol/L)	0	0	0	0	1	8	.54
Acidosis (any signs)	1	5	0	0	0	0	1.00
At least plasma bicarbonate <15 mmol/L, acidemia pH <7.35							
Hyperlactatemia (arterial lactate >1.8 mmol/L)	4	21	2	20	7	54	.12
<b>Renal impairment</b>							
Creatinine >120 μmol/L	3	16	0	0	2	15	.57
Creatinine >265 μmol/L and/or blood urea nitrogen >17 mmol/L	2	11	0	0	0	0	.49
Anemia (Hb <7 g/dL or hematocrit <20%)	0	0	0	0	0	0	
Median (IQR) hemoglobin at day 0 (g/dL)	11.4 (10-13)		11.8 (11-14)		13.6 (12-15)		.019†
Median (IQR) nadir of hemoglobin before day 8 (g/dL)	9.0 (7-11)		9.9 (9-12)		11.2 (10-13)		.004†
Median (IQR) loss of hemoglobin between day 0 and the day of the nadir before day 8 (g/dL)	2.3 (1-3)		1.9 (1-3)		2.3 (2-3)		.91
Median RPI	1.1 (1-1.4)‡		1.5 (1-2)		1.6 (1-3)¶		.1
Hyperparasitemia (>4%)	7	37	5	50	12	92	.006#
Median (IQR) parasitemia at day 0 (% of infected red blood cells)	2.4 (0.4-7)		3.9 (0.4-12)		8.0 (6-14)		.013†
<b>Total dose of AS (mg)</b>							
Median (IQR) total dose	755 (540-1020)		844 (577-970)		800 (603-925)		.92
<b>Complementary qualitative features when available</b>							
DAT +/-DAT realized	0	1	1**	2	1	3††	
G6PD deficiency/G6PD realized	0	1	0	0	0	5	
Abnormal Hb electrophoresis/Hb electrophoresis realized	1	2‡‡	0	1	1	4§	

Numbers shown in **bold** reach significance.  
 DAT, direct antiglobulin test; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; mn, minutes; PaO2, arterial partial pressure of oxygen; RPI, reticulocyte production index, defined by [% Reticulocyte at peak × hematocrit value at nadir/45] × [1/Correction factor]<sup>10</sup>; SPo2, oxygen saturation.  
 \*peripheral signs of hypotension with systolic blood pressure >80 mmHg.  
 ‡n = 7.  
 ||n = 6.  
 ¶n = 11.  
 †Mann-Whitney U test, between patterns Rising and PADH.  
 #Fisher exact test.  
 \*\*DAT + for IgG.  
 ††DAT + for IgM.  
 ‡‡Minor α thalassemia.  
 §Sickle cell disease A/S hemoglobin.

of AS in malaria and does not significantly alter the positive impact of AS in terms of mortality. PADH is indeed rarely (if ever) fatal and is becoming predictable. Our results should therefore encourage programs and physicians to maintain the momentum for a rapid

implementation of this lifesaving therapeutic approach for severe malaria worldwide.

Our approach has some limitations. First, the study was not randomized. This is because, in the context of imported severe

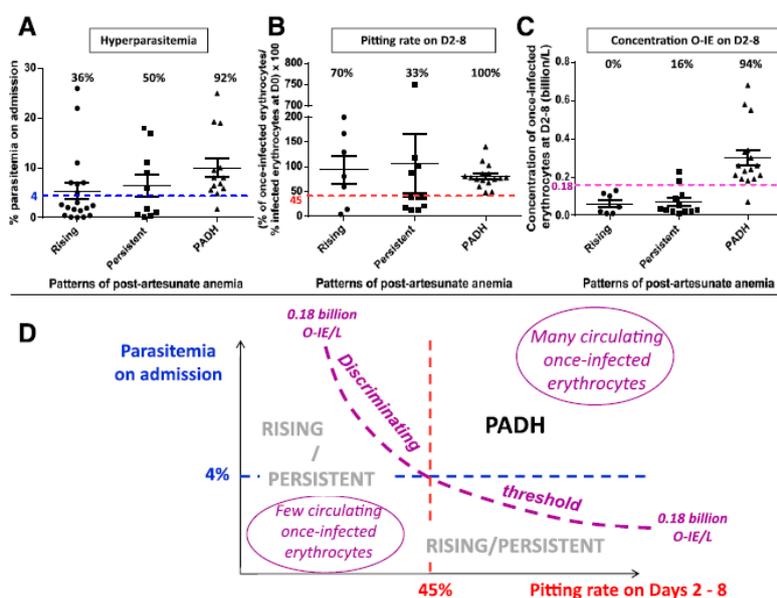


**Figure 3. Pitting and surface area loss.** (A) Quinine- vs AS-induced parasite clearance and pitting rates. Mean and SEM for (solid red circles) parasitemia and concentration of (open circles) once-infected erythrocytes (both normalized against parasitemia at day 0) in patients with severe malaria treated either with quinine ( $n = 11$ ) or AS ( $n = 16$ ). (B) Concentration of circulating once-infected erythrocytes (billions of cells per liter) in patients with severe malaria treated with AS for whom posttreatment evolution of anemia could be categorized as (solid red circles) PADH (9 patients) and (solid black squares) non-PADH (12 patients). (C) Population frequency of erythrocytes—uninfected erythrocytes (uEs, yellow line; C2-C3), infected erythrocytes (iEs, blue line; C2), or once-infected erythrocytes (o-iEs, orange line; C3)—according to the projected surface areas ( $\mu\text{m}^2$ ) estimated on the bright field picture after identifying erythrocyte subtype by using a combination of immunofluorescent (IF) and Hoechst staining for parasite DNA. Uninfected erythrocytes were IF- and DNA-negative, infected erythrocytes were both IF- and DNA-positive, and once-infected erythrocytes were IF-positive and DNA-negative. Typical aspects are shown in panel C1. Samples were collected from the same patient at (C2) day 0 or (C3) day 4. At least 5000 infected or once-infected erythrocytes and 100 000 never-infected erythrocytes were analyzed. (D) (open circles) Individual values and (open bars) mean projected surface of uninfected and infected erythrocytes in samples from 4 patients on day 0 and of uninfected and once-infected erythrocytes from 4 patients on day 3  $\pm$  1. The lines connect 2 subpopulations analyzed simultaneously in the same sample. The percentages indicate the mean decrease in projected surface area between uninfected and infected erythrocytes at day 0 or between uninfected and once-infected erythrocytes at day 3  $\pm$  1.

malaria, it has generally been considered unethical to repeat AS vs quinine trials already performed in endemic countries.<sup>2</sup> Second, our conclusions are based on the analysis of a relatively limited number of patients and samples. This weakness is compensated by the strong statistical significance of differences observed between early concentrations of once-infected erythrocytes in the different patterns of anemia (Figure 4). Our cohort is also the largest reported to date on the safety of AS in the treatment of severe malaria in travelers that includes the analysis of specific cellular parameters obtained between day 8 and day 28 after initiation of therapy, a demanding task. Because deciphering the mechanisms of PADH requires a robust analysis of the kinetics of erythrocyte subpopulations, we excluded transfused patients. General efficacy and safety data from the whole cohort, including transfused patients will be reported elsewhere. Finally, although our data show a strong link between PADH and the loss of once-infected erythrocytes, we cannot definitely exclude the intervention of a complementary mechanism of hemolysis. In PADH patients, the mean delayed decline in hemoglobin was 12% (Figure 2),

and the median peak concentration of once-infected erythrocytes was 7.93% (range, 1.6% to 17.5%) of circulating erythrocytes. These numbers match reasonably well, but in some individuals, other subpopulations of erythrocytes (that had never been infected) may have been lost simultaneously. In malarial anemia occurring before anti-malarial therapy, the loss of infected erythrocytes is accompanied by the loss of uninfected erythrocytes.<sup>29</sup> A similar amplifying mechanism may occur in PADH. Alternatively, the loss of once-infected erythrocytes may have triggered a by stander erythrocyte loss as in the posttransfusion hyperhemolysis syndrome.<sup>30,31</sup> In both cases, the precise amplifying or bystander mechanism has not yet been established.

Once-infected erythrocytes are initially spared by pitting. Why and how they are ultimately cleared a few weeks later remains to be fully elucidated. PADH typically occurs 2 weeks after treatment initiation. This is consistent with the intervention of an adaptive immunologic process such as a specific humoral response targeted against a potential alteration of once-infected erythrocyte surface. However, to the best of our knowledge, no serum reactivity to AS-



**Figure 4.** Parasitemia, pitting rate, concentration of once-infected erythrocytes, and the risk of evolution toward PADH or other patterns of post-AS anemia in patients with severe malaria. (A) Individual values of parasitemia (as a percentage of infected erythrocytes) in patients with severe malaria treated with AS in whom posttreatment evolution of anemia could be categorized as rising (19 patients), persistent (10 patients), or PADH (13 patients). The dotted line corresponds to the threshold of 4% parasitemia, which provides the best discrimination between PADH and other patterns of post-AS anemia. Percentages at the top of the panel are the proportion of patients above this 4% threshold for each pattern of anemia. (B-C) Individual values of pitting rate (normalized against initial parasitemia [B]), and concentration of once-infected erythrocytes (g/L [C]) in 35 samples from 21 patients with severe malaria treated with AS in whom posttreatment evolution of anemia could be categorized as rising, persistent, or PADH. The dotted lines correspond to thresholds providing the best discrimination between PADH (9 patients) and other patterns of post-AS anemia (12 patients). Percentages at the top of the panel are the proportion of samples above this threshold of 45% pitting rate and above 0.18 billion once-infected erythrocytes per liter for each pattern of anemia. (D) Graphic representation of the relative influences of parasitemia on admission, peak pitting rate, and peak concentration of once-infected erythrocytes on the risk of evolution toward the different patterns of post-AS anemia. The concentration of circulating once-infected erythrocytes was computed by multiplying parasitemia by the pitting rate. Patients with high initial parasitemia and a high pitting rate harbor a high concentration of once-infected erythrocytes (upper right zone of the panel) and are at high risk of intense PADH in the following days or weeks. On the basis of these markers, the risk of subsequent PADH can be predicted before the end of the first week. The risk becomes significant when parasitemia on admission is above 4% and the peak pitting rate on days 2 through 8 is above 45%. On the basis of this data set (panels A-C), a concentration of circulating once-infected erythrocytes on days 2 to 8 greater than 0.18 g/L discriminates patients with PADH from patients with other patterns of anemia more effectively than do parasitemia or the peak pitting rate taken separately. This model also explains why delayed hemolysis has not been observed in severe malaria patients treated with quinine, a compound that induces low pitting rates.

exposed parasitized erythrocytes has been observed to date (P.A.N. and C.R. unpublished observations).<sup>17</sup> This negative observation does not definitively exclude the intervention of opsonization because antibodies may be very rapidly removed from the circulation (with their pitted RBC target) by the activated post-malarial spleen. Yet, of 72 children treated with AS in Gabon and Ghana for severe malaria, 5 experienced delayed hemolysis; associated risks factors were high parasitemia on admission and younger age (median, 24 months).<sup>32</sup> These features do not support the hypothesis of a hemolytic process strongly related to acquired immunity. More sensitive explorations on a larger number of patients are required for a conclusion on this point. By using the ImageStream technology recently adapted to analyze erythrocyte morphology,<sup>27,28,33</sup> we observed an 8.9% reduction in projected surface area of once-infected erythrocytes compared with uninfected erythrocytes in the same sample. A 17% surface loss immediately induces the mechanical retention of erythrocytes in the spleen.<sup>27,28,33</sup> We suspect that infection of erythrocytes by *P. falciparum* followed by pitting may have mimicked premature aging, thus reducing the lifespan of once-infected erythrocytes. The moderately reduced size of once-infected erythrocytes is thus consistent with a premature, immune-independent mechanical clearance a few days or weeks after AS administration. Analysis of this marker in a larger group of patients is needed.

PADH has affected approximately 20% to 25% of travelers with severe malaria<sup>6-8</sup> and a smaller proportion of African children treated

with AS.<sup>32</sup> If PADH is indeed caused by the delayed clearance of once-infected erythrocytes, it is by definition linked to drug activity (ie, pitting that operates in a high proportion of AS-treated patients). This model thus convincingly explains why the incidence of PADH is higher than that of most idiosyncratic reactions to drugs (Figure 3A). The inconstant occurrence of PADH is also predicted by the delayed loss of once-infected erythrocytes. High initial parasitemia and high pitting rates are indeed both required to generate a sufficient volume of once-infected erythrocytes, the clearance of which will trigger delayed anemia (Figure 4). Significant variations in these parameters were observed across individuals (Figures 3A and 4)<sup>34</sup>; for example, parasitemia was lower than 4% in 44% of patients (18 of 43) whose anemia patterns were analyzed in detail (Figure 4). In this nonhyperparasitemic subgroup, PADH was infrequent (1 of 18; 6%). Pitting rates were also variable (Figure 4B) in our study. This too had role to play because we observed that some hyperparasitemic patients with low pitting rates did not have PADH.

Patterns of post-AS anemia other than PADH were frequent in our study but generally exposed patients to a threat more easily manageable than that of PADH. Because the rising pattern of anemia corresponded to an early hemolytic episode followed by a sustained recovery without delayed anemia, the conventional follow-up recommended by the World Health Organization (day 0, day 3, day 7, day 28) was well suited for the detection of early complications or late relapse of the malaria attack. This pattern has

been observed in thousands of uncomplicated malaria cases in both adults and children treated with artemisinin combined therapy.<sup>35,36</sup> Our observations also suggest that the persistent pattern may result from a more complex overlap of mechanisms that comprise those causing the 2 polar rising and PADH patterns (Figures 2 and 4). A monophasic, accelerated clearance of normal or uninfected erythrocytes has been observed in malaria patients in Thailand.<sup>37</sup> It lasts several weeks and is more intense in severe as compared with uncomplicated malaria, thus fitting the characteristics of the persistent pattern. Either nonspecific splenic activation or decoration of uninfected erythrocytes by *P. falciparum* proteins such as RSP-2 and/or RAP-2 may induce this prolonged extravascular hemolysis, as already observed in quinine-treated patients.<sup>37-39</sup> Via the division of post-AS anemia into distinct patterns and the quantification of once-infected erythrocytes, we confirmed that PADH is a separate entity related to a novel mechanism of anemia. Our findings markedly strengthen a new disease framework for post-AS anemia and open the way to the development of early predictive and prognosis markers. We propose that the combination of 2 parameters—initial parasitemia and pitting rate—determine the number of once-infected erythrocytes produced and the risk of PADH (Figure 4D). Although no strongly predictive threshold of parasitemia could be identified, a concentration of once-infected erythrocytes greater than 180 million cells per liter during the first week effectively discriminated PADH from other patterns of post-AS anemia (Figure 4). Because the highest concentrations of once-infected erythrocytes were observed between day 3 and day 7, this marker should be a strong candidate for providing an accurate prediction of subsequent PADH before patients are discharged from the hospital. Currently, quantification of once-infected erythrocytes can be performed via flow cytometry at reference centers, but a point-of-care test should also be developed for deployment in the field. The approach described here should ultimately facilitate the management of patients treated with any endoperoxide-containing antimalarial compound (including synthetic trioxolane ozonide compounds) for a malaria attack with initial parasitemia greater than 4%. The test would identify not only patients who require very close follow-up during the 2 to 4 weeks following therapy but also those who are at low risk of subsequent PADH and for whom the conventional World Health Organization follow-up schedule (day 7 and day 28) would suffice. This approach would ensure that all patients benefit from more pertinent follow-up while reducing burdens on health care systems.

## Acknowledgments

The authors thank Arjen Dondorp from the Mahidol Oxford Research Unit; Thomas Zoller from the Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany; and Rick Fairhurst from the National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rockville, MD for the fruitful discussions.

This work was supported by grants from the Domaine d'Intérêt Majeur Mal Inf Région Ile de France and the Worldwide Antimalarial Resistance Network, and by the Bill & Melinda Gates Foundation (P.A.N.), by the Follereau Foundation (L.C.), by an INSERM-AP-HP France interface contract (S.J.), and by a grant from the National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute (K.H.). Support for equipment was provided by Oxford University (Project No. 5P01HL078826-06). Labex GR-Ex is funded by the program "Investissements d'avenir."

## Authorship

Contribution: S.J., P.A.N., and P.B. designed and performed research, contributed vital analytical tools, analyzed data, and wrote the paper; C.R. and M.T. performed research, contributed vital analytical tools, analyzed data, and wrote the paper; I.S., M.N., M.V., K.H., and D.M. contributed vital analytical tools, analyzed data, and wrote the paper; E.K. contributed vital analytical tools and performed research; M.D. designed research; F.A., S.B., L.C., O.M., A.A., F.B., and J.M. performed research; and E.C. wrote the paper.

Conflict of interest: S.J. collaborates with Guilin Laboratories; P.B. provided expertise and collaborates with Fast-Track Drugs & Biologics LLC and Sigma-Tau Pharmaceuticals, is engaged in a collaboration with Guilin Laboratories, and has provided expertise to Sanofi Aventis Research & Development. The remaining authors declare no competing financial interests.

A complete list of the members of the French Artesunate Working Group appears in the online data supplement, available on the *Blood* Web site.

Correspondence: Pierre Buffet, Service de Parasitologie-Myologie Groupe Hôpital Pitie-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France; e-mail: pabuffet@gmail.com.

## References

- WHO. *The treatment of malaria*, 2nd ed. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2010.
- Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, et al; AQUAMAT group. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*. 2010;376(9753):1647-1657.
- Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N; South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet*. 2005;366(9487):717-725.
- Sinclair D, Donegan S, Isba R, Lalloo DG. Artesunate versus quinine for treating severe malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;6:CD005967.
- Rolling T, Wichmann D, Schmiedel S, Burchard GD, Kluge S, Cramer JP. Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis. *Malar J*. 2013;12:241.
- Zoller T, Junghanss T, Kapaun A, et al. Intravenous artesunate for severe malaria in travelers, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):771-777.
- Briggs M, Arquin PM; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Published reports of delayed hemolytic anemia after treatment with artesunate for severe malaria—worldwide, 2010-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013;62(1):5-8.
- Caramello P, Balbiano R, De Biasi T, Chiriotto M, Deagostini M, Calleri G. Severe malaria, artesunate and haemolysis. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(8):2053-2054.
- Kreeftmeijer-Vegter AR, van Genderen PJ, Visser LG, et al. Treatment outcome of intravenous artesunate in patients with severe malaria in the Netherlands and Belgium. *Malar J*. 2012;11(1):102.
- Rolling T, Schmiedel S, Wichmann D, Wittkopf D, Burchard GD, Cramer JP. Post-treatment haemolysis in severe imported malaria after intravenous artesunate: case report of three patients with hyperparasitaemia. *Malar J*. 2012;11(1):169.
- Kano S. Artemisinin-based combination therapies and their introduction in Japan. *J Infect Chemother*. 2010;16(6):375-382.
- MMV. *Experts Group Meeting on delayed anaemia following treatment with injectable artesunate*. Wien, Austria: 2013. <http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/events/2013/InjectableArtesunateExpertGroupMeeting.pdf>.
- World Health Organization Global Malaria Program. WHO Information Note on Delayed

- Haemolytic Anaemia following Treatment with Artesunate. *WHO Note*. 2013;(October):1-2.
14. Finaurini S, Basiglio N, Corbett Y, et al. Dihydroartemisinin inhibits the human erythrocyte cell differentiation by altering the cell cycle. *Toxicology*. 2012;300(1-2):57-66.
  15. Angus BJ, Chotivanich K, Udomsangpetch R, White NJ. In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria. *Blood*. 1997;90(5):2037-2040.
  16. White NJ. The assessment of antimalarial drug efficacy. *Trends Parasitol*. 2002;18(10):458-464.
  17. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Dondorp A, et al. The mechanisms of parasite clearance after antimalarial treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 2000;182(2):629-633.
  18. Newton PN, Chotivanich K, Chierakul W, et al. A comparison of the in vivo kinetics of *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen-positive and -negative erythrocytes. *Blood*. 2001;98(2):450-457.
  19. Buffet PA, Milon G, Brousse V, et al. Ex vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions. *Blood*. 2006;107(9):3745-3752.
  20. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*. 2011;117(2):381-392.
  21. ANSM-CNR La Pitié-Salpêtrière. Protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations. Malacef (artésunate) 60 mg, poudre et solvant pour solution injectable. Laboratoire ACE Pharmaceuticals BV // ARTECEF BV. Available at: [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/01d138a64031bcf9f37fa2737308caa5.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/01d138a64031bcf9f37fa2737308caa5.pdf). Accessed December 2011.
  22. WHO. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(suppl):1-90.
  23. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Recommendations for clinical practice. Management and prevention of imported *Plasmodium falciparum* malaria. (Revision 2007 of the 1999 Consensus conference). Short text [in English, French]. *Med Mal Infect*. 2008;38(2):54-67, 39-53.
  24. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974;2(7872):81-84.
  25. Haut Conseil de al Santé Publique. Place de l'artésunate injectable dans le traitement du paludisme grave chez l'adulte et l'enfant. Available at: [http://www.hcsp.fr/explore.cgi/telecharger/hcspr20130201\\_palugraveartésunate.pdf](http://www.hcsp.fr/explore.cgi/telecharger/hcspr20130201_palugraveartésunate.pdf). 2013 Accessed February 1, 2013.
  26. Safeukui I, Correas JM, Brousse V, et al. Retention of *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen. *Blood*. 2008;112(6):2520-2528.
  27. Safeukui I, Buffet PA, Deplaine G, et al. Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen. *Blood*. 2012;120(2):424-430.
  28. Safeukui I, Buffet PA, Perrot S, et al. Surface area loss and increased sphericity account for the splenic entrapment of subpopulations of *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocytes. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e60150.
  29. Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, et al. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2012;11:135.
  30. Win N, New H, Lee E, de la Fuente J. Hyperhemolysis syndrome in sickle cell disease: case report (recurrent episode) and literature review. *Transfusion*. 2008;48(6):1231-1238.
  31. Chadebech P, Habibi A, Nzouakou R, et al. Delayed hemolytic transfusion reaction in sickle cell disease patients: evidence of an emerging syndrome with suicidal red blood cell death. *Transfusion*. 2009;49(9):1785-1792.
  32. Rolling T, Agbenyega T, Issifou S, et al. Delayed Hemolysis After Treatment With Parenteral Artesunate in African Children With Severe Malaria—A Double-center Prospective Study [published online ahead of print January 29, 2014]. *J Infect Dis*.
  33. Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood*. 2011;117(8):e88-e95.
  34. White NJ, Chapman D, Watt G. The effects of multiplication and synchronicity on the vascular distribution of parasites in falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992;86(6):590-597.
  35. Price RN, Simpson JA, Nosten F, et al. Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(5):614-622.
  36. Olliaro P, Djimdé A, Dorsey G, et al. Hematologic parameters in pediatric uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(4):619-625.
  37. Looareesuwan S, Davis TM, Pukrittayakamee S, et al. Erythrocyte survival in severe falciparum malaria. *Acta Trop*. 1991;48(4):263-270.
  38. Biemba G, Gordeuk VR, Thuma PE, Mabeza GF, Weiss G. Prolonged macrophage activation and persistent anaemia in children with complicated malaria. *Trop Med Int Health*. 1998;3(1):60-65.
  39. Metha SR, Joshi V, Lazar AI. Unusual acute and chronic complications of malaria. *J Assoc Physicians India*. 1996;44(7):451-453.
  40. Perkins S. Diagnosis of anemia. In: Kjeldsberg C, Perkins S, eds. *Practical Diagnosis of Hematologic Disorders*, 5th Edition. Chicago, IL: American Society of Clinical Pathology Press; 2010.

#### **4.4 Valorisation écrite, orale et projets congruents**

##### **Rapports techniques (suivi d'efficacité et de tolérance, ANSM)**

###### **En 1<sup>er</sup> auteur**

MALACEF<sup>®</sup> (artésunate) 60 mg, poudre et solvant pour solution injectable ATU nominative. Rapport de synthèse N°1 et résumé (période de mai 2011 à septembre 2011).

MALACEF<sup>®</sup> (artésunate) 60 mg, poudre et solvant pour solution injectable ATU nominative. Rapport de synthèse N°2 et résumé (période de mai 2011 à février 2012).

MALACEF<sup>®</sup> (artésunate) 60 mg, poudre et solvant pour solution injectable ATU nominative. Rapport de synthèse N°3 et résumé (période de mai 2011 à novembre 2012).

###### **En 2<sup>ème</sup> auteur**

MALACEF<sup>®</sup> (artésunate) 60 mg, poudre et solvant pour solution injectable ATU nominative. Rapport de synthèse N°4 et résumé (période de mai 2011 à février 2014).

###### **Membre du groupe de travail**

Réponse à la saisine du HCSP du 16/05/2012 afin de positionner l'AS dans l'arsenal thérapeutique du paludisme grave en France compte tenu de sa supériorité thérapeutique par rapport à la quinine (efficacité et tolérance), membre du groupe de travail, rapport de 49 pages : « Place de l'artésunate injectable dans le traitement du paludisme grave de l'adulte et de l'enfant », 1<sup>er</sup> février 2013 [251, 252].

###### **Communications affichées**

Communications affichées : 5

PA Ndour, S Biligui, **S Jauréguiberry**, *et al.* Detection of Artemisinin tolerant/resistant malaria parasite by optimizing *in vitro* "pitting". RICAI décembre 2011, Paris.

PA Ndour, S Biligui, **S Jauréguiberry**, *et al.* Artificial pitting : a way to predict slow *Plasmodium falciparum* clearance/parasite resistance in artemisinin-treated patients? ASTMH, 2011, Philadelphie.

PA Ndour, T Lopera-Mesa, **S Jauréguiberry**, *et al.* Rapid, pitting independent clearance of *Plasmodium falciparum* in immune malian children treated with artesunate for uncomplicated malaria. ASTMH, 2013, Washington DC.

**S Jauréguiberry**, A Ndour, *et al.* Delayed onset hemolytic anaemia is the cost of Artesunate life-saving benefit in severe malaria. ESH, 2014.

**S Jauréguiberry**, *et al.* L'artésunate IV est efficace et bien tolérée malgré la fréquente mais rarement sévère anémie hémolytique retardée. Suivi prospectif de 123 malades atteints de paludisme grave traités en France. JNI, 2014, Bordeaux.

### **Communications orales**

Communications orales : 10

S. Jauréguiberry, *et al.* Mise en place de l'artésunate IV en France pour le traitement des accès graves de paludisme à *P. falciparum*. JNI juin 2011, Toulouse.

S. Jauréguiberry, *et al.* Mise en place de l'artésunate IV en France pour le traitement des accès graves de paludisme à *P. falciparum* : bilan à 6 mois. RICAI décembre 2011, Paris.

S. Jauréguiberry, *et al.* Mise en place de l'artésunate IV en France pour le traitement des accès graves de paludisme à *P. falciparum* : bilan à 6 mois. Journée du CNR décembre 2011, Paris.

S. Jauréguiberry, *et al.* Actualités du paludisme en France. Journée de la SMV, octobre 2012, Strasbourg.

S. Jauréguiberry, *et al.* Mise en place de l'artésunate IV en France pour le traitement des accès graves de paludisme à *P. falciparum* : bilan à 1 an. Journée de la SFP mai 2012, Rennes. P. Buffet orateur

S. Jauréguiberry, *et al.* Mise en place de l'artésunate IV en France pour le traitement des accès graves de paludisme à *P. falciparum* : bilan à 18 mois. Journée du CNR décembre 2012, Paris.

S. Jauréguiberry, *et al.* Severe imported malaria and Intravenous Artesunate: the French experience. MMV Workshop, mars 2013, Wien, Austria.

S. Jauréguiberry, *et al.* Post-Artesunate Non infectious Deferred Anemia (PANDA) is related to pitting. TropNetEurope meeting, septembre 2013, Bordeaux.

S. Jauréguiberry. Actualités des traitements antipaludiques en France. Cours d'automne de chimiothérapie anti-infectieuse et de vaccinologie SPILF, octobre 2013, Annecy.

S. Jauréguiberry, *et al.* "Shifted clearance of once-infected erythrocytes contributes to Post Artesunate Non infectious Delayed Anemia (PANDA) in severe malaria patients cured with intravenous artésunate". Congrès ASTMH, novembre 2013, Washington DC, USA. P. Buffet orateur

### **Articles publiés sur la thématique durant le travail de thèse en marge des 2 articles principaux**

Articles publiés : 6

Ndour PA, Lopera-Mesa TM, Diakité SA, Chiang S, Mouri O, Roussel C, **Jauréguiberry S**, Biligui S, Kendjo E, Claessens A, Ciceron L, Mazier D, Thellier M, Diakité M, Fairhurst RM, Buffet PA. Plasmodium falciparum Clearance Is Rapid and Pitting Independent in Immune Malian Children Treated With Artesunate for Malaria. J Infect Dis. 2014 Sep 2. pii: jiu427. [Epub ahead of print].

Danis M, **Jauréguiberry S**. The artemisinin derivatives must be in France the first-line treatment of all *P. falciparum* malaria cases simple or severe. Rev Prat. 2013 Sep;63(7):896-8.

Danis M, Thellier M, **Jauréguiberry S**, Bricaire F, Buffet P. Imported severe falciparum malaria in France in 2000-2011: epidemiological trends and the need for new treatments. Bull Acad Natl Med. 2013 Mar;197(3):699-714; discussion 714-6.

Laurent V, Buffet P, **Jauréguiberry S**, Bruneel F. Physiopathologie du paludisme à *Plasmodium falciparum* : principaux mécanismes et avancées récentes. La Lettre de l'Infectiologue, (6) nov-déc 2012, p222-226.

**Jauréguiberry S**, Kendjo E, Ndour A, Thellier M, Buffet P. Traitement par l'artésunate intraveineux en France. La Lettre de l'Infectiologue, (6) nov-déc 2012, p244-251.

Dournon N, Buffet P, Caumes E, Clair B, **Jauréguiberry S**. Artesunate for severe acute *Plasmodium falciparum* infection in a patient with myasthenia gravis. Am J Trop Med Hyg. 2012 Sep;87(3):435-6.

### **Contrat et bourse obtenus**

**Contrat**

Obtention d'un contrat d'interface INSERM-APHP depuis avril 2013 : UMRs945 INSERM-Université Paris 6 et Maladies Infectieuses et Tropicales, Service du Pr. Bricaire, CHU Pitié Salpêtrière, Paris portant sur la « Clairance différée des globules rouges « pittés » et anémie hémolytique au décours du paludisme grave traité par l'artésunate ».

### **Bourse**

Obtention de la bourse du Collège des universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales pour l'année 2013 : « Clairance différée des globules rouges « pittés » et anémie hémolytique au décours du paludisme grave traité par l'artésunate ».

### **Collaborations engagées**

#### **Internationales**

##### **Essai DHART**

Collaboration internationale avec le Pr. Dondorp (Mahidol, Oxford, Wellcome Trust, Thaïlande), à Kinshasa, portant sur la clairance différée des globules rouges « pittés » et anémie hémolytique au décours du paludisme grave traité par l'artésunate (essai DHART). Une demande de financement complémentaire a été demandée et obtenue (bourse CMIT 2013). Il s'agit de conforter l'hypothèse du mécanisme d'anémie retardée (PADH) en population vivant en zone d'endémie palustre. Le sponsor est l'université d'Oxford, Royaume Uni (toujours) et le bailleur de fond Guilin Pharmaceuticals, Chine. Ce projet est en cours.

##### **Essai PANDAONE**

Collaboration internationale avec le Walter Reed Army Research Institute qui comportera un partage de données sous l'égide de l'INVS et du CNR du paludisme concernant le suivi d'efficacité et de tolérance de l'artésunate dans le traitement du paludisme grave d'importation, toujours selon une approche prospective. Ce travail et cette collaboration sont en cours. Le financement obtenu a permis l'embauche d'une Assistante de Recherche Clinique afin de mener le recueil et la saisie de l'information.

#### **Nationale**

Programme Hospitalier de Recherche Clinique « Artémis » : soumis une première fois en 2011 puis resoumis en janvier 2012, il s'articulait étroitement avec le travail de thèse et répondait aux

demandes de l'ANSM et des décideurs politiques en santé. Il a été refusé par deux fois. Son objectif principal se voulait d'estimer la mortalité sous traitement avec comparaison historique. Les objectifs secondaires étaient de préciser la tolérance de ce nouveau médicament, de confirmer la corrélation entre rigidité des globules rouges circulants et le pronostic, de déterminer s'il existe une corrélation entre le taux de rétention des globules rouges parasités circulants in vitro et le pronostic, de déterminer s'il existe une corrélation entre le taux de rétention des globules rouges non parasités circulants in vitro et le pronostic, de déterminer in vivo et ex-vivo la vitesse de clairance et de pitting après traitement par AS.

#### 4.5 Détails du marquage mis au point pour l'utilisation du CyflowSLOptics (mission Kinshasa – DHART-avril, juin 2014)

##### **Tube A : Marquage de l'ADN parasitaire (détermine la parasitémie)**

1. Lavage PBS (1ml) 2 fois (spin 1800 tr/mn, 2 mn)
2. **Fixation** : 10 µl de RBC + 500 µl de Glutaraldehyde 1%, 30 secondes, mélanger doucement
3. **Lavage** PBS (1ml) 2 fois (spin 1800 tr/mn, 2 mn)
4. **Marquage ADN** : 10 µl de RBC + 0.1 µl de Sybr + 1 ml PBS Albumax1% ; ou prendre solution reconstituée : 1 ml de solution (10 ml de PBSAlbumax1% + 1 µl de Sybr) + 10 µl de RBC, bien mélanger, incubation 30mn à RT, à l'abri de la lumière
5. Lavage PBS (1ml) 2 fois (spin 1800 tr/mn, 2 mn)
6. Transfert sur tube FACS 2 ml (250 µl de l'échantillon dans 1750 µl de PBS) → lecture facs

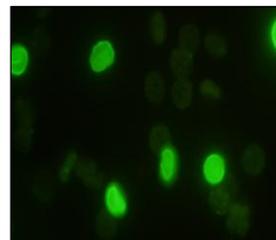
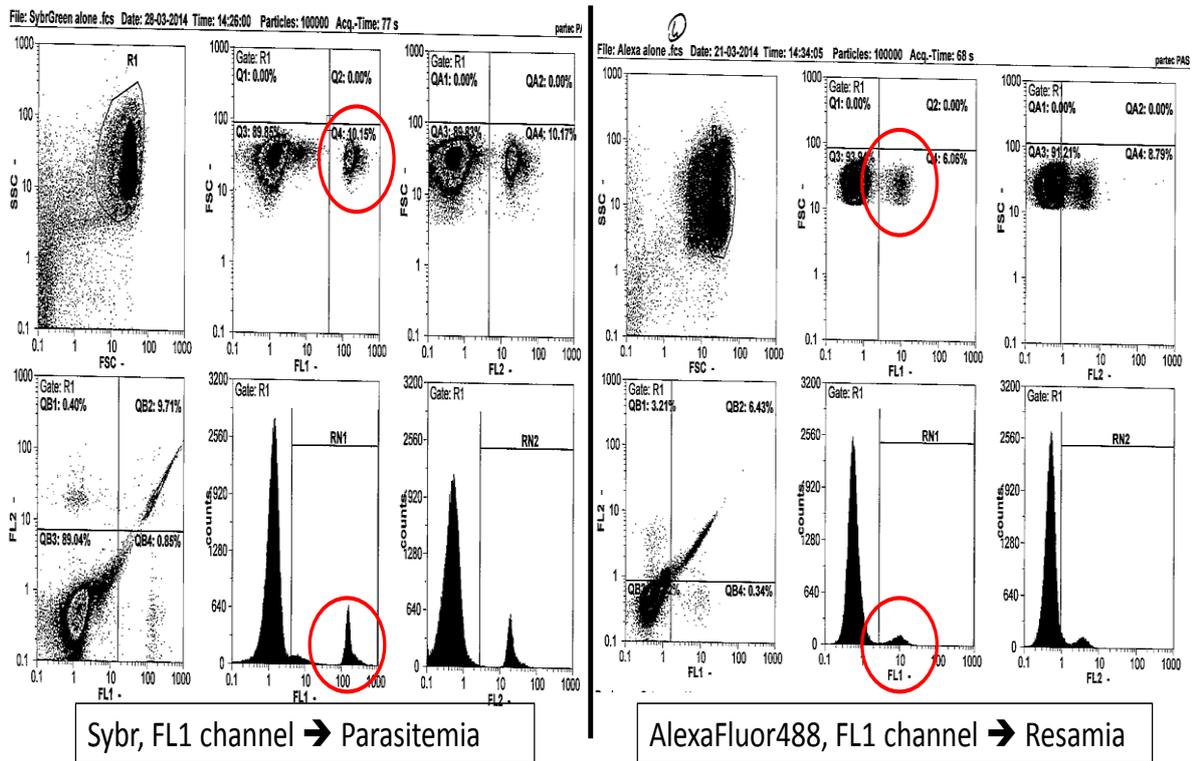
##### **Tube B : Marquage protéine RESA (détermine la résamie)**

1. Lavage PBS (1ml) 2 fois (spin 1800 tr/mn, 2 mn)
2. **Fixation** : 10 µl de RBC + 500 µl de Glutaraldehyde 1%, 30 secondes, mélanger doucement
3. **Lavage** PBS (1ml) 2 fois (spin 1800 tr/mn, 2 mn)
4. **Phase Ac primaire.**  
[Diluer l'anticorps primaire au 1/20 (50 µl Acprim + 950 µl PBSAlbumax1%)]  
+  
[Triton 0.1% (1 µl for 1 ml)]  
+  
L'échantillon (10 µl de RBC) : incubation 30 mn, température ambiante, mélanger doucement, à l'abri de la lumière
5. Lavage PBS (1ml) 2 fois (spin 1800 tr/mn, 2 mn)
6. **Phase Ac secondaire.**  
[1 ml PBSAlbumax1% + anticorps secondaire (IgG Goat Ab-Alexa fluor 488) au 1/1000 (1 µl pour 1 ml)]  
+  
[Triton 0.1% (1 µl pour 1 ml)]  
+

l'échantillon (10 µl de RBC) : incubation 30 mn, température ambiante, mélanger doucement, à l'abri de la lumière

7. Lavage PBS (1ml) 2 fois (spin 1800 tr/mn, 2 mn)
8. Transfert sur tube FACS 2 ml (250 µl de l'échantillon dans 1750 µl de PBS) → lecture facs

**Exemple et sortie facs**



→ [Pittemia] = [Resamia – Parasitemia]x100

**La reconstruction de l'appareil (Kingasani juin 2014)**



**Cytométrie en action (Kingasani juin 2014)**





## 5 BIBLIOGRAPHIE

1. Kitchen SF: **Falciparum malaria**. In: *Malariology Vol 2*. edn. Edited by Boyd MF. Philadelphia: WB Saunders; 1949: 995-1016.
2. WHO: **World Malaria Report 2011**; 2011.
3. Lindner SE, Miller JL, Kappe SH: **Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity**. *Cellular microbiology* 2012, **14**(3):316-324.
4. Rosenthal PJ: **Artesunate for the treatment of severe falciparum malaria**. *N Engl J Med* 2008, **358**(17):1829-1836.
5. Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH: **Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host**. *Annual review of microbiology* 2009, **63**:195-221.
6. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH *et al*: **A global map of dominant malaria vectors**. *Parasites & vectors* 2012, **5**:69.
7. Hay SI, Sinka ME, Okara RM, Kabaria CW, Mbithi PM, Tago CC, Benz D, Gething PW, Howes RE, Patil AP *et al*: **Developing global maps of the dominant anopheles vectors of human malaria**. *PLoS Med* 2010, **7**(2):e1000209.
8. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IR, Johnston GL, Tatem AJ, Hay SI: **A new world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2010**. *Malar J* 2011, **10**:378.
9. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM: **Malaria**. *Lancet* 2014, **383**(9918):723-735.
10. Koella JC, Sorensen FL, Anderson RA: **The malaria parasite, Plasmodium falciparum, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, Anopheles gambiae**. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 1998, **265**(1398):763-768.
11. Anderson RA, Koella JC, Hurd H: **The effect of Plasmodium yoelii nigeriensis infection on the feeding persistence of Anopheles stephensi Liston throughout the sporogonic cycle**. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 1999, **266**(1430):1729-1733.
12. Lacroix R, Mukabana WR, Gouagna LC, Koella JC: **Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes**. *PLoS biology* 2005, **3**(9):e298.
13. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R: **Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal**. *Nat Med* 2006, **12**(2):220-224.
14. Vaughan AM, Wang R, Kappe SH: **Genetically engineered, attenuated whole-cell vaccine approaches for malaria**. *Human vaccines* 2010, **6**(1):107-113.
15. Silvie O, Goetz K, Matuschewski K: **A sporozoite asparagine-rich protein controls initiation of Plasmodium liver stage development**. *PLoS pathogens* 2008, **4**(6):e1000086.
16. Kumar KA, Garcia CR, Chandran VR, Van Rooijen N, Zhou Y, Winzeler E, Nussenzweig V: **Exposure of Plasmodium sporozoites to the intracellular concentration of potassium enhances infectivity and reduces cell passage activity**. *Molecular and biochemical parasitology* 2007, **156**(1):32-40.
17. Mackellar DC, O'Neill MT, Aly AS, Sacchi JB, Jr., Cowman AF, Kappe SH: **Plasmodium falciparum PF10\_0164 (ETRAP10.3) is an essential parasitophorous vacuole and exported protein in blood stages**. *Eukaryotic cell* 2010, **9**(5):784-794.
18. Mikolajczak SA, Jacobs-Lorena V, MacKellar DC, Camargo N, Kappe SH: **L-FABP is a critical host factor for successful malaria liver stage development**. *International journal for parasitology* 2007, **37**(5):483-489.
19. Jayabalasingham B, Bano N, Coppens I: **Metamorphosis of the malaria parasite in the liver is associated with organelle clearance**. *Cell research* 2010, **20**(9):1043-1059.
20. Hegge S, Kudryashev M, Barniol L, Frischknecht F: **Key factors regulating Plasmodium berghei sporozoite survival and transformation revealed by an automated visual assay**.

- FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010, **24**(12):5003-5012.
21. Doi Y, Shinzawa N, Fukumoto S, Okano H, Kanuka H: **Calcium signal regulates temperature-dependent transformation of sporozoites in malaria parasite development.** *Experimental parasitology* 2011, **128**(2):176-180.
  22. Stanway RR, Mueller N, Zobiak B, Graewe S, Froehle U, Zessin PJ, Aepfelbacher M, Heussler VT: **Organelle segregation into Plasmodium liver stage merozoites.** *Cellular microbiology* 2011, **13**(11):1768-1782.
  23. Tarun AS, Peng X, Dumpit RF, Ogata Y, Silva-Rivera H, Camargo N, Daly TM, Bergman LW, Kappe SH: **A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(1):305-310.
  24. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT: **Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids.** *Science* 2006, **313**(5791):1287-1290.
  25. Simpson JA, Aarons L, Collins WE, Jeffery GM, White NJ: **Population dynamics of untreated Plasmodium falciparum malaria within the adult human host during the expansion phase of the infection.** *Parasitology* 2002, **124**(Pt 3):247-263.
  26. Cowman AF, Berry D, Baum J: **The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell.** *The Journal of cell biology* 2012, **198**(6):961-971.
  27. Cowman AF, Crabb BS: **Invasion of red blood cells by malaria parasites.** *Cell* 2006, **124**(4):755-766.
  28. Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, Mboup S, Ndir O, Kwiatkowski DP, Duraisingh MT *et al*: **Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum.** *Nature* 2011, **480**(7378):534-537.
  29. Srinivasan P, Beatty WL, Diouf A, Herrera R, Ambroggio X, Moch JK, Tyler JS, Narum DL, Pierce SK, Boothroyd JC *et al*: **Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(32):13275-13280.
  30. Leykauf K, Treeck M, Gilson PR, Nebl T, Bräulke T, Cowman AF, Gilberger TW, Crabb BS: **Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite.** *PLoS pathogens* 2010, **6**(6):e1000941.
  31. Riglar DT, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, Turnbull L, Angrisano F, Marapana DS, Rogers KL, Whitchurch CB *et al*: **Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte.** *Cell host & microbe* 2011, **9**(1):9-20.
  32. Miller LH, Ackerman HC, Su XZ, Wellems TE: **Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments.** *Nat Med* 2013, **19**(2):156-167.
  33. Lehane AM, McDevitt CA, Kirk K, Fidock DA: **Degrees of chloroquine resistance in Plasmodium - is the redox system involved?** *International journal for parasitology, drugs and drug resistance* 2012, **2**:47-57.
  34. Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner GD, Louwrier K, Mai NT, Simpson JA, Hien TT, White NJ: **A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain.** *The American journal of pathology* 1999, **155**(2):395-410.
  35. Joice R, Nilsson SK, Montgomery J, Dankwa S, Egan E, Morahan B, Seydel KB, Bertuccini L, Alano P, Williamson KC *et al*: **Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow.** *Science translational medicine* 2014, **6**(244):244re245.
  36. Farfour E, Charlotte F, Settegrana C, Miyara M, Buffet P: **The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for Plasmodium falciparum gametocyte maturation?** *Malar J* 2012, **11**:285.
  37. Tiburcio M, Niang M, Deplaine G, Perrot S, Bischoff E, Ndour PA, Silvestrini F, Khattab A, Milon G, David PH *et al*: **A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation**

- and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood* 2012, **119**(24):e172-180.
38. Kitchen SF: **Symptomatology: general considerations.** In: *Malariaology Vol2.* edn. Edited by Boyd MF. Philadelphia: WB Saunders; 1949: 966-994.
  39. Buffet PA, Safeukui I, Milon G, Mercereau-Puijalon O, David PH: **Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria.** *Curr Opin Hematol* 2009, **16**(3):157-164.
  40. Sarda V, Kaslow DC, Williamson KC: **Approaches to malaria vaccine development using the retrospectroscope.** *Infection and immunity* 2009, **77**(8):3130-3140.
  41. SPILF: **Recommendations for clinical practice. Management and prevention of imported Plasmodium falciparum malaria. (Revision 2007 of the 1999 Consensus conference). Short text.** *Med Mal Infect* 2008, **38**(2):54-67, 39-53.
  42. Alfandari S, Santre C, Chidiac C, Senneville E, Leroy O, Beuscart C, Gerard Y, Georges H, Beaucaire G, Mouton Y: **Imported malaria: presentation and outcome of 111 cases.** *Clin Microbiol Infect* 1996, **2**(2):86-90.
  43. Jaureguiberry S, Caumes E: **Accès palustre.** *La revue du praticien Médecine générale* 2007, **21**(754/755):23-28.
  44. Rogier C, Fusai T, Pradines B: **Epidémiologie du paludisme.** In: *Paludisme grave.* edn. Edited by Wolters Kluwer France: Saissy, JM.; 2001: 23-40.
  45. WHO: **Severe falciparum malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, **94** (suppl):1-90.
  46. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N: **Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial.** *Lancet* 2005, **366**(9487):717-725.
  47. WHO: **The treatment of malaria, 2nd edn.** Geneva, Switzerland; 2010.
  48. Dondorp AM, Lee SJ, Faiz MA, Mishra S, Price R, Tjitra E, Than M, Htut Y, Mohanty S, Yunus EB *et al*: **The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**(2):151-157.
  49. Pain A, Ferguson DJ, Kai O, Urban BC, Lowe B, Marsh K, Roberts DJ: **Platelet-mediated clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(4):1805-1810.
  50. Doumbo OK, Thera MA, Kone AK, Raza A, Tempest LJ, Lyke KE, Plowe CV, Rowe JA: **High levels of Plasmodium falciparum rosetting in all clinical forms of severe malaria in African children.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **81**(6):987-993.
  51. Carlson J, Helmsby H, Hill AV, Brewster D, Greenwood BM, Wahlgren M: **Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies.** *Lancet* 1990, **336**(8729):1457-1460.
  52. Ponsford MJ, Medana IM, Prapansilp P, Hien TT, Lee SJ, Dondorp AM, Esiri MM, Day NP, White NJ, Turner GD: **Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria.** *J Infect Dis* 2012, **205**(4):663-671.
  53. Dondorp AM, Angus BJ, Hardeman MR, Chotivanich KT, Silamut K, Ruangveerayuth R, Kager PA, White NJ, Vreeken J: **Prognostic significance of reduced red blood cell deformability in severe falciparum malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 1997, **57**(5):507-511.
  54. Dondorp AM, Nyanoti M, Kager PA, Mithwani S, Vreeken J, Marsh K: **The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe falciparum malaria and its restoration by blood transfusion.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, **96**(3):282-286.
  55. Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ: **Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria.** *Parasitology today* 2000, **16**(6):228-232.
  56. Dasari P, Fries A, Heber SD, Salama A, Blau IW, Lingelbach K, Bhakdi SC, Udomsangpetch R, Torzewski M, Reiss K *et al*: **Malarial anemia: digestive vacuole of Plasmodium falciparum mediates complement deposition on bystander cells to provoke hemophagocytosis.** *Medical microbiology and immunology* 2014.

57. Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukritayakamee S, Nagachinta B *et al*: **An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration.** *The American journal of pathology* 1994, **145**(5):1057-1069.
58. Yeo TW, Lampah DA, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, McNeil YR, Darcy CJ, Granger DL, Weinberg JB, Lopansri BK *et al*: **Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria.** *J Exp Med* 2007, **204**(11):2693-2704.
59. Yeo TW, Lampah DA, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, Piera K, Price RN, Duffull SB, Celermajer DS, Anstey NM: **Angiopoietin-2 is associated with decreased endothelial nitric oxide and poor clinical outcome in severe falciparum malaria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(44):17097-17102.
60. Conroy AL, Glover SJ, Hawkes M, Erdman LK, Seydel KB, Taylor TE, Molyneux ME, Kain KC: **Angiopoietin-2 levels are associated with retinopathy and predict mortality in Malawian children with cerebral malaria: a retrospective case-control study\***. *Critical care medicine* 2012, **40**(3):952-959.
61. Maude RJ, Barkhof F, Hassan MU, Ghose A, Hossain A, Abul Faiz M, Choudhury E, Rashid R, Abu Sayeed A, Charunwatthana P *et al*: **Magnetic resonance imaging of the brain in adults with severe falciparum malaria.** *Malar J* 2014, **13**:177.
62. Potchen MJ, Kampondeni SD, Seydel KB, Birbeck GL, Hammond CA, Bradley WG, DeMarco JK, Glover SJ, Ugorji JO, Latourette MT *et al*: **Acute brain MRI findings in 120 Malawian children with cerebral malaria: new insights into an ancient disease.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2012, **33**(9):1740-1746.
63. de Mast Q, Groot E, Asih PB, Syafruddin D, Oosting M, Sebastian S, Ferwerda B, Netea MG, de Groot PG, van der Ven AJ *et al*: **ADAMTS13 deficiency with elevated levels of ultra-large and active von Willebrand factor in P. falciparum and P. vivax malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **80**(3):492-498.
64. Francischetti IM, Seydel KB, Monteiro RQ, Whitten RO, Erexson CR, Noronha AL, Ostera GR, Kamiza SB, Molyneux ME, Ward JM *et al*: **Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce tissue factor expression in endothelial cells and support the assembly of multimolecular coagulation complexes.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007, **5**(1):155-165.
65. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whitten RO, Mueller JS, Fosiko NG, Lewallen S, Liomba NG, Molyneux ME: **Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts.** *Nat Med* 2004, **10**(2):143-145.
66. Vouret-Craviari V, Grall D, Van Obberghen-Schilling E: **Modulation of Rho GTPase activity in endothelial cells by selective proteinase-activated receptor (PAR) agonists.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2003, **1**(5):1103-1111.
67. Pankoui Mfonkeu JB, Gouado I, Fotso Kuate H, Zambou O, Amvam Zollo PH, Grau GE, Combes V: **Elevated cell-specific microparticles are a biological marker for cerebral dysfunctions in human severe malaria.** *PLoS One* 2010, **5**(10):e13415.
68. Marquet S, Doumbo O, Cabantous S, Poudiougou B, Argiro L, Safeukui I, Konate S, Sissoko S, Chevereau E, Traore A *et al*: **A functional promoter variant in IL12B predisposes to cerebral malaria.** *Hum Mol Genet* 2008, **17**(14):2190-2195.
69. White NJ, Turner GD, Day NP, Dondorp AM: **Lethal Malaria: Marchiafava and Bignami Were Right.** *J Infect Dis* 2013.
70. Cabantous S, Poudiougou B, Oumar AA, Traore A, Barry A, Vitte J, Bongrand P, Marquet S, Doumbo O, Dessein AJ: **Genetic evidence for the aggravation of Plasmodium falciparum malaria by interleukin 4.** *J Infect Dis* 2009, **200**(10):1530-1539.

71. Crompton PD, Moebius J, Portugal S, Waisberg M, Hart G, Garver LS, Miller LH, Barillas-Mury C, Pierce SK: **Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease.** *Annual review of immunology* 2014, **32**:157-187.
72. White NJ: **The parasite clearance curve.** *Malar J* 2011, **10**:278.
73. White NJ, Chapman D, Watt G: **The effects of multiplication and synchronicity on the vascular distribution of parasites in falciparum malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992, **86**(6):590-597.
74. Silamut K, White NJ: **Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in severe falciparum malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, **87**(4):436-443.
75. Field JW, Niven IC: **A note on prognosis in relation to parasite counts in acute subtertian malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1937, **30**(6):569-571, 573-574.
76. WHO: **Management of severe malaria: a practical handbook – 3rd ed.;** 2013.
77. Udomsangpetch R, Pipitaporn B, Silamut K, Pinches R, Kyes S, Looareesuwan S, Newbold C, White NJ: **Febrile temperatures induce cytoadherence of ring-stage Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(18):11825-11829.
78. Dondorp AM, Desakorn V, Pongtavornpinyo W, Sahassananda D, Silamut K, Chotivanich K, Newton PN, Pitisuttithum P, Smithyman AM, White NJ *et al*: **Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2.** *PLoS Med* 2005, **2**(8):e204.
79. Pukrittayakamee S, White NJ, Davis TM, Looareesuwan S, Supanaranond W, Desakorn V, Chaivisuth B, Williamson DH: **Hepatic blood flow and metabolism in severe falciparum malaria: clearance of intravenously administered galactose.** *Clinical science* 1992, **82**(1):63-70.
80. Krishna S, Supanaranond W, Pukrittayakamee S, Karter D, Supputamongkol Y, Davis TM, Holloway PA, White NJ: **Dichloroacetate for lactic acidosis in severe malaria: a pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment.** *Metabolism: clinical and experimental* 1994, **43**(8):974-981.
81. Warrell DA, White NJ, Veall N, Looareesuwan S, Chanthavanich P, Phillips RE, Karbwang J, Pongpaew P, Krishna S: **Cerebral anaerobic glycolysis and reduced cerebral oxygen transport in human cerebral malaria.** *Lancet* 1988, **2**(8610):534-538.
82. Day NP, Phu NH, Mai NT, Bethell DB, Chau TT, Loc PP, Chuong LV, Sinh DX, Solomon T, Haywood G *et al*: **Effects of dopamine and epinephrine infusions on renal hemodynamics in severe malaria and severe sepsis.** *Critical care medicine* 2000, **28**(5):1353-1362.
83. Day NP, Phu NH, Mai NT, Chau TT, Loc PP, Chuong LV, Sinh DX, Holloway P, Hien TT, White NJ: **The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria.** *Critical care medicine* 2000, **28**(6):1833-1840.
84. Dondorp AM, Ince C, Charunwatthana P, Hanson J, van Kuijen A, Faiz MA, Rahman MR, Hasan M, Bin Yunus E, Ghose A *et al*: **Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria.** *J Infect Dis* 2008, **197**(1):79-84.
85. Abu Sayeed A, Maude RJ, Hasan MU, Mohammed N, Hoque MG, Dondorp AM, Faiz MA: **Malarial retinopathy in Bangladeshi adults.** *Am J Trop Med Hyg* 2011, **84**(1):141-147.
86. Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H, Fu W, Whitten RO, Milner D, Kamiza S, Molyneux M, Taylor TE: **The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children.** *The American journal of pathology* 2011, **178**(5):2146-2158.
87. Roze E, Thiebaut MM, Mazevet D, Bricaire F, Danis M, Deseilligny CP, Caumes E: **Neurologic sequelae after severe falciparum malaria in adult travelers.** *Eur Neurol* 2001, **46**(4):192-197.
88. Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM: **Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis.** *Lancet Infect Dis* 2012, **12**(6):457-468.
89. Cholera R, Brittain NJ, Gillrie MR, Lopera-Mesa TM, Diakite SA, Arie T, Krause MA, Guindo A, Tubman A, Fujioka H *et al*: **Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(3):991-996.

90. Cyrklaff M, Sanchez CP, Kilian N, Bisseye C, Simpoire J, Frischknecht F, Lanzer M: **Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.** *Science* 2011, **334**(6060):1283-1286.
91. Marsh K, Kinyanjui S: **Immune effector mechanisms in malaria.** *Parasite Immunol* 2006, **28**(1-2):51-60.
92. Baird JK, Krisin, Barcus MJ, Elyazar IR, Bangs MJ, Maguire JD, Fryauff DJ, Richie TL, Sekartuti, Kalalo W: **Onset of clinical immunity to Plasmodium falciparum among Javanese migrants to Indonesian Papua.** *Ann Trop Med Parasitol* 2003, **97**(6):557-564.
93. Bouchaud O, Cot M, Kony S, Durand R, Schiemann R, Ralaimazava P, Coulaud JP, Le Bras J, Deloron P: **Do African immigrants living in France have long-term malarial immunity?** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**(1):21-25.
94. Cohen S, Mc GI, Carrington S: **Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria.** *Nature* 1961, **192**:733-737.
95. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S *et al*: **Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.** *Nature* 2002, **419**(6906):498-511.
96. Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L: **Antigenic variation in Plasmodium falciparum.** *Annual review of microbiology* 2008, **62**:445-470.
97. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD: **Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis.** *Lancet* 2012, **379**(9814):413-431.
98. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B: **Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.** *Clin Infect Dis* 2008, **46**(2):165-171.
99. Riehle MM, Guelbeogo WM, Gneme A, Eiglmeier K, Holm I, Bischoff E, Garnier T, Snyder GM, Li X, Markianos K *et al*: **A cryptic subgroup of Anopheles gambiae is highly susceptible to human malaria parasites.** *Science* 2011, **331**(6017):596-598.
100. INVS: **Recommandations sanitaires pour les voyageurs, 2014.** *BEH* 2014, **16-17**:261-311.
101. Bouchaud O, Legros F, Le Bras J, Danis M, Durand R: **Décès par paludisme d'importation en France : analyse de 107 cas entre 1996 et 2003.** *Médecine et Maladies Infectieuses* 2005, **35**(COL4-02):S141-S193.
102. Legros F, Bouchaud O, Ancelle T, Arnaud A, Cojean S, Le Bras J, Danis M, Fontanet A, Durand R: **Risk factors for imported fatal Plasmodium falciparum malaria, France, 1996-2003.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**(6):883-888.
103. Seringe E, Thellier M, Fontanet A, Legros F, Bouchaud O, Ancelle T, Kendjo E, Houze S, Le Bras J, Danis M *et al*: **Severe imported Plasmodium falciparum malaria, France, 1996-2003.** *Emerg Infect Dis* 2011, **17**(5):807-813.
104. Suter SP, Gardner RA, Boylan CW, Carroll GL, Chang KC, Marvel JS, Kilo C, Gonen B, Williamson JR: **Age-related changes in deformability of human erythrocytes.** *Blood* 1985, **65**(2):275-282.
105. Connor J, Pak CC, Schroit AJ: **Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells.** *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**(4):2399-2404.
106. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, Turner GD, Mercereau-Puijalon O: **The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology.** *Blood* 2011, **117**(2):381-392.
107. Koury MJ, Rhodes M: **How to approach chronic anemia.** *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2012, **2012**:183-190.
108. MMV: **Experts Group Meeting on delayed anaemia following treatment with injectable artesunate,** **Wien Austria.** In: **2013 2013:**

<http://www.mmv.org/sites/default/files/uploads/docs/events/2013/InjectableArtesunateExpertGroupMeeting.pdf>; 2013.

109. Heegaard ED, Brown KE: **Human parvovirus B19**. *Clinical microbiology reviews* 2002, **15**(3):485-505.
110. Perkins S: **Diagnosis of Anemia**. In: *Practical Diagnosis of Hematologic Disorders, 5th Edition*. edn. Edited by Kjeldsberg C, Perkins S. Chicago, IL: American Society of Clinical Pathology Press; 2010.
111. Fendel R, Brandts C, Rudat A, Kreidenweiss A, Steur C, Appelmann I, Ruehe B, Schroder P, Berdel WE, Kreamsner PG *et al*: **Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia**. *PLoS One* 2010, **5**(4):e10038.
112. d'Onofrio G, Kuse R, Foures C, Jou JM, Pradella M, Zini G: **Reticulocytes in haematological disorders**. *Clinical and laboratory haematology* 1996, **18 Suppl 1**:29-34.
113. Rosse W, Bunn HF: **Hemolytic anemia**. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. edn. Edited by Mc Graw-Hill I; 1994: 1743-1754.
114. Safeukui I, Correias JM, Brousse V, Hirt D, Deplaine G, Mule S, Lesurtel M, Goasguen N, Sauvanet A, Couvelard A *et al*: **Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen**. *Blood* 2008, **112**(6):2520-2528.
115. Abdalla S, Weatherall DJ, Wickramasinghe SN, Hughes M: **The anaemia of P. falciparum malaria**. *Br J Haematol* 1980, **46**(2):171-183.
116. Dondorp AM, Angus BJ, Chotivanich K, Silamut K, Ruangveerayuth R, Hardeman MR, Kager PA, Vreeken J, White NJ: **Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria**. *Am J Trop Med Hyg* 1999, **60**(5):733-737.
117. Li J, Huang YX, Ji T, Tu M, Mao X, Chen WX, Chen GW: **Non-invasive in situ simultaneous measurement of multi-parameter mechanical properties of red blood cell membrane**. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2005, **37**(6):391-395.
118. Goka BQ, Kwarko H, Kurtzhals JA, Gyan B, Ofori-Adjei E, Ohene SA, Hviid L, Akanmori BD, Neequaye J: **Complement binding to erythrocytes is associated with macrophage activation and reduced haemoglobin in Plasmodium falciparum malaria**. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001, **95**(5):545-549.
119. Pawluczakowycz AW, Lindorfer MA, Waitumbi JN, Taylor RP: **Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria**. *Journal of immunology* 2007, **179**(8):5543-5552.
120. Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA: **Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe plasmodium falciparum anemia**. *Blood* 2000, **95**(4):1481-1486.
121. Awah N, Balogun H, Achidi E, Mariuba LA, Nogueira PA, Orlandi P, Troye-Blomberg M, Gysin J, Berzins K: **Antibodies to the Plasmodium falciparum rhoptry protein RAP-2/RSP-2 in relation to anaemia in Cameroonian children**. *Parasite Immunol* 2011, **33**(2):104-115.
122. Gwamaka M, Fried M, Domingo G, Duffy PE: **Early and extensive CD55 loss from red blood cells supports a causal role in malarial anaemia**. *Malar J* 2011, **10**:386.
123. Buffet PA, Milon G, Brousse V, Correias JM, Dousset B, Couvelard A, Kianmanesh R, Farges O, Sauvanet A, Paye F *et al*: **Ex vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions**. *Blood* 2006, **107**(9):3745-3752.
124. Cranston HA, Boylan CW, Carroll GL, Sutera SP, Williamson JR, Gluzman IY, Krogstad DJ: **Plasmodium falciparum maturation abolishes physiological red cell deformability**. *Science* 1984, **223**(4634):400-403.
125. Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, Biligui S, Guillotte M, Guitton C, Dokmak S *et al*: **The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro**. *Blood* 2011, **117**(8):e88-95.

126. Pouvelle B, Buffet PA, Lepolard C, Scherf A, Gysin J: **Cytoadhesion of Plasmodium falciparum ring-stage-infected erythrocytes.** *Nat Med* 2000, **6**(11):1264-1268.
127. Nuchongsin F, Chotivanich K, Charunwatthana P, Omodeo-Sale F, Taramelli D, Day NP, White NJ, Dondorp AM: **Effects of malaria heme products on red blood cell deformability.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**(4):617-622.
128. Omodeo-Sale F, Motti A, Dondorp A, White NJ, Taramelli D: **Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by Plasmodium falciparum haem products.** *European journal of haematology* 2005, **74**(4):324-332.
129. Mohandas N, An X: **Malaria and human red blood cells.** *Medical microbiology and immunology* 2012, **201**(4):593-598.
130. Naumann KM, Jones GL, Saul A, Smith R: **Parasite-induced changes to localized erythrocyte membrane deformability in Plasmodium falciparum cultures.** *Immunology and cell biology* 1992, **70 ( Pt 4)**:267-275.
131. Nash GB, O'Brien E, Gordon-Smith EC, Dormandy JA: **Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by Plasmodium falciparum.** *Blood* 1989, **74**(2):855-861.
132. Glenister FK, Fernandez KM, Kats LM, Hanssen E, Mohandas N, Coppel RL, Cooke BM: **Functional alteration of red blood cells by a megadalton protein of Plasmodium falciparum.** *Blood* 2009, **113**(4):919-928.
133. Shelby JP, White J, Ganesan K, Rathod PK, Chiu DT: **A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(25):14618-14622.
134. Chien S, Donnandy J, Ernst E, Matrai A: **Physiological and pathophysiological significance of hemorheology** In: *Clinical Hemorheology.* edn. Edited by Nijhoff M: Dordrecht, The Netherlands; 1987: 125–164.
135. Nash GB, Cooke BM, Carlson J, Wahlgren M: **Rheological properties of rosettes formed by red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum.** *Br J Haematol* 1992, **82**(4):757-763.
136. Safeukui I, Buffet PA, Deplaine G, Perrot S, Brousse V, Ndour A, Nguyen M, Mercereau-Puijalon O, David PH, Milon G *et al*: **Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by human spleen: implications for understanding clinical variability of membrane disorders.** *Blood* 2012, **120**(2):424-430.
137. Ruangjirachuporn W, Udomsangpetch R, Carlsson J, Drenckhahn D, Perlmann P, Berzins K: **Plasmodium falciparum: analysis of the interaction of antigen Pf155/RESA with the erythrocyte membrane.** *Experimental parasitology* 1991, **73**(1):62-72.
138. Glenister FK, Coppel RL, Cowman AF, Mohandas N, Cooke BM: **Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells.** *Blood* 2002, **99**(3):1060-1063.
139. Safeukui I, Buffet PA, Perrot S, Sauvanet A, Aussilhou B, Dokmak S, Couvelard A, Hatem DC, Mohandas N, David PH *et al*: **Surface area loss and increased sphericity account for the splenic entrapment of subpopulations of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes.** *PLoS One* 2013, **8**(3):e60150.
140. Snow RW, Marsh K: **New insights into the epidemiology of malaria relevant for disease control.** *British medical bulletin* 1998, **54**(2):293-309.
141. Imbert P, Rapp C, Buffet PA: **Pathological rupture of the spleen in malaria: analysis of 55 cases (1958-2008).** *Travel medicine and infectious disease* 2009, **7**(3):147-159.
142. Schnitzer B, Sodeman T, Mead ML, Contacos PG: **Pitting function of the spleen in malaria: ultrastructural observations.** *Science* 1972, **177**(44):175-177.
143. Chotivanich K, Udomsangpetch R, McGready R, Proux S, Newton P, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, White NJ: **Central role of the spleen in malaria parasite clearance.** *J Infect Dis* 2002, **185**(10):1538-1541.
144. Angus BJ, Chotivanich K, Udomsangpetch R, White NJ: **In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria.** *Blood* 1997, **90**(5):2037-2040.

145. Newton PN, Chotivanich K, Chierakul W, Ruangveerayuth R, Teerapong P, Silamut K, Looareesuwan S, White NJ: **A comparison of the in vivo kinetics of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen-positive and -negative erythrocytes.** *Blood* 2001, **98**(2):450-457.
146. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Dondorp A, Williams T, Angus B, Simpson JA, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, Newbold CI, White NJ: **The mechanisms of parasite clearance after antimalarial treatment of Plasmodium falciparum malaria.** *J Infect Dis* 2000, **182**(2):629-633.
147. Grankvist A, Andersson PO, Mattsson M, Sender M, Vaht K, Hoper L, Sakiniene E, Trysberg E, Stenson M, Fehr J *et al*: **Infections with the tick-borne bacterium "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" mimic noninfectious conditions in patients with B cell malignancies or autoimmune diseases.** *Clin Infect Dis* 2014, **58**(12):1716-1722.
148. Ho M, White NJ, Looareesuwan S, Wattanagoon Y, Lee SH, Walport MJ, Bunnag D, Harinasuta T: **Splenic Fc receptor function in host defense and anemia in acute Plasmodium falciparum malaria.** *J Infect Dis* 1990, **161**(3):555-561.
149. de Porto AP, Lammers AJ, Bennink RJ, ten Berge IJ, Speelman P, Hoekstra JB: **Assessment of splenic function.** *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2010, **29**(12):1465-1473.
150. Sanyal S, Egee S, Bouyer G, Perrot S, Safeukui I, Bischoff E, Buffet P, Deitsch KW, Mercereau-Puijalon O, David PH *et al*: **Plasmodium falciparum STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties.** *Blood* 2012, **119**(2):e1-8.
151. Looareesuwan S, Ho M, Wattanagoon Y, White NJ, Warrell DA, Bunnag D, Harinasuta T, Wyler DJ: **Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria.** *N Engl J Med* 1987, **317**(11):675-679.
152. Bruneel F, Tubach F, Corne P, Megarbane B, Mira JP, Peytel E, Camus C, Schortgen F, Azoulay E, Cohen Y *et al*: **Severe imported falciparum malaria: a cohort study in 400 critically ill adults.** *PLoS One* 2010, **5**(10):e13236.
153. Bruneel F, Hocqueloux L, Alberti C, Wolff M, Chevret S, Bedos JP, Durand R, Le Bras J, Regnier B, Vachon F: **The clinical spectrum of severe imported falciparum malaria in the intensive care unit: report of 188 cases in adults.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**(5):684-689.
154. White NJ, Warrell DA, Chanthavanich P, Looareesuwan S, Warrell MJ, Krishna S, Williamson DH, Turner RC: **Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in falciparum malaria.** *N Engl J Med* 1983, **309**(2):61-66.
155. Planche T, Krishna S: **The relevance of malaria pathophysiology to strategies of clinical management.** *Curr Opin Infect Dis* 2005, **18**(5):369-375.
156. White NJ: **Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**(7):1413-1422.
157. Neil U: **From branch to bedside: Youyou Tu is awarded the 2011 Lasker-DeBaakey Clinical Medical Research Award for discovering artemisinin as a treatment for malaria.** *J Clin Invest* 2011, **121**(10):3768-3773.
158. Woodrow CJ, Haynes RK, Krishna S: **Artemisinins.** *Postgrad Med J* 2005, **81**(952):71-78.
159. White NJ: **The assessment of antimalarial drug efficacy.** *Trends Parasitol* 2002, **18**(10):458-464.
160. Udomsangpetch R, Pipitaporn B, Krishna S, Angus B, Pukrittayakamee S, Bates I, Suputtamongkol Y, Kyle DE, White NJ: **Antimalarial drugs reduce cytoadherence and rosetting Plasmodium falciparum.** *J Infect Dis* 1996, **173**(3):691-698.
161. Miller RS, Li Q, Cantilena LR, Leary KJ, Saviolakis GA, Melendez V, Smith B, Weina PJ: **Pharmacokinetic profiles of artesunate following multiple intravenous doses of 2, 4, and 8 mg/kg in healthy volunteers: Phase 1b study.** *Malar J* 2012, **11**(1):255.
162. Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB, Gustafsson LL, Masimirembwa CM: **Identification of human cytochrome P(450)s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from in vitro data.** *Eur J Clin Pharmacol* 2003, **59**(5-6):429-442.

163. Byakika-Kibwika P, Lamorde M, Mayito J, Nabukeera L, Mayanja-Kizza H, Katabira E, Hanpithakpong W, Obua C, Pakker N, Lindegardh N *et al*: **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous artesunate during severe malaria treatment in Ugandan adults.** *Malar J* 2012, **11**(1):132.
164. Morris CA, Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Jung D, Shin CS, Fleckenstein L: **Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration.** *Malar J* 2011, **10**:263.
165. Newton PN, Angus BJ, Chierakul W, Dondorp A, Ruangveerayuth R, Silamut K, Teerapong P, Suputtamongkol Y, Looareesuwan S, White NJ: **Randomized comparison of artesunate and quinine in the treatment of severe falciparum malaria.** *Clin Infect Dis* 2003, **37**(1):7-16.
166. Pittler MH, Ernst E: **Artemether for severe malaria: a meta-analysis of randomized clinical trials.** *Clin Infect Dis* 1999, **28**(3):597-601.
167. Hien TT, Davis TM, Chuong LV, Ilett KF, Sinh DX, Phu NH, Agus C, Chiswell GM, White NJ, Farrar J: **Comparative pharmacokinetics of intramuscular artesunate and artemether in patients with severe falciparum malaria.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(11):4234-4239.
168. Teja-Isavadharm P, Nosten F, Kyle DE, Luxemburger C, Ter Kuile F, Peggins JO, Brewer TG, White NJ: **Comparative bioavailability of oral, rectal, and intramuscular artemether in healthy subjects: use of simultaneous measurement by high performance liquid chromatography and bioassay.** *Br J Clin Pharmacol* 1996, **42**(5):599-604.
169. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, Bojang K, Olaosebikan R, Anunobi N, Maitland K *et al*: **Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial.** *Lancet* 2010, **376**(9753):1647-1657.
170. Jones KL, Donegan S, Laloo DG: **Artesunate versus quinine for treating severe malaria.** *Cochrane Database Syst Rev* 2007(4):CD005967.
171. Morch K, Strand O, Dunlop O, Berg A, Langeland N, Leiva RA, Longva JA, Sjursen H, Skrede S, Sundal J *et al*: **Severe malaria and artesunate treatment, Norway.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(11):1816-1818.
172. Hess KM, Goad JA, Arguin PM: **Intravenous artesunate for the treatment of severe malaria.** *Ann Pharmacother* 2010, **44**(7-8):1250-1258.
173. Ribeiro IR, Olliaro P: **Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and unpublished clinical trials.** *Med Trop (Mars)* 1998, **58**(3 Suppl):50-53.
174. Leonardi E, Gilvary G, White NJ, Nosten F: **Severe allergic reactions to oral artesunate: a report of two cases.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001, **95**(2):182-183.
175. Efferth T, Kaina B: **Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives.** *Crit Rev Toxicol* 2010, **40**(5):405-421.
176. Brewer TG, Grate SJ, Peggins JO, Weina PJ, Petras JM, Levine BS, Heiffer MH, Schuster BG: **Fatal neurotoxicity of arteether and artemether.** *Am J Trop Med Hyg* 1994, **51**(3):251-259.
177. Reinhart H, Hughson C, de Palacios PI: **Comment on: Audiometric changes associated with the treatment of uncomplicated falciparum malaria with co-artemether.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005, **99**(4):315-316; author reply 316-317.
178. Kissinger E, Hien TT, Hung NT, Nam ND, Tuyen NL, Dinh BV, Mann C, Phu NH, Loc PP, Simpson JA *et al*: **Clinical and neurophysiological study of the effects of multiple doses of artemisinin on brain-stem function in Vietnamese patients.** *Am J Trop Med Hyg* 2000, **63**(1-2):48-55.
179. Group A-QM-aS: **A meta-analysis using individual patient data of trials comparing artemether with quinine in the treatment of severe falciparum malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001, **95**(6):637-650.
180. Maude RJ, Plewes K, Faiz MA, Hanson J, Charunwatthana P, Lee SJ, Tarning J, Yunus EB, Hoque MG, Hasan MU *et al*: **Does artesunate prolong the electrocardiograph QT interval in patients with severe malaria?** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **80**(1):126-132.

181. Price R, van Vugt M, Phaipun L, Luxemburger C, Simpson J, McGready R, ter Kuile F, Kham A, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ *et al*: **Adverse effects in patients with acute falciparum malaria treated with artemisinin derivatives.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **60**(4):547-555.
182. Bethell D, Se Y, Lon C, Socheat D, Saunders D, Teja-Isavadharm P, Khemawoot P, Darapiseth S, Lin J, Sriwichai S *et al*: **Dose-dependent risk of neutropenia after 7-day courses of artesunate monotherapy in Cambodian patients with acute Plasmodium falciparum malaria.** *Clin Infect Dis* 2010, **51**(12):e105-114.
183. Clark RL, Lerman SA, Cox EM, Gristwood WE, White TE: **Developmental toxicity of artesunate in the rat: comparison to other artemisinins, comparison of embryotoxicity and kinetics by oral and intravenous routes, and relationship to maternal reticulocyte count.** *Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology* 2008, **83**(4):397-406.
184. McGready R, Cho T, Keo NK, Thwai KL, Villegas L, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F: **Artemisinin antimalarials in pregnancy: a prospective treatment study of 539 episodes of multidrug-resistant Plasmodium falciparum.** *Clin Infect Dis* 2001, **33**(12):2009-2016.
185. Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, Biligui S, Guillotte M, Guitton C, Dokmak S *et al*: **The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro.** *Blood* 2010.
186. Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ: **Malarial anemia: of mice and men.** *Blood* 2007, **110**(1):18-28.
187. Camacho LH, Gordeuk VR, Wilairatana P, Pootrakul P, Brittenham GM, Looareesuwan S: **The course of anaemia after the treatment of acute, falciparum malaria.** *Ann Trop Med Parasitol* 1998, **92**(5):525-537.
188. Phiri K, Esan M, van Hensbroek MB, Khairallah C, Faragher B, ter Kuile FO: **Intermittent preventive therapy for malaria with monthly artemether-lumefantrine for the post-discharge management of severe anaemia in children aged 4-59 months in southern Malawi: a multicentre, randomised, placebo-controlled trial.** *Lancet Infect Dis* 2012, **12**(3):191-200.
189. Price RN, Simpson JA, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, ter Kuile F, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ: **Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **65**(5):614-622.
190. Looareesuwan S, Davis TM, Pukrittayakamee S, Supanaranond W, Desakorn V, Silamut K, Krishna S, Boonamrung S, White NJ: **Erythrocyte survival in severe falciparum malaria.** *Acta Trop* 1991, **48**(4):263-270.
191. Boele van Hensbroek M, Calis JC, Phiri KS, Vet R, Munthali F, Kraaijenhagen R, van den Berg H, Faragher B, Bates I, Molyneux ME: **Pathophysiological mechanisms of severe anaemia in Malawian children.** *PLoS One* 2010, **5**(9):e12589.
192. Calis JC, Phiri KS, Faragher EB, Brabin BJ, Bates I, Cuevas LE, de Haan RJ, Phiri AI, Malange P, Khoka M *et al*: **Severe anemia in Malawian children.** *N Engl J Med* 2008, **358**(9):888-899.
193. Pongponratn E, Riganti M, Bunnag D, Harinasuta T: **Spleen in falciparum malaria: ultrastructural study.** *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 1987, **18**(4):491-501.
194. Mills JP, Diez-Silva M, Quinn DJ, Dao M, Lang MJ, Tan KS, Lim CT, Milon G, David PH, Mercereau-Puijalon O *et al*: **Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cells harboring Plasmodium falciparum.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(22):9213-9217.
195. Jakeman GN, Saul A, Hogarth WL, Collins WE: **Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes.** *Parasitology* 1999, **119** ( Pt 2):127-133.
196. Layez C, Nogueira P, Combes V, Costa FT, Juhan-Vague I, da Silva LH, Gysin J: **Plasmodium falciparum rhoptyr protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage.** *Blood* 2005, **106**(10):3632-3638.

197. Looareesuwan S, Merry AH, Phillips RE, Pleehachinda R, Wattanagoon Y, Ho M, Charoenlarp P, Warrell DA, Weatherall DJ: **Reduced erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients.** *Br J Haematol* 1987, **67**(4):473-478.
198. Cumming JN, Ploypradith P, Posner GH: **Antimalarial activity of artemisinin (qinghaosu) and related trioxanes: mechanism(s) of action.** *Advances in pharmacology* 1997, **37**:253-297.
199. Woodruff AW, Ansdell VE, Pettitt LE: **Cause of anaemia in malaria.** *Lancet* 1979, **1**(8125):1055-1057.
200. Snow RW, Craig MH, Deichmann U, le Sueur D: **A preliminary continental risk map for malaria mortality among African children.** *Parasitology today* 1999, **15**(3):99-104.
201. Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Bruce J, Carneiro I, Olomi R, Cox J, Nkya WM, Lemnge M, Greenwood BM *et al*: **Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe Plasmodium falciparum malaria.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2005, **293**(12):1461-1470.
202. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM: **Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis.** *International journal of biological sciences* 2011, **7**(9):1427-1442.
203. Karle H: **The pathogenesis of the anaemia of chronic disorders and the role of fever in erythrokinetics.** *Scandinavian journal of haematology* 1974, **13**(2):81-86.
204. Marinkovic M, Diez-Silva M, Pantic I, Fredberg JJ, Suresh S, Butler JP: **Febrile temperature leads to significant stiffening of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes.** *American journal of physiology Cell physiology* 2009, **296**(1):C59-64.
205. Jhaveri KN, Ghosh K, Mohanty D, Parmar BD, Surati RR, Camoens HM, Joshi SH, Iyer YS, Desai A, Badakere SS: **Autoantibodies, immunoglobulins, complement and circulating immune complexes in acute malaria.** *The National medical journal of India* 1997, **10**(1):5-7.
206. Adner MM, Altstatt LB, Conrad ME: **Coombs'-positive hemolytic disease in malaria.** *Annals of internal medicine* 1968, **68**(1):33-38.
207. Facer CA, Bray RS, Brown J: **Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with Plasmodium falciparum malaria. I. Incidence and class specificity.** *Clinical and experimental immunology* 1979, **35**(1):119-127.
208. Facer CA: **Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with Plasmodium falciparum malaria. II. Specificity of erythrocyte-bound IgG.** *Clinical and experimental immunology* 1980, **39**(2):279-288.
209. Ritter K, Kuhlencord A, Thomssen R, Bommer W: **Prolonged haemolytic anaemia in malaria and autoantibodies against triosephosphate isomerase.** *Lancet* 1993, **342**(8883):1333-1334.
210. Garratty G: **Immune hemolytic anemia associated with drug therapy.** *Blood reviews* 2010, **24**(4-5):143-150.
211. Garratty G, Arndt PA: **An update on drug-induced immune hemolytic anemia.** *Immunohematology / American Red Cross* 2007, **23**(3):105-119.
212. Bollotte A, Vial T, Bricca P, Bernard C, Broussolle C, Seve P: **[Drug-induced immune haemolytic anemia: A retrospective study of 10 cases.].** *La Revue de medecine interne / fondee par la Societe nationale francaise de medecine interne* 2014.
213. Tran TH, Day NP, Ly VC, Nguyen TH, Pham PL, Nguyen HP, Bethell DB, Dihn XS, Tran TH, White NJ: **Blackwater fever in southern Vietnam: a prospective descriptive study of 50 cases.** *Clin Infect Dis* 1996, **23**(6):1274-1281.
214. Bruneel F, Gachot B, Wolff M, Regnier B, Danis M, Vachon F: **Resurgence of blackwater fever in long-term European expatriates in Africa: report of 21 cases and review.** *Clin Infect Dis* 2001, **32**(8):1133-1140.
215. Bodi JM, Nsibu CN, Longenge RL, Aloni MN, Akilimali PZ, Tshibassu PM, Kayembe PK, Omar AH, Hirayama K, Verhaegen J: **Blackwater fever in Congolese children: a report of clinical, laboratory features and risk factors.** *Malar J* 2013, **12**:205.
216. Gobbi F, Audagnotto S, Trentini L, Nkurunziza I, Corachan M, Di Perri G: **Blackwater fever in children, Burundi.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**(7):1118-1120.

217. Aloni NM, Nsangu M, Kunuanunua T, Kadima TB, Muanda TF: **[Haemolytic crisis of blackwater fever following artemether-lumefantrine intake]**. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* 2010, **103**(5):296-298.
218. Bisoffi Z, Marocco S, Monteiro G, Marsiaj M: **Acute intravascular haemolysis (blackwater fever) after antimalarial treatment**. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 1999, **4**(1):72-73.
219. Lon C, Spring M, Sok S, Chann S, Bun R, Ittiverakul M, Buathong N, Thay K, Kong N, You Y *et al*: **Blackwater fever in an uncomplicated Plasmodium falciparum patient treated with dihydroartemisinin-piperazine**. *Malar J* 2014, **13**:96.
220. Marcsisin SR, Jin X, Bettger T, McCulley N, Sousa JC, Shanks GD, Tekwani BL, Sahu R, Reichard GA, Sciotti RJ *et al*: **CYP450 phenotyping and metabolite identification of quinine by accurate mass UPLC-MS analysis: a possible metabolic link to blackwater fever**. *Malar J* 2013, **12**:214.
221. Howes RE, Dewi M, Piel FB, Monteiro WM, Battle KE, Messina JP, Sakuntabhai A, Satyagraha AW, Williams TN, Baird JK *et al*: **Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions**. *Malar J* 2013, **12**:418.
222. Phillips RE, Looareesuwan S, Warrell DA, Lee SH, Karbwang J, Warrell MJ, White NJ, Swasdichai C, Weatherall DJ: **The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration**. *The Quarterly journal of medicine* 1986, **58**(227):305-323.
223. Perkins DJ, Weinberg JB, Kreamsner PG: **Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity**. *J Infect Dis* 2000, **182**(3):988-992.
224. Wickramasinghe SN, Abdalla SH: **Blood and bone marrow changes in malaria**. *Bailliere's best practice & research Clinical haematology* 2000, **13**(2):277-299.
225. Biemba G, Gordeuk VR, Thuma PE, Mabeza GF, Weiss G: **Prolonged macrophage activation and persistent anaemia in children with complicated malaria**. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 1998, **3**(1):60-65.
226. Burchard GD, Radloff P, Philipps J, Nkeyi M, Knobloch J, Kreamsner PG: **Increased erythropoietin production in children with severe malarial anemia**. *Am J Trop Med Hyg* 1995, **53**(5):547-551.
227. Kurtzhals JA, Rodrigues O, Addae M, Commey JO, Nkrumah FK, Hviid L: **Reversible suppression of bone marrow response to erythropoietin in Plasmodium falciparum malaria**. *Br J Haematol* 1997, **97**(1):169-174.
228. Burgmann H, Looareesuwan S, Kapiotis S, Viravan C, Vanijanonta S, Hollenstein U, Wiesinger E, Presterl E, Winkler S, Graninger W: **Serum levels of erythropoietin in acute Plasmodium falciparum malaria**. *Am J Trop Med Hyg* 1996, **54**(3):280-283.
229. el Hassan AM, Saeed AM, Fandrey J, Jelkmann W: **Decreased erythropoietin response in Plasmodium falciparum malaria-associated anaemia**. *European journal of haematology* 1997, **59**(5):299-304.
230. Rolling T, Schmiedel S, Wichmann D, Wittkopf D, Burchard GD, Cramer JP: **Post-treatment haemolysis in severe imported malaria after intravenous artesunate: case report of three patients with hyperparasitaemia**. *Malar J* 2012, **11**(1):169.
231. Keller CC, Ouma C, Ouma Y, Awandare GA, Davenport GC, Were T, Hittner JB, Vulule JM, Ong'echa JM, Perkins DJ: **Suppression of a novel hematopoietic mediator in children with severe malarial anemia**. *Infection and immunity* 2009, **77**(9):3864-3871.
232. Sinclair D, Donegan S, Isba R, Lalloo DG: **Artesunate versus quinine for treating severe malaria**. *Cochrane Database Syst Rev* 2012, **6**:CD005967.
233. Zoller T, Junghanss T, Kapaun A, Gjørup I, Richter J, Hugo-Persson M, Morch K, Foroutan B, Suttorp N, Yurek S *et al*: **Intravenous artesunate for severe malaria in travelers, Europe**. *Emerg Infect Dis* 2011, **17**(5):771-777.

234. Itoda I, Yasunami T, Kikuchi K, Yamaura H, Totsuka K, Yoshinaga K, Teramura M, Mizoguchi H, Hatabu T, Kano S: **[Severe falciparum malaria with prolonged hemolytic anemia after successful treatment with intravenous artesunate]**. *Kansenshogaku Zasshi* 2002, **76**(8):600-603.
235. Kreeftmeijer-Vegter AR, van Genderen PJ, Visser LG, Bierman WF, Clerinx J, van Veldhuizen CK, de Vries PJ: **Treatment outcome of intravenous artesunate in patients with severe malaria in the Netherlands and Belgium**. *Malar J* 2012, **11**(1):102.
236. Rolling T, Wichmann D, Schmiedel S, Burchard GD, Kluge S, Cramer JP: **Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis**. *Malar J* 2013, **12**:241.
237. Briggs M, Arguin PM: **Published reports of delayed hemolytic anemia after treatment with artesunate for severe malaria-Worldwide, 2010-2012**. *MMWR* 2013, **62**(1):5-8.
238. Caramello P, Balbiano R, De Blasi T, Chiriotto M, Deagostini M, Calleri G: **Severe malaria, artesunate and haemolysis**. *J Antimicrob Chemother* 2012, **67**(8):2053-2054.
239. Kano S: **Artemisinin-based combination therapies and their introduction in Japan**. *J Infect Chemother* 2010, **16**(6):375-382.
240. Corpolongo A, De Nardo P, Ghirga P, Gentilotti E, Bellagamba R, Tommasi C, Paglia MG, Nicastrì E, Narciso P: **Haemolytic anaemia in an HIV-infected patient with severe falciparum malaria after treatment with oral artemether-lumefantrine**. *Malar J* 2012, **11**:91.
241. Rolling T, Agbenyega T, Issifou S, Adegnika AA, Sylverken J, Spahlinger D, Ansong D, Lohr SJ, Burchard GD, May J *et al*: **Delayed Hemolysis After Treatment With Parenteral Artesunate in African Children With Severe Malaria--A Double-center Prospective Study**. *J Infect Dis* 2014.
242. Burri C, Ferrari G, Ntuku HM, Kitoto AT, Duparc S, Hugo P, Mitembo DK, Lengeler C: **Delayed Anemia after Treatment with Injectable Artesunate in the Democratic Republic of the Congo: A Manageable Issue**. *Am J Trop Med Hyg* 2014.
243. Bartoloni A, Tomasoni L, Bartalesi F, Galli L, Sani S, Veloci S, Zammarchi L, Pini A, Castelli F: **Combined intravenous treatment with artesunate and quinine for severe malaria in Italy**. *Am J Trop Med Hyg* 2010, **83**(2):274-276.
244. Mali S, Kachur SP, Arguin PM, Division of Parasitic D, Malaria CfGH, Centers for Disease C, Prevention: **Malaria surveillance--United States, 2010**. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries* 2012, **61**(2):1-17.
245. Callender DM, Hsue G: **Artesunate: investigational drug for the treatment of severe falciparum malaria in Hawai'i**. *Hawaii medical journal* 2011, **70**(4):77-79.
246. Dournon N, Buffet P, Caumes E, Clair B, Jaureguiberry S: **Artesunate for severe acute Plasmodium falciparum infection in a patient with myasthenia gravis**. *Am J Trop Med Hyg* 2012, **87**(3):435-436.
247. Eder M, Farne H, Cargill T, Abbara A, Davidson RN: **Intravenous artesunate versus intravenous quinine in the treatment of severe falciparum malaria: a retrospective evaluation from a UK centre**. *Pathogens and global health* 2012, **106**(3):181-187.
248. Jarvis JN, Coltart CE, Pule M, Chiodini PL, Doherty T: **Artemisinin therapy and severe delayed haemolysis**. *Lancet* 2013, **382**(9887):180.
249. Rolling T, Agbenyega T, Issifou S, Adegnika AA, Sylverken J, Spahlinger D, Ansong D, Lohr SJ, Burchard GD, May J *et al*: **Delayed Hemolysis After Treatment With Parenteral Artesunate in African Children With Severe Malaria-A Double-center Prospective Study**. *J Infect Dis* 2014, **209**(12):1921-1928.
250. WHO, GMP: **Information Note on Delayed Haemolytic Anaemia following Treatment with Artesunate October 2013**. . In.; 2013.
251. **Place de l'artésunate injectable dans le traitement du paludisme grave de l'adulte et de l'enfant en France**  
[[http://www.hcsp.fr/explore.cgi/telecharger/hcspr20130201\\_palugraveartesunate.pdf](http://www.hcsp.fr/explore.cgi/telecharger/hcspr20130201_palugraveartesunate.pdf)]

252. **Avis relatif à la place de l'artésunate injectable dans le traitement du paludisme grave chez l'adulte et l'enfant**  
[\[http://www.hcsp.fr/explore.cgi/telecharger/hcspa20130201\\_palugraveartésunate.pdf\]](http://www.hcsp.fr/explore.cgi/telecharger/hcspa20130201_palugraveartésunate.pdf)
253. **Protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations Malacef® (artésunate) 60mg, poudre et solvant pour solution injectable laboratoire ACE Pharmaceuticals BV // ARTECEF BV**  
[\[http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/01d138a64031bcf9f37fa2737308caa5.pdf\]](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/01d138a64031bcf9f37fa2737308caa5.pdf)
254. Jaureguiberry S, Ndour PA, Roussel C, Ader F, Safeukui I, Nguyen M, Biligui S, Ciceron L, Mouri O, Kendjo E *et al*: **Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins.** *Blood* 2014, **124**(2):167-175.
255. Hazell L, Shakir SA: **Under-reporting of adverse drug reactions : a systematic review.** *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience* 2006, **29**(5):385-396.
256. Montastruc JL, Sommet A, Lacroix I, Olivier P, Durrieu G, Damase-Michel C, Lapeyre-Mestre M, Bagheri H: **Pharmacovigilance for evaluating adverse drug reactions: value, organization, and methods.** *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 2006, **73**(6):629-632.
257. Rehan HS, Chopra D, Kakkar AK: **Physician's guide to pharmacovigilance: terminology and causality assessment.** *European journal of internal medicine* 2009, **20**(1):3-8.
258. Ndour PA, Lopera-Mesa TM, Diakite SA, Chiang S, Mouri O, Roussel C, Jaureguiberry S, Biligui S, Kendjo E, Claessens A *et al*: **Plasmodium falciparum Clearance Is Rapid and Pitting Independent in Immune Malian Children Treated With Artesunate for Malaria.** *J Infect Dis* 2014.
259. Gifford SC, Derganc J, Shevkoplyas SS, Yoshida T, Bitensky MW: **A detailed study of time-dependent changes in human red blood cells: from reticulocyte maturation to erythrocyte senescence.** *Br J Haematol* 2006, **135**(3):395-404.
260. Clough B, Atilola FA, Pasvoi G: **The role of rosetting in the multiplication of Plasmodium falciparum: rosette formation neither enhances nor targets parasite invasion into uninfected red cells.** *Br J Haematol* 1998, **100**(1):99-104.
261. Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ: **The increased susceptibility of young red cells to invasion by the malarial parasite Plasmodium falciparum.** *Br J Haematol* 1980, **45**(2):285-295.
262. Simpson JA, Silamut K, Chotivanich K, Pukrittayakamee S, White NJ: **Red cell selectivity in malaria: a study of multiple-infected erythrocytes.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999, **93**(2):165-168.
263. Hunt NH, Stocker R: **Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes.** *Blood cells* 1990, **16**(2-3):499-526; discussion 527-430.