Criblage par microsphiltration : à la recherche de composés altérant la déformabilité des gamétocytes de plasmodium falciparum pour bloquer la transmission du paludisme.

Julien Duez

▶ **To cite this version:**

Julien Duez. Criblage par microsphiltration : à la recherche de composés altérant la déformabilité des gamétocytes de plasmodium falciparum pour bloquer la transmission du paludisme.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066227 . tel-01234641

HAL Id: tel-01234641
https://theses.hal.science/tel-01234641

Submitted on 27 Nov 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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 515, Complexité du Vivant

Laboratoires HRA Pharma, Paris

INSERM - CIMI-Paris, Unité 1135, équipe 4 « Erythrocytes, parasites et pathogénèse »

Criblage par microsphiltration :

A la recherche de composés altérant la déformabilité des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* pour bloquer la transmission du paludisme.

Par Duez Julien

Thèse CIFRE de doctorat de Biologie-Chimie médicinale

Dirigée par Pierre Buffet

Présentée et soutenue publiquement le 30 / 09/ 2015

Devant un jury composé de :

-Françoise Benoit-Vical, Directeur de Recherche Inserm, Toulouse :	Rapporteur
-Benoit Déprez, Professeur de l'Université de Lille:	Rapporteur
-Dominique Mazier, Professeur de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris :	Examinateur
-Benoit Gamain, Directeur de recherche CNRS, Paris :	Examinateur
-Joêl Lelièvre, Sientifique en chef chez GlaxoSmithKline, Madrid :	Examinateur
-Pierre Buffet, Maître de conférences de l'Université Pierre et Marie Curie :	Examinateur

REMERCIEMENTS

Laboratoires HRA Pharma :

J'adresse mes très sincères remerciements à André Ulmann et l'ensemble du comité de direction, à Michèle Resche-Rigon et au personnel de soutien administratif, logistique et de valorisation sans qui ce projet de thèse n'aurait pas existé.

CIMI-Paris U1135 et APHP:

Mes seconds remerciements reviennent à Pierre Buffet, pour la confiance que vous m'avez accordé, la transmission de vos précieuses connaissances tant scientifiques que diplomatiques, pour votre support rigoureux, constant, théorique et pratique, pour ces différentes missions internationales, pour mon invitation à ces réunions d'experts CNR du lundi et pour l'opportunité que vous m'offrez d'intégrer un laboratoire de recherche pharmaceutique industriel de renommée mondiale. Je n'oublierai pas et tâcherai d'être à la hauteur de vos enseignements. Je remercie très chaleureusement les Professeurs Christophe Combadière et Dominique Mazier pour leur accueil au sein du CIMI-Paris et parmi les équipes de recherches APHP. Je remercie Papa Alioune Ndour pour l'important support apporté à mon projet de thèse et sa grande accessibilité, sa patience et les bons moments passés ensembles. Je remercie plus généralement l'ensemble des membres de l'équipe 4 et des services de Parasitologie-Mycologie pour cette ambiance si chaleureuse et bienveillante qui m'a beaucoup apaisé au cours de ces années et pour le support scientifique important dont j'ai bénéficié. Je remercie l'ensemble du CIMI-Paris et notamment le personnel de gestion pour leur soutient administratif et logistique essentiel à l'aboutissement de ma thèse.

Institut Eskitis, Université Griffith, Australie :

My sincere acknowledgements to Professor Ronald J. Queen for welcoming me into to Eskitis Institute and Professor Vicky Avery for this friendly welcome within the malaria group. I will not forget your important scientific and administrative support. I learned a lot in your team and am very gratefull for the trust you placed in me. Many thanks to the malaria group, especially to John Holleran, Sasdekumar Loganathan, Sandra Duffy, Leonardo Lucantoni and Sabine Fletscher for this extraordinary experience, for your help, your professionalism, your precious advices in lab automation and screening and more generally for these awesome moments that made me feel my stay so short.

Institut Pasteur de Paris :

J'adresse mes sincères remerciements à Geneviève Milon, Odile Mercereau-Pujalon et Catherine Lavazec ainsi que l'ensemble des membres du Cosi Fan pour ces réunions d'experts si enrichissantes. Mes remerciements spécifiques à Catherine pour le support scientifique crucial apporté à mon projet de thèse. Je remercie Audrey Lorthois pour son amitié et nos discussions sur la pratique de la gamétocytogénèse *in vitro*. Mes remerciements sincères aux co-auteurs pasteuriens de ma première publication scientifique.

Plateforme p3s :

Je remercie très sincèrement les membres de la plateforme p3s pour l'accès m'ayant été accordé, pour la formation et le support technique m'ayant été dispensé, ainsi que pour leur simplicité et les moments conviviaux passés ensembles.

INTS, Imagine & Gr-Ex :

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Pascal Amireault ainsi qu'à l'ensemble de son équipe pour le support scientifique accordé à mon projet de thèse, pour leur accessibilité, pour m'avoir permis de participer à un projet de recherche annexe stimulant et enrichissant. Des remerciements spécifiques aux bureaux de directions et logistiques de l'INTS, notamment pour leur incroyable efficacité, leur professionnalisme, leur accessibilité et la confiance accordée.

ENS Cachan :

Je remercie Bruno Lepioufle et Olivier Français pour le support scientifique dont j'ai pu bénéficier au travers du développement de micropuces fluidiques.

GSK Tres Cantos :

Je remercie les membres du TCOLF ainsi que le personnel de direction et de soutient chez GlaxoSmithKline, comprenant notamment Noémie Bahamontes, pour les responsabilités qui me sont confiées et le support financier, scientifique, logistique et administratif conséquent qui me sont attribués.

New York Blood Center :

Specific acknowledgement to Narla Mohandas and his friendly team for their scientific support.

ANRT et CIFRE :

Mes remerciements au personnel de support ANRT et CIFRE pour cette thèse et pour les formations très intéressantes dispensées.

Bill and Melinda Gates Foundation :

My last acknowledgments for the Bill and Melinda Gates Foundation, comprising Omar Vandal, as their trust and important fundings have been essential for my thesis.

Je tiens à ajouter ces lignes par gratitude afin de souligner l'encadrement d'excellence dont j'ai bénéficié au cours de ces 3 années. Je conserverai en mémoire cette aventure extraordinaire, très complète et extrêmement responsabilisante qu'à été cette thèse CIFRE. Cette expérience m'a changé. Je suis extrêmement reconnaissant envers toutes celles et ceux ayant participé de près ou de loin à mon évolution dans cette expérience internationale dont la riche interface fut essentielle au développement du prototype de microsphiltration au format microplaque.

SOMMAIRE

Abréviations 11

Introduction 15

I. Paludisme : Une endémie en régression dont l'éradication demandera des moyens innovants 15

1. Le paludisme est l'infection parasitaire causant les dommages les plus lourds en santé humaine. 15

2. *Plasmodium falciparum* est responsable des cas de mortalité associés aux accès palustres. 16

3. L'incidence du paludisme humain a connu une régression globale au cours de ces 150 dernières années. 16

4. Bien que n'ayant pas abouti, le plan d'éradication globale du paludisme lancé dans les années 50 a contribué à cette régression. 17

5. Lancé dans les années 90, un plan d'action mondial contre le paludisme a tenu compte des erreurs passées. 18

6. Des outils innovants sont nécessaires pour maintenir l'objectif d'élimination. 19

7. Le plan de bataille préventif actuel doit être renforcé. 19

8. De nouveaux outils chimiothérapeutiques sont nécessaires. 20

9. *Plasmodium vivax* doit être considéré sérieusement. 20

10. Résumé 21

11. Références : 22

II. *Plasmodium falciparum*, un protiste parasite de l'hépatocyte et de l'érythrocyte humain 24

1. Le développement biologique de *Plasmodium falciparum* obéit à un cycle hétéroxène à 2 hôtes et impliquant 2 phases : la schizogonie et la sporogonie. 24

2. Une phase transitoire d'amplification a lieu dans le foie. 25

3. Chez l'Homme, la deuxième cellule hôte est l'érythrocyte. 26

4. Le cycle de développement schizogonique intra-érythrocytaire asexué de *Plasmodium falciparum* s'opère sur 2 jours. 28

5. L'exportome de *Plasmodium falciparum* contribue à la restructuration de l'érythrocyte hôte. 31

6. Dans l'érythrocyte, le développement de nouveaux compartiments membranaires contribue à l'adressage des protéines parasitaires. 31

7. Le système d'adressage des protéines parasitaires n'est pas entièrement décrypté. 32

8. La digestion de l'hémoglobine est essentielle au développement du parasite intra-érythrocytaire. 34

9. L'érythrocyte se rigidifie progressivement dû au développement du parasite asexué. 34

10. Vers la sporogonie : Une fraction de parasites intra-érythrocytaires s'engage dans la gamétocytogénèse afin d'assurer la transmission à l'Anophèle vecteur. 36

11. Résumé 39

12. Références 39

III. Complexité physiopathologique et thérapeutique du paludisme à *P. falciparum* 44

1. L'accès palustre simple non traité peut évoluer vers un accès grave. 44

2. Les stades parasitaires asexués sont responsables des symptômes de la maladie. 45

3. Les protéines PfEMP-1 opèrent la séquestration des érythrocytes parasités et sont le support d'un phénomène de variation antigénique. 47

4. Une sur-activation de la réponse immunitaire contribue probablement à la gravité de l'accès palustre. 48

5. Certains polymorphismes érythrocytaires confèrent une protection contre l'accès grave. 49

6. Les adultes en zone endémique ne font plus d'accès graves. 50

7. Le volume et la structure du réservoir asymptomatique sont mal connus. 51

8. Des expériences de gorgement d'anophèles femelle permettent d'appréhender la contribution des sujets asymptomatiques à la transmission du paludisme. 53

9. Contribution des infections asymptomatiques à la dynamique complexe de transmission du paludisme. 54

10. Différents types d'interventions thérapeutiques ciblent le réservoir d'êtres humains asymptomatiques. 56

11. Le vaccin RTS,S, bien que non optimal, représente une percée dans le champ de la vaccinologie antipaludique. 58

12. Résumé 59

13. Références 60

IV. Le gamétocyte, un stade parasitaire minoritaire dont les interactions complexes avec l'hôte humain aboutissent à une transmission efficace à l'anophèle. 69

1. La gamétocytogénèse se caractérise par une différenciation morphologique parasitaire. 69

2. Un réseau de structures membranaires spécifique se développe au cours de la gamétocytogénèse. 71

3. Les gamétocytes déploient un transcriptome et un exportome spécialisés, en lien avec leur fonction spécifique. 72

4. Les érythrocytes abritant des gamétocytes immatures s'accumulent dans la moelle osseuse. 73

5. La déformabilité des gamétocytes pourrait contribuer à leur séquestration médullaire. 75

6. La déformabilité des érythrocytes abritant des gamétocytes peut être modulée par une approche pharmacologique anti-transmission. 76

7. L'engagement d'un parasite asexué dans la gamétocytogénèse est modulé par sa composante génétique. 77

8. La perception d'un stress oxydatif par le parasite joue un rôle central dans son engagement dans la gamétocytogénèse. 79

9. Une communication inter-parasitaire supporte l'initiation de la gamétocytogénèse. ... 81

10. Le sex ratio gamétocytaire est déséquilibré. 82

11. Une adaptation des proportions de gamétocytes mâles générés par gamétocytogénèse supporte la transmission efficace du paludisme. 82

12. Les gamétocytes mâles et femelles répondent différemment aux antipaludiques *in vitro*. 83

13. Résumé 85

14. Références 86

V. Chimiothérapie antipaludique conventionnelle (« anti-asexués ») et anti-transmission, deux mondes distincts qui doivent se compléter. 97

1. La chloroquine a été intensément utilisée au cours des années 1950 à 1970. 97

2. Les arylaminoalcools sont des quinoléines synthétisées pour contrer la chloroquino-résistance. 100

3. Les anti-métabolites sont administrés sous forme de combinaisons et ciblent également les parasites asexués. 101

4. Les dérivés de l'artémisinine sont administrés en combinaison avec des médicaments partenaires à demi-vie longue. 102

5. L'expansion des résistances médicamenteuses dépend de facteurs épidémiologiques. 104

6. Des marqueurs génétiques sont associés aux pharmaco-résistances. 105

7. Les 8-aminoquinoléines sont des gamétocytocides puissants induisant une hémolyse chez les patients déficients en glucose-6-phosphate déshydrogénase. 107

8. La posologie de la primaquine a été modifiée au regard de la déficience G6PDH. ... 109

9. L'OMS encourage les études de l'impact d'un traitement ACT-primaquine monodose 0.25mg/Kg sur la transmission du paludisme. 111

10. Le risque d'hémolyse associé au traitement ACT-PQ 0.25mg/Kg est incertain. 113

11. Le portefeuille antipaludique comporte une minorité d'agents gamétocytocides. ... 114

12. La découverte de composés anti-transmission par criblage pharmacologique phénotypique représente un défi expérimental en milieu académique et industriel. 117

13. Différentes méthodes ont été proposées pour la découverte de composés anti-transmission par criblage phénotypique. 119
14. Résumé 126
15. Références 128
VI. Rôle de la rate dans les accès palustres. 140
Objectifs de l'étude 141
I. Contexte focalisé 141
II. Objectif général de l'étude 141
III. Mes objectifs principaux 142
IV. Mes objectifs spécifiques : 142
V. Echéancier 143
Matériel et Méthodes 144
I. Culture des parasites asexués de *Plasmodium falciparum* 144
II. Production *in vitro* des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* 145
III. Préparation des microplaques à microsphiltration 148
IV. Préparation des colonnes à microsphiltration 151
V. Microsphiltration 151
VI. Criblage de la *Gambox* par microsphiltration. 152
VII. Formules mathématiques employées 152
VIII. Références 153
Résultats 155
I. Développement d'une plateforme de criblage. 155
1. Développement de microplaques 96-puits à microsphiltration 155
1.1 Dessin conceptuel de la microsphiltration en microplaque. 155
1.2 Microplaques de première génération. 155
1.3 Microplaques de seconde génération. 160
2. Identification de paramètres modulant les taux de rétention. 163
3. Quantification automatisée des taux de rétention par microscopie confocale à haut débit et haute résolution et identification d'un contrôle positif. 166
4. Définition d'une fenêtre de criblage. 168
5. Optimisation et validation d'une séquence technique de criblage par microsphiltration. 169
7. Criblage à bas débit par microsphiltration au format 96 puits. 176

II. Gamétocytogénèse *in vitro* : appropriation et optimisation de méthodes de rendements compatibles avec une campagne de criblage. 179

1. Induction de la gamétocytogénèse sur la plateforme australienne. 179

2. Expatriation et adaptation d'une méthode de production de gamétocytes en France. 182

III. Développement et validation d'une plateforme de microsphiltration multi-formats. .. 184

1. Quantification automatisée des taux de rétention par cytométrie en flux. 185

2. Criblage de la *Gambox* : adaptation aux souhaits d'un financeur majeur et participation à un réseau de laboratoires académiques. 187

3. Développement d'une méthode de stockage des microplaques à microsphiltration pour transport et utilisation différée. 189

4. Préparation automatisée et stockage de cônes à microsphiltration 191

V. Ouverture des applications de la microsphiltration sur le champ thérapeutique de la transfusion. 194

VI. Références 197

Conclusion-Discussion-Perspectives 200

I. Résumé 200

II. Difficultés et verrous technologiques rencontrés au cours de la thèse 200

1. Le pouvoir filtrant d'une microsphiltration est conditionné par le pipetage des microsphères. 200

2. Des microplaques à puits profonds ont permis de réduire la durée des microsphiltrations. 201

3. Les parasites asexués ont été initialement employés comme outil de calibrage des performances de la microsphiltration. 202

4. Une ré-optimisation de la méthode de production des gamétocytes est nécessaire afin de maximiser son rendement. 203

5. Le comportement des parasites diffère selon le site de culture, limitant l'utilisation internationale d'un unique protocole de production de gamétocytes. 204

6. Une combinaison complexe de paramètres expérimentaux conditionne la rétention des érythrocytes parasités dans les filtres à microsphères. 204

III. Perspectives expérimentales 208

1. Portes ouvertes par la microsphiltration au format microplaque. 208

2. Rétention mécanique des gamétocytes exposés à la méfloquine et prédictivité de la méthode 209

3. Optimisation de la méthode de quantification 210

4. Un format microplaque 384 puits a été développé et validé par un criblage à bas débit. 211

5. Exportation du procédé de criblage par microsphiltration pour l'exécution d'une campagne de criblage haut débit en milieu industriel. 211

IV. Questions en suspens 212

1. Quelle profil d'activité devrait caractériser un *Lead* identifié par microsphiltration ayant un impact significatif sur la transmission du paludisme ? 212

2. Le Viagra est-il le prochain médicament anti-transmission ? 214

3. Sera-t-il bénéfique d'employer la primaquine en masse pour bloquer la transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum* ? Avons-nous vraiment besoin de nouveaux médicaments anti-transmission ? 215

V. Références : 217

FIGURES

Figure I-1 : Représentation schématique du mécanisme d'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte. 28

Figure I-2 : Présentation du cycle de développement schizogonique intra-érythrocytaire asexué de *Plasmodium falciparum*. 30

Figure I-3 : Model mécanistique d'adressage de l'exportome à motif PEXEL de *Plasmodium falciparum* dans l'érythrocyte hôte. 33

Figure I-4 : Modélisation schématique des cytosquelettes membranaires d'un érythrocyte non parasité et parasité. 36

Figure I-5 : développement parasitaire et cinétique de transmission au cours d'une infection à *Plasmodium falciparum* traitée efficacement par un schizonticide dépourvu d'activité gamétocytocide. 37

Figure I-6 : Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*. 38

Figure I-7 : Séquence physiopathologique amenant à la symptomatologie de l'accès palustre. 47

Figure I-8 : Schématisation des principales méthodes d'études par gorgement de moustiques. 54

Figure I-9 : Modélisation de la contribution globale des individus impaludés, par classes d'âges et en considérant la surface corporelle et la fréquence d'exposition relative au cours de l'infection, au réservoir de transmission en zone endémique. 56

Figure I-10 : Différenciation morphologique des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* en rapport avec leur remodelage cytosquelettique d'actine et de tubuline mis en valeur par immunofluorescence. 71

Figure I-11 : Model hypothétique d'entrée et de sortie des gamétocytes dans le compartiment extracellulaire de la moelle osseuse. 75

Figure I-13: Antipaludiques de référence. 98

Figure I-14: Développement et exploitation chronologique des antipaludiques de référence, en relation avec l'apparition des pharmaco-résistances respectives. 105

Figure I-15: Distribution mondiale du polymorphisme de déficience de la glucose-6-phosphate déshydrogénase. 109

Figure I-16: Cinétique du taux sanguin d'hémoglobine associé à une hémolyse oxydative intravasculaire induite par un traitement quotidien à la primaquine, chez des adultes à déficience variable en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase 110

Figure I-17: Relation dose-réponse entre une prise unique de primaquine ≤ 0.75mg/Kg et le développement de sporozoïtes dans le vecteur Anophèle s'étant gorgé du sang des patients 48 heures après leur traitement. 112

Figure I-18: « Global Malaria Portfolio », portefeuille antipaludique mondial actuel. 115

Figure I-19: Approches pharmacologiques actuelles pour la découverte de composés anti-transmission. 121

Figure M-1: Principales étapes du protocole d'induction gamétocytaire développé par Avery et *al.*. 147

Figure M-2: Transfert automatisé des microsphères depuis le réservoir du robot jusqu'aux puits des microplaques. 150

FigR1 : Développement d'un prototype d'essai à format microplaque en utilisant l'outil robotique. 159

FigR2 : Seconde génération de microplaques filtrantes compatibles avec l'exécution d'une campagne de criblage. 162

FigR3 : Identification de paramètres majeurs conditionnant la rétention des érythrocytes anormalement rigides en microsphiltration. 165

FigR4 : Couplage de la microsphiltration à la microscopie confocale à haut débit et haute résolution. 167

FigR5 : Rétention des gamétocytes matures microsphiltrés suite à une exposition de 2 ou 24 heures avec la calyculine A, 50nM, 0.4% DMSO final. 169

FigR6 : Définition d'une fenêtre de criblage et développement d'une séquence technique automatisée pour la réalisation d'une campagne de criblage par microsphiltration. 171

FigR7-A : Rétention de gamétocytes matures suite à leur exposition à 9 antipaludiques de référence + 1 composé contrôle (zaprinast) en concentrations croissantes durant 2 et 24 heures au cours d'une campagne de pré-criblage. 174

FigR7-B : Rétention de gamétocytes matures suite à leur exposition à 9 antipaludiques de référence + 1 composé contrôle (zaprinast) en concentrations croissantes durant 2 et 24 heures au cours d'une campagne de pré-criblage. 175

FigR7-C : Rétentions contrôles associées au pré-criblage (2 et 24H) et paramètres statistiques associés. 176

FigR8 : Activité rigidifiante de 40 composés pharmacologiques évaluée par microsphiltration au format microplaque 96-puits. 179

FigR9 : Suivi d'une induction gamétocytaire exécutée selon le protocole de mon équipe d'accueil australienne 181

FigR10 : Suivi d'une induction gamétocytaire réalisée au sein de mon équipe d'accueil française. 183

FigR11 : Double marquage fluorescent des gamétocytes matures pour quantification automatisée en cytométrie de flux compatible 96-puits. 186

FigR12 : Activités rigidifiante et gamétocytocide de 40 composés (*gametocyte box*) évaluée en aveugle dans mon laboratoire d'accueil parisien. 189

FigR13 : Validation de 2 méthodes pour le stockage des microplaques à microsphiltration. 191

FigR14 : Préparation automatisée de cônes à microsphiltration 193

FigR15 : Suivi longitudinal sur 7 semaines de la rétention de culots érythrocytaires déleucocytés issus de 6 poches de sang conservés en condition EFS. 196

Figure D-1 : photographie des prototypes de microsphiltration de première (gauche, Millipore) et seconde génération 202

Figure D-2: Impact de la séquence d'aspiration sur les taux de rétention gamétocytaires. ... 206

Figure D-3 : Représentation schématique conceptuelle d'une population d'érythrocytes traversant un filtre de microsphères. 207

Figure D-4 : Relation entre densité gamétocytaire et infection des vecteurs Anophèles en relation avec l'efficacité des interventions anti-transmissions. 213

TABLEAUX

Tableau I-1 : Comparaison des stratégies thérapeutiques ciblant le réservoir de transmission asymptomatique (AS) et symptomatique (S)..... 59

Tableau I-2 : Marqueurs de genres mâle et femelle gamétocytaires et leurs fonctions biologiques..... 84

Tableau I-3: Méthodes de criblages pharmacologiques mono- ou poly-paramétriques rapportées depuis 2010, pour la découverte de composés gamétocytocides..... 126

Echéancier..... 143

Tableau R1 : Rendement des 2 méthodes d'induction de la gamétocytogénèse appliquées durant ma thèse au sein de mes équipes d'accueil australienne (Dufy & Avey et *al.*) et française (Duez et *al.*)..... 184

Abréviations

8AQ : 8-aminoquinoléines

ACT : combinaison chimiothérapeutique à base d'artémisinine

AD : Amodiaquine

AMA1 : *Apical Membrane Antigen 1*

AQ : Atovaquone

ART : Artémether

AS : Artésunate

Cmax : Concentration maximale plasmatique

CMI : complexe membranaire interne (inner membrane complex, IMC)

CLAG : *Cytoadherence-Linked Antigen*

CR1 : récepteur au complément 1

CSP : protéine circumsporozoite

DAMP : *Danger-Associated Molecular Patterns*

DHA : Dihydroxy-artémisinine

DHFR : dihydrofolate réductase

DHOdase : dihydroorotate déshydrogénase

DHP : dihydroxy-pipéraquine

DHPS : dihydropétoate synthétase

DSFA : *Direct Skin Feeding Assay*

EBA-175 : *Erythrocyte Binding antigen 175*

EXP2 : *Exported Protein 2*

G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

GAP45-50 : *Glideosome-Associated Proteins 45 and 50*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GMEP : *global malaria eradication plan*

GPI : glycosylphosphatidyl-inositol

HCS : *High Content Screening*

HGF : *Hepatocyte Growth Factor*

HRBC : *Heated RBC* (érythrocyte rigidifié par traitement thermique)

HRP2 : *Histidin Rich Protein 2*

HSPG : protéoglycane de type héparane sulfate

HTS : *Hight Throughput Screening*

ICAM-1 : *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IFN-ɣ : interféronɣ

IgG1-3 : immunoglobulines (Ig) polyclonales de type G1 et G3

IL-1 ß : Interleukine-1 ß

iRBC : *infected RBC* (érythrocyte parasité)

KAHRP : *Knob-Associated His-Rich Protein*

Luc : Luciférase

LUM : Luméfantrine

MACs : colonne MACs pour séparation magnétique parasitaire

MAHRP : *Membrane-Associated His-rich protein 1*

MDA : *Mass Drug Administration*

MESA : *Mature parasite-infected Erythrocyte Surface Antigen*

MILD : moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée

MSaT : *Mass Screen & Treat*

MTIP : *Myosin A-Tail Interacting Protein*

MyoA : myosine A

NAG : N-acétyl-D-Glucosamine

NLR : *Nodd Like Receptor*

nRBC : normal RBC (érythrocyte sain, déformable)

OMS : Organisation Mondiale pour la Santé (*WHO, World Health Organization*)

P : Pyriméthamine

PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PbODA : *Plasmodium berghei Ookinete Development Assay*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PECAM-1 : *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*

PEXEL : *Protein EXport ELements* (signal de transport vacuolaire)

Pfcrt : *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*

PfDGFA : *Plasmodium falciparum Dual Gamete Formation Assay*

PfEMP1-3 : *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1-3*

Pfgdv1 : *Plasmodium falciparum gametocyte development 1*

Pfgeg : *Plasmodium falciparum gametocytogenesis early gene*

PfGEXP : *Plamodium falciparum Gametocyte EXported Protein*

PfHda2 : *Plasmodium falciparum Histone deacetylase 2*

PfHP1 : *Plasmodium falciparum Heterochromatin Protein 1*

Pfmdr1 : *Plasmodium falciparum multidrug resistance 1*

PfPKA : Protéine Kinase A

PfRh4 : *Plasmodium falciparum Reticulocyte homology 4 protein*

PfsMFA : *Plasmodium falciparum Standard Membrane Feeding Assay*

PftetQ : *Plasmodium falciparum tetracycline resistance TetQ*

PG : proguanil

Pgh1 : *P-Glycoprotein homologue 1*

PID : pulvérisations intra-domiciliaires d'insecticides à effet rémanent

PNUD : Programme des Nations Unies pour le Développement

PP : Pipéraquine

PQ : Primaquine

PTEX : *PEXEL-protein Translocation machine*

PVN : *parasitophorous vacuole membrane* (membrane de la vauole parasitophore)

RBC : *red blood cell* (érythrocyte, hématie, globule rouge)

RBM : *Roll Back Malaria*

RIFIN : *Repetitve Interspersed Families of polypeptides*

RON2-4 : *Rhoptry neck protein 2-4*

S : Sulfadoxine

S/B : rapport signal/bruit de fond

S/N : rapport signal/bruit

SBP1 : *Skeleton Binding Protein 1*

SMFA : *Standard Membrane Feeding Assay*

STEVOR : *SubTelomeric Variable Open Reading frame*

T1/2*el* : demi-vie d'élimination

TDR : Test de Dépistage Rapide

TLR : *Toll Like Receptor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TRAP : *Thrombospondin-Related Anonymous Protein*

TRX2 : *Thioredoxin 2*

TVN : *TubuloVesicular Nextwork* (réseau tubulovésiculaire)

UIS3-4 : *Up-regulated in Infective Sporozoites gene 3-4*

UNICEF : Fonds des Nations unies pour l'enfance

Introduction

I. Paludisme : Une endémie en régression dont l'éradication demandera des moyens innovants

-Qu'est ce que le paludisme ? Comment est-il transmis ?

-Qui cette maladie cible-t-elle ? Pourquoi ?

-Quels sont les outils et stratégies historiquement développés pour circonscrire l'endémie ? Ont-ils fonctionné ?

-Quels sont les challenges à relever pour éliminer du paludisme ?

1. Le paludisme est l'infection parasitaire causant les dommages les plus lourds en santé humaine.

Le paludisme, ou malaria pour les anglo-saxons, est une infection parasitaire humaine causée par un protozoaire Apicomplexe du genre *Plasmodium*. *Plasmodium* est un hématozoaire, il envahit les érythrocytes puis s'y multiplie. La transmission interhumaine du paludisme repose sur la piqûre d'un moustique vecteur, l'Anophèle femelle. Sur à peu près 400 espèces Anophèles mondialement répertoriées, une soixantaine est connue pour transmettre le paludisme, dont les mieux étudiés sont Anopheles *gambiae* et Anopheles *arabiensis*. Ce mode de transmission implique une combinaison complexe de facteurs régissant la propagation endémo-épidémiologique de la maladie. Aux mouvements des populations (êtres humains et moustiques) et à la géo-climatique s'ajoutent notamment des facteurs humains spécifiques, tels l'aménagement des territoires et la capacité à appliquer les mesures de préventions chimio-prophylaxiques ou thérapeutiques existantes. Le niveau d'endémie apparaît ainsi étroitement lié à la géographie, au contexte sociopolitique et au niveau de développement d'un pays, donc à la pauvreté. Un peu plus de 3 milliards d'individus sont exposés au risque de transmission du paludisme dans le monde [1]. Près de 200 millions de cas cliniques sont recensés chaque année, environ 90% de l'effectif touchant l'Afrique. Plus de 600 000 décès annuels sont associés à un accès palustre, dont 95% en Afrique, la majorité (~80%) étant représentée par des enfants. Une part de la mortalité liée au paludisme dérive indirectement de l'infection des femmes enceintes en zone endémique qui

induit, au cours de la première grossesse, une hypotrophie fœtale elle-même pourvoyeuse d'une surmortalité infantile. Dans les régions de forte transmission, le nombre de porteurs asymptomatiques de *Plasmodium* dépasse nettement celui des sujets symptomatiques. Le portage asymptomatique peut se prolonger pendant toute la saison sèche dans les zones à transmission saisonnière.

2. *Plasmodium falciparum* est responsable des cas de mortalité associés aux accès palustres.

Cinq espèces plasmodiales sont actuellement responsables du paludisme humain :

-*Plasmodium falciparum* : responsable de la fièvre tierce maligne, cette espèce est connue pour la gravité des accès palustres associés. Potentiellement létale, elle prédomine en régions tropicales et intertropicales et représente 98% des cas de paludisme en Afrique.

-*Plasmodium vivax* : responsable de la fièvre tierce bénigne, cette espèce sévit dans des zones géographiques à climat plus tempéré et peut rarement engendrer des formes graves, exceptionnellement mortelles notamment en Inde ou en Amazonie.

-*Plasmodium ovale* : essentiellement retrouvée en Afrique intertropicale, cette espèce est responsable de la fièvre tierce bénigne.

-*Plasmodium malariae* : responsable de la fièvre quarte bénigne, cette espèce se manifeste dans toutes les zones endémiques.

-*Plasmodium knowlesi* : responsable du paludisme simien, cette espèce est connue depuis le milieu du siècle dernier pour infecter l'homme en milieu forestier et provoquer une fièvre quarte. D'incidence extrêmement faible et exclusivement retrouvée en Asie du Sud-Est, son évolution est souvent grave, voire mortelle. Elle est donc traitée comme *Plasmodium falciparum* par artésunate intraveineux si un ou plusieurs signes de gravité sont présents [2].

3. L'incidence du paludisme humain a connu une régression globale au cours de ces 150 dernières années.

Depuis l'identification du parasite hématozoaire *Plasmodium* par Charles Louis Alphonse Laveran puis la démonstration de sa transmission vectorielle par l'Anophèle en 1897 par Ronald Ross, l'Homme est parvenu à éliminer le paludisme de presque la moitié des

pays du globe. Durant la 1ere moitié du 20e siècle, époque à laquelle 178 pays étaient déclarés endémiques, les efforts déployés pour contrôler, voire éliminer la maladie se sont avérés largement contrecarrés par l'impact politico-économique néfaste de la 1ere et 2nde Guerre Mondiale [3]. Cependant en l'espace de ces 65 dernières années, le paludisme a été éliminé dans près de 80 pays. En 2010, 99 pays endémiques étaient recensés. Parmi ceux-ci, 67 étaient en phase de contrôle et 32 en phase d'élimination [4]. Actuellement, environ 50% de la population mondiale vit dans un environnement exempt de paludisme, contre 30% en 1950.

4. Bien que n'ayant pas abouti, le plan d'éradication globale du paludisme lancé dans les années 50 a contribué à cette régression.

Supporté par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), le plan d'éradication globale du paludisme (*Global Malaria Eradication Programme*, GMEP) déployé entre 1955 et 1969 a contribué de façon importante à la régression du paludisme observée au cours du siècle dernier. Le GMEP a résulté en une élimination du paludisme dans de nombreuses zones où un contrôle était déjà opéré de façon efficace depuis plusieurs années et de façon plus générale, en une réduction considérable de la distribution du paludisme au niveau mondial [5]. Basée quasi-exclusivement sur l'utilisation massive d'insecticides à grande échelle, l'efficacité apparente globale à court terme de cette approche internationale s'est hélas rapidement effritée. Les causes principales référées dans la littérature sont de 3 types [6]:

-Un affaiblissement des programmes de contrôle : non reconduction des subventions attribuées et faible adhésion communautaire au programme.

-Un accroissement du potentiel du paludisme : mouvements des êtres humains et des vecteurs Anophèles et développement-aménagement des territoires.

-Des problèmes techniques : l'apparition de résistances vectorielles aux insecticides comme le D.T.T, et les résistances aux antipaludiques de synthèse telle la chloroquine.

Au cours de la 22e Assemblée Mondiale pour la Santé en 1969, l'échec du GMEP a été officialisé, avec reprise de campagnes de contrôle locales concentrées dans des foyers endémiques contrôlables. La situation s'est gravement détériorée à partir de 1965, avec des résurgences qui ont émergé progressivement pour atteindre au début des années 1990 près de 500 millions de cas cliniques et plus de 2.5 millions de morts annuelles, concentrées essentiellement en Afrique subsaharienne (90% des cas) et en Asie [7].

5. Lancé dans les années 90, un plan d'action mondial contre le paludisme a tenu compte des erreurs passées.

Un nouveau plan d'action mondial pour le contrôle et l'élimination du paludisme a été lancé à la fin du siècle dernier. Structuré sur le partenariat *Roll Back Malaria* (RBM) inauguré en 1998 par l'OMS, l'UNICEF, la Banque mondiale et le PNUD, la coordination des actions contre le paludisme aux échelles internationale et locale est désormais centralisée dans les bureaux du Secrétariat RBM hébergé par l'OMS, en Suisse [8]. Une stratégie d'éradication à long terme a été adoptée, fondée sur 3 composantes : (1) un contrôle agressif et soutenu visant à réduire l'incidence et la mortalité imputables au paludisme dans les pays à forte endémie; (2) une élimination progressive du paludisme à partir des pays en marge des épicentres endémiques, afin de réduire la distribution géographique globale du paludisme ; (3) un support prolongé de la recherche, notamment interventionnelle à fibre préventive, diagnostique et curative.

L'exécution de ce plan a fourni des résultats très encourageants en l'espace d'une décennie. Au niveau mondial, l'incidence du paludisme a diminué de 29% et sa mortalité de 45%. En Afrique, son incidence a diminué de 31% et le nombre de décès a été réduit de 49%. Si l'on réduit encore l'échelle géographique: le nombre de cas cliniques recensés en Afrique du Sud est passé de 64500 à 6847, le nombre de décès a considérablement chuté de 460 à 70 et une baisse de 46% de la prévalence moyenne chez les enfants de 2-10 ans a été observée [1]. C'est essentiellement sur les aspects préventifs que les progrès les plus importants ont été réalisés [1, 9], avec l'accroissement de la production (x3 entre 2004 et 2007) et la distribution en masse de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée (MILD), ainsi que la généralisation des pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides à effet rémanent (PID). Par ailleurs, l'accès aux tests de diagnostic rapide aux stades précoces de l'infection a permis une meilleure utilisation de stocks médicamenteux parfois en rupture. D'autre part, la grande efficacité des combinaisons chimiothérapeutiques à base d'artémisinine (ACT : analogue artémisinine à ½ vie courte combiné à un antipaludique de référence à ½ vie longue) et leur utilisation en tant que traitement de 1^{ere} intention du paludisme à *Plasmodium falciparum* dans les pays endémiques ont joué un rôle important dans le volet curatif de la lutte contre le paludisme. La rapidité d'action des dérivés de l'artémisinine contribue en partie à réduire la transmission à partir de sujets symptomatiques.

Dans un élan optimiste, l'élimination du paludisme du continent Africain a été annoncée comme une perspective concevable au cours de la 3e session de la conférence des Ministres de la Santé à Johannesburg, en Avril 2007. Cet évènement a été suivi par un appel à l'éradication lancé par la Fondation *Bill & Melinda Gates* - un des financeurs actuels majeurs de la R&D en recherche anti-transmission -, appel énergiquement supporté par l'OMS [10] .

6. Des outils innovants sont nécessaires pour maintenir l'objectif d'élimination.

En dépit de leur impact sur les taux de mortalité et de morbidité mondiaux, les approches interventionnelles actuelles ne sont probablement pas suffisantes pour éliminer le paludisme des zones à prévalence élevée, telles que l'Afrique subsaharienne. Bien que le financement du plan d'action mondial contre le paludisme ait triplé entre 2005 et 2013, son subventionnement mondial demeure déficitaire [1]. Il est estimé qu'un doublement des fonds attribués à la cause serait nécessaire afin d'atteindre les objectifs d'élimination. Dans ce sens, les simulations mathématiques et les données empiriques suggèrent que l'utilisation combinée des MILD, PID et des ACTs ne peut aboutir à l'élimination du paludisme à *Plasmodium falciparum* que dans les zones ou les taux de transmission sont les plus faibles [9, 11]. Des moyens innovants seront donc requis pour les zones à plus forte transmission.

7. Le plan de bataille préventif actuel doit être renforcé.

La résistance des Anophèles aux insecticides menace l'efficacité des approches MILD et PID [12]. Au total 4 classes d'insecticides sont actuellement exploitées pour la lutte anti-vectorielle : les organochlorés, les organophosphates, les carbamates et les pyréthroïdes. En raison de sa faible toxicité pour l'être humain, de sa rapidité d'action et de sa puissante activité insecticide, la classe des pyréthroïdes est la seule approuvée par l'OMS pour la préparation des MILD. Les MILD représentant l'un des piliers de l'approche préventive antipaludique actuelle, les cas de résistances vectorielles aux pyréthroïdes déclarés par 27 pays de l'Afrique subsaharienne ont amené l'OMS a officialisé un statut d'alerte et à dresser un Plan Global pour le Contrôle des résistances aux Insecticides chez les vecteurs du paludisme [13]. Des recherches intenses ont lieu dans ce domaine.

8. De nouveaux outils chimiothérapeutiques sont nécessaires.

L'efficience variable des services de santé et l'observance imparfaite des patients sont des limites importantes à l'approche chimio-thérapeutique, tant en terme d'impact clinique direct qu'en terme de contrôle (indirect) de la transmission. De plus, les porteurs asymptomatiques représentent un réservoir de transmission susceptible d'entraver, tant en Asie qu'en Afrique, l'efficacité anti-transmission des approches chimiothérapeutiques conventionnelles qui ne ciblent que les sujets symptomatiques [14]. Toutefois les tentatives infructueuses passées visant à cibler ce réservoir asymptomatique ont montré que l'efficacité de campagnes de traitement de masse n'est pas toujours pérenne, et qu'un échec peut avoir des conséquences néfastes sur la population, directement par sélection de parasites résistants et indirectement par « décrédibilisation » des entités portant les programmes [15].

Récemment, des cas d'émoussement de l'efficacité des dérivés de l'artémisinine ont été détectés dans 4 pays d'Asie du Sud Est (Région du Mékong, épicentre des résistances aux antipaludiques) [16]. L'importation ou l'émergence d'un tel phénomène en Afrique est une menace majeure sur la démarche d'élimination/éradication.

Par ailleurs, l'arsenal chimiothérapeutique à disposition du clinicien cible principalement les stades de développement parasitaires responsables des symptômes du paludisme. Les stades de développement parasitaires assurant la transmission de l'être humain au vecteur Anophèle (les gamétocytes) ne sont que partiellement affectés par les médicaments disponibles. Les ACTs ne sont que partiellement efficaces sur la transmission. La primaquine, une 8-amino-quinoléine d'efficacité avérée [17] cause des effets secondaires potentiels graves chez les patients atteints d'une déficience de la Glucose-6-Phosphate-Deshydrogénase (G6PD), la plus répandue des déficiences enzymatiques dans le monde. La difficulté de mise en pratique d'un test de dépistage systématique limite ainsi grandement son usage.

9. *Plasmodium vivax* doit être considéré sérieusement.

Un dernier défit réside dans la faisabilité opérationnelle de l'élimination des autres espèces plasmodiales. Un intérêt particulier doit être porté à *Plasmodium vivax*, moins étudié que *Plasmodium falciparum* en raison de son moindre impact sur la santé humaine. Près de 2.6 milliards d'individus sont à risque de contracter un paludisme à *Plasmodium vivax*. Responsable de 20 millions de cas cliniques estimés à l'échelle mondiale par l'OMS en 2010,

cette espèce peut entrer en dormance (hypnozoïte) dans le foie des patients favorisant les récurrences multiples ainsi que les résistances [18, 19]. Les hypnozoites, peu sensibles aux antipaludiques de références, sont éliminés par la primaquine en cure longue (14 jours). *Plasmodium vivax* est présent, seul ou associé à *Plasmodium falciparum*, dans 25 des 32 pays engagés dans une politique d'élimination du paludisme. Les résistances aux antipaludiques de référence sont moins répandues que pour *Plasmodium falciparum* mais posent un problème thérapeutique en Papouasie Nouvelle Guinée en dans certaines zones d'Amérique du Sud. La prévalence du paludisme à *Plasmodium falciparum* connaissant dans ces pays une réduction plus rapide comparé à *Plasmodium vivax*, les étapes ultimes de l'élimination se focaliseront donc sur cette dernière espèce.

10. Résumé

Transmis par les moustiques du genre *Anopheles*, le paludisme est l'infection parasitaire à mortalité et morbidité les plus élevées dans le monde. *Plasmodium falciparum* est présent sur tous les continents et il est responsable de la majorité des décès imputables à cette maladie. Sa prévalence a été réduite de moitié au cours des 2 dernières décennies. Les résultats des stratégies d'élimination déployées dépendent essentiellement de l'efficacité avec laquelle les opérations préventive (moustiquaires et insecticides) et curative (antipaludiques) sont exécutées. Le paludisme étant fortement lié au climat intertropical et à la pauvreté, il affecte essentiellement le continent Africain, et dans une moindre mesure l'Asie du Sud Est et l'Amérique latine. Le passé a montré que l'élimination du paludisme n'est possible que si l'effort est maintenu sur de nombreuses années et que la stratégie générale s'adapte à l'environnement socio-économique, sociopolitique et socioculturel des zones endémiques (« Think global Act local »). Les résistances aux insecticides et aux antipaludiques de référence, le ciblage pharmacologique incomplet du cycle de transmission parasitaire, le contrôle insuffisant du réservoir de transmission asymptomatique et la persistance d'un *Plasmodium vivax* sous-considéré sont les obstacles principaux auxquels une démarche générale d'élimination/éradication est confrontée. Le développement de nouvelles familles chimiques d'insecticides et d'antipaludiques à modes d'action diversifiés sera donc fondamental pour sécuriser les progrès réalisés et continuer à progresser [20].

11. Références :

1. WHO | World Malaria Report 2014. WHO.
2. **Ahmed MA, Cox-Singh J**. 2015. Plasmodium knowlesi–an emerging pathogen. ISBT science series **10**:134–140.
3. **Brabin BJ**. 2014. Malaria's contribution to World War One–the unexpected adversary. Malaria journal **13**:497.
4. **Feachem RG, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM, Sabot O, Rodriguez MH, Abeyasinghe RR, Ghebreyesus TA**, **others**. 2010. Shrinking the malaria map: progress and prospects. The Lancet **376**:1566–1578.
5. **Nájera JA, González-Silva M, Alonso PL**. 2011. Some Lessons for the Future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). PLoS Medicine **8**:e1000412.
6. **Cohen JM, Smith DL, Cotter C, Ward A, Yamey G, Sabot OJ, Moonen B**. 2012. Malaria resurgence: a systematic review and assessment of its causes. Malar J **11**:122.
7. **Trigg PI, Kondrachine AV**. 1998. Commentary: malaria control in the 1990s. Bulletin of the World Health Organization **76**:11.
8. Roll Back Malaria | http://www.rollbackmalaria.org/fr/page-daccueil
9. **Griffin JT, Hollingsworth TD, Okell LC, Churcher TS, White M, Hinsley W, Bousema T, Drakeley CJ, Ferguson NM, Basáñez M-G, Ghani AC**. 2010. Reducing Plasmodium falciparum Malaria Transmission in Africa: A Model-Based Evaluation of Intervention Strategies. PLoS Med **7**.
10. **Roberts L, En Serink M.** 2007. Did They Really Say…Eradication? Science.**318**:5856-1544.
11. **Tatem AJ, Smith DL, Gething PW, Kabaria CW, Snow RW, Hay SI**. 2010. Ranking of elimination feasibility between malaria-endemic countries. The Lancet **376**:1579–1591.

12. **Strode C, Donegan S, Garner P, Enayati AA, Hemingway J**. 2014. The Impact of Pyrethroid Resistance on the Efficacy of Insecticide-Treated Bed Nets against African Anopheline Mosquitoes: Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS Medicine **11**:e1001619.
13. 2012. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
14. **Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L**. 2013. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. Expert Review of Anti-infective Therapy **11**:623–639.
15. **Poirot E, Skarbinski J, Sinclair D, Kachur SP, Slutsker L, Hwang J**. 2013. Mass drug administration for malaria. Cochrane Database Syst Rev **12**.
16. **Wongsrichanalai C, Sibley CH**. 2013. Fighting drug-resistant Plasmodium falciparum: the challenge of artemisinin resistance. Clinical Microbiology and Infection **19**:908–916.
17. **Graves PM, Gelband H, Garner P**. 2015. Primaquine or other 8-aminoquinoline for reducing Plasmodium falciparum transmission. The Cochrane Library.
18. **Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R**. 2001. The neglected burden of Plasmodium vivax malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene **64**:97–106.
19. **White NJ**. 2011. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. Malaria journal **10**:297.
20. **Baleta A**. 2013. MIM conference focuses on malaria elimination. The Lancet **382**:1319–1320.

II. *Plasmodium falciparum*, un protiste parasite de l'hépatocyte et de l'érythrocyte humain

-Quelles sont les étapes principales du développement parasitaire chez l'être humain ?

-Quelle est la cible finale du parasite asexué ?

-Quels changements moléculaires, structuraux et phénotypiques accompagnent le développement intra-érythrocytaire du parasite asexué ?

-Quels sont les facteurs de virulence parasitaire ? Comment expliquer la pathogenèse du paludisme ?

-Comment le parasite échappe-t-il aux mécanismes de défense immunitaires et non immunitaires de l'hôte humain ?

1. Le développement biologique de *Plasmodium falciparum* obéit à un cycle hétéroxène à 2 hôtes et impliquant 2 phases : la schizogonie et la sporogonie.

L'Anophèle, connu comme vecteur du paludisme, est en fait l'hôte définitif de *Plasmodium falciparum*. L'Homme est son hôte secondaire. Après avoir été inoculé à l'être humain par l'Anophèle, le parasite envahit successivement deux types de cellules : 1/ d'abord comme sporozoïte, le parasite envahit les hépatocytes durant la phase initiale transitoire de l'infection humaine, puis 2/ comme mérozoïte, le parasite envahit les érythrocytes où il se développe selon un cycle invasion-maturation d'une durée de 48 heures. En leur sein, le parasite se multiplie par divisions nucléaires mitotiques multiples suivies d'un morcellement du cytoplasme, processus appelé schizogonie [1]. Ce mode de reproduction est asexué.

La schizogonie est suivie par la sporogonie, caractérisée par le passage du parasite depuis le sang de l'hôte intermédiaire jusqu'au vecteur (hôte final), un moustique femelle hématophage du genre Anophèle. Une proportion - *toujours minoritaire* - de parasites s'engage, au cours de chaque cycle asexué intra-érythrocytaire, sur un développement de type sexué : la gamétocytogénèse. Des gamétocytes mâles et femelles résultent de ce processus. Ils se différencient, tout comme les stades asexués, dans l'érythrocyte. Leur circulation les prédispose à une ingestion par l'Anophèle permettant la transmission du paludisme.

Dans l'Anophèle [2], les gamétocytes mâles et femelles s'activent en gamètes puis fusionnent pour former un zygote par fusion des gamètes. Ce zygote, produit dans l'estomac de

l'Anophèle, acquière un phénotype mobile et devient ookinète (*« œuf mobile »)*. Après avoir traversé la paroi stomacale de l'Anophèle, l'ookinète est dit oocyste. En bordure stomacale, sa maturation par divisions méiotiques aboutit à la formation de centaines de sporozoïtes invasifs. Les sporozoïtes produits migrent dans les glandes salivaires de l'Anophèle et seront inoculés à un hôte secondaire durant le prochain repas de sang.

2. Une phase transitoire d'amplification a lieu dans le foie.

Durant un repas de sang, l'Anophèle inocule l'être humain avec des sporozoïtes. Ces sporozoïtes, généralement déposés dans le derme, migrent en son sein en effectuant des brèches grâce à une ou plusieurs phospholipases de surface. Les sporozoïtes se dirigent alors sur le système vasculaire cutané, qu'ils empruntent afin d'atteindre très rapidement les capillaires sinusoïdes hépatiques.

Le ciblage hépatique implique la reconnaissance de protéoglycanes de type héparane sulfates (HSPGs) [3] par l'intermédiaire de protéines de surface des sporozoïtes, dont la protéine circumsporozoite (CSP) [4]. Des proéminences d'HSPGs produites par les cellules environnantes, faisant saillie au travers des fenestrations endothéliales jusque dans l'espace sinusoïdale, contribuent au recrutement des sporozoïtes. Les sporozoïtes traversent les cellules composant le mur sinusoïdal pour entrer en contact avec les hépatocytes, exprimant à leur surface des HSPGs. Chacun des sporozoïtes va alors traverser plusieurs hépatocytes en effectuant des brèches membranaires, pour au final en sélectionner un à l'intérieur duquel il se développera. Les sporozoïtes sont dotés d'une motilité particulière dite « *gliding motility* ». Cette motilité leur est essentielle afin de franchir le mur sinusoïdal et d'envahir les hépatocytes [5].

La migration trans-hépatique des sporozoïtes leur permet d'acquérir un phénotype moléculaire invasif. Le clivage protéolytique de la protéine CSP survient à cette étape [6]. En parallèle, des cascades de signalisation intra-parasitaires -*probablement calcium-dépendantes*- participent à l'exposition apicale de protéines membranaires nécessaires pour l'invasion hépatique, telle que TRAP. En réponse à la migration trans-hépatique, le microenvironnement hépatique lésé exprime des déterminants moléculaires favorisant l'infection. L'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) exprimé à la membrane hépatique a ainsi été identifié comme récepteur aux protéines CSP et TRAP. La protéine de surface tétraspanine CD81, un potentiel

récepteur pour le virus de l'Hépatite C, joue également un rôle important dans le mécanisme d'infection hépatique par le sporozoïte [7].

Au final, la migration du sporozoïte depuis le derme, puis le ciblage et l'invasion d'un hépatocyte n'aura pris que quelques minutes. La rapidité du processus minimisant le temps d'exposition du parasite extracellulaire au système immunitaire de l'hôte constitue sans doute un avantage sélectif.

Dans l'hépatocyte, les sporozoïtes initient une phase de multiplication intra-hépatocytaire d'une durée générale de 5 à 10 jours, dite schizogonique pré-érythrocytaire (*synonyme : schizogonie hépatique et mérogonie exo- ou pré-érythrocytaire*) [1]. Cette phase de développement est asymptomatique. Le sujet est en période d'incubation. La nature des interactions sporozoïte-hépatocyte hôte régissant la progression de cette phase ne sont pas entièrement connues chez *Plasmodium falciparum*. Chez *Plasmodium berghei* (*Plasmodium* du rongeur), les protéines UIS3, UIS4 ou Pb36p sont essentielles pour la maturation du schizonte intra-hépatocytaire [8], l'immunisation de souris avec des parasites déficients pour ces 3 protéines induisant une protection antiplasmodiale complète. L'hépatocyte parasité par le schizonte s'hypertrophie progressivement sous l'effet de la multiplication du parasite et peut alors atteindre un diamètre de plus de 50µm. A maturité, entre 10 et 30 000 mérozoïtes filles sont relâchés dans la circulation sanguine à partir d'un mérosome, un bourgeon de membrane hépatocytaire d'aspect vésiculaire.

3. Chez l'Homme, la deuxième cellule hôte est l'érythrocyte.

Au terme d'une amplification hépatique, des milliers de mérozoïtes libres diffusent dans la circulation sanguine et entrent alors rapidement en collision avec des érythrocytes. Des protéines parasitaires permettent l'adhésion du mérozoïte à l'érythrocyte percuté. Les plus importantes de ces protéines, membres des familles EBA et Rh [9], sont sécrétées par le complexe apical du mérozoïte, un agglomérat d'organelles sécrétoires localisé à son extrémité apicale. Ainsi, EBA-175 est connu pour lier l'acide sialique des résidus de glycophorine A [10] exposés par la membrane érythrocytaire, tandis que PfRh4 lie le récepteur du complément CR1 [11].

L'adhésion intercellulaire est suivie d'une réorientation passive du mérozoïte de sorte que son complexe apical sous-membranaire pointe directement sur l'érythrocyte. Un grand nombre de

protéines parasitaires participent de façon séquentielle à l'invasion coordonnée de l'érythrocyte par le mérozoïte [12].

Un complexe jonctionnel est tout d'abord établi et encercle le complexe apical parasitaire. Il résulte d'interactions protéiques fortes soudant localement les membranes parasitaires et érythrocytaires. Il représente un point d'appui pour l'insertion du mérozoïte dans l'érythrocyte. Une dépression en forme de dôme apparait dans la membrane de l'érythrocyte qui épouse la forme de l'apex du mérozoïte.

D'un point de vue moléculaire, des protéines de surface parasitaires, telles mTRAP et AMA1 jouent un rôle essentiel dans la formation du complexe jonctionnel. Ces dernières se lient aux protéines parasitaires RON2 et RON4 insérées dans le feuillet interne de la membrane érythrocytaire. Le complexe jonctionnel délimite une aire d'ancrage pour l'exécution d'une invasion supportée par un moteur moléculaire actine-myosine.

Ce moteur actine-myosine, encore appelé glidéosome, fait intervenir différentes protéines, telles myoA (myosin-A), MTIP (*myosin-A tail domain interacting protein*), GAP45 et GAP 50 (*glideosome-associated proteins 45 and 50*) qui assurent la « gliding motility » du mérozoïte infectieux et supportent l'invasion. Les études indiquent un rôle spécifique de GAP50 dans l'ancrage d'un complexe protéique GAP45–MTIP–MyoA, associé à mTRAP, pour le déplacement du complexe jonctionnel. Le glidéosome est ancré dans une structure parasitaire spécifique appelée le complexe membranaire interne (*inner membrane complex*, IMC), un compartiment membranaire bilaminaire qui s'appose à la surface interne de la membrane plasmique du parasite exo-érythrocytaire.

Progressivement au cours de son entrée, le parasite est débarrassé de son manteau protéique de surface sous l'action de protéases, les Sheddases [13]. Sous l'action des moteurs moléculaires, les membranes se juxtaposent progressivement et le corps du parasite s'insère de plus en plus dans l'érythrocyte invaginé. Au terme de cette invasion par un processus ayant des points commun avec l'endocytose, le complexe jonctionnel est lysé sous l'action de protéases résidentes. Le parasite internalisé est alors entouré par 2 membranes dont la 1ere, la plus externe et d'origine érythrocytaire, délimite la vacuole parasitophore. Sa composition sera rapidement modifiée par le parasite.

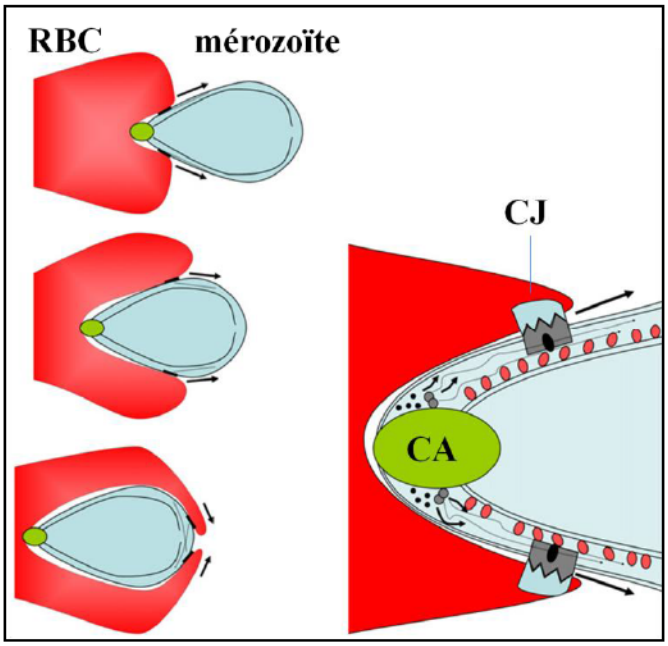


Figure I-1 : Représentation schématique du mécanisme d'invasion de l'érythrocyte (*RBC : red blood cell*) par le mérozoïte. *Celui-ci repose sur la réorientation du mérozoïte, avec le complexe apical (CA) parasitaire pointant sur la membrane érythrocytaire, puis l'établissement d'un complexe jonctionnel (CJ) et enfin l'invasion orientée de l'érythrocyte sous l'action d'un moteur moléculaire. Illustration modifiée à partir de [12]*

4. Le cycle de développement schizogonique intra-érythrocytaire asexué de *Plasmodium falciparum* s'opère sur 2 jours.

Dans l'érythrocyte, le parasite suit une phase de développement schizogonique érythrocytaire asexuée *(synonyme : mérogonie érythrocytaire)* [1]. Cette phase de développement intra-érythrocytaire est cyclique. Elle est principalement responsable des symptômes du paludisme. Un cycle dure approximativement 48 heures. La répétition de ce cycle assure la survie du parasite dans l'hôte sur le plus long terme possible. L'examination microscopique de frottis sanguins colorés au bleu de Giemsa, méthode diagnostique de référence, permet d'observer l'évolution morphologique du parasite sur différents stades de maturation caractérisant le cycle asexué [14]. Ces stades morphologiques sont, respectivement et par tranche temporelle :

-de 0 à ~16-20 heures : Trophozoïte jeune ou immature à forme annulaire. Un anneau bleu représente le cytoplasme basophile parasitaire marqué par 1 ou 2 structures ponctiformes rouges-violacées correspondant au noyau. Un pluri-parasitisme est possible. Une sous-

classification plus précise différencie les jeunes formes annulaires des plus avancées. De 0 à 10 heures, les formes annulaires jeunes sont de taille réduite, souvent dysmorphiques et localisables sur la périphérie de l'érythrocyte. Les formes annulaires avancées de 10 à 16-20 heures sont caractérisés par une symétrie annulaire mieux définie, un volume cytoplasmique plus large et un noyau un peu plus épais. A ce stade des ponctuations disséminées de part en part de l'érythrocyte signent le développement des tâches de Maurer.

-de ~16-20 à ~36 heures : Trophozoïtes ou Trophozoïtes mûrs. La taille du parasite augmente. L'apparition d'un ou quelques pigments d'hémozoïne de couleur brune reflète la digestion de l'hémoglobine érythrocytaire par le parasite. Ces pigments sont en fait des cristaux d'hémozoïne. Le matériel nucléaire de couleur rouge-violacée s'épaissit et gagne en volume progressivement.

-de ~36 à ~44-48 heures : Le parasite est dit schizonte. Il gagne progressivement en taille et peut occuper jusqu'à 90% du volume érythrocytaire au terme de sa maturation. Les divisions mitotiques successives résultent en un nombre de noyaux croissant de 2 à 32. Le parasite acquiert progressivement l'aspect d'une rosace. Le(s) pigment(s) sont très épais. La pression mécanique exercée sur le parasite durant la préparation du frottis peut parfois entrainer l'explosion du schizonte, donnant lieu à des ponctuations brunes extra-érythrocytaires représentant des mérozoïtes filles qui peuvent s'accoler aux érythrocytes avoisinants.

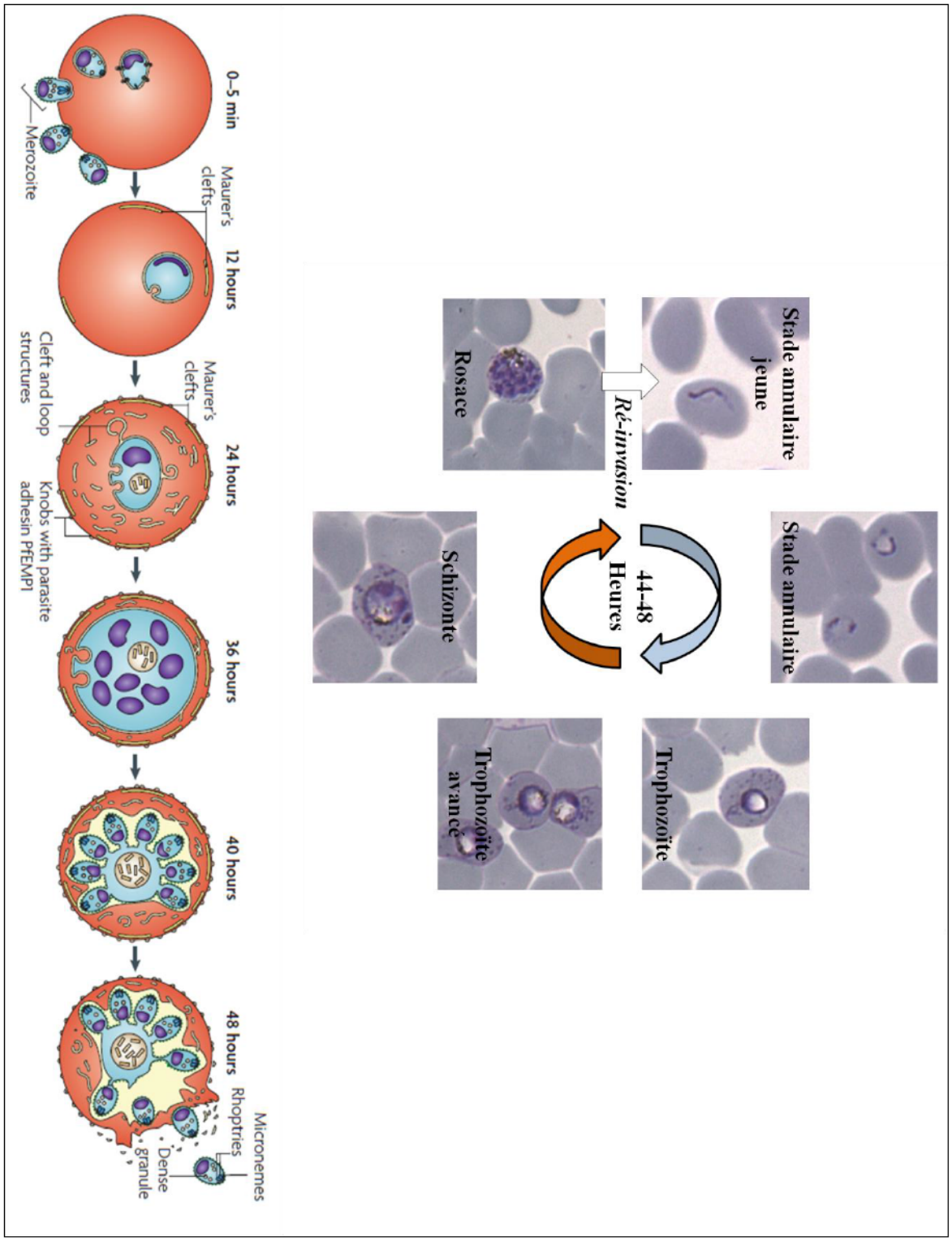


Figure I-2 : Présentation du cycle de développement schizogonique intra-érythrocytaire asexué de *Plasmodium falciparum*. *Acquisitions microscopiques au grossissement x100 permettant de visualiser la différenciation d'une souche de laboratoire FUP sur frottis colorés au bleu de Giemsa. Cette différenciation s'opère sur 44-48 heures, au terme desquelles le schizonte lyse son érythrocyte hôte et relâche des mérozoïtes filles pouvant ré-*

envahir d'autres érythrocytes. Diamètre estimé des érythrocytes = 9µm. Schématisation du cycle tirée de [15]

5. L'exportome de *Plasmodium falciparum* contribue à la restructuration de l'érythrocyte hôte.

Abrité par l'érythrocyte, le parasite se développe dans la vacuole parasitophore. L'érythrocyte est une cellule hautement spécialisée, riche en hémoglobine, dont la fonction primaire est double : 1/ le transport de l'oxygène et 2/ le rapatriement du dioxyde de carbone produit par le métabolisme cellulaire. Au cours de sa différenciation [16], l'érythrocyte perd son noyau et ses organelles, donc sa capacité à synthétiser de nouvelles protéines. Il est également dépourvu d'une majorité des transporteurs membranaires ubiquitaires à spécificité protéique, nucléique, et ionique. Il est donc incapable de renouveler la grande majorité de ses composantes cellulaires. Sa durée de vie est limitée : 120 jours en moyenne. Durant ce laps de temps, l'érythrocyte exploite progressivement ses réserves afin d'assurer un métabolisme basal glycolytique satisfaisant ses besoins fondamentaux. En conséquence, le parasite est amené à induire de profondes modifications chez son érythrocyte hôte pour y assurer son développement. Un panel diversifié de protéines est sécrété par le parasite. L'ensemble des protéines parasitaires exportées dans l'érythrocyte représente l'Exportome, la « boîte à outil » du parasite [17]. L'Exportome est responsable d'une restructuration fonctionnelle profonde de l'érythrocyte. Cette restructuration s'accompagne du développement de la membrane parasitophore -*frontière obligée entre le parasite et le cytoplasme érythrocytaire*- et de compartiments membranaires cytoplasmiques, ainsi que de modifications du cytosquelette, de la membrane et de la surface de l'érythrocyte.

6. Dans l'érythrocyte, le développement de nouveaux compartiments membranaires contribue à l'adressage des protéines parasitaires.

Le parasite développe un réseau complexe de structures membranaires compartimentées contribuant à son développement, à ses besoins énergétiques et à sa virulence. La membrane parasitophore se développe progressivement, projetant des ramifications dans le cytoplasme de l'érythrocyte et formant le réseau tubulovésiculaire (TVN). De nouveaux mécanismes de perméabilité sont mis en place très précocement pour instaurer un nouvel équilibre ionique et assurer un influx de solutés indispensables pour le développement du parasite. Ces solutés comportent notamment des sucres, des acides aminés,

des purines, des anions, des cations organiques (telle la choline) et des vitamines. Un système de transporteur est ainsi mis en place afin d'assurer l'acheminement de tels solutés au travers de la membrane érythrocytaire puis du PVN [18, 19].

Des protubérances microscopiques denses aux électrons appelés Knobs apparaissent à la membrane de l'érythrocyte. Ces Knobs sont riches en protéine KAHRP (*knob-associated His-rich protein*) et sont constitués de complexes multi-protéiques associés au cytosquelette et à la membrane érythrocytaire [20]. Les Knobs servent de plateforme pour des facteurs moléculaires permettant la séquestration de l'érythrocyte parasité au niveau vasculaire, telle PfEMP1, une protéine transmembranaire contribuant à la pathogénicité du parasite [15].

D'autre part, des citernes mono-membranaires vacuolées d'apparence golgienne riches en protéines de structure SBP1 (*skeleton binding protein 1*) et MAHRP1 (*Membrane-associated His-rich protein 1*) se développent progressivement : ce sont les clefs de Maurer [21] (tâches de Maurer observées sur frottis coloré au bleu de Giemsa). L'origine des clefs de Maurer est incertaine. Elle est supposée sous-jacente à un macro-bourgeonnement de la membrane parasitophore des TVN. Les clefs de Maurer sont des structures indépendantes potentiellement rattachées au TVN, à la membrane érythrocytaire ou au Knobs par un réseau cytosquelettique d'actine supportant des échanges vésiculaires (*J-Dots*) [22]. Les clefs de Maurer constituent des plateformes d'adressage transitoire ou permanent pour des protéines parasitaires. Des protéines de surface importantes responsables de la virulence et de l'immuno-évasion du parasite, telles PfEMP1, les RIFINs, les STEVORs et des membres de la famille CLAG transitent par ce compartiment.

7. Le système d'adressage des protéines parasitaires n'est pas entièrement décrypté.

Les mécanismes régissant la sécrétion et l'adressage des protéines parasitaires dans l'érythrocyte restent en partie inconnus. Une partie des protéines destinées au compartiment érythrocytaire possède un motif amino-terminal appelé PEXEL (*protein export elements*), ou signal de transport vacuolaire (VTS) [23]. Ce motif se caractérise par une séquence pentamérique consensus R/QnLnE/Q/D, où n représente un acide aminé non chargé. Il est précédé en amont d'une séquence hydrophobe permettant l'adressage co- ou post-traductionnel des protéines à motif PEXEL au niveau du réticulum endoplasmique (RE) du parasite. Les protéines à motif PEXEL doivent obligatoirement transiter par le RE pour être

exportées dans le corps érythrocytaire. Dans le RE, le motif PEXEL est clivé par une « PEXELase », puis l'extrémité N-terminale de la protéine est acétylée. Suite à leur libération dans la vacuole parasitophore, ces protéines sont dirigées sur la membrane parasitophore selon une modalité qui n'est pas encore clairement définie. Quelque soit le modèle proposé, l'export protéique au-delà de la membrane parasitophore fait intervenir un « complexe de translocation ATP-dépendant pour protéines à motif PEXEL » (PTEX : *PEXEL-protein translocation machine*) [24] composé, entre autre, par l'ATPase HSP101, la protéine canalaire EXP2 et des potentiels régulateurs tels que TRX2, PTEX150 et PTEX88. Une proportion non négligeable de protéines dépourvues de motif PEXEL sont néanmoins exportées dans le compartiment érythrocytaire, telles les protéines SBPs ou MAHRPs, sous-tendant l'utilisation par le parasite d'un système d'adressage parallèle indépendant de PEXEL.

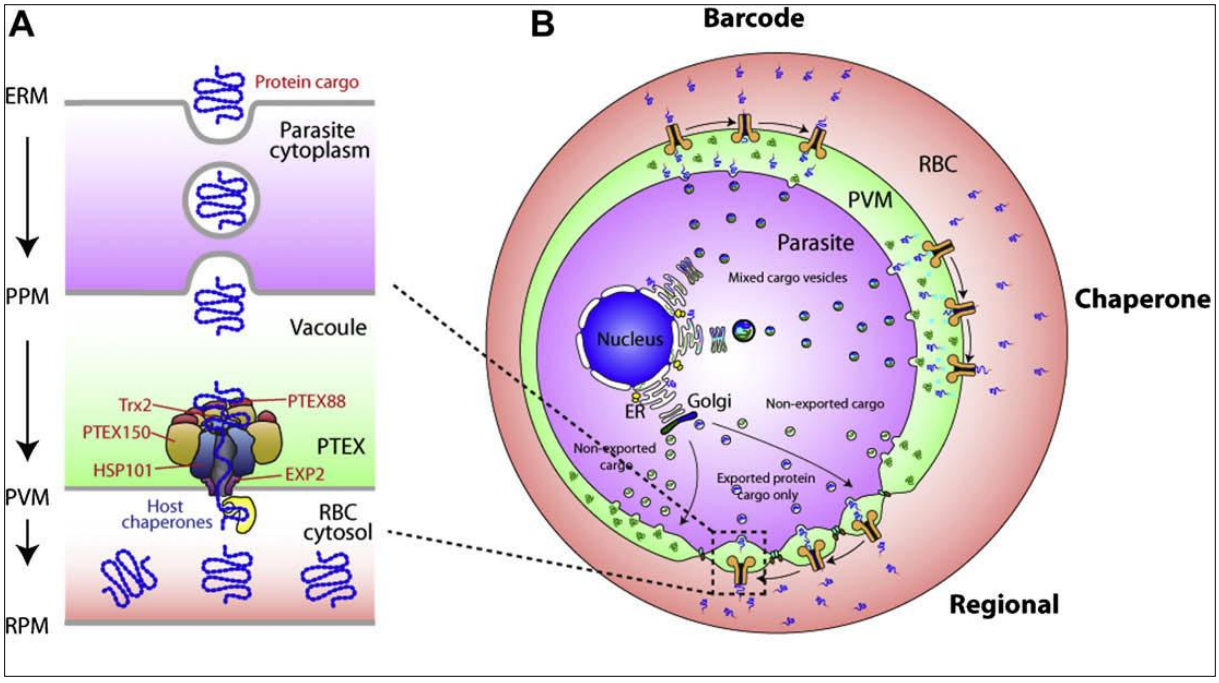


Figure I-3 : Model mécanistique d'adressage de l'exportome à motif PEXEL de *Plasmodium falciparum* dans l'érythrocyte hôte. *Les protéines parasitaires sont adressées au réticulum endoplasmique, où leur motif PEXEL est clivé et leur extrémité N-amino-terminal est acétylée. Celles-ci peuvent ensuite franchir plusieurs compartiments membranaires successifs afin d'atteindre la membrane plasmique érythrocytaire, dont la membrane du parasite, dite membrane parasitophore. Tiré de [23].*

8. La digestion de l'hémoglobine est essentielle au développement du parasite intra-érythrocytaire.

La restructuration de l'érythrocyte s'accompagne d'une digestion progressive de l'hémoglobine par le parasite. Celle-ci commence très tôt après l'invasion et s'intensifie au fil de la maturation du parasite. La digestion de l'hémoglobine culmine au stade trophozoïte avancé [25] et complète l'influx d'acides aminés essentiels généré par les transporteurs membranaires. La digestion de l'hémoglobine ferait intervenir une structure parasitaire appelée le cytostome. Le cytostome est une cavité s'enfonçant dans le corps parasitaire à partir d'une invagination des membranes parasitophores et parasitaires. Des vésicules d'origine cytostomale et renfermant de l'hémoglobine seraient acheminées à la vacuole digestive du parasite, organelle caractérisée par son pH acide entre 5 et 5,5. Dans la vacuole digestive, l'hémoglobine est dégradée sous l'action de cystéine- ou d'aspartique- protéases acides appelées hémoglobinases. L'activité aspartique-protéase des plasmepsines I et II permet de fragmenter l'hémoglobine. Le catabolisme de ces fragments par la cystéine-protéase falcipaïne permet ensuite une biosynthèse protéique parasitaire et l'alimentation du métabolisme énergétique [26]. Néanmoins, l'hème libéré au cours du processus peut endommager le métabolisme parasitaire par inhibition enzymatique, par péroxidation des membranes et via la production de radicaux libres dans la vacuole digestive. L'hème libre est donc détoxifiée, sous l'action de l'hème oxygénase, en cristaux d'hémozoïne [27]. Outre son importance pour compléter la chaîne d'approvisionnement protéique du parasite, la digestion de l'hémoglobine *–occupant près de 95% du volume d'un jeune érythrocyte-* semble également importante pour libérer un espace nécessaire au développement du parasite.

9. L'érythrocyte se rigidifie progressivement dû au développement du parasite asexué.

L'érythrocyte, d'un diamètre moyen de 8-10µm, est caractérisé par sa déformabilité très élevée. Celle-ci lui est essentielle afin de pouvoir circuler au travers des réseaux capillaires très étroits *-par exemple retrouvés au niveau du système réticulo-endothélial (diamètre capillaire inférieur à 5µm)-* et les fentes interendothéliales spléniques *–séparant la pulpe rouge des sinus veineux (diamètre moyen de 2.85µm)-*. La déformabilité de l'érythrocyte repose en partie sur les particularités structurales de son cytosquelette sous-membranaire [15]. Des complexes jonctionnels multiprotéiques flexibles (constitués

d'oligomères d'actines stabilisés par la protéine 4.1R) assurent la cohésion d'hétérodimères de spectrine qui forment un maillage cytosquelettique recouvrant la surface plasmique de la membrane érythrocytaire. La glycophorine et la protéine de la Bande 3 sont des protéines structurales essentielles, en assurant des points d'ancrage du cytosquelette à la membrane [15].

Au cours de son développement intra-érythrocytaire asexué, le parasite exporte un panel de protéines qui entrent en interaction avec le réseau de spectrine cytosquelettique érythrocytaire et altèrent la capacité de l'érythrocyte hôte à se déformer. Ce processus est étroitement associé à la formation des Knobs. L'outil génétique a notamment permis de démontrer l'impact négatif de plusieurs protéines de remodelage d'origine parasitaire sur la déformabilité érythrocytaire [28].

Au stade de développement annulaire, la protéine RESA (*ring-infected erythrocyte surface antigen*) est exportée au travers de la vacuole parasitophore et s'associe avec la spectrine. Une stabilisation du cytosquelette sous-membranaire résulte de cette interaction. A ce stade les érythrocytes parasités sont moyennement déformables. Des éléments de stabilisation supplémentaires surviennent au cours de la seconde moitié du cycle de développement asexués. Ils confèrent à l'érythrocyte un phénotype rigide. Plus précisément, à partir du stade trophozoïte pigmenté/schizonte, les protéines parasitaires KHARP (*knob-associated His-rich protein*) se concentrent et s'auto-assemblent sous la membrane érythrocytaire. Elles forment des structures protubérantes qui interagissent avec la spectrine et supportent l'ancrage carboxy-terminal de PfEMP1 : ce sont les Knobs. L'extrémité N-terminale de PfEMP1, extracellulaire, permet la reconnaissance d'adhésines et la séquestration parasitaire. La protéine PfEMP3 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 3)* interagit avec la spectrine et régule négativement la déformabilité du cytosquelette érythrocytaire. Par ailleurs, les protéines Pf332 et MESA (*mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen*) sont capables de lier les complexes jonctionnels d'actine, ce qui pourrait également compromettre leur degré de flexibilité. De plus, l'association indirecte des clefs de Maurer à la membrane par des structures de relai tubulaires pourrait consolider l'impact stabilisateur rigidifiant sous-jacent à l'édification des Knobs.

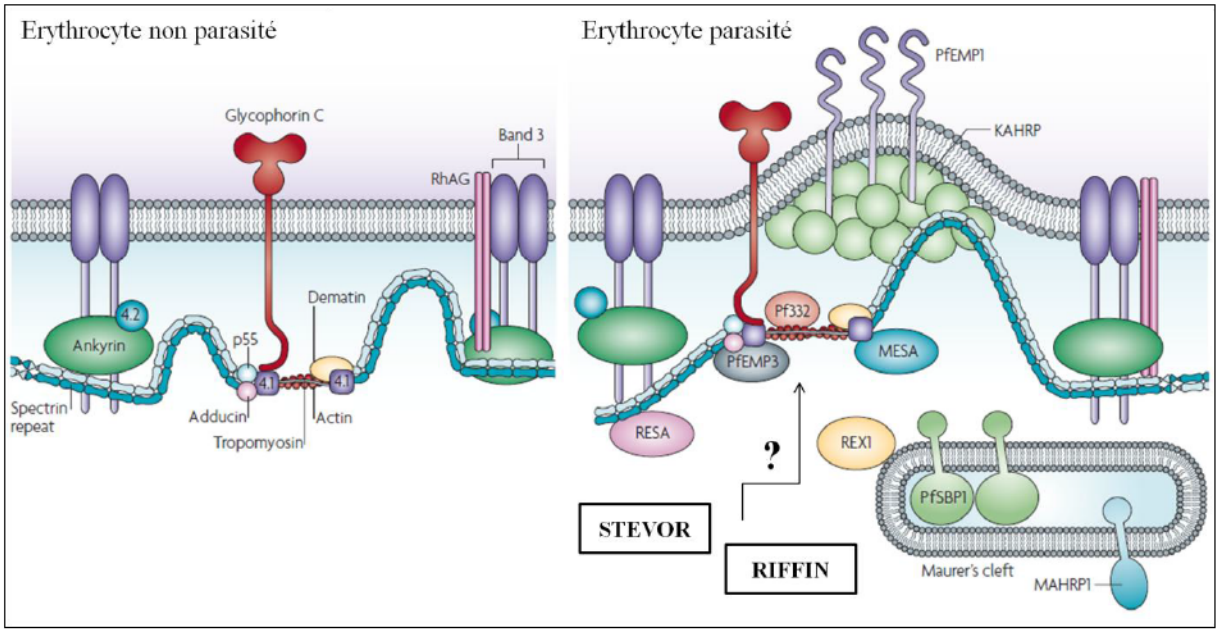


Figure I-4 : Modélisation schématique des cytosquelettes membranaires d'un érythrocyte non parasité et parasité. *Adapté à partir de [15].*

Enfin, les travaux rapportés par Lavazec et *al*. indiquent que l'expression des protéines de surface de la famille STEVOR affecte la déformabilité des érythrocytes parasités [29]. Une telle activité n'est pas exclue pour les protéines RIFINs [30]. Néanmoins, les mécanismes moléculaires par lesquels ces deux familles protéiques modulent la déformabilité des érythrocytes parasités ne sont pas encore démontrés.

Ainsi, la restructuration progressive de l'érythrocyte par le parasite asexué affecte négativement sa déformabilité.

10. Vers la sporogonie : Une fraction de parasites intra-érythrocytaires s'engage dans la gamétocytogénèse afin d'assurer la transmission à l'Anophèle vecteur.

Au cours de chaque cycle de réplication intra-érythrocytaire, un faible pourcentage de parasites asexués s'engage dans une phase de développement intra-érythrocytaire sexuée, appelée gamétocytogénèse. Les évènements inducteurs de ce processus ne sont pas entièrement compris. La gamétocytogénèse génère des gamétocytes, sexués donc de genre mâle ou femelle à caractéristiques propres [1]. Elle s'effectue en ~10 jours dans la moelle osseuse [31] et se caractérise, de même que pour la différenciation des stades asexués, par une différenciation morphologique du parasite et la restructuration de l'érythrocyte hôte. Le

nombre de gamétocytes produits au cours d'un cycle asexué est typiquement exprimé sous le terme « facteur de conversion » et est conditionné par un grand nombre de facteurs, tant *in vitro* qu'*in vivo*. A maturité, les gamétocytes sont libérés dans la circulation sanguine et peuvent êtres ingérés par le vecteur Anophèle, supportant ainsi la transmission du paludisme [2].

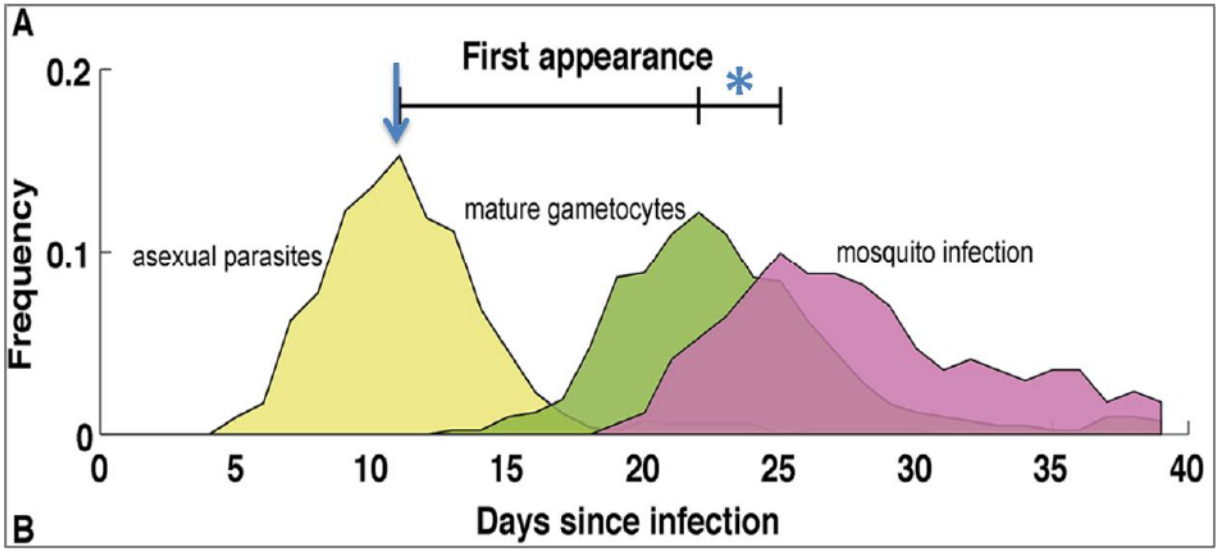


Figure I-5 : développement parasitaire et cinétique de transmission au cours d'une infection à *Plasmodium falciparum* traitée efficacement par un schizonticide (flèche bleue) dépourvu d'activité gamétocytocide. *L'apparition de parasitémies asexuées (jaune) détectables par microscopie survient généralement au cours de la première quinzaine suivant la piqûre infectieuse d'un Anophèle. Un décalage de 10-15 jours entre les pics parasitémique asexué et gamétocytaire (vert) s'explique par la durée de la gamétocytogénèse. Des gamétocytes détectés précocement 10 à 15 jours après l'inoculation de sporozoïtes [32] suggèrent le développement possible de gamétocytes dés le premier cycle de développement asexué intra-érythrocytaire. A maturité, les gamétocytes sont détectés dans le sang des malades. Une période de 2-3 jours (*) leur est nécessaire afin d'acquérir le potentiel de s'activer pour former un zygote suite à leur ingestion par le vecteur Anophèle (violet).Tirée de [33].*

Dans la vacuole digestive de l'Anophèle, la réduction de la température, l'augmentation du pH et l'acide xanthurénique sont autant de stimuli qui induisent l'activation des gamétocytes. L'activation du gamétocyte mâle débute par une restructuration interne suivie de son dégagement hors de l'érythrocyte. Son noyau entreprend alors 3 cycles de division rapides aboutissant à la formation de 8 noyaux. La migration de ces noyaux dans des microfilaments

issus du cytoplasme initial aboutit à la formation de 8 microgamètes motiles (gamètes mâles) chacun à la recherche d'un macrogamète (=gamète femelle). L'activation du gamétocyte femelle se caractérise par la traduction en masse des transcrits stockés durant la gamétocytogénèse et sa sortie hors de son érythrocyte hôte afin d'engendrer un unique macrogamète femelle d'aspect sphérique, via un processus appelé arrondissement (« rounding up of female gametocyte »). Son noyau a entrepris une division réductionnelle. La rencontre d'un micro- et d'un macrogamète haploïdes conduit à la formation d'un zygote diploïde, évènement caractérisant les phases précoces de la sporogonie [34]

.

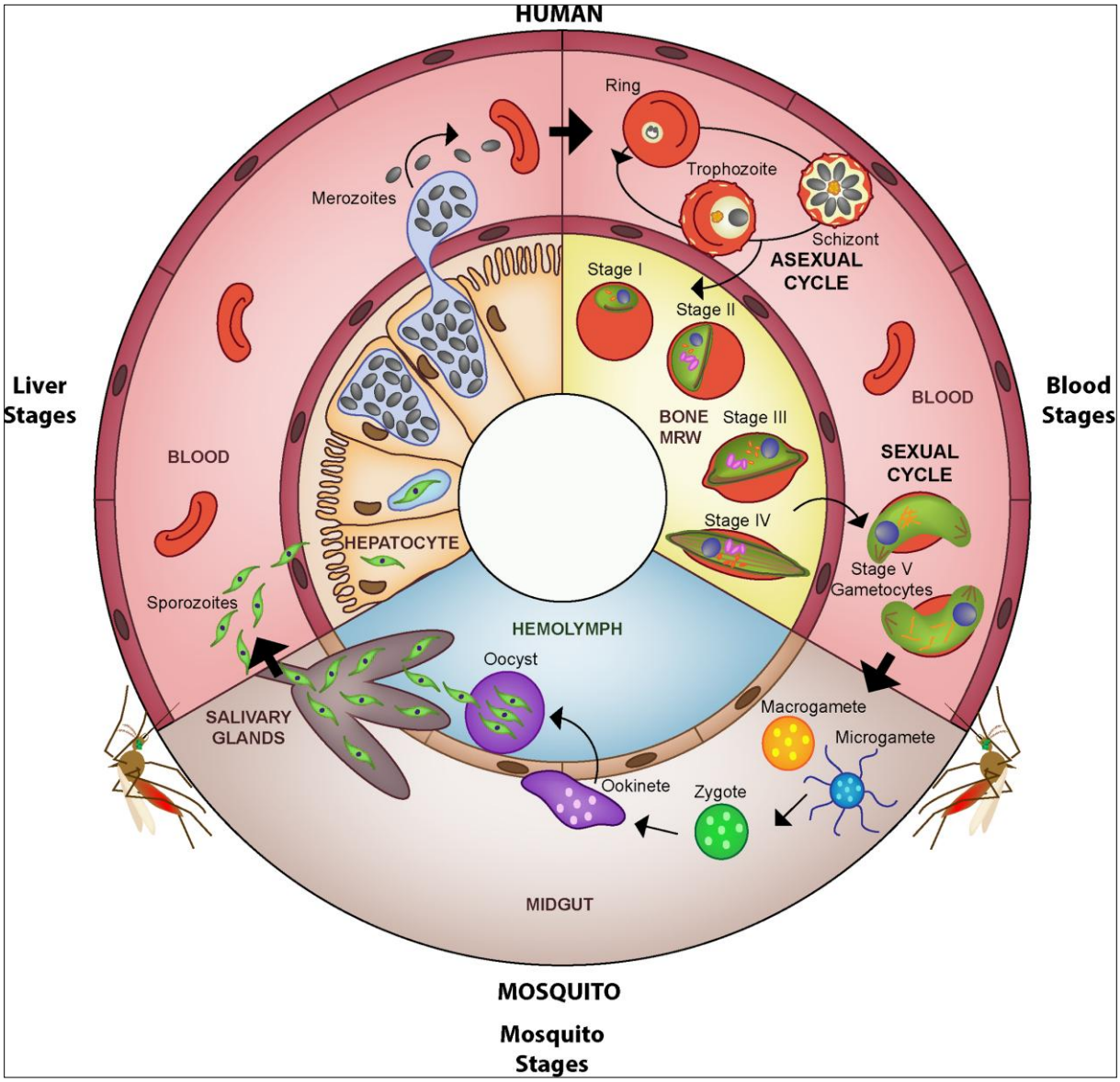


Figure I-6 : Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*. *Tirée de [33].*

11. Résumé

Plasmodium falciparum déploie des processus complexes pour parasiter successivement l'hépatocyte puis l'érythrocyte humain, au cours d'une phase de développement appelée schizogonie. Au terme d'une phase d'amplification hépatique de quelques jours, des milliers de parasites sont libérés dans la circulation sanguine et envahissent des érythrocytes. Le cycle schizogonique érythrocytaire asexué commence. Dans l'érythrocyte, le parasite développe un système membranaire complexe. Ce dernier supporte une machinerie d'échange avec le cytoplasme érythrocytaire et le milieu extracellulaire. En parallèle, le parasite pourvoit à ses besoins énergétiques en catabolisant l'hémoglobine et en développant un système de transporteurs assurant un influx en solutés complémentaires. Les modifications de la membrane et du cytosquelette qui résultent de cette restructuration réduisent considérablement la déformabilité de l'érythrocyte hôte. Au cours de sa différenciation, le parasite est subséquemment qualifié de stade annulaire (moyennement déformable), trophozoïte, puis schizonte (rigide). La libération de mérozoïtes dans la circulation signe l'aboutissement réussi d'un cycle asexué de 48 heures et le début d'un autre. En parallèle, une faible proportion de parasites asexués s'engage sur une différenciation sexuée. Des gamétocytes générés au cours de ce processus pourront êtres ingérés par l'Anophèle lors d'un repas de sang, assurant ainsi la transmission du paludisme.

12. Références

1. **Wery M**. 1995. Protozoologie médicale. De Boeck Supérieur.
2. **Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI**. 2009. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. Annual Review of Microbiology **63**:195–221.
3. **Pradel G, Garapaty S, Frevert U**. 2002. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. Molecular microbiology **45**:637–651.
4. **Pradel G, Garapaty S, Frevert U**. 2004. Kupffer and stellate cell proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. Comp Hepatol **3**:S47.

5. **Silvie O, Franetich J-F, Rénia L, Mazier D**. 2004. Malaria sporozoite: migrating for a living. Trends in molecular medicine **10**:97–100.

6. **Coppi A**. 2005. The Plasmodium circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. Journal of Experimental Medicine **201**:27–33.

7. **Silvie O, Rubinstein E, Franetich J-F, Prenant M, Belnoue E, Rénia L, Hannoun L, Eling W, Levy S, Boucheix C, Mazier D**. 2002. Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. Nature Medicine **9**:93–96.

8. **Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM**. 2006. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. Nature Reviews Microbiology **4**:849–856.

9. **Gomez-Escobar N, Amambua-Ngwa A, Walther M, Okebe J, Ebonyi A, Conway DJ**. 2010. Erythrocyte Invasion and Merozoite Ligand Gene Expression in Severe and Mild *Plasmodium falciparum* Malaria. The Journal of Infectious Diseases **201**:444–452.

10. **Wanaguru M, Crosnier C, Johnson S, Rayner JC, Wright GJ**. 2013. Biochemical Analysis of the Plasmodium falciparum Erythrocyte-binding Antigen-175 (EBA175)-Glycophorin-A Interaction: IMPLICATIONS FOR VACCINE DESIGN. Journal of Biological Chemistry **288**:32106–32117.

11. **Tham W-H, Wilson DW, Lopaticki S, Schmidt CQ, Tetteh-Quarcoo PB, Barlow PN, Richard D, Corbin JE, Beeson JG, Cowman AF**. 2010. Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for Plasmodium falciparum PfRh4 invasion ligand. Proc Natl Acad Sci USA **107**:17327–17332.

12. **Farrow RE, Green J, Katsimitsoulia Z, Taylor WR, Holder AA, Molloy JE**. 2011. The mechanism of erythrocyte invasion by the malarial parasite, Plasmodium falciparum. Seminars in Cell & Developmental Biology **22**:953–960.

13. **Harris PK, Yeoh S, Dluzewski AR, O'Donnell RA, Withers-Martinez C, Hackett F, Bannister LH, Mitchell GH, Blackman MJ**. 2005. Molecular Identification of a Malaria Merozoite Surface Sheddase. PLoS Pathogens **1**:e29.

14. **Gentilini**. 2012. Médecine tropicale - 6e édition. Lavoisier.

15. **Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L**. 2009. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. Nature Reviews Microbiology **7**:341–354.

16. **Dzierzak E, Philipsen S**. 2013. Erythropoiesis: Development and Differentiation. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **3**:a011601–a011601.

17. **Marti M, Baum J, Rug M, Tilley L, Cowman AF**. 2005. Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. The Journal of cell biology **171**:587–592.

18. **Staines HM, Derbyshire ET, Slavic K, Tattersall A, Vial H, Krishna S**. 2010. Exploiting the therapeutic potential of Plasmodium falciparum solute transporters. Trends in Parasitology **26**:284–296.

19. **Mbengue A, Yam XY, Braun-Breton C**. 2012. Human erythrocyte remodelling during Plasmodium falciparum malaria parasite growth and egress. British Journal of Haematology **157**:171–179.

20. **Leech JH, Barnwell JW, Aikawa M, Miller LH, Howard RJ**. 1984. Plasmodium falciparum malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton. The Journal of cell biology **98**:1256–1264.

21. **Mundwiler-Pachlatko E, Beck H-P**. 2013. Maurer's clefts, the enigma of Plasmodium falciparum. Proceedings of the National Academy of Sciences **110**:19987–19994.

22. **Külzer S, Rug M, Brinkmann K, Cannon P, Cowman A, Lingelbach K, Blatch GL, Maier AG, Przyborski JM**. 2010. Parasite-encoded Hsp40 proteins define novel

mobile structures in the cytosol of the P. falciparum-infected erythrocyte: Hsp40s in the P. falciparum-infected erythrocyte. Cellular Microbiology **12**:1398–1420.

23. **Crabb BS, de Koning-Ward TF, Gilson PR**. 2010. Protein export in Plasmodium parasites: From the endoplasmic reticulum to the vacuolar export machine. International Journal for Parasitology **40**:509–513.

24. **Elsworth B, Matthews K, Nie CQ, Kalanon M, Charnaud SC, Sanders PR, Chisholm SA, Counihan NA, Shaw PJ, Pino P, Chan J-A, Azevedo MF, Rogerson SJ, Beeson JG, Crabb BS, Gilson PR, de Koning-Ward TF**. 2014. PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites. Nature **511**:587–591.

25. **Ridley RG**. 1996. Haemozoin formation in malaria parasites: is there a haem polymerase? Trends in Microbiology **4**:253–254.

26. **Wang J-S, Matyjaszewski K**. 1995. Controlled/“ living” radical polymerization. Atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. Journal of the American Chemical Society **117**:5614–5615.

27. **Coronado LM, Nadovich CT, Spadafora C**. 2014. Malarial hemozoin: From target to tool. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1840**:2032–2041.

28. **Maier AG**, **Rug M**, **O’Neill MT**, **Brown M**, **Chakravorty S**, **Szestak T**, **Chesson J**, **Wu Y**, **Hughes K**, **Coppel RL**, **Newbold C**, **Beeson JG**, **Craig A**, **Crabb BS**, **Cowman AF**. 2008. Exported Proteins Required for Virulence and Rigidity of Plasmodium falciparum-Infected Human Erythrocytes. Cell **134**:48–61.

29. **Lavazec C**, **Sanyal S**, **Templeton TJ**. 2007. Expression switching in the *stevor* and *Pfmc-2TM* superfamilies in *Plasmodium falciparum*: Expression switching in *P. falciparum* 2TM superfamilies. Molecular Microbiology **64**:1621–1634.

30. **Lavazec C**, **Sanyal S**, **Templeton TJ**. 2006. Hypervariability within the Rifin, Stevor and Pfmc-2TM superfamilies in Plasmodium falciparum. Nucleic Acids Research **34**:6696–6707.

31. **Joice R, Nilsson SK, Montgomery J, Dankwa S, Egan E, Morahan B, Seydel KB, Bertuccini L, Alano P, Williamson KC, Duraisingh MT, Taylor TE, Milner DA, Marti M**. 2014. Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. Science Translational Medicine **6**:244re5–244re5.

32. **Nilsson SK**, **Childs LM**, **Buckee C**, **Marti M**. 2015. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. PLOS Pathogens **11**:e1004871.

33. **Collins WE**, **Jeffery GM**. 2003. A retrospective examination of mosquito infection on humans infected with Plasmodium falciparum. The American journal of tropical medicine and hygiene **68**:366–371.

34. **Bray RS**, **Garnham PCC**. 1982. The life-cycle of primate malaria parasites. British medical bulletin **38**:117–122.

III. Complexité physiopathologique et thérapeutique du paludisme à *P. falciparum*

-Quelle symptomatologie est associée au paludisme ? Quels sont les critères de gravité ?

-Quelles en sont les causes physiopathologiques et moléculaires ?

-Quelle est la sensibilité des méthodes de diagnostic ? Les différents stades de développement parasitaire contribuent-ils également à cette symptomatologie ?

-Comment expliquer les infections asymptomatiques ? Sont-elles fréquentes ? Qui concernent-elles ?

-Quels outils permettent d'évaluer le potentiel de transmission individuel ? Les malades contribuent-ils de la même façon à la transmission ? Les porteurs sains contribuent-ils à la transmission du paludisme ?

-Les stratégies thérapeutiques actuelles ciblent-elles l'ensemble du réservoir de transmission ? Si oui avec quelle efficacité ?

1. L'accès palustre simple non traité peut évoluer vers un accès grave.

Un accès palustre de primo-invasion apparaît 1 à 2 semaines post-infection et se caractérise par un tableau algique fébrile caractérisé par une fièvre persistante, des céphalées, et/ou des douleurs musculaires, articulaires. Ce tableau peut s'accompagner de troubles digestifs (diarrhées, nausées, vomissements) [1]. Non traité l'accès de primo-invasion peut ensuite évoluer vers un accès palustre simple rythmé ou vers un accès palustre grave. L'accès palustre simple rythmé se manifeste par des épisodes fébriles cycliques décomposées en 3 phases : 1/ des frissons, une sensation de malaise et de froid intense durant 1 à 2 heures, 2/ un épisode fébrile à 39°- 40°C durant 1 à 4 heures et 3/une phase d'hypersudation accompagnant le retour à une température corporelle normale. Le patient, myalgique et asthénique suite à cette accès fébrile, devra s'attendre à la répétition de cette expérience tous les 2 jours jusqu'à une prise en charge thérapeutique efficace. A défaut, l'accès peut évoluer vers un accès grave mettant en jeu le pronostic vital. Un paludisme grave (*severe malaria = complicated malaria*) est défini par au moins une des manifestations cliniques suivantes: une défaillance neurologique (neuropaludisme), des convulsions, une anémie grave, une hémoglobinurie, une hypoglycémie, une hyperlactatémie, une insuffisance rénale aigüe ou un œdème pulmonaire aigu, un ictère, une acidose métabolique, une hyperparasitémie, un collapsus circulatoire ou des saignements spontanés [2]. Ces manifestations cliniques dépendent de l'âge [3]. Tandis

que l'anémie grave et l'hypoglycémie sont fréquentes chez l'enfant, l'insuffisance rénale survient majoritairement chez l'adulte. L'acidose ou l'atteinte neurologique sont observées à tout âge. En zone endémique, ces symptômes graves sont principalement observés chez l'enfant [4]: le paludisme grave est plus fréquent chez les nourrissons n'ayant pas encore acquis une protection par expositions répétées au parasite.

2. Les stades parasitaires asexués sont responsables des symptômes de la maladie.

Les symptômes du paludisme sont généralement attribués aux déterminants pathogéniques des parasites asexués, bien qu'une contribution hypothétique des formes sexuées (gamétocytes, développement médullaire) au profil anémique ne soit pas exclus [5-7].

Les 3 principaux évènements physiopathologiques survenant au cours d'un accès palustre sont : 1/la production et la libération de cytokines par les cellules immunitaires, 2/le développement de phénomènes d'adhésions intercellulaires anormaux et 3/ la clairance (surtout splénique) des érythrocytes infectés de la circulation. Ces 3 évènements sont interconnectés et conditionnent la pathogénicité de *Plasmodium falciparum* [8].

Les phagocytes spléniques sont fortement sollicités durant l'accès palustre. La rate humaine exerce en conditions physiologiques un contrôle mécanique de la déformabilité des érythrocytes circulants [9, 10]. Elle contribue ainsi à l'homéostasie érythrocytaire et circulatoire. Tout érythrocyte de déformabilité réduite (érythrocyte endommagé, sénescent) est mécaniquement retenu dans la rate, puis détruit par les monocytes/macrophages spléniques [11]. Le remodelage de l'érythrocyte par le parasite intracellulaire (Introduction, Chapitre II, sous-chapitre 9) induit une réduction importante de la déformabilité érythrocytaire. Cette déformabilité réduite le sensibilise à une clairance splénique. En conséquence, la sur-activation des phagocytes spléniques par les érythrocytes parasités conduit à une production très importante de cytokines et une hypertrophie splénique (« rate palpable »), voire une splénomégalie selon la durée de l'infection.

De façon intrigante, la clairance splénique des érythrocytes parasités n'est pas à elle seule capable d'expliquer l'importante réduction du nombre d'érythrocytes observée en cas d'accès palustre. Une inhibition de l'érythropoïèse par les cytokines pro-inflammatoires expliquerait le profil anémique y étant associé [12, 13].

Les cytokines produites en masse par les phagocytes spléniques ont des fonctions pyrogéniques et pro-inflammatoires.

-L'interleukine 1ß (IL-1 ß) ou le *Tumor Necrosis Factor* (TNF) induisent une élévation de la température corporelle et contribuent ainsi à lutter contre l'infection, la fièvre permettant de limiter la croissance parasitaire.

-L'interférony (IFN-y) et le TNF sont connus pour induire une réponse inflammatoire systémique favorisant l'expression de molécules d'adhésion par le tissu vasculaire [8].

Ces molécules d'adhésion, représentées entre autre par CD36, la chondroitine sulfate A, l'héparane sulfate, ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*), ou le récepteur du complément CR-1, sont reconnues par des molécules de surface exportées à la surface de l'érythrocyte parasité (PfEMPs, *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Proteins*) [14]. La cytoadhésion des érythrocytes parasités aux cellules endothéliales assurent ainsi leur séquestration vasculaire.

IL est possible que ce processus confère un avantage sélectif au parasite en lui permettant d'échapper à la clairance mécanique splénique à la phase où son développement a rendu sa cellule hôte très peu déformable [15].

En retour, la séquestration des parasites aux niveaux d'organes vitaux, tels le cerveau, les reins ou les poumons, interfère avec leur vascularisation, leur métabolisme et leur fonction [8]. Elle induit des signaux pro-inflammatoires qui altèrent la barrière endothéliale et favorise l'inflammation tissulaire locale. L'hypoxie voire l'anoxie qui peut résulter d'un blocage de la microcirculation sanguine favorise la glycolyse anaérobie et la production d'acide lactique, responsables de l'hypoglycémie et de l'acidose métabolique. D'autre part, l'adhésion des érythrocytes parasités *–via l'expression à leur surface des protéines PfEMP1, STEVOR et RIFIN-* à des érythrocytes sains résulte en la formation de conglomérats érythrocytaires appelés rosettes. Ces dernières pourraient perturber le flux microcirculatoire vasculaire et amplifier la cascade physiopathologique associée à la séquestration parasitaire [16].

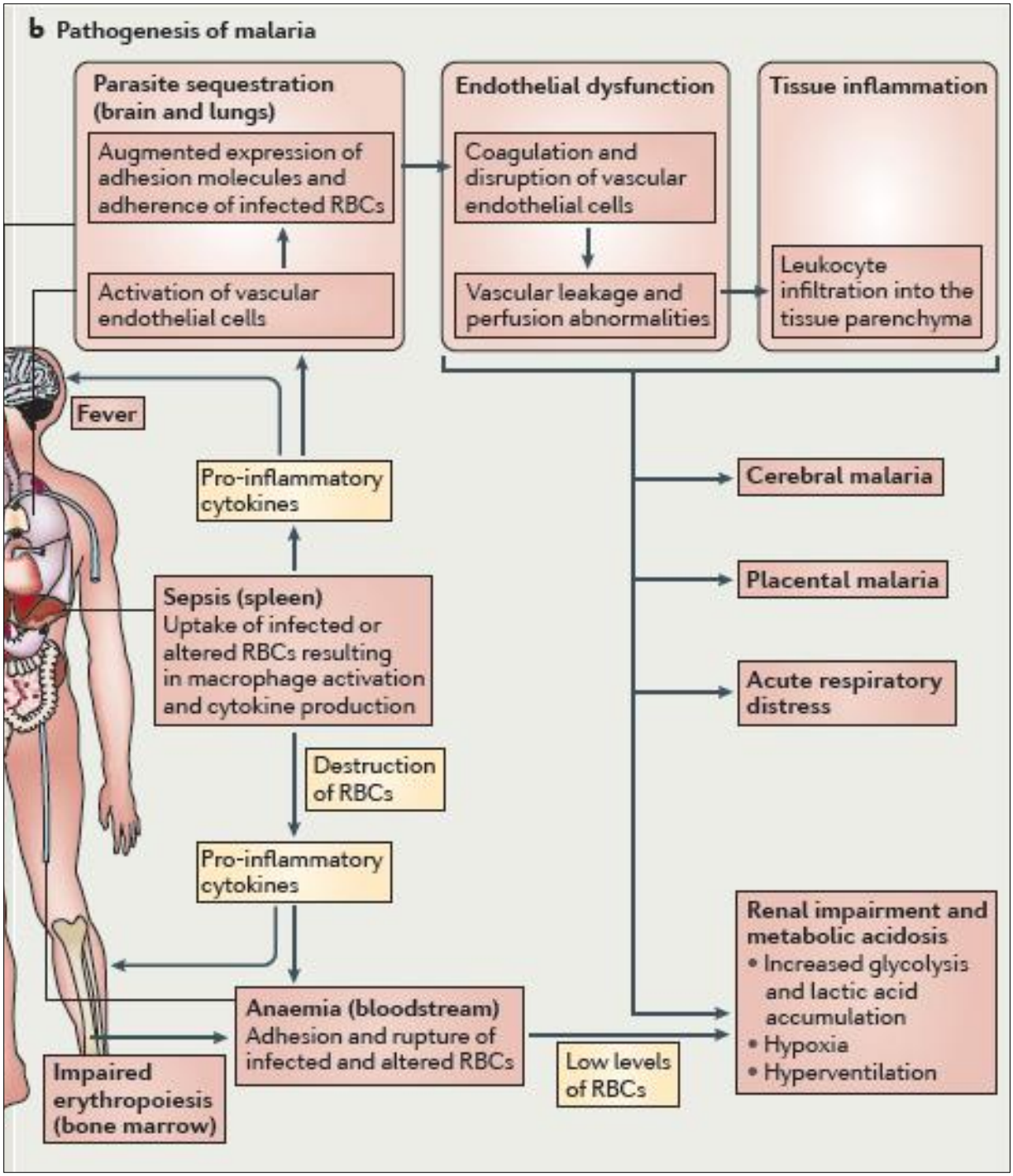


Figure I-7 : Séquence physiopathologique amenant à la symptomatologie de l'accès palustre. *Tirée de [8].*

3. Les protéines PfEMP-1 opèrent la séquestration des érythrocytes parasités et sont le support d'un phénomène de variation antigénique.

La famille multi-protéique PfEMP1 joue un rôle crucial dans la séquestration plasmodiale, donc sa virulence. Les protéines PfEMP1 sont des protéines de surface

érythrocytaires, d'origine parasitaire et ancrées dans les Knobs. L'exposition de ces protéines à la surface de l'érythrocyte parasité implique une restructuration cytosquelettique érythrocytaire réduisant sa formabilité [17]. Hautement polymorphes, les protéines PfEMP1 sont codées par la famille multigénique *var*, regroupant 50 à 60 séquences géniques par génome haploïde et distribuées sur tous les chromosomes du parasite. Les transcrits des gènes var subissent un épissage alternatif [18]. La fréquence avec laquelle les réarrangements génétiques var se produisent est élevée. Cette fréquence doit être liée à l'efficacité de la réponse immunitaire adaptative développée par l'hôte. A chaque cycle de ré-invasion, s'amplifie une proportion de parasites intra-érythrocytaires asexués qui exprime de nouveaux variants PfEMP1 dont les propriétés antigéniques échappent transitoirement au système immunitaire de l'hôte.

En liant préférentiellement des molécules d'adhésion différentes, les différents variants de PfEMP-1 pourraient influencer le tropisme parasitaire *in vivo*. Ainsi, la liaison avec ICAM-1 et CD36 est importante pour la séquestration des érythrocytes parasités au niveau vasculaire ou vasculaire cérébral, tandis que l'héparane sulfate ou la chondroitine sulfate A sont les principaux ligands au niveau du placenta [8, 18, 19]. Les molécules PfEMP1 sont exposées à la surface de l'érythrocyte parasité à partir du stade jeune trophozoïte pigmenté. En conséquence, la réalisation d'un frottis ne permet pas souvent d'apprécier correctement la charge parasitaire totale chez le patient, celle-ci étant sous-estimée en raison de la séquestration très efficace des stades asexués matures.

4. Une sur-activation de la réponse immunitaire contribue probablement à la gravité de l'accès palustre.

Les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) sont des structures microbiennes détectées par les PRRs (*Pathogen Recognition Receptors*), des récepteurs immunitaires présents à la surface de cellules humaines. Suite à leur activation, les PRR enclenchent des cascades de signalisation et des programmes transcriptionnels permettant l'établissement d'une réponse immunologique adaptée aux caractéristiques du pathogène. Dans le cas du paludisme, une sur-activation de cette machinerie de réponse contribue au développement d'une inflammation systémique qui contribue à la genèse de l'accès grave [8].

Les PAMPs les mieux étudiés chez *Plasmodium falciparum* sont le glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) [20] –*une glycoprotéine à fonction structurale essentielle pour le parasite*-,

l'hémozoïne [21] et les motifs nucléiques immunogènes parasitaires (ADN et ARN) [22]. Ces PAMPs sont libérés dans la circulation lors de la rupture des schizontes ou dans le phagolysosome des phagocytes après lyse du globule rouge parasité phagocyté avant sa rupture. Plusieurs types de PRR permettent la reconnaissance de ces PAMPs. Des TLRs (*Toll-Like Receptors*) sont enchâssés dans les membranes phagolysosomiale et plasmique des phagocytes alors que les NLRs (*Nodd-Like Receptors*) sont cytoplasmiques. L'activation de tels PRR par les PAMPs amène les phagocytes à produire des cytokines et les cellules endothéliales à exprimer des molécules d'adhésions [8].

Un certain nombre de DAMPS (*Damaged Associated Molecular Patterns*) -*des composants endogènes libérés par les cellules endommagées/stressées/détruites, saines ou parasitées*- amplifie l'effet des PAMPs durant l'accès palustre : l'acide urique via l'activation de NLRP3 ; des microvésicules d'origine parasitaires via l'activation de TLR4 ; l'hème, issue de l'oxydation de l'hémoglobine, via la formation d'espèces réactives de l'oxygène et l'activation de l'endothélium vasculaire [8].

La réponse immunitaire développée par le malade contribue ainsi à la libération de PAMPs et de DAMPs qui, directement ou indirectement, peuvent participer à une amplification des mécanismes moléculaires relayant l'échappement mécanique -*par séquestration*- et immunologique -*par stimulation de la variation antigénique*- du parasite.

5. Certains polymorphismes érythrocytaires confèrent une protection contre l'accès grave.

Certains polymorphismes érythrocytaires, tels le trait drépanocytaire (DREP, modifications de la chaîne ß d'hémoglobine), les thalassémies (THAL, altération de la synthèse des chaînes de globine) et l'ovalocytose héréditaire de l'Asie du Sud-Est (OVAL, carence d'une protéine du cytosquelette : Bande III) ont un rôle protecteur contre les manifestations cliniques graves de l'accès palustre [23].

D'un point de vue co-évolutif, leur origine ferait intervenir une pression de sélection imposée pendant plusieurs dizaines de milliers d'années par le parasite *Plasmodium falciparum* sur les populations impaludées d'*Homo sapiens* [24]. Dans ce sens, les distributions géographiques des gènes de polymorphismes recouvraient probablement grossièrement celle de circulation de *Plasmodium falciparum* jusqu'à la mise à exécution des mesures de contrôle et d'élimination (GMEP, années 50) [3]. Ces gènes confèreraient un avantage sélectif à

l'individu impaludé et au parasite. Par exemple, une atténuation du potentiel de séquestration parasitaire est observée chez les patients DREP, THAL et OVAL, qui opérerait tout ou partie de la protection contre les accès graves. Cette atténuation du phénomène de séquestration pourrait notamment s'expliquer par une altération des processus de restructuration du cytosquelette d'actine par les parasites [25], résultant en l'expression d'un nombre élevé de Knobs dysmorphiques, probablement moins efficaces en terme de cytoadhérence que des knobs normaux en forme et en nombre [26]. Le développement d'accès palustres non compliqués favorise en retour la persistance de l'infection et sa transmission.

6. Les adultes en zone endémique ne font plus d'accès graves.

L'efficacité d'une réponse immunitaire antipaludique est principalement déterminée par la fréquence et la durée d'exposition de l'individu au parasite. En zone d'endémie, la prévalence élevée des accès palustres favorise l'exposition des individus à de multiples infections sur de longues périodes. Cette exposition chronique au paludisme conditionne le développement d'une immunité acquise, donc naturelle, mais non stérilisante *–protection contre la maladie, mais pas contre l'infection-* et dite « relative à l'exposition » [27]. Elle se développe progressivement avec la répétition des accès palustres et ce d'autant plus rapidement que la fréquence d'exposition est élevée. Ainsi, une relation négative entre l'âge et la gravité des symptômes est globalement observée dans les zones à transmission modérée et élevée [27, 28]. La mortalité y est la plus élevée dans les classes d'âges les plus jeunes. La plupart des individus développent une protection contre les complications létales, tel le neuropaludisme, entre l'âge de 2 et 10 ans. Au-delà de cet âge, ils ont généralement acquis une prémunition dite partielle se traduisant par des accès palustres non compliqués. Cette prémunition partielle peut ensuite évoluer sur le portage asymptomatique [28, 29].

Une fraction importante de la population adulte impaludée est asymptomatique en zone endémique [28, 29, 30]. L'infection asymptomatique repose sur un contrôle efficace de la pathogénèse et/ou de la prolifération parasitaire par le système immunitaire. Dans ce sens, les études rapportent que le développement d'une mémoire humorale polyclonale est essentielle à ce contrôle, avec un rôle majeur joué par les immunoglobulines (Ig) polyclonales de type G1 et G3 dans la protection contre l'accès grave [31, 32]. Par ailleurs, l'immunité antipaludique est très souvent « multi-souche » en zone endémique car les accès palustres sont généralement causés par plusieurs génotypes (ou clones antigéniques) co-infectants. L'exposition chronique

à de multiples souches parasitaires serait donc essentielle pour le développement sur un moyen-long terme d'une prémunition naturelle balayant le spectre génétique parasitaire local, incluant en particulier le répertoire de protéines PfEMP1, peu chevauchant entre clones parasitaires donc comptant probablement plusieurs centaines d'antigènes.

En corollaire, dans les zones à transmission faible ou saisonnière, le recouvrement des infections est plus espacé et une période plus longue est généralement nécessaire pour le développement d'une prémunition partielle. Cependant, la prévalence des infections asymptomatiques, bien que plus faible, n'est pas nulle. Des infections asymptomatiques aux classes d'âges les plus jeunes sont même rapportées [32]. Ce paradoxe suggère le développement rapide d'une immunité humorale antipaludique efficace facilitée par l'exposition des individus à une plus faible diversité génétique parasitaire. En outre, l'acquisition d'une protection contre les formes graves ne semble nécessiter qu'un petit nombre d'infections [33]

De façon générale, les infections asymptomatiques peuvent persister sur plusieurs semaines, mois, ou années. Elles sont globalement caractérisées par des parasitémies asexuées le plus souvent indétectables par les techniques microscopiques conventionnelles (frottis- goutte épaisse, TDR) [34, 35, 36]. Elles jouent un rôle important dans la persistance de la circulation de *Plasmodium falciparum* en zone de transmission pérenne et saisonnière, particulièrement dans l'émergence du pic de transmission observé après une saison sèche [34].

7. Le volume et la structure du réservoir asymptomatique sont mal connus.

Il est actuellement difficile d'appréhender le volume et la structure du réservoir asymptomatique pour plusieurs raisons. D'une part, les méthodes diagnostiques utilisées ne sont pas égales en terme de sensibilité [28, 36]. La méthode diagnostique de référence est l'observation microscopique de frottis sanguins ou de gouttes épaisses colorés au bleu de Giemsa. Le seuil de détection de la goutte épaisse peut varier de 5 à 20 parasites/µL de sang selon que l'analyse soit effectuée en laboratoire ou sur le terrain. Des tests de diagnostic rapides (TDR), basés sur la détection de la CSP (*Circumsporozoite protein*) ou HRP2 (*Histidin Rich Protein 2*) ont une sensibilité et une spécificité supérieures à 90% pour des densités parasitaires ≥ 200 parasites/µL. La PCR, en revanche, représente la méthode

diagnostic d'excellence avec une limite de détection estimée à 0.02 parasites/µL pour les procédures les plus sensibles. Ainsi, un grand nombre de porteurs asymptomatiques à parasitémies sous-microscopiques ne sont pas détectés lorsque l'analyse diagnostique repose sur la réalisation d'un frottis ou les TDR. Or ces individus contribuent activement au réservoir infectieux. Les données indiquent que la microscopie sous-estimerait la prévalence des infections plasmodiales d'environ 50% comparativement à la PCR [28]. Le développement de tests de dépistage moléculaires rapides, sensibles et plus accessibles aux études de terrain est un axe de recherche en développement [37].

D'autre part, la définition clinique non consensuelle d'une infection asymptomatique complexifie les méta-analyses. Cette définition implique généralement la détection de parasites intra-érythrocytaires et une absence de symptômes (généralement, la fièvre) durant une période donnée. Cependant, la durée minimale durant laquelle les individus impaludés ne présentent aucun symptôme -*avant et après diagnostic*- peut varier. Les longues durées ont le désavantage de favoriser l'exclusion d'une proportion de cas sujets à une symptomatologie aspécifique (secondaire à une autre maladie). Dans certaines études, la fièvre est le seul symptôme clinique considéré, tandis que les critères d'inclusion définis pour d'autres études sont moins stricts. Enfin, le suivi d'un traitement antipaludique préalable au diagnostic est parfois considéré comme un facteur d'exclusion. Une nouvelle définition opérationnelle de l'infection asymptomatique a récemment été proposée [28]: toute infection caractérisée par la présence de parasites intra-érythrocytaire, toutes parasitémies confondues et préférablement déterminées par approche moléculaire (PCR), en absence de fièvre durant les 48 dernières heures et en l'absence d'un traitement antipaludique dans les dernières 72 heures.

Enfin, la détection d'une infection asymptomatique repose principalement sur l'exécution d'une opération active de dépistage (*Mass Screen & Treat*, MSaT), associable ou non à une étude clinique ou de terrain. Contrairement aux infections symptomatiques, un recensement passif des porteurs asymptomatiques n'a que très peu de chance d'être rentable en raison de l'absence de bénéfice thérapeutique individuel immédiat. Ainsi, les individus asymptomatiques sont difficilement recensables dans leur totalité, comparativement aux individus symptomatiques qui doivent bénéficier d'une consultation médicale et peuvent ainsi faire l'objet d'un dénombrement plus précis.

8. Des expériences de gorgement d'anophèles femelle permettent d'appréhender la contribution des sujets asymptomatiques à la transmission du paludisme.

L'infectivité *d'Homo sapiens* pour l'Anophèle dépend de la différenciation intra-érythrocytaire de stades asexués en stades sexués, les gamétocytes [38]. Ces derniers sont détectés par microscopie dans moins de 50% des infections [7]. Cependant, il existe un biais technique lié à la sensibilité de cette méthode. Plusieurs études basées sur un diagnostic moléculaire indiquent que le portage de gamétocytes pourrait accompagner la grande majorité des infections symptomatiques et asymptomatiques. Néanmoins, les densités gamétocytaires portées par les individus impaludés sont globalement très faibles comparativement aux formes asexuées qui représentent en général plus de 95% de la biomasse parasitaire totale. Cette faible densité en gamétocytes permettrait de minimiser l'impact de leur présence sur le développement d'une réponse immunitaire. Elle pourrait aussi prévenir le développement massif de gamètes dans l'Anophèle qui influencerait négativement la transmission Homme-vecteur.

La quantification de l'infectivité humaine pour le vecteur repose sur l'évaluation du nombre d'oocystes présents dans une population d'Anophèles qui s'est gorgée de sang impaludé en tenant compte de la période de gestation nécessaire après le repas sanguin. Le gorgement de vecteurs sur volontaire (*direct skin feeding assay,* DSFA) est la méthode la plus informative car elle reflète le mieux l'environnement auquel est confronté l'Anophèle durant un repas sanguin [38, 39, 40]. Cependant l'application de cette méthode est restreinte, pour des raisons éthiques, aux volontaires âgés de plus de 2 ou 3 ans - *excluant ainsi la population associée à la plus haute prévalence en gamétocytes*-. D'autre part, la répétition des expériences est difficile avec le DSFA. Le gorgement de vecteurs au travers d'une membrane artificielle et à partir de cultures de laboratoire enrichies en gamétocytes ou de sang clinique représente donc par défaut la méthode standard (*standard membrane feeding assay,* SMFA) [41].

Le gorgement d'anophèle via le DSFA et le SMFA a montré une corrélation positive entre la présence ou le nombre d'oocystes dans le vecteur et l'infectivité du moustique, donc le développement de sporozoïtes viables et infectieux [41]. L'efficacité d'infection des moustiques est néanmoins plus élevée en DSFA comparé au SMFA, probablement dû à une altération de l'infectivité des gamétocytes sous-jacente à leur manipulation *in vitro* avec le SMFA. La standardisation de ces approches est difficile et un nombre de points important est

nécessaire afin d'établir une analyse scientifique. Les différents résultats générés avec ces méthodes ont cependant permis d'identifier des facteurs importants déterminant le potentiel de transmission associé à des profils infectieux variables, dans des zones de transmission différentes.

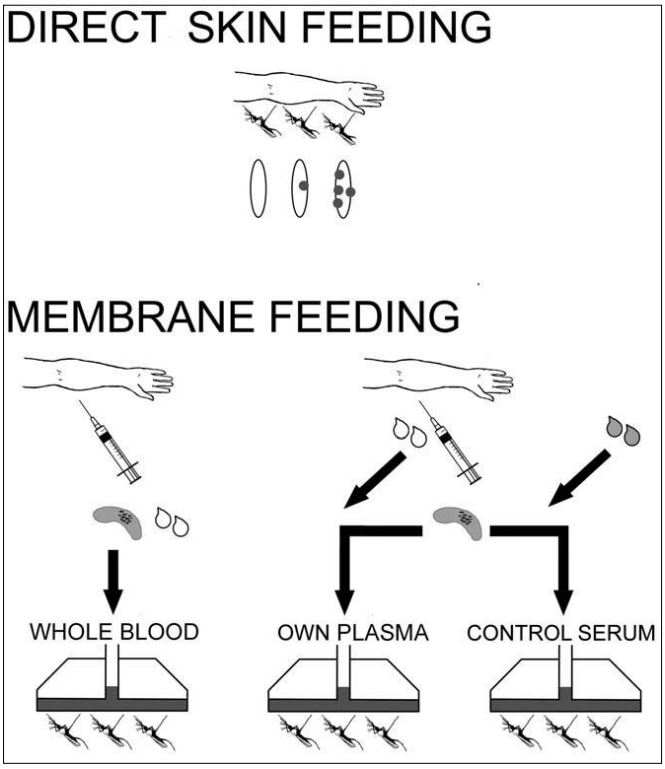


Figure I-8 : Schématisation des principales méthodes d'études par gorgement de moustiques. *Direct skin feeding assay (DSFA) et standard membrane feeding assay (SMFA). Tirée de [41].*

9. Contribution des infections asymptomatiques à la dynamique complexe de transmission du paludisme.

La dynamique de transmission du paludisme n'est pas entièrement comprise mais est sous-tendue par les éléments suivants : 1/ La prévalence gamétocytaire (parasites sexués) succède généralement à celle des asexués, quelque soit leur densité. [7, 38]. 2/ En zone endémique, les densités parasitaires asexuées et sexuées (gamétocytes) diminuent globalement avec l'âge [7, 42, 43]. 3/ Les infections sous-microscopiques sont plus fréquentes chez les classes d'âge hautes et en zone de forte transmission [34, 44]. 4/ Une relation globalement positive, mais non linéaire, existe entre les densités parasitaires asexuées ou sexuées et l'infectivité du porteur sur des vecteurs Anophèles [7, 45, 46]. 5/ Une relation

pourrait exister entre l'âge auquel survient l'accès palustre et l'infectivité des vecteurs [7, 39, 47, 48]. La nature (positive ou négative) de cette dernière association est cependant variable selon les études.

Les informations dégagées ci-dessus suggèrent, entre autre, une contribution importante des facteurs humains et démographiques dans ce puzzle dynamique complexe. En raison de leur prédominance démographique et de leurs importantes densités gamétocytaires, les classes d'âges les plus jeunes contribueraient significativement au réservoir de transmission humain à l'échelle globale. Cependant, la fréquence d'exposition d'un individu impaludé au vecteur Anophèle, donc sa potentielle contribution au réservoir de transmission, devrait être positivement associée à la durée de l'infection. Il est donc vraisemblable que les infections des classes d'âges inférieures, parce que plus souvent symptomatiques, ont tendance à bénéficier d'une prise en charge thérapeutique qui limiterait leur potentiel de transmission sur une période donnée. Par contre, les infections des classes d'âges supérieures, moins souvent traitées parce que moins souvent symptomatiques ont tendance à persister ce qui favorise une contribution ponctuelle faible à la transmission, mais considérable sur la durée totale de l'infection [47-50].

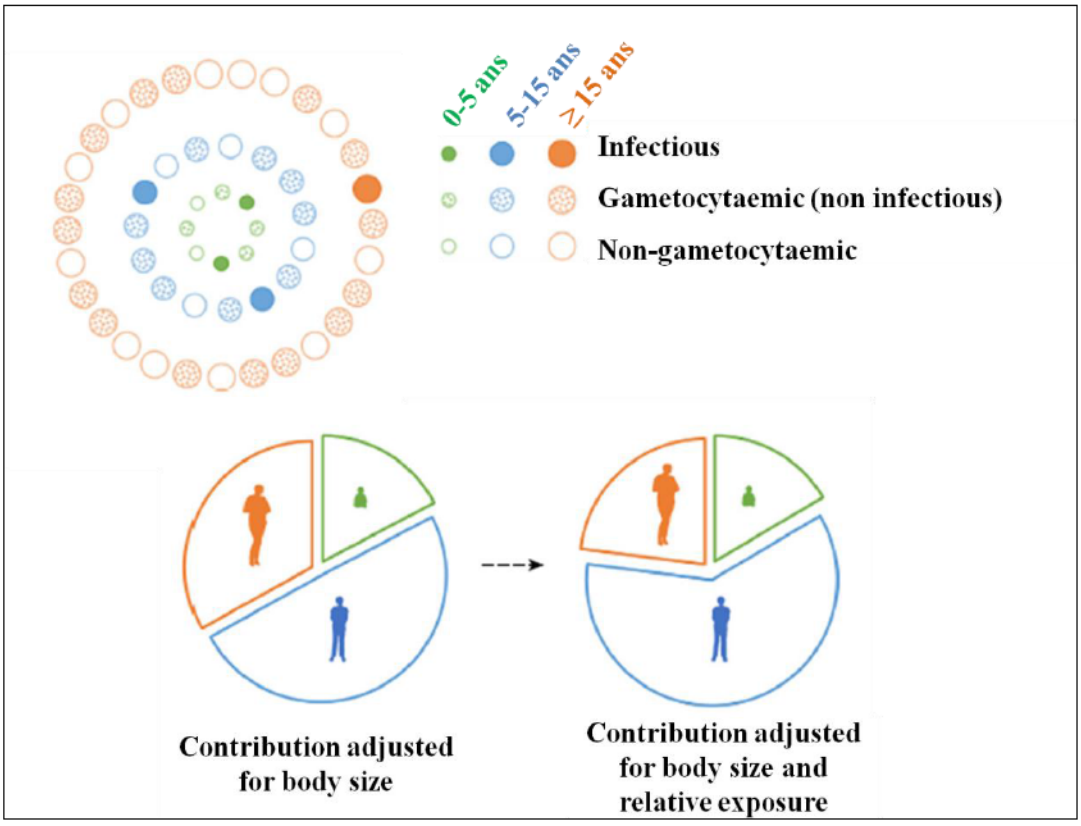


Figure I-9 : Modélisation de la contribution globale des individus impaludés, par classes d'âges et en considérant la surface corporelle et la fréquence d'exposition relative au cours de l'infection, au réservoir de transmission en zone endémique. *Tirée de [48], une méta-analyse exploitant 7 études de terrain.*

Néanmoins, plusieurs facteurs théoriques et empiriques dégagent un axe de complexité supplémentaire qui pourrait expliquer les résultats en contradiction avec cette tendance globale [7] (Par exemple, certaines études indiquent que des gamétocytémies élevées ne résultent pas forcément en l'infection de moustiques, tandis que d'autres, de type sous-microscopiques, y parviennent). Un tropisme gamétocytaire au niveau du réseau capillaire dermique potentialiserait les chances de transmission lors d'un repas de sang du vecteur [7]. L'attractivité des porteurs pour l'Anophèle serait potentiellement conditionnée par les odeurs corporelles et les densités gamétocytaires [51-54]. Les mouvements ou activités humaines (ex : MILD, déforestation et urbanisme, agriculture, migrations des travailleurs, émigrations dues aux guerres) pourraient aussi favoriser un changement comportemental des vecteurs Anophèles (ex : distances parcourues, heures des repas sanguins, cibles des piqûres, piqûres et digestion préférentielles en extérieures = comportement exophagique et exophilique) [55-56]. Une immunité anti-transmission, dépendante de facteurs génétiques humains et de l'environnement auquel est exposé le porteur, pourrait moduler la densité gamétocytaire et le potentiel de transmission associé [57]. La saison des pluies semblerait quant à elle favoriser à un accroissement de l'infectivité des vecteurs [39]. Enfin, des micro-organismes résidents du tube digestif de l'Anophèle pourraient, par phénomène de compétition, réduire l'infectiosité [58] des gamétocytes ingérés et la diversité génétique entomologique (diversité des espèces Anophèles) pourrait déterminer le potentiel d'infectivité et de transmission.

Ainsi, les porteurs de gamétocytes ne participent pas tous de la même façon à la transmission du paludisme et une combinaison complexe de facteurs humains, entomologiques et climatologiques semble pondérer cette contribution.

10. Différents types d'interventions thérapeutiques ciblent le réservoir d'êtres humains asymptomatiques.

Plusieurs approches ciblent le réservoir de transmission du paludisme (infections symptomatiques et asymptomatiques). Parmi, celles-ci, les plus importantes sont les

démarches de traitement de masse (MDA pour Mass Drug Administration), de criblage de masse suivi de traitement (MSaT pour Mass Screen & Treat) et de vaccination.

Le traitement de masse (MDA) concerne l'ensemble d'une population indépendamment du statu individuel porteur ou non, symptomatique ou non. En théorie, la MDA est l'approche anti-transmission la plus efficace. La pérennité du bénéfice est toutefois incertaine. Une récente méta-analyse balayant le spectre complet d'endémicité indique que les campagnes MDA utilisant des doses thérapeutiques d'antipaludiques anti-asexués réduisent substantiellement le risque de transmission initial. En contrepartie, seul un faible nombre d'études montre un bénéfice soutenu au-delà de 6 mois et ne concerne alors que les études conduites en environnement isolé (petites îles ou régions montagneuses) [59]. D'autre part, les MDA sont connues pour générer une pression de sélection pharmacologique qui, dans un contexte de transmission intense compliqué par une dynamique logistique opérationnelle complexe, peut contribuer au risque d'émergence de résistances. Un nouvel intérêt est actuellement porté à l'égard des MDA, mais dans un contexte opérationnel soutenu sur un plus long terme (sur des années) impliquant un recouvrement des zones traitées par des mesures complémentaires préventives (moustiquaires imprégnées d'insecticide : MILD et pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides : PID) et curatives (détection passive et prise en charge des infections symptomatiques) [60]. En effet, l'accès croissant aux MILD combiné aux répétitions des interventions MDA combinant les ACTs et la primaquine, efficaces en zone de transmission faible à modérée ou circonscrite géographiquement, ont de grande chances de pouvoir aider à rétrécir la « malaria map » dans ces prochaines décennies, en accord avec les études de modélisations actuelles [61].

Une approche alternative aux campagnes MDA est le criblage le plus exhaustif possible d'une population à l'aide d'un test de diagnostic rapide (TDR), suivi du traitement des infections détectées : *Mass Screen & Treat* (MSaT) ou stratégie active-agressive par détection de cas. Le bénéfice apporté par le MSaT semble étroitement dépendre de la sensibilité du test diagnostique utilisé, d'un contrôle préventif parallèle (MILD) et potentiellement du niveau d'endémicité de la zone couverte. Une récente étude réalisée par Cook et *al.* [62] a démontré que l'exécution d'une campagne MSaT basée sur l'utilisation de TDR n'a eut aucun effet sur l'incidence de l'accès palustre au Zanzibar en raison d'un seuil de détection trop élevé (parasitémies sous-microscopiques prédominantes). Les auteurs précisent que seul 4% de l'ensemble des individus infectés (test PCR) ont été détectés à l'aide des TDR. En revanche, un dépistage actif par diagnostic microscopique semble bénéfique dans les zones à faible

transmission. Combiné à des mesures préventives efficacement soutenues, un dépistage actif réalisé par diagnostic microscopique a fortement contribué à l'élimination des infections indigènes entre 2012 et 2014 au Sri Lanka [63]. Les modélisations suggèrent toutefois qu'en zones de forte transmission, 1/un impact négligeable des MSaT est prévisible et 2/qu'un abaissement du seuil de détection en deçà de 0.1 parasites/µL serait nécessaire pour privilégier cette approche par rapport aux MDA [64].

11. Le vaccin RTS,S, bien que non optimal, représente une percée dans le champ de la vaccinologie antipaludique.

Les progrès réalisés dans le champ de la vaccinologie antipaludique ont été initialement marqués par plusieurs évènements scientifiques [65]. Les résultats encourageants des études sur l'efficacité des vaccins 1/à base de sporozoïtes atténués par irradiation –*mais toujours métaboliquement actifs*-, puis 2/ à base de sporozoïtes inactivés par mutation génétique se sont vite vus contrebalancés par le développement d'accès palustres observés lors des essais cliniques.

Depuis, les recherches ont essentiellement été focalisées sur le développement de vaccins de sous-unités plasmodiales. Parmi ceux-ci, le vaccin RTS, S, développé par GlaxoSmithKline (GSK), résulte d'une fusion entre de multiples séquences antigéniques de la protéine CSP (*circumsporozoite protein*) et du virus de l'hépatite B, formulée sous une galénique liposomale (adjuvant AS01E). Il cible les phases de développement pré-érythrocytaires. Les essais cliniques de phase III ont été récemment publiés. L'étude le l'efficacité du vaccin a été évaluée 18 mois post-vaccination sur plus de 6500 nourrissons (6-12 semaines) et près de 9000 enfants de 5 à 17 ans, sur 11 sites africains. Les résultats indiquent une efficacité générale modérée chez l'enfant (46%), avec 34% des accès graves évités. Pour le nourrisson, cette efficacité est de 27% contre l'accès simple et nulle contre l'accès grave. De plus, le nombre d'accès graves semble augmenté chez l'enfant vacciné comparativement au contrôle [66]. Une décision de l'OMS est espérée prochainement quant à son éventuelle mise sur le marché. Celle-ci sera conditionnée par la rentabilité financière et le bénéfice apporté par le vaccin, sachant que : 1/les études modélistiques suggèrent une réduction de la prévalence du paludisme et un impact bénéfique significatif sur le réservoir de transmission en zone à faible transmission, uniquement suite à l'exécution d'une campagne de vaccination en masse, 2/ les simulations suggèrent une médiocre efficacité du vaccin RTS,S en zone à forte transmission, 3/ une atténuation du niveau de protection dans la première décennie post-vaccination sous-

tend la répétition des campagnes de vaccination en masse tous les 5-10 ans afin de maintenir le bénéfice apporté en zone à faible transmission, 4/ une rentabilité financière maximale est prédite pour les zones à faible transmission, le prix de vente n'étant pas encore fixé.

Ainsi, le vaccin RTS, S/AS01E apporte une preuve de concept et ouvre la voie sur le développement futur de vaccins à sous-unités plasmodiales améliorés.

Stratégie	**1-Population ciblée 2-Observance**	**Avantage(s)**	**Limite(s)**	**Efficacité en zone de :**
MDA (*mass drug administration*)	1- S = AS 2- S ≥ AS	-Couverture totale -Impact immédiat	-Coopération -Stock médicamenteux = rentabilité financière -Dosage + risque de « fake drugs » = risque de résistance -Efficacité = répétition MDA	Transmission faible, voire modérée ou circonscrite
MSaT (*mass screen and treat*)	1- S ≥ AS 2- S = AS	-Risque d'émergence de résistance réduit -Meilleur gestion du stock médicamenteux	-Coopération -Impact sur moyen/long-terme -Sensibilité des TDR -Efficacité = maintient MSaT	Transmission faible
Vaccin RTS,S	S=AS	-Couverture totale -Impact immédiat	-Efficacité médiocre chez le nourrisson -Efficacité chez l'enfant = vaccination en masse + répétition -rentabilité financière	Transmission faible

Tableau I-1 : Comparaison des stratégies thérapeutiques ciblant le réservoir de transmission asymptomatique (AS) et symptomatique (S).

12. Résumé

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est une parasitose potentiellement létale. Ses symptômes résultent directement et indirectement de la multiplication intra-érythrocytaire de parasites asexués qui ont développé des stratégies pour échapper aux mécanismes de défense de l'organisme humain. Un mécanisme de séquestration vasculaire efficace, opéré essentiellement par des protéines de surface PfEMP1 hautement polymorphes, supporte l'échappement d'une majorité des stades parasitaires matures rigides à une clairance

splénique. La minorité restante est retenue mécaniquement par la rate et contribue via l'activation des macrophages au développement d'une réponse immunitaire qui amplifie la virulence parasitaire. Les infections palustres récurrentes favorisent le développement d'une immunité adaptative qui assure un contrôle de la biomasse parasitaire et atténue la symptomatologie associée. En zone endémique, les infections asymptomatiques sont plus fréquentes chez l'adulte que chez l'enfant, mais sont toutefois également observées en zone de faible transmission et chez l'enfant. Associées au portage de gamétocytes (parasites sexués), les infections symptomatiques et asymptomatiques représentent un réservoir humain hétérogène dont la contribution à la transmission, corrélée positivement aux densités gamétocytaires, est pondérée par une combinaison complexe de facteurs supplémentaires humains, entomologiques et climatiques. Le développement de stratégies opérationnelles curatives (MDA, MSaT) et/ou chimioprophylactiques (vaccinologie, médicaments anti-transmission) recouvrant efficacement l'ensemble du spectre de transmission fait l'objet d'études intensives. Elles impliqueront le maintien, voire le renforcement des mesures préventives (moustiquaires et insecticides) déjà déployées.

13. Références

1. **Grobusch MP**, **Kremsner PG**. 2005. Uncomplicated malaria. Curr Top Microbiol Immunol **295**:83–104.
2. 2000. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg **94 Suppl 1**:S1–90.
3. **White NJ**, **Pukrittayakamee S**, **Hien TT**, **Faiz MA**, **Mokuolu OA**, **Dondorp AM**. 2014. Malaria. Lancet **383**:723–735.
4. **Snow RW**, **Omumbo JA**, **Lowe B**, **Molyneux CS**, **Obiero JO**, **Palmer A**, **Weber MW**, **Pinder M**, **Nahlen B**, **Obonyo C**, **Newbold C**, **Gupta S**, **Marsh K**. 1997. Relation between severe malaria morbidity in children and level of Plasmodium falciparum transmission in Africa. Lancet **349**:1650–1654.

5. **Stepniewska K**, **Price RN**, **Sutherland CJ**, **Drakeley CJ**, **Seidlein L von**, **Nosten F**, **White NJ**. 2008. Plasmodium falciparum gametocyte dynamics in areas of different malaria endemicity. Malaria Journal **7**:249.

6. **Nacher M**, **Singhasivanon P**, **Silachamroon U**, **Treeprasertsuk S**, **Tosukhowong T**, **Vannaphan S**, **Gay F**, **Mazier D**, **Looareesuwan S**. 2002. Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, and severe malaria are associated with increased Plasmodium falciparum gametocyte carriage. J Parasitol **88**:97–101.

7. **Bousema T**, **Drakeley C**. 2011. Epidemiology and Infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. Clinical Microbiology Reviews **24**:377–410.

8. **Gazzinelli RT**, **Kalantari P**, **Fitzgerald KA**, **Golenbock DT**. 2014. Innate sensing of malaria parasites. Nature Reviews Immunology **14**:744–757.

9. **Weed RI**. 1970. The importance of erythrocyte deformability. Am J Med **49**:147–150.

10. **Buffet PA**, **Safeukui I**, **Deplaine G**, **Brousse V**, **Prendki V**, **Thellier M**, **Turner GD**, **Mercereau-Puijalon O**. 2011. The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology. Blood **117**:381–392.

11. **de Back DZ**, **Kostova EB**, **van Kraaij M**, **van den Berg TK**, **van Bruggen R**. 2014. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. Front Physiol **5**.

12. **Chang K-H**, **Stevenson MM**. 2004. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. Int J Parasitol **34**:1501–1516.

13. **Awandare GA**, **Kempaiah P**, **Ochiel DO**, **Piazza P**, **Keller CC**, **Perkins DJ**. 2011. Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. Am J Hematol **86**:155–162.

14. **Chulay JD**, **Ockenhouse CF**. 1990. Host receptors for malaria-infected erythrocytes. Am J Trop Med Hyg **43**:6–14.

15. **Dhangadamajhi G**, **Kar SK**, **Ranjit M**. 2010. The Survival Strategies of Malaria Parasite in the Red Blood Cell and Host Cell Polymorphisms. Malaria Research and Treatment **2010**:1–9.

16. **Wang CW**, **Hviid L**. 2015. Rifins, rosetting, and red blood cells. Trends in Parasitology **31**:285–286.

17. **Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L**. 2009. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. Nature Reviews Microbiology **7**:341–354.

18. **Craig A**, **Scherf A**. 2001. Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. Molecular and biochemical parasitology **115**:129–143.

19. **Baruch DI**, **Gormely JA**, **Ma C**, **Howard RJ**, **Pasloske BL**. 1996. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:3497–3502.

20. **Debierre-Grockiego F**, **Schwarz RT**. 2010. Immunological reactions in response to apicomplexan glycosylphosphatidylinositols. Glycobiology **20**:801–811.

21. **Griffith JW**, **Sun T**, **McIntosh MT**, **Bucala R**. 2009. Pure Hemozoin Is Inflammatory In Vivo and Activates the NALP3 Inflammasome via Release of Uric Acid. The Journal of Immunology **183**:5208–5220.

22. **Sharma S**, **DeOliveira RB**, **Kalantari P**, **Parroche P**, **Goutagny N**, **Jiang Z**, **Chan J**, **Bartholomeu DC**, **Lauw F**, **Hall JP**, **Barber GN**, **Gazzinelli RT**, **Fitzgerald KA**, **Golenbock DT**. 2011. Innate Immune Recognition of an AT-Rich Stem-Loop DNA Motif in the Plasmodium falciparum Genome. Immunity **35**:194–207.

23. **Cserti CM**, **Dzik WH**. 2007. The ABO blood group system and Plasmodium falciparum malaria. Blood **110**:2250–2258.

24. **Kwiatkowski DP**. 2005. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. Am J Hum Genet **77**:171–192.

25. **Cyrklaff M**, **Sanchez CP**, **Frischknecht F**, **Lanzer M**. 2012. Host actin remodeling and protection from malaria by hemoglobinopathies. Trends in Parasitology **28**:479–485.

26. **Cholera R**, **Brittain NJ**, **Gillrie MR**, **Lopera-Mesa TM**, **Diakité SAS**, **Arie T**, **Krause MA**, **Guindo A**, **Tubman A**, **Fujioka H**, **Diallo DA**, **Doumbo OK**, **Ho M**, **Wellems TE**, **Fairhurst RM**. 2008. Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. Proc Natl Acad Sci USA **105**:991–996.**Doolan DL**, **Dobano C**, **Baird JK**. 2009. Acquired Immunity to Malaria. Clinical Microbiology Reviews **22**:13–36.

27. **Smith T**, **Genton B**, **Baea K**, **Gibson N**, **Taime J**, **Narara A**, **Al-Yaman F**, **Beck HP**, **Hii J**, **Alpers M**. 1994. Relationships between Plasmodium falciparum infection and morbidity in a highly endemic area. Parasitology **109 (Pt 5)**:539–549.

28. **Lindblade KA**, **Steinhardt L**, **Samuels A**, **Kachur SP**, **Slutsker L**. 2013. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. Expert Rev Anti Infect Ther **11**:623–639.

29. **Stresman GH**, **Stevenson JC**, **Ngwu N**, **Marube E**, **Owaga C**, **Drakeley C**, **Bousema T**, **Cox J**. 2014. High Levels of Asymptomatic and Subpatent Plasmodium falciparum Parasite Carriage at Health Facilities in an Area of Heterogeneous Malaria Transmission Intensity in the Kenyan Highlands. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **91**:1101–1108.

30. **Coura JR**, **Suárez-Mutis M**, **Ladeia-Andrade S**. 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection-a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **101**:229–237.

31. **Bouharoun-Tayoun H**, **Attanath P**, **Sabchareon A**, **Chongsuphajaisiddhi T**, **Druilhe P**. 1990. Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. J Exp Med **172**:1633–1641.

32. **Guiyedi V**, **Bécavin C**, **Herbert F**, **Gray J**, **Cazenave P-A**, **Kombila M**, **Crisanti A**, **Fesel C**, **Pied S**. 2015. Asymptomatic Plasmodium falciparum infection in children is associated with increased auto-antibody production, high IL-10 plasma levels and antibodies to merozoite surface protein 3. Malaria Journal **14**.

33. **Gupta S**, **Snow RW**, **Donnelly CA**, **Marsh K**, **Newbold C**. 1999. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. Nat Med **5**:340–343.

34. **Okell LC**, **Bousema T**, **Griffin JT**, **Ouédraogo AL**, **Ghani AC**, **Drakeley CJ**. 2012. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. Nature Communications **3**:1237.

35. **Lin JT**, **Saunders DL**, **Meshnick SR**. 2014. The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? Trends in Parasitology **30**:183–190.

36. **Tangpukdee N**, **Duangdee C**, **Wilairatana P**, **Krudsood S**. 2009. Malaria Diagnosis: A Brief Review. The Korean Journal of Parasitology **47**:93.

37. **Hänscheid T**, **Grobusch MP**. 2002. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? Trends Parasitol **18**:395–398.

38. **Nilsson SK**, **Childs LM**, **Buckee C**, **Marti M**. 2015. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. PLOS Pathogens **11**:e1004871.

39. **Ouédraogo AL**, **Gonçalves BP**, **Gnémé A**, **Wenger EA**, **Guelbeogo MW**, **Ouédraogo A**, **Gerardin J**, **Bever CA**, **Lyons H**, **Pitroipa X**, **others**. 2015. Dynamics of the human infectious reservoir for malaria determined by mosquito feeding assays and ultra-sensitive malaria diagnosis in Burkina Faso. Journal of Infectious Diseases jiv370.

40. **Gaye A**, **Bousema T**, **Libasse G**, **Ndiath MO**, **Konaté L**, **Jawara M**, **Faye O**, **Sokhna C**. 2015. Infectiousness of the human population to Anopheles arabiensis by direct skin feeding in an area hypoendemic for malaria in Senegal. Am J Trop Med Hyg **92**:648–652.

41. **Bousema T**, **Dinglasan RR**, **Morlais I**, **Gouagna LC**, **van Warmerdam T**, **Awono-Ambene PH**, **Bonnet S**, **Diallo M**, **Coulibaly M**, **Tchuinkam T**, **Mulder B**, **Targett G**, **Drakeley C**, **Sutherland C**, **Robert V**, **Doumbo O**, **Touré Y**, **Graves PM**, **Roeffen W**, **Sauerwein R**, **Birkett A**, **Locke E**, **Morin M**, **Wu Y**, **Churcher TS**. 2012. Mosquito Feeding Assays to Determine the Infectiousness of Naturally Infected Plasmodium falciparum Gametocyte Carriers. PLoS ONE **7**:e42821.

42. **Koepfli C**, **Robinson LJ**, **Rarau P**, **Salib M**, **Sambale N**, **Wampfler R**, **Betuela I**, **Nuitragool W**, **Barry AE**, **Siba P**, **Felger I**, **Mueller I**. 2015. Blood-Stage Parasitaemia and Age Determine Plasmodium falciparum and P. vivax Gametocytaemia in Papua New Guinea. PLOS ONE **10**:e0126747.

43. **Shah NK**, **Poole C**, **MacDonald PDM**, **Srivastava B**, **Schapira A**, **Juliano JJ**, **Anvikar A**, **Meshnick SR**, **Valecha N**, **Mishra N**. 2013. Epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytemia in India: prevalence, age structure, risk factors and the role of a predictive score for detection. Tropical Medicine & International Health **18**:800–809.

44. **Okell LC**, **Ghani AC**, **Lyons E**, **Drakeley CJ**. 2009. Submicroscopic Infection in *Plasmodium falciparum* Endemic Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis. The Journal of Infectious Diseases **200**:1509–1517.

45. **Ross A**, **Killeen G**, **Smith T**. 2006. Relationships between host infectivity to mosquitoes and asexual parasite density in Plasmodium falciparum. The American journal of tropical medicine and hygiene **75**:32–37.

46. **Churcher TS**, **Bousema T**, **Walker M**, **Drakeley C**, **Schneider P**, **Ouédraogo AL**, **Basáñez M-G**. 2013. Predicting mosquito infection from Plasmodium falciparum gametocyte density and estimating the reservoir of infection. Elife **2**:e00626.

47. **Drakeley CJ**, **Akim NIJ**, **Sauerwein RW**, **Greenwood BM**, **Targett GAT**. 2000. Estimates of the infectious reservoir of Plasmodium falciparum malaria in The Gambia and in Tanzania. Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene **94**:472–476.

48. **Stone W**, **Gonçalves BP**, **Bousema T**, **Drakeley C**. 2015. Assessing the infectious reservoir of falciparum malaria: past and future. Trends in Parasitology **31**:287–296.

49. **Alves FP**, **Gil LHS**, **Marrelli MT**, **Ribolla PEM**, **Camargo EP**, **Da Silva LHP**. 2005. Asymptomatic carriers of Plasmodium spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. J Med Entomol **42**:777–779.

50. **Gaye A**, **Bousema T**, **Libasse G**, **Ndiath MO**, **Konaté L**, **Jawara M**, **Faye O**, **Sokhna C**. 2015. Infectiousness of the human population to Anopheles arabiensis by direct skin feeding in an area hypoendemic for malaria in Senegal. Am J Trop Med Hyg **92**:648–652.

51. **Smallegange RC**, **van Gemert G-J**, **van de Vegte-Bolmer M**, **Gezan S**, **Takken W**, **Sauerwein RW**, **Logan JG**. 2013. Malaria Infected Mosquitoes Express Enhanced Attraction to Human Odor. PLoS ONE **8**:e63602.

52. **Himeidan YE**, **Elbashir MI**, **Adam I**. 2004. Attractiveness of pregnant women to the malaria vector, Anopheles arabiensis, in Sudan. Ann Trop Med Parasitol **98**:631–633.

53. **Ansell J**, **Hamilton KA**, **Pinder M**, **Walraven GEL**, **Lindsay SW**. 2002. Short-range attractiveness of pregnant women to Anopheles gambiae mosquitoes. Trans R Soc Trop Med Hyg **96**:113–116.

54. **Lacroix R**, **Mukabana WR**, **Gouagna LC**, **Koella JC**. 2005. Malaria Infection Increases Attractiveness of Humans to Mosquitoes. PLoS Biology **3**:e298.

55. **Geissbühler Y**, **Chaki P**, **Emidi B**, **Govella NJ**, **Shirima R**, **Mayagaya V**, **Mtasiwa D**, **Mshinda H**, **Fillinger U**, **Lindsay SW**, **Kannady K**, **Castro MC de**, **Tanner M**, **Killeen GF**. 2007. Interdependence of domestic malaria prevention measures and mosquito-human interactions in urban Dar es Salaam, Tanzania. Malaria Journal **6**:126.

56. **Martens P**, **Hall L**. 2000. Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. Emerg Infect Dis **6**:103–109.

57. **Lawaly YR**, **Sakuntabhai A**, **Marrama L**, **Konate L**, **Phimpraphi W**, **Sokhna C**, **Tall A**, **Diène Sarr F**, **Peerapittayamongkol C**, **Louicharoen C**, **Schneider BS**, **Levescot A**, **Talman A**, **Casademont I**, **Menard D**, **Trape J-F**, **Rogier C**, **Kaewkunwal J**, **Sura T**, **Nuchprayoon I**, **Ariey F**, **Baril L**, **Singhasivanon P**, **Mercereau-Puijalon O**, **Paul R**. 2010. Heritability of the Human Infectious Reservoir of Malaria Parasites. PLoS ONE **5**:e11358.

58. **Bian G**, **Joshi D**, **Dong Y**, **Lu P**, **Zhou G**, **Pan X**, **Xu Y**, **Dimopoulos G**, **Xi Z**. 2013. Wolbachia invades Anopheles stephensi populations and induces refractoriness to Plasmodium infection. Science **340**:748–751.

59. **Poirot E**, **Skarbinski J**, **Sinclair D**, **Kachur SP**, **Slutsker L**, **Hwang J**. 2013. Mass drug administration for malaria. Cochrane Database Syst Rev **12**.

60. **Okell LC**, **Griffin JT**, **Kleinschmidt I**, **Hollingsworth TD**, **Churcher TS**, **White MJ**, **Bousema T**, **Drakeley CJ**, **Ghani AC**. 2011. The Potential Contribution of Mass Treatment to the Control of Plasmodium falciparum Malaria. PLoS ONE **6**:e20179.

61. **Eziefula AC**, **Gosling R**, **Hwang J**, **Hsiang MS**, **Bousema T**, **von Seidlein L**, **Drakeley C**, **others**. 2012. Rationale for short course primaquine in Africa to interrupt malaria transmission. Malar J **11**:360.

62. **Cook J**, **Xu W**, **Msellem M**, **Vonk M**, **Bergström B**, **Gosling R**, **Mafazy A-W Al-**, **McElroy P**, **Molteni F**, **Abass AK**, **Garimo I**, **Ramsan M**, **Ali A**, **Mårtensson A**, **Björkman A**. 2015. Mass screening and treatment on the basis of results of a Plasmodium falciparum-specific rapid diagnostic test did not reduce malaria incidence in Zanzibar. J Infect Dis **211**:1476–1483.

63. **Wickremasinghe R**, **Fernando SD**, **Thillekaratne J**, **Wijeyaratne PM**, **Wickremasinghe AR**. 2014. Importance of active case detection in a malaria elimination programme. Malar J **13**:186.

64. **Gerardin J**, **Eckhoff P**, **Wenger EA**. 2015. Mass campaigns with antimalarial drugs: a modelling comparison of artemether-lumefantrine and DHA-piperaquine with and without primaquine as tools for malaria control and elimination. BMC infectious diseases **15**:144.

65. **Halbroth BR**, **Draper SJ**. 2015. Recent Developments in Malaria Vaccinology, p. 1–49. *In* Advances in Parasitology. Elsevier.

66. **Krishna S**. 2014. Efficacy and Safety of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination: A Phase 3 Randomized, Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites. PLoS Med **11**.

IV. Le gamétocyte, un stade parasitaire minoritaire dont les interactions complexes avec l'hôte humain aboutissent à une transmission efficace à l'anophèle.

-D'où proviennent les gamétocytes ? Quelle est leur rôle dans l'infection ? Participent-ils à la symptomatologie de l'accès palustre ?

-Quels changements moléculaires, structuraux et phénotypiques accompagnent la gamétocytogénèse ?

-Peut-on détecter les gamétocytes dans le sang ? Pourquoi ? Ou séquestrent-ils ? Comment ?

-Quels mécanismes régulent l'engagement d'un parasite asexué dans la gamétocytogénèse ?

-Le taux de conversion gamétocytaire peut-il varier ? Pourquoi et comment ?

-Comment différencier les genres gamétocytaires ? Les proportions de gamétocytes mâles et femelles sont-elles identiques ? Si non, pourquoi ?

-Les gamétocytes mâles et femelles répondent-ils de la même façon aux médicaments ?

1. La gamétocytogénèse se caractérise par une différenciation morphologique parasitaire.

Les gamétocytes sont des stades parasitaires sexués exprimant une différenciation de genre. A chaque cycle de ré-invasion asexué, une proportion minoritaire des parasites -*moins de 5% de la biomasse*- s'engage dans un développement sexué : la gamétocytogénèse [1]. La gamétocytogénèse s'effectue en ~10 jours *in vivo* et *in vitro*. Elle se caractérise par une différenciation morphologique, appréciable par examen au microscope des frottis sanguins colorés au Giemsa. Le suivi de cette étape du développement parasitaire utilise une classification en 5 stades notés I à V initialement proposée par Field & Shute en 1956 [2]. Les gamétocytes sont dits « immatures » du stade I à IV et « matures » au stade V. Leur différenciation s'accompagne du développement d'un cytosquelette de tubuline [3] et d'actine [4] leur conférant, à maturité, un aspect en faucille (*crescent-shaped*) [5], étymologie du nom de l'espèce *falciparum*.

-Stade I : A ce stade initial, les gamétocytes sont difficilement différenciés des parasites asexués dits trophozoïtes pigmentés. Caractérisés par un corps ovalaire, ils sont parfois plus volumineux. Leur noyau, bleu-violacé après coloration au Bleu de Giemsa, est plus dense. Les

pigments malariques de couleur brunâtre (hémozoïne) sont plus abondants et relativement plus dispersés. Ils apparaissent entre 24 et 72 heures après l'invasion érythrocytaire *in vitro*.

-Stade II (3 à 5 jours post-invasion) : Plus aisément discriminables des parasites asexués, une sous-classification permet de les différencier en stades de développement IIa et IIb. Le stade IIa, en forme d'amande, comporte des extrémités pointues renfermant une forte densité en actine F et définissant une imparfaite symétrie bi-axiale. Un réseau microtubulaire axial monolatéral s'étend en faisceau depuis cette extrémité apicale. Au stade IIb, une densification du réseau microtubulaire monolatéral (suggérant une force de contraction) accompagne l'aplatissement d'une des 2 faces du gamétocyte et l'acquisition d'un aspect de demi-disque. Un réseau cytosquelettique d'actine fortifié par quelques prolongements tubulaires tapisse le flan courbé du gamétocyte. Une co-localisation actine-tubuline est marquée aux apex du parasite. La mitochondrie se ramifie. Un ratio longueur/largeur ~2 est calculable tandis que le volume et la surface de l'érythrocyte parasité restent stables.

-stade III (4 à 7 jours post-invasion) : Des boursouflures apparaissent au niveau des extrémités apicales du parasite et lui confèrent un aspect en forme de « chapeau de Napoléon ». Ces boursouflures renferment une concentration importante en tubuline et en actine et pourraient constituer des centres de nucléation. L'allongement du côté basal gamétocytaire favorise un ratio longueur/largeur plus important de l'ordre de 4. Les faisceaux de tubulines poursuivent leur assemblement sur le flan courbé du gamétocyte, qui concentre entre autre le matériel génétique, la mitochondrie et l'apicoplaste. La digestion simultanée de l'hémoglobine érythrocytaire par le gamétocyte s'accompagne d'une réduction progressive du volume érythrocytaire.

-stade IV (7 à 9 jours post-invasion) : le flan courbé du gamétocyte s'est rétracté, le corps du gamétocyte s'est affiné et allongé. Les extrémités apicales du gamétocyte sont pointues et riches en actine F. Une symétrie bi-axiale est restaurée. Les organelles demeurent centralisées et repoussent le matériel génétique à l'une des extrémités du gamétocyte. La mitochondrie a établi un réseau branché recouvrant l'apicoplaste. Un quadrillage de tubuline recouvre l'ensemble de la surface interne du gamétocyte. Le rapport longueur/largeur est d'environ 3.

-stade V (8-15 jours post-invasion): le cytosquelette d'actine et de tubuline se désassemblerait partiellement, adoptant une structure plus lâche résultant en un marquage plus diffus en immunofluorescence. Les extrémités initialement pointues sont désormais arrondies. Le volume occupé par l'érythrocyte hôte est très réduit, de sorte que sa membrane peut parfois

être indissociable de celle du gamétocyte visuellement. Le gamétocyte mature présente une forme de faucille ou de croissant.

Il est possible de différencier les gamétocytes mâles des gamétocytes femelles. Les gamétocytes mâles prennent une couleur rosâtre après coloration au Giemsa [6]. Ils sont caractérisés par l'absence de nucléole et des pigments malariques disséminés dans le corps parasitaire. Les gamétocytes femelles apparaissent bleu-violacés, leurs pigments sont concentrés localement. Ils possèdent un nucléole [7]. Les gamétocytes matures de *P. falciparum* sont détectables dans le sang entre 7 et 15 jours après l'apparition des parasites asexués dont ils dérivent [1, 8]. Les tout premiers cycles de réplication asexuée peuvent s'accompagner d'une gamétocytogénèse *in vivo*.

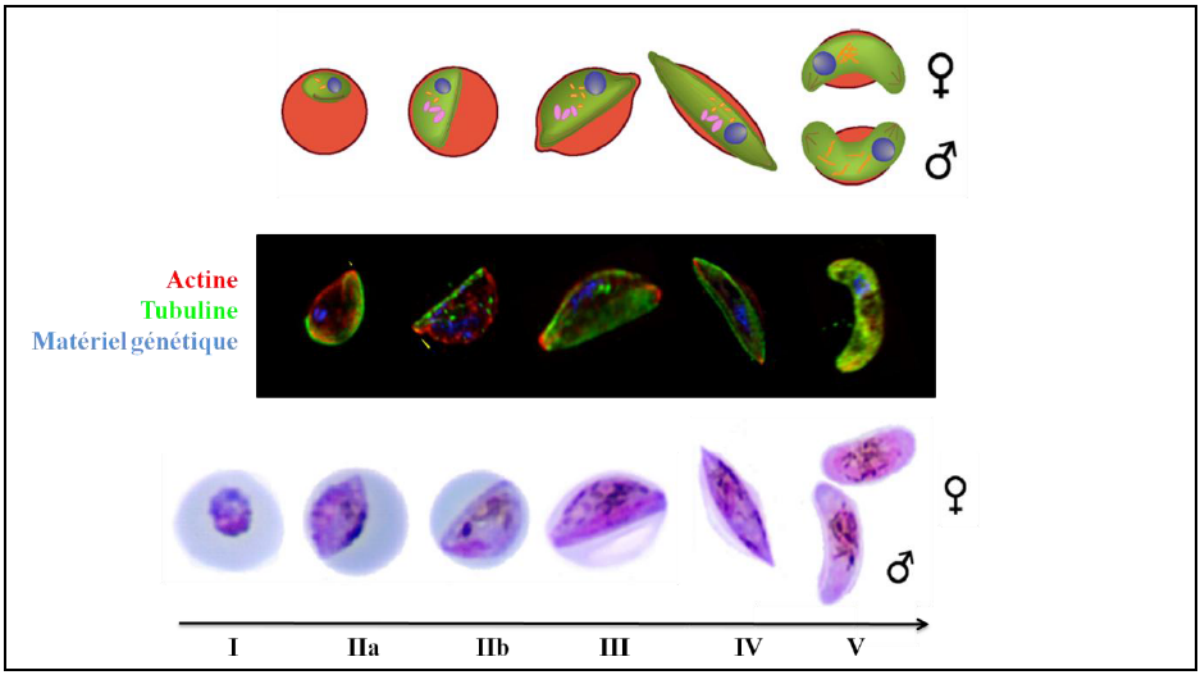


Figure I-10 : Différenciation morphologique des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* en rapport avec leur remodelage cytosquelettique d'actine et de tubuline mis en valeur par immunofluorescence. *Adaptée à partir de [1, 3, 8]*

2. Un réseau de structures membranaires spécifique se développe au cours de la gamétocytogénèse.

Tout comme le parasite asexué, le gamétocyte induit une profonde restructuration de son érythrocyte hôte afin d'assurer sa survie et son développement. Ainsi, le développement de la vacuole parasitophore résulte en un réseau tubulovésiculaire (TVN) ramifié. Des tâches

(« clefts ») de Maurer sont détectées dans le cytoplasme érythrocytaire [7]. Des vésicules liées à la membrane parasitaire, appelées corps osmiophiles [9], se forment progressivement durant la gamétocytogénèse. La libération de leur contenu dans le TVN supporterait la sortie du gamétocyte mature activé en dehors de son érythrocyte hôte.

Une autre structure appelée complexe membranaire interne (IMC) se développe dans les gamétocytes [10]. L'IMC résulte du recouvrement progressif de la face interne de la membrane parasitaire par un compartiment vésiculaire. Une structure en 3 feuillets caractérise ainsi l'IMC, qui inclut la membrane du gamétocyte. Le cytosquelette de tubuline recouvre sa surface interne et le stabilise. Absent chez les parasites asexués, l'IMC est également retrouvée chez les plasmodies exo-érythrocytaires (mérozoïtes et sporozoïtes) : dans ce cas l'IMC permet l'ancrage du glidéosome et supporte la motilité des parasites et l'invasion érythrocytaire. Bien que les protéines MyOA, GAP45, GAP50 et MTIP (=composants du glidéosome) soient détectées dans l'IMC des gamétocytes, un rôle purement structural leur est dans ce cas attribué [10]. En effet, les changements morphologiques associés à la différenciation gamétocytaire ne dépendent pas de moteurs moléculaires actine-myosine. Les modalités par lesquelles le sécrétome gamétocytaire est exporté au travers de l'IMC ne sont pas connues. L'agencement particulier de l'IMC en plaques de recouvrements rectangulaires suturées *–responsables de son aspect strié en microscopie à super résolution 3D-* pourrait faire apparaître une machinerie de transport spécifique.

3. Les gamétocytes déploient un transcriptome et un exportome spécialisés, en lien avec leur fonction spécifique.

Le profil d'expression génique des gamétocytes est très différent de celui des stades asexués. Les taux de transcription et de traduction ne sont pas constants au cours de la gamétocytogénèse ; ils sont intenses aux phases précoces puis s'amenuisent progressivement. Une importante partie du transcriptome gamétocytaire n'est pas traduit au stade gamétocyte et représente une réserve d'ARNm [11]. Prédominante chez le gamétocyte femelle, son rôle sera essentiel suite à l'ingestion du gamétocyte par l'Anophèle. La traduction tardive, aux stades gamètes et zygote, de ce pool d'ARNm reposera sur une levée d'inhibition imposée par l'hélicase ARN DDX6 PdDOZI [12].

Sur le versant protéomique, Silvestrini et *al*. ont mis en évidence l'enrichissement spécifique de 251 protéines dans des gamétocytes immature synchronisés aux stades I et II [13]. Parmi

celles-ci, une fraction considérable désigne des protéines potentiellement impliquées dans le remodelage érythrocytaire et appelées PfGEXPs (*Plamodium falciparum gametocyte exported proteins*). Parmi ces PfGEXPs, plusieurs protéines à motif PEXEL ont été identifiées. L'expression de la plasmepsine V est également détectée dans le gamétocyte. Ces éléments suggèrent : 1/ l'adressage massif de protéines au compartiment érythrocytaire durant le développement des gamétocytes et 2/ un exportome en partie dépendant d'un système d'adressage PEXEL/PTEX, impliquant un clivage du motif PEXEL, une N-acétylation au niveau du réticulum endoplasmique puis un adressage érythrocytaire dépendant d'une translocation par le complexe PTEX [14]. Une déplétion du protéome à motif PEXEL est observée au stade mature (V). Cette déplétion met en exergue une phase de synthèse protéique et d'adressage concentrées transitoirement au début de la gamétocytogénèse [13].

Outre le système PEXEL/PTEX putatif commun aux stades asexués et sexués, l'étude réalisée par Silvestrini et *al*. indique qu'entre 40 et 50% des protéines exprimées par les gamétocytes ne le sont pas chez les stades asexués. Ce protéome spécifique est très probablement en lien avec la spécialisation des gamétocytes et leur fonction de transmission. Par exemple, les gamétocytes mâles accumulent des protéines qui leur seront essentielles dans le vecteur Anophèle, permettant entre autre la condensation de leur chromatine [15], la réplication de leur ADN et la motilité flagellaire [16]. Les 2 genres gamétocytaires se caractérisent par l'adressage de protéines importantes pour l'étape de fertilisation aboutissant à la formation d'un zygote [17]. Deuxième illustration de cette spécialisation de stade, l'utilisation des lipides et le métabolisme énergétique des gamétocytes diffèrent de ceux des parasites asexués [18]. Cela s'explique probablement par leur développement séquentiel dans le compartiment vasculaire humain puis la vacuole digestive du vecteur Anophèle. Ainsi, le glucose représente le principal substrat carboné exploité par le catabolisme mitochondrial gamétocytaire, tandis que le cycle de Krebs des parasites asexués dépend principalement de la glutamine [19].

4. Les érythrocytes abritant des gamétocytes immatures s'accumulent dans la moelle osseuse.

Contrairement aux parasites intra-érythrocytaires asexués, les gamétocytes sont dépourvus de Knobs -*ces protubérances membranaires riches en KHARP, supportant une séquestration vasculaire médiée par l'interaction de PfEMP1 à des adhésines vasculaires*-. L'expression des protéines de surface de la famille PfEMP1 n'est détectable que faiblement et exclusivement aux stades très précoces de différenciation gamétocytaire (stade I) [20]. Dans

ce sens, une répression de la transcription des gènes *var* a été démontrée chez les gamétocytes. Seul un sous-groupe non subtélomérique de type C est transcrit dans les gamétocytes I, indépendamment du phénotype de leur progéniteurs asexués [21]. Une séquestration vasculaire de type asexuée reposant sur une reconnaissance PfEMP1 : CD36/ICAM-1 n'a donc que très peu de chances d'être opérée efficacement par le gamétocyte, si elle se produit réellement [20, 22].

D'un point de vue historique, la présence de gamétocytes dans la moelle osseuse de patients impaludés a été initialement rapportée depuis le siècle dernier par Sinton (1929) [23] et *al*., Smalley et *al*. (1981) [24] et Farfour et *al*. (2012) [25]. Les études *post-mortem* et de cas cliniques n'ont validé que très récemment (2014) la moelle osseuse comme principal site de séquestration pour les gamétocytes [26, 27]. Ainsi, les travaux de Joice et *al.* mettent en évidence un enrichissement considérable des gamétocytes immatures dans le compartiment extracellulaire médullaire [27]. Leur présence à des taux plus faibles dans d'autres organes autopsiés, telle la rate, a également été observée, en accord avec la détection de gamétocytes immatures dans la circulation de patients splénectomisés [28]. Les analyses histologiques réalisées par les auteurs suggèrent le possible développement de gamétocytes dans des précurseurs érythroïdes, en interaction avec des îlots érythroblastiques. Cette séquestration pourrait potentiellement affecter les fonctions médullaires. Une relation positive semble exister entre la prévalence gamétocytaire et le profil anémique associé aux accès graves, bien qu'un lien de cause à effet n'aie pas été prouvé scientifiquement [29, 30]. Finalement, les proportions de gamétocytes matures (stade V) mesurées par Joice et *al*. -*indirectement via la quantification de l'expression du marqueur PfS25*- supportent un enrichissement minimal dans l'ensemble des organes autopsiés [27], en accord avec leur localisation proéminente au niveau vasculaire, nécessaire pour leur accessibilité au vecteur Anophèle.

Les déterminants moléculaires régissant le tropisme médullaire des gamétocytes immatures ne sont pas formellement connus et la majorité des modèles murins actuels ne permettent pas d'aborder cette question de façon pertinente. Les études *in vitro* rapportent une très faible cytoadhésion des gamétocytes immatures aux cellules stromales, potentiellement permise par l'expression des adhésines ICAM-1, CD49c, CD166 et CD164 [22, 31]. Cette cytoadhésion n'est pas observée pour les gamétocytes matures. D'autre part, des études ont rapporté l'expression des protéines de surface STEVORs et RIFINs par les érythrocytes abritant des gamétocytes [32, 33, 34]. Néanmoins, leur implication dans la séquestration médullaire n'est actuellement qu'hypothétique.

5. La déformabilité des gamétocytes pourrait contribuer à leur séquestration médullaire.

A défaut ou en complément d'une séquestration moléculaire (interactions ligand : récepteur) efficace, une séquestration mécanique pourrait également conditionner le tropisme médullaire des érythrocytes abritant des gamétocytes immatures [34].

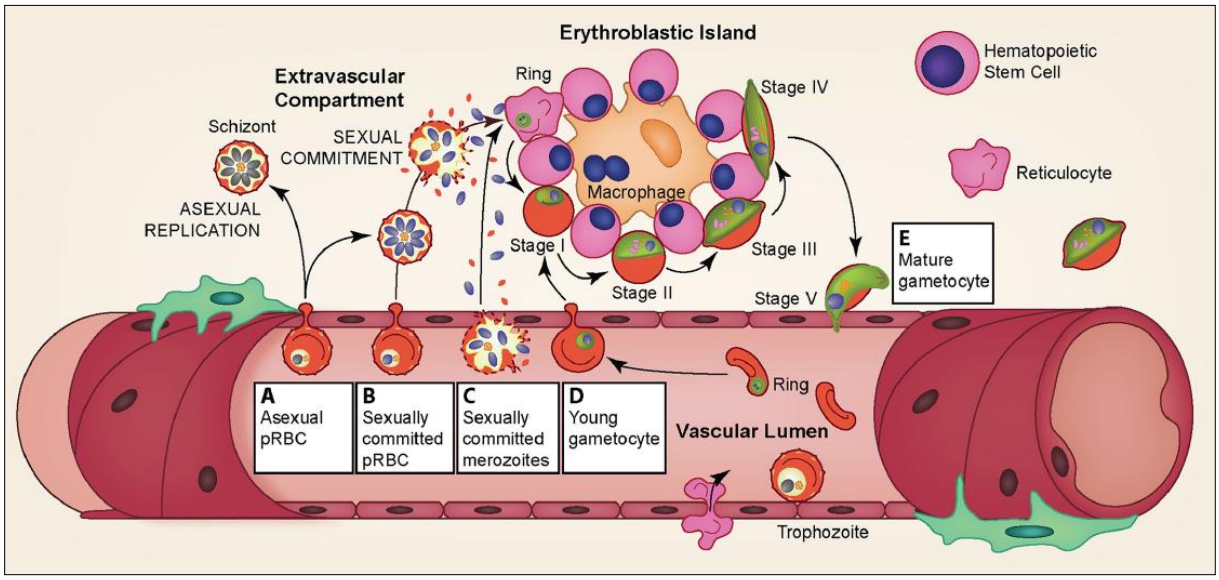


Figure I-11 : Model hypothétique d'entrée et de sortie des gamétocytes dans le compartiment extracellulaire de la moelle osseuse. *Tirée de [8]. Les propriétés histologiques de l'endothélium médullaire (discontinu ou contigu) font l'objet d'une controverse, à l'origine de 2 mécanismes distincts supportant le tropisme médullaire gamétocytaire. Un endothélium discontinu [35] favoriserait l'entrée passive, sous la force d'entrainement du flux sanguin, des parasites intra-érythrocytaires déformables asexués. La rigidité des gamétocytes immatures conditionnerait leur rétention transitoire dans la moelle osseuse et à maturité, les gamétocytes déformables pourraient s'en échapper et gagner la circulation. Un model hypothétique facultatif, dans lequel la contigüité de l'endothélium vasculaire est assurée par des jonctions serrées et/ou adherens [36], impliquerait la transmigration endothéliales des mérozoïtes engagés sur une gamétocytogénèse. Leur motilité particulière (« gliding motility ») et la création de brèches transitoires dans l'endothélium permettraient leur entrée active dans le compartiment extracellulaire de la moelle osseuse, supportant l'invasion ciblée de précurseurs érythrocytaires médullaires.*

En effet, la déformabilité des érythrocytes abritant des gamétocytes immatures de *Plasmodium falciparum* est très fortement diminuée comparativement aux érythrocytes sains.

Au terme de la gamétocytogénèse (gamétocyte stade V), les érythrocytes parasités redeviennent déformables (*commutation de déformabilité*). Cela a été confirmé par différentes approches expérimentales telles que l'ektacytométrie en gradient osmotique, l'aspiration dans des micropipettes et la filtration au travers de couches de microsphères (microsphiltration) [5, 33, 37]. La rigidité des érythrocytes abritant des gamétocytes immatures les sensibilisent à une rétention mécanique par la rate humaine. Contrairement aux gamétocytes immatures, les gamétocytes matures, déformables, sont capables d'échapper à une rétention mécanique splénique et sont détectés dans la circulation. La séquestration gamétocytaire au stade immature pourrait donc constituer une stratégie d'échappement à une clairance mécanique splénique.

Après leur libération dans la circulation, une période de 2 à 3 jours est nécessaire aux gamétocytes matures pour acquérir un phénotype infectant et être capable d'effectuer une gamétogénèse (formation d'un zygote) après ingestion par le vecteur Anophèle [1], étape obligée pour la transmission du parasite.

6. La déformabilité des érythrocytes abritant des gamétocytes peut être modulée par une approche pharmacologique anti-transmission.

Les mécanismes de remodelage moléculaires régissant la déformabilité des érythrocytes abritant des gamétocytes ne sont pas aussi bien compris que pour les parasites asexués. Le désassemblage du cytosquelette d'actine et de tubuline supportant le CMI gamétocytaire participe potentiellement à ce processus. Des protéines gamétocytaires exportées à la membrane de l'érythrocyte hôte, telles MESA (mature parasite-infected erythrocyte surface antigen), Pf11-1 ou MAL7P1.171 (motif PEXEL) pourraient, par interaction directe ou indirecte avec le cytosquelette de spectrine, réguler négativement sa déformabilité [34]. De façon intéressante, les résultats initiaux générés par Tibùrcio et *al*. en 2012 indiquent que la commutation de déformabilité observée en fin de gamétocytogénèse s'accompagne d'une dissociation des protéines STEVORs de la membrane érythrocytaire [33]. La surexpression des STEVORs dans des parasites intra-érythrocytaires asexués réduit leur déformabilité [38]. Un rôle de la famille STEVOR dans la déformabilité des érythrocytes abritant des gamétocytes est suspecté.

Enfin, Ramdani et *al*. ont récemment montré que la déformabilité des érythrocytes abritant des gamétocytes matures dépend d'une réduction de la signalisation dépendante de l'AMPc

concomitante à un accroissement de l'expression de phosphodiestérases [39]. Plus particulièrement, les travaux générés par les auteurs confirment 1/qu'une activité kinasique gamétocytaire dépendante de l'AMPc (PfPKA) contribue au phénotype rigide des érythrocytes abritant des gamétocytes immatures, 2/que l'exposition d'érythrocytes abritant des gamétocytes matures (stade V, déformables) avec des composés induisant une augmentation des concentrations en AMPc intracellulaire, tels que la forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase), la calyculine (un inhibiteur de phosphatases), le zaprinast ou le citrate de sildénafil (VIAGRA®) (des inhibiteurs de phosphodiestérases), résulte en leur rigidification. Finalement, les auteurs soulignent le rôle très important de l'activité phosphodiestérases PDEδ, surreprésentée au stade immature (I-IV) et réprimée au stade mature (V), dans le contrôle de déformabilité dépendant de l'AMPc.

7. L'engagement d'un parasite asexué dans la gamétocytogénèse est modulé par sa composante génétique.

La compréhension globale du processus de gamétocytogénèse est incomplète. L'engagement d'un parasite sur une voie de différenciation sexuée se produit au cycle asexué précédent le développement des gamétocytes [1, 40]. Il s'effectue selon un taux de conversion basal responsable d'un bruit de fond gamétocytaire *in vitro* et *in vivo* [41]. Des facteurs génétiques propres au parasite déterminent l'engagement dans la gamétocytogénèse [1].

Dans ce sens, la culture prolongée des souches plasmodiales de laboratoire ou d'isolats cliniques s'accompagne fréquemment d'un affaiblissement, voire d'une perte du potentiel de gamétocytogénèse. Cette défaillance fonctionnelle a été associée à une perte d'information génétique sur le bras droit du chromosome parasitaire n°9 [42]. Une élégante démonstration de l'importance de cette région chromosomique a été apportée en 1993 par K. P. DAY et *al*.. Les auteurs sont parvenus à isoler, par adhésion à des cellules mélanomateuses CD36+, une sous-population parasitaire de la souche HB3. La souche HB3 est connue pour son faible taux de production de gamétocytes, sa faible cytoadhésion à CD36 et son caryotype caractérisé par une délétion subtélomérique de son chromosome n°9. Les parasites sélectionnés par cette approche présentaient un chromosome 9 intact et leur capacité à produire des gamétocytes était 10 fois supérieure à la souche d'origine [43]. Par la suite, le projet de séquençage du génome de *Plasmodium falciparum* a fortement contribué à l'annotation de 19 séquences codantes putatives codées par cette région chromosomique et pouvant être impliquées dans la conversion sexuée parasitaire [44]. La troncation du bras chromosomique s'effectuerait

généralement à ~150kb du télomère et à ~90kb en amont de la région codante pour des gènes *var* et *rifin*.

Les approches protéomiques ont révélé un enrichissement de plusieurs produits géniques codés par la région cible du chromosome 9 durant les phases initiales de la gamétocytogénèse. Plus particulièrement, Eksi et *al*. ont montré en 2012 que la protéine péri-nucléaire codée par le gène PFI1710w (sur le chromosome 9), renommé Pfgdv1 (*Plasmodium falciparum gametocyte development 1*) conditionne l'expression secondaire d'un génome précoce référé comme Pfgeg (gametocytogenesis early genes) [45]. La famille Pfgeg inclut la séquence codant la protéine Pfs16, utilisée en tant que marqueur précoce de la gamétocytogénèse depuis plusieurs années. L'expression de Pfs16 est mesurée dans les 24 heures suivant l'invasion érythrocytaire et persiste durant la gamétocytogénèse [46]. La microscopie électronique met en évidence son adressage à la vacuole parasitophore, dans les membranes annexées aux vacuoles digestives du parasite et dans les citernes de Maurer intra-érythrocytaires [47]. Sa fonction biologique n'est pas entièrement comprise mais cet antigène est essentiel à l'exécution d'un programme de différenciation sexué [48, 49]. De façon très intéressante, Eksi et *al*. soulignent une correspondance entre le pic d'expression Pfgdv1 et le pic parasitémique précédent l'engagement dans la gamétocytogénèse [45]. Ces éléments sous-tendent un modèle mécanistique dans lequel l'accumulation des transcrits Pfgdv1 conditionnerait l'activation d'une cascade transcriptionnelle Pfgdv1→Pfgeg responsable d'une gamétocytogénèse continue *in vitro* et *in vivo*.

En 2013, Kafsack et *al*. ont adopté une approche génétique et moléculaire afin d'identifier de potentiels inducteurs moléculaires de la gamétocytogénèse [40]. Leur rapport identifie le facteur de transcription AP2-G (famille apiAP2) comme essentiel à la différenciation sexuée chez *Plasmodium falciparum*. En 2014, une démonstration similaire du rôle joué par ce facteur de transcription a été apportée pour *Plasmodium berghei*, une plasmodie du rongeur [50]. L'expression du facteur de transcription AP2-G est en fait réprimée épigénétiquement au stade de développement asexué par l'histone désacétylase PfHda2 (*Plasmodium falciparum histone deacetylase 2*) et la protéine PfHP1 (*Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1*). Une activation (ou dé-répression) stochastique d'AP2-G contribuerait aux faibles taux de conversion spontanés communément observés *in vitro*. Néanmoins, les mécanismes moléculaires responsables de l'activation d'AP2-G ne sont pas connus. L'implication potentielle de Pfgdv1 (*Plasmodium falciparum gametocyte development 1*) dans cette activation d'AP2-G est possible [8].

8. La perception d'un stress oxydatif par le parasite joue un rôle central dans son engagement dans la gamétocytogénèse.

Une combinaison complexe de facteurs extérieurs supplémentaires semble conditionner, en amont de la cascade transcriptionnelle AP2, l'engagement des parasites dans la différenciation sexuée.

Ainsi, des conditions non favorables à la réplication asexuée et donc aux opportunités de transmission futures devraient moduler le taux de conversion gamétocytaire « basal », responsable des gamétocytémies précoces associées aux tous premiers cycles de développement asexués chez l'individu impaludé [1, 8]. Dans ce sens, une relation positive semble exister entre le rapport gamétocytémie/parasitémie et l'âge des individus impaludés [1]. Plus particulièrement, l'observation fréquente de parasitémies sous-microscopiques avec densités gamétocytaires prépondérantes chez l'adulte suggère que chez ces individus, le contrôle efficace des parasitémies favorise une prise de décision des plasmodies en faveur d'une transmission sur la durée, bien que médiocre sur le court terme.

Sur le volet *in vitro*, un panel de facteurs ont été proposés pour moduler l'engagement parasitaire sur une différenciation sexuée [51]*:* les fortes parasitémies, la synchronicité des cultures, la présence de précurseurs érythroïdes et la qualité des érythrocytes supportant la réplication des parasites, la présence de sérum humain dans le milieu de culture, une réduction soudaine de l'hématocrite, l'addition de lysats érythrocytaires, l'élimination des parasites asexués par traitement chimique (lyse osmotique par traitement au sorbitol 5%) ou pharmacologique (addition de chloroquine ou de pyriméthamine), le changement incomplet des milieux de culture (*conditionned media*) [52].

Ces différents facteurs sont typiquement combinés dans le cadre d'un protocole basé sur l'induction d'un stress oxydatif par privation nutritive. Deux approches sont possibles : 1/une induction lente, à partir d'une faible parasitémie qui s'amplifie sur une 1 à 2 semaines [53]. Le stress oxydatif survient progressivement avec la levée des parasitémies asexuées, maintenues à hématocrite constant. 2/une induction rapide [52], à partir d'une culture parasitaire travaillée pour obtenir un pic parasitémique abrupt. Dans ce cas, un contrôle fin et instinctif de l'hématocrite de travail (optimisation progressive, par essais et erreurs, du volume de culture pour un volume donné de culot érythrocytaire à parasitémie donnée) permet de moduler l'intensité d'un stress oxydatif transitoire imposé aux cultures. Ces 2

approches requièrent un suivi rigoureux des cultures et une modulation souvent instinctive des paramètres de culture en fonction de l'état des parasites. En effet, un stress oxydatif par privation nutritive repose sur le fin contrôle de la balance existante entre le volume, la qualité du stock nutritif à disposition du parasite et sa biomasse (=nombre de parasites par volume de milieu de culture). Des protocoles d'induction standardisés ont fait l'objet de publications, avec des rendements de conversion sexuée pouvant atteindre jusque 30% [52, 53]. Cependant, la reproduction des rendements optimaux décrits dans ces articles implique généralement une réappropriation de la méthode et une optimisation subséquente afin de considérer les spécificités des souches parasitaires et les modalités de cultures propres à chaque laboratoire.

Les mécanismes moléculaires relayant l'efficacité des paramètres expérimentaux cités à la gamétocytogénèse ne sont pas entièrement connus. Les résultats rapportés par Chaubey et *al*. confirment cependant l'importance du stress oxydatif *in vitro*. Ceux-ci indiquent que sa perception par le réticulum endoplasmique parasitaire régule positivement l'expression de marqueurs de différenciation sexués [54]. Plus précisément, les auteurs mettent en évidence que l'incapacité des parasites à répondre au stress oxydatif (dithiothréitol : DTT) par la surexpression de chaperonnes et de facteurs antioxydant est compensée par la surexpression du facteur de transcription AP2, en faveur d'un engagement sur une gamétocytogénèse *in vitro*. D'un point de vue clinique, le stress oxydatif est l'une des plus importantes conséquences physiopathologiques d'un accès palustre. L'hémoglobine libérée en masse dans le compartiment vasculaire, suite aux vagues d'hémolyse érythrocytaire, génère des radicaux libres et des ions peroxydes (H2O2) difficilement neutralisés dans leur globalité par le système antioxydant. Ces facteurs pro-oxydants modifient l'hémoglobine extracellulaire, génèrent des molécules d'hémoglobine modifiées et d'hème, des produits de dégradation de l'hème et des molécules de fer libre [55]. Leur taux de production est étroitement lié à la charge parasitaire asexuée chez le malade. Ils génèrent un environnement plasmatique et intracellulaire oxydatifs et inflammatoires qui contribuent à la symptomatologie de l'accès palustre.

Ainsi, une composante physiopathologique centrée sur le stress oxydatif conditionne le niveau d'activité de la machinerie de transcription responsable d'un engagement du parasite sur une différenciation sexuée *in vitro*. Une extrapolation au niveau clinique est concevable, mais aucune étude n'a encore démontré une relation positive directe entre le stress oxydatif ou la gravité des symptômes et les densités gamétocytaires *in vivo*.

9. Une communication inter-parasitaire supporte l'initiation de la gamétocytogénèse.

Deux récentes études ont montré qu'un réseau de communication interparasitaire contribue à l'engagement des parasites dans une différenciation sexuée et à l'immuno-modulation de la cellule hôte [56]. Par une approche de co-culture employant des plasmides rapporteurs, Regev-Rudzki et *al*. ont montré en 2013 que les parasites sont capables de libérer des nanovésicules de type lysosomale permettant le transfert de gènes, incluant des gènes de résistance aux médicaments, à longue distance sans contact cellulaire [57]. La protéine parasitaire PfPTP2 jouerait un rôle important dans le bourgeonnement de ces nanovésicules à partir des clefs de Maurer. Ce système de communication permet la survie parasitaire et favorise la différenciation de gamétocytes pour la transmission de la maladie.

La même année, Mantel et *al*. ont rapporté la production de microvésicules par les érythrocytes parasités [58]. L'intensité de cette production est plus élevée aux stades de développement asexués matures. Des protéines membranaires érythrocytaires retrouvées au niveau des radeaux lipidiques, telle la stomatine, la bande 3 et des anhydrases carboniques seraient importantes pour la formation de ces vésicules. Par une approche protéomique, les auteurs ont révélé une trentaine de protéines parasitaires, classifiées en 2 groupes, présentes dans ces structures. Le 1er groupe désigne des protéines parasitaires associées à la vacuole parasitophore, aux citernes de Maurer et à la membrane érythrocytaire, suggérant un adressage élaboré de protéines depuis le parasite jusqu'aux microvésicules. Le 2nd groupe comporte des antigènes de liaison aux membranes érythrocytaires ou appartenant aux organelles sécrétrices du mérozoïte, assurant probablement l'intégration des microvésicules par les érythrocytes voisins ciblés. Par ailleurs, ces microvésicules stimulent les monocytes/macrophages et les neutrophiles, indiquant une fonction immunomodulatrice. Enfin, la culture de parasites dans du milieu conditionné renfermant de telles microvésicules résulte en une activation de la gamétocytogénèse reproductible sur plusieurs expériences indépendantes et à des taux significatifs.

Ainsi, les nano- et micro-vésicules produites par les parasites asexués contribuent à l'efficacité des méthodes d'induction de la gamétocytogénèse *in vitro*. *In vivo*, elles permettraient une perception collective de l'environnement par le parasite. Une prise de décision groupée serait alors possible, en faveur d'une adaptation par modulation du volume parasitaire s'engageant sur l'axe de transmission.

10. Le sex ratio gamétocytaire est déséquilibré.

La discrimination morphologique des genres mâle et femelle n'est possible en microscopie classique que lorsque les gamétocytes ont achevé leur différenciation. Pourtant, les observations *in vitro* suggèrent que tous les mérozoïtes issus d'un même schizonte sont supposés devenir soit des gamétocytes mâles, soit des gamétocytes femelles [1, 59]. Cela suppose une différenciation des genres très tôt avant l'apparition du dimorphisme gamétocytaire. Cependant, aucun marqueur moléculaire de genre n'a été identifié au stade asexué.

Les mécanismes moléculaires déterminant le genre des gamétocytes ne sont pas connus, mais reposent sur une composante génétique [16, 60]. Dans ce sens, la culture au long terme d'une souche productrice de gamétocytes peut se traduire par l'apparition de mutations affectant le rapport des genres (*sex ratio*) [61].

Ce dernier n'est jamais égal à 1. Il est biaisé en faveur d'un plus grand nombre de gamétocytes femelles [60]. Ce déséquilibre confère un avantage sélectif car le gamétocyte mâle peut produire plusieurs microgamètes. Il est donc économe qu'il y ait plus de gamétocytes femelles que de gamétocytes mâles. Suite à son activation dans la vacuole digestive du vecteur Anophèle, le gamétocyte mâle exflagelle et libère 8 microgamètes mobiles capables de fertiliser chacun un macrogamète. Ainsi, le rapport biaisé des genres permettrait de favoriser un taux de fertilisation maximal pour une transmission optimale.

11. Une adaptation des proportions de gamétocytes mâles générés par gamétocytogénèse supporte la transmission efficace du paludisme.

Dans les infections naturelles, il est estimé que 3 et 4 gamétocytes femelles sont dénombrables pour un gamétocyte mâle. Cependant, ce rapport peut varier en fonction des clones parasitaires, au cours de l'infection, en fonction de la géographie et au cours du temps pour une même aire géographique [1]. Cette modulation du rapport des genres est considérée comme un mécanisme évolutif soumis à au moins deux variables complémentaires [60]. La 1^{ere} est la complexité générale de l'infection, de laquelle dépend le taux d'auto-fertilisation (consanguinité) : les infections monoclonales s'accompagnent d'un taux d'auto-fertilisation de 100%. Un rapport des genres fortement déséquilibré en faveur des gamétocytes femelles favorisera un taux de fertilisation optimal. Dans le cas d'une infection pluri-clonale, les

différents clones parasitaires auront tendance, par compétition, à produire plus de gamétocytes mâles afin de favoriser la transmission de leur génotype, en faveur d'un biais plus faible. La 2nde variable accompagne le besoin d'optimiser le rapport des genres en fonction de la densité gamétocytaire pour maximiser un taux de fertilisation efficace sur le court terme. En affectant l'hématocrite, l'anémie réduit les probabilités de rencontre entre gamétocytes mâles et femelles. Une surproduction de gamétocytes mâles observée chez les patients anémiques permettrait de maximiser le taux de fertilisation [62, 63]. Un rôle modulateur joué par l'érythropoïétine est suspecté [64]. En corollaire, l'apparition d'un pic gamétocytémique persistant sur 1 ou 2 semaines s'accompagne d'une plus grande proportion de gamétocytes femelles car à densité gamétocytaire élevée, les probabilités de rencontres entre gamétocytes mâle et femelles sont plus fortes [1, 60].

12. Les gamétocytes mâles et femelles répondent différemment aux antipaludiques *in vitro*.

L'impact d'un traitement antipaludique sur le sex ratio a fait l'objet d'investigations *in vivo* dont les résultats, contradictoires, ne sont pas concluants. Un traitement peut être suivi d'une augmentation ou d'une diminution des proportions de gamétocytes mâles détectés dans le sang des sujets traités [1]. Les durées variables séparant le traitement du point d'analyse contribue probablement à ce résultat. De plus, les résultats issus de ces études reposent sur une discrimination des genres gamétocytaires par examen microscopique de frottis réalisés à partir du sang périphérique des sujets infectés. Ainsi, la précision des analyses peut facilement être affectée par la qualité des frottis, le très faible nombre de gamétocytes à morphologie préservée présents sur les lames et l'expertise de l'opérateur.

Des études rapportent l'identification de marqueurs moléculaires permettant la discrimination des gamétocytes mâles et femelles *in vitro*, via différentes approches telles que la microscopie électronique, l'hybridation *in situ* et l'immunofluorescence. Ainsi, les transcrits Pfs77 et Pfs25, ainsi que les protéines Pfs47, PfG377 et gABCG2 ont été décrits comme spécifiques du genre gamétocytaire femelle. L'α-tubuline et la protéine PfB0400w (Pfs230p) sont 2 marqueurs du genre gamétocytaire mâle.

Marqueur moléculaire	Expression	Fonction biologique	Référence
Pfs47	Exclusive chez le gamétocyte femelle à partir du stade II-III et gamète	Non essentielle	Van Schaijk et *al.* 2006 [65]
PfG377	Exclusive chez le gamétocyte mâle à partir du stade II-III à V	Formation et fonctionnalité des corps osmiophiles, sortie des gamétocytes femelle de leur érythrocyte hôte [9]	Severini et *al.* 1999 [66]
gABCG2	Exclusive chez le gamétocyte femelles à partir du stade I et gamète	transporteur de la famille ABC exprimé par des structures membranaires à proximité de la vacuole digestive parasitaire	Tran et *al.* 2014 [67]
Pf77	-Transcript ARN -Exclusive chez le gamétocyte femelles à partir du stade III	inconnue	Baker et *al.* 1995 [68]
Pfs25	-Transcript ARN -Exclusive chez le gamétocyte femelle à partir du stade IV-V	Protéine détectée après fertilisation, aux stades zygotes et ookinètes [70]. Essentielle au développement de l'oocyste [71]	Schneider et *al.* 2015 [69]
α–Tubuline	Prédominante chez le gamétocyte mâle aux stades IV-V	Remodelage érythrocyte	Schwank et *al.* 2010 [4]
Pfs230p	Exclusive chez le gamétocyte stade V	Inconnue, localisation au niveau de compartiments membranaires intra-érythrocytaires spécifiques	Eksi et *al.* 2002 [72]

Tableau I-2 : Marqueurs de genres mâle et femelle gamétocytaires et leurs fonctions biologiques.

L'identification de ces marqueurs représente un point de départ encourageant pour le développement d'outils moléculaires qui permettent la discrimination fine et standardisée des genres gamétocytaires. Dans ce sens, Schneider et *al.* ont rapporté en 2015 l'optimisation d'une méthode RT-qPCR ciblant les transcrits PfB0400w et Pfs25 avec une sensibilité de 0.3 gamétocytes femelles et 1.8 gamétocytes mâles/µL de sang, surpassant donc celle de la microscopie [69]. La validation de cette méthode par une approche clinique, très attendue, représente un objectif majeur pour une meilleure évaluation des interventions anti-transmission.

L'importance de cet objectif est soulignée par les récentes investigations de Delves et *al*. qui rapportent une sensibilité différente des gamétocytes mâles et femelles à des antipaludiques de références *in vitro* [73]. L'élégante approche développée par les auteurs repose sur la quantification parallèle des centres d'exflagellation (gamétocytes mâles) et des gamétocytes femelles activés (*rounding up*) puis marqués avec un anticorps anti-Pfs25. Leur résultats indiquent un profil de sensibilité pharmacologique opposé entre gamétocytes des 2 genres, marqué par une insensibilité des gamétocytes femelles aux antifolates, tels le cycloguanil et la pyriméthamine et à certains endopéroxides, dont l'artésunate, l'artémisinine et la dihydroxyartémisinine.

13. Résumé

Les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* permettent la transmission du paludisme de l'être humain au vecteur Anophèle. Ils représentent une sous-population minoritaire sexuée à morphologie particulière qui se différencie à partir des parasites asexués intra-érythrocytaires. Une communication basée sur l'échange vésiculaire régule sans doute la proportion populationnelle parasitaire engagée dans la gamétocytogénèse ce qui pourrait optimiser la transmission. Des conditions non favorables à la réplication asexuée stimuleraient l'engagement d'un parasite asexué dans la gamétocytogénèse. A l'échelle moléculaire, cet engagement repose sur l'activation d'une cascade transcriptionnelle. Cette cascade est régulée par une composante génétique qui assure un taux de conversion gamétocytaire basal. Une composante environnementale centrée sur le stress oxydatif pourrait moduler ce taux de conversion basal. La différenciation sexuée s'effectue en une dizaine de jours dans la moelle osseuse, au terme desquels les gamétocytes acquièrent un aspect de faucille et gagnent le compartiment vasculaire. Durant cette différenciation, un remodelage du gamétocyte et de l'érythrocyte hôte est observé. Ce remodelage, caractérisé par le développement de structures

membranaires et cytosquelettiques spécialisées et par l'expression d'un transcriptome spécifique, est à l'origine d'un phénotype rigide. Au terme de leur différenciation, les gamétocytes matures deviennent déformables, gagnent le compartiment vasculaire et sont capables de franchir le filtre mécanique splénique. Une signalisation dépendante de l'AMPc participe à ce changement de déformabilité. Cette signalisation peut être ciblée par une approche anti-transmission, visant à induire la rétention splénique des gamétocytes matures suite à leur rigidification pharmacologique. Le rapport des genres gamétocytaires mâle et femelle peut être désormais évalué par une approche moléculaire *in vitro*. Sa définition précise *in vivo* apportera un complément d'information considérable pour l'évaluation des approches curatives et chimioprophylactiques antipaludiques. Finalement, les mécanismes régulant l'engagement parasitaire sur une gamétocytogénèse, contrôlant la déformabilité, le sex ratio ou la séquestration transitoire des gamétocytes dans le compartiment médullaire sont exploités par le parasite afin de maximiser ses chances de transmission. Leur élucidation s'appuie sur une démarche scientifique empirique limitée par une faible accessibilité à ces stades parasitaires sexués tant *in vivo* qu'*in vitro*. Les progrès réalisés dans la culture des gamétocytes *in vitro*, le génotypage complet de *Plasmodium falciparum* combinés à l'essor du génie moléculaire dégagent un axe scientifique encourageant pour l'exploitation efficace de ces mécanismes comme cibles potentielles d'approches pharmacologiques innovantes anti-transmission.

14. Références

1. **Bousema T**, **Drakeley C**. 2011. Epidemiology and Infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. Clinical Microbiology Reviews **24**:377–410.
2. **Field JW**, **Shute PG**. 1956. The Microscopic Diagnosis of Human Malaria. II. A Morphological Study of the Erythroeytic Parasites. Government Press 142.
3. **Hliscs M**, **Millet C**, **Dixon MW**, **Siden-Kiamos I**, **McMillan P**, **Tilley L**. 2015. Organization and function of an actin cytoskeleton in *P lasmodium falciparum* gamétocytes: A plasmodium gametocyte actin cytoskeleton. Cellular Microbiology **17**:207–225.

4. **Schwank S**, **Sutherland CJ**, **Drakeley CJ**. 2010. Promiscuous Expression of α-Tubulin II in Maturing Male and Female Plasmodium falciparum Gametocytes. PLoS ONE **5**:e14470.

5. **Dixon MWA**, **Dearnley MK**, **Hanssen E**, **Gilberger T**, **Tilley L**. 2012. Shape-shifting gametocytes: how and why does P. falciparum go banana-shaped? Trends in Parasitology **28**:471–478.

6. **Carnevale P**, **Baudon D**, **Molez J-F**, **Guiguemde TR**. 1984. Aspects classiques et modernes des cycles de développement des plasmodiums humains. Etudes Médicales 61–78.

7. **Talman AM**, **Domarle O**, **McKenzie FE**, **Ariey F**, **Robert V**. 2004. Gametocytogenesis: the puberty of Plasmodium falciparum. Malaria Journal **3**:24.

8. **Nilsson SK**, **Childs LM**, **Buckee C**, **Marti M**. 2015. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. PLOS Pathogens **11**:e1004871.

9. **De Koning-Ward TF**, **Olivieri A**, **Bertuccini L**, **Hood A**, **Silvestrini F**, **Charvalias K**, **Berzosa Díaz P**, **Camarda G**, **McElwain TF**, **Papenfuss T**, **Healer J**, **Baldassarri L**, **Crabb BS**, **Alano P**, **Ranford-Cartwright LC**. 2007. The role of osmiophilic bodies and Pfg377 expression in female gametocyte emergence and mosquito infectivity in the human malaria parasite. Molecular Microbiology **67**:278–290.

10. **Dearnley MK**, **Yeoman JA**, **Hanssen E**, **Kenny S**, **Turnbull L**, **Whitchurch CB**, **Tilley L**, **Dixon MWA**. 2012. Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of Plasmodium falciparum gametocytes. Journal of Cell Science **125**:2053–2063.

11. **Alano P**. 2007. Plasmodium falciparum gametocytes: still many secrets of a hidden life. Molecular Microbiology **66**:291–302.

12. **Tarique M**, **Ahmad M**, **Ansari A**, **Tuteja R**. 2013. Plasmodium falciparum DOZI, an RNA helicase interacts with eIF4E. Gene **522**:46–59.

13. **Silvestrini F**, **Lasonder E**, **Olivieri A**, **Camarda G**, **van Schaijk B**, **Sanchez M**, **Younis SY**, **Sauerwein R**, **Alano P**. 2010. Protein export marks the early phase of gametocytogenesis of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Molecular & Cellular Proteomics **9**:1437–1448.

14. **Ingmundson A**, **Alano P**, **Matuschewski K**, **Silvestrini F**. 2014. Feeling at home from arrival to departure: protein export and host cell remodelling during *P lasmodium* liver stage and gametocyte maturation: Export in *Plasmodium* liver stages and gametocytes. Cellular Microbiology **16**:324–333.

15. **Pace T**, **Olivieri A**, **Sanchez M**, **Albanesi V**, **Picci L**, **Siden Kiamos I**, **Janse CJ**, **Waters AP**, **Pizzi E**, **Ponzi M**. 2006. Set regulation in asexual and sexual Plasmodium parasites reveals a novel mechanism of stage-specific expression. Mol Microbiol **60**:870–882.

16. **Khan SM**, **Franke-Fayard B**, **Mair GR**, **Lasonder E**, **Janse CJ**, **Mann M**, **Waters AP**. 2005. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific Plasmodium biology. Cell **121**:675–687.

17. **Sauerwein RW**, **Eling WMC**. 2002. Sexual and sporogonic stage antigens. Chem Immunol **80**:188–203.

18. **Lamour SD**, **Straschil U**, **Saric J**, **Delves MJ**. 2014. Changes in metabolic phenotypes of Plasmodium falciparum in vitro cultures during gametocyte development. Malar J **13**:468.

19. **MacRae JI**, **Dixon MW**, **Dearnley MK**, **Chua HH**, **Chambers JM**, **Kenny S**, **Bottova I**, **Tilley L**, **McConville MJ**. 2013. Mitochondrial metabolism of sexual and

asexual blood stages of the malaria parasite Plasmodium falciparum. BMC biology **11**:67.

20. **Day KP**, **Hayward RE**, **Smith D**, **Culvenor JG**. 1998. CD36-dependent adhesion and knob expression of the transmission stages of Plasmodium falciparum is stage-specific. Molecular and biochemical parasitology **93**:167–177.

21. **Sharp S**, **Lavstsen T**, **Fivelman QL**, **Saeed M**, **McRobert L**, **Templeton TJ**, **Jensen ATR**, **Baker DA**, **Theander TG**, **Sutherland CJ**. 2006. Programmed Transcription of the var Gene Family, but Not of stevor, in Plasmodium falciparum Gametocytes. Eukaryotic Cell **5**:1206–1214.

22. **Silvestrini F**, **Tibúrcio M**, **Bertuccini L**, **Alano P**. 2012. Differential Adhesive Properties of Sequestered Asexual and Sexual Stages of Plasmodium falciparum on Human Endothelial Cells Are Tissue Independent. PLoS ONE **7**:e31567.

23. **Sinton J.A.**, **Baily J.D.**, **Chand D.** 1926. Studies in malaria, with special reference to treatment. IV: the occurrence of sexual forms of Plasmodium falciparum in the peripheral circulation. Indian J Med Res **13**: 895–902.

24. **Smalley M.E.**, **Abdalla S.**, **Brown**, **J.** (1981) The distribution of Plasmodium falciparum in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. Trans R Soc Trop Med Hyg 75: 103–105.

25. **Farfour E**, **Charlotte F**, **Settegrana C**, **Miyara M**, **Buffet P**. 2012. The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for Plasmodium falciparum gametocyte maturation? Malar J **11**:285.

26. **Aguilar R**, **Magallon-Tejada A**, **Achtman AH**, **Moraleda C**, **Joice R**, **Cisteró P**, **Wai Suen CSN**, **Nhabomba A**, **Macete E**, **Mueller I**, **Marti M**, **Alonso PL**, **Menéndez C**, **Schofield L**, **Mayor A**. 2014. Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. Blood **123**:959–966.

27. **Joice R**, **Nilsson SK**, **Montgomery J**, **Dankwa S**, **Egan E**, **Morahan B**, **Seydel KB**, **Bertuccini L**, **Alano P**, **Williamson KC**, **Duraisingh MT**, **Taylor TE**, **Milner DA**, **Marti M**. 2014. Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. Science Translational Medicine **6**:244re5–244re5.

28. **Bachmann A**, **Esser C**, **Petter M**, **Predehl S**, **von Kalckreuth V**, **Schmiedel S**, **Bruchhaus I**, **Tannich E**. 2009. Absence of erythrocyte sequestration and lack of multicopy gene family expression in Plasmodium falciparum from a splenectomized malaria patient. PLoS ONE **4**:e7459.

29. **Nacher M**, **Singhasivanon P**, **Silachamroon U**, **Treeprasertsuk S**, **Tosukhowong T**, **Vannaphan S**, **Gay F**, **Mazier D**, **Looareesuwan S**. 2002. Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, and severe malaria are associated with increased Plasmodium falciparum gametocyte carriage. J Parasitol **88**:97–101.

30. **Stepniewska K**, **Price RN**, **Sutherland CJ**, **Drakeley CJ**, **Seidlein L von**, **Nosten F**, **White NJ**. 2008. Plasmodium falciparum gametocyte dynamics in areas of different malaria endemicity. Malaria Journal **7**:249.

31. **Rogers NJ**, **Hall BS**, **Obiero J**, **Targett GA**, **Sutherland CJ**. 2000. A model for sequestration of the transmission stages of Plasmodium falciparum: adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. Infect Immun **68**:3455–3462.

32. **Wang CW**, **Mwakalinga SB**, **Sutherland CJ**, **Schwank S**, **Sharp S**, **Hermsen CC**, **Sauerwein RW**, **Theander TG**, **Lavstsen T**. 2010. Identification of a major rif transcript common to gametocytes and sporozoites of Plasmodium falciparum. Malar J **9**:147.

33. **Tiburcio M**, **Niang M**, **Deplaine G**, **Perrot S**, **Bischoff E**, **Ndour PA**, **Silvestrini F**, **Khattab A**, **Milon G**, **David PH**, **Hardeman M**, **Vernick KD**, **Sauerwein RW**,

Preiser PR, **Mercereau-Puijalon O**, **Buffet P**, **Alano P**, **Lavazec C**. 2012. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. Blood **119**:e172–e180.

34. **Tibúrcio M**, **Sauerwein R**, **Lavazec C**, **Alano P**. 2015. Erythrocyte remodeling by Plasmodium falciparum gametocytes in the human host interplay. Trends in Parasitology **31**:270–278.

35. **Ribatti D**, **Nico B**, **Vacca A**, **Roncali L**, **Dammacco F**. 2002. Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. J Hematother Stem Cell Res **11**:81–90.

36. **Carman CV**. 2009. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by `invadosome-like protrusions'. Journal of Cell Science **122**:3025–3035.

37. **Aingaran M**, **Zhang R**, **Law SK**, **Peng Z**, **Undisz A**, **Meyer E**, **Diez-Silva M**, **Burke TA**, **Spielmann T**, **Lim CT**, **Suresh S**, **Dao M**, **Marti M**. 2012. Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Cell Microbiol **14**:983–993.

38. **Sanyal S**, **Egee S**, **Bouyer G**, **Perrot S**, **Safeukui I**, **Bischoff E**, **Buffet P**, **Deitsch KW**, **Mercereau-Puijalon O**, **David PH**, **Templeton TJ**, **Lavazec C**. 2012. Plasmodium falciparum STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties. Blood **119**:e1–e8.

39. **Ramdani G**, **Naissant B**, **Thompson E**, **Breil F**, **Lorthiois A**, **Dupuy F**, **Cummings R**, **Duffier Y**, **Corbett Y**, **Mercereau-Puijalon O**, **Vernick K**, **Taramelli D**, **Baker DA**, **Langsley G**, **Lavazec C**. 2015. cAMP-Signalling Regulates Gametocyte-Infected Erythrocyte Deformability Required for Malaria Parasite Transmission. PLOS Pathogens **11**:e1004815.

40. **Inselburg J**. 1983. Gametocyte formation by the progeny of single Plasmodium falciparum schizonts. J Parasitol **69**:584–591.

41. **Kafsack BFC**, **Rovira-Graells N**, **Clark TG**, **Bancells C**, **Crowley VM**, **Campino SG**, **Williams AE**, **Drought LG**, **Kwiatkowski DP**, **Baker DA**, **Cortés A**, **Llinás M**. 2014. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. Nature **507**:248–252.

42. **Chaiyaroj SC**, **Thompson JK**, **Coppel RL**, **Brown GV**. 1994. Gametocytogenesis occurs in Plasmodium falciparum isolates carrying a chromosome 9 deletion. Mol Biochem Parasitol **63**:163–165.

43. **Day KP**, **Karamalis F**, **Thompson J**, **Barnes DA**, **Peterson C**, **Brown H**, **Brown GV**, **Kemp DJ**. 1993. Genes necessary for expression of a virulence determinant and for transmission of Plasmodium falciparum are located on a 0.3-megabase region of chromosome 9. Proceedings of the National Academy of Sciences **90**:8292–8296.

44. **Cui L**, **Rzomp KA**, **Fan Q**, **Martin SK**, **Williams J**. 2001. Plasmodium falciparum: differential display analysis of gene expression during gametocytogenesis. Exp Parasitol **99**:244–254.

45. **Eksi S**, **Morahan BJ**, **Haile Y**, **Furuya T**, **Jiang H**, **Ali O**, **Xu H**, **Kiattibutr K**, **Suri A**, **Czesny B**, **Adeyemo A**, **Myers TG**, **Sattabongkot J**, **Su X**, **Williamson KC**. 2012. Plasmodium falciparum Gametocyte Development 1 (Pfgdv1) and Gametocytogenesis Early Gene Identification and Commitment to Sexual Development. PLoS Pathogens **8**:e1002964.

46. **Dechering KJ**, **Thompson J**, **Dodemont HJ**, **Eling W**, **Konings RN**. 1997. Developmentally regulated expression of pfs16, a marker for sexual differentiation of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Molecular and biochemical parasitology **89**:235–244.

47. **Bruce MC**, **Carter RN**, **Nakamura K**, **Aikawa M**, **Carter R**. 1994. Cellular location and temporal expression of the Plasmodium falciparum sexual stage antigen Pfs16. Mol Biochem Parasitol **65**:11–22.

48. **Kongkasuriyachai D**, **Fujioka H**, **Kumar N**. 2004. Functional analysis of Plasmodium falciparum parasitophorous vacuole membrane protein (Pfs16) during gametocytogenesis and gametogenesis by targeted gene disruption. Molecular and Biochemical Parasitology **133**:275–285.

49. **Berry A**, **Deymier C**, **Sertorio M**, **Witkowski B**, **Benoit-Vical F**. 2009. Pfs 16 pivotal role in Plasmodium falciparum gametocytogenesis: A potential antiplasmodial drug target. Experimental Parasitology **121**:189–192.

50. **Sinha A**, **Hughes KR**, **Modrzynska KK**, **Otto TD**, **Pfander C**, **Dickens NJ**, **Religa AA**, **Bushell E**, **Graham AL**, **Cameron R**, **Kafsack BFC**, **Williams AE**, **Llinás M**, **Berriman M**, **Billker O**, **Waters AP**. 2014. A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in Plasmodium. Nature **507**:253–257.

51. **Baker DA**. 2010. Malaria gametocytogenesis. Mol Biochem Parasitol **172**:57–65.

52. **Fivelman QL**, **McRobert L**, **Sharp S**, **Taylor CJ**, **Saeed M**, **Swales CA**, **Sutherland CJ**, **Baker DA**. 2007. Improved synchronous production of Plasmodium falciparum gametocytes in vitro. Molecular and Biochemical Parasitology **154**:119–123.

53. **Roncalés M**, **Vidal-Mas J**, **Leroy D**, **Herreros E**. 2012. Comparison and Optimization of Different Methods for the *In Vitro* Production of *Plasmodium falciparum* Gametocytes. Journal of Parasitology Research **2012**:1–7.

54. **Chaubey S**, **Grover M**, **Tatu U**. 2014. Endoplasmic Reticulum Stress Triggers Gametocytogenesis in the Malaria Parasite. Journal of Biological Chemistry **289**:16662–16674.

55. **Rifkind JM**, **Mohanty JG**, **Nagababu E**. 2015. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. Frontiers in Physiology **5**.

56. **Del Portillo HA**, **Chitnis CE**. 2013. Talking to Each Other to Initiate Sexual Differentiation. Cell **153**:945–947.

57. **Regev-Rudzki N**, **Wilson DW**, **Carvalho TG**, **Sisquella X**, **Coleman BM**, **Rug M**, **Bursac D**, **Angrisano F**, **Gee M**, **Hill AF**, **Baum J**, **Cowman AF**. 2013. Cell-Cell Communication between Malaria-Infected Red Blood Cells via Exosome-like Vesicles. Cell **153**:1120–1133.

58. **Mantel P-Y**, **Hoang AN**, **Goldowitz I**, **Potashnikova D**, **Hamza B**, **Vorobjev I**, **Ghiran I**, **Toner M**, **Irimia D**, **Ivanov AR**, **Barteneva N**, **Marti M**. 2013. Malaria-Infected Erythrocyte-Derived Microvesicles Mediate Cellular Communication within the Parasite Population and with the Host Immune System. Cell Host & Microbe **13**:521–534.

59. **Silvestrini F**, **Alano P**, **Williams JL**. 2000. Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Parasitology **121 Pt 5**:465–471.

60. **Tao D**, **Ubaida-Mohien C**, **Mathias DK**, **King JG**, **Pastrana-Mena R**, **Tripathi A**, **Goldowitz I**, **Graham DR**, **Moss E**, **Marti M**, **Dinglasan RR**. 2014. Sex-partitioning of the Plasmodium falciparum Stage V Gametocyte Proteome Provides Insight into falciparum-specific Cell Biology. Molecular & Cellular Proteomics **13**:2705–2724.

61. **Guinet F**, **Dvorak JA**, **Fujioka H**, **Keister DB**, **Muratova O**, **Kaslow DC**, **Aikawa M**, **Vaidya AB**, **Wellems TE**. 1996. A developmental defect in Plasmodium falciparum male gametogenesis. The Journal of cell biology **135**:269–278.

62. **Robert V**, **Sokhna CS**, **Rogier C**, **Ariey F**, **Trape JF**. 2003. Sex ratio of Plasmodium falciparum gametocytes in inhabitants of Dielmo, Senegal. Parasitology **127**:1–8.

63. **Gbotosho GO**, **Sowunmi A**, **Okuboyejo TM**, **Happi CT**, **Michael OS**, **Folarin OA**, **Adewoye EO**. 2011. Plasmodium falciparum gametocyte carriage, emergence, clearance and population sex ratios in anaemic and non-anaemic malarious children. Mem Inst Oswaldo Cruz **106**:562–569.

64. **Paul RE**, **Doerig C**, **Brey PT**. 2000. Erythropoiesis and molecular mechanisms for sexual determination in malaria parasites. IUBMB Life **49**:245–248.

65. **van Schaijk BCL**, **van Dijk MR**, **van de Vegte-Bolmer M**, **van Gemert G-J**, **van Dooren MW**, **Eksi S**, **Roeffen WFG**, **Janse CJ**, **Waters AP**, **Sauerwein RW**. 2006. Pfs47, paralog of the male fertility factor Pfs48/45, is a female specific surface protein in Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol **149**:216–222.

66. **Severini C**, **Silvestrini F**, **Sannella A**, **Barca S**, **Gradoni L**, **Alano P**. 1999. The production of the osmiophilic body protein Pfg377 is associated with stage of maturation and sex in Plasmodium falciparum gametocytes. Molecular and biochemical parasitology **100**:247–252.

67. **Tran PN**, **Brown SHJ**, **Mitchell TW**, **Matuschewski K**, **McMillan PJ**, **Kirk K**, **Dixon MWA**, **Maier AG**. 2014. A female gametocyte-specific ABC transporter plays a role in lipid metabolism in the malaria parasite. Nature Communications **5**:4773.

68. **Baker DA**, **Thompson J**, **Daramola OO**, **Carlton JM**, **Targett GA**. 1995. Sexual-stage-specific RNA expression of a new Plasmodium falciparum gene detected by in situ hybridisation. Mol Biochem Parasitol **72**:193–201.

69. **Schneider P**, **Reece SE**, **van Schaijk BCL**, **Bousema T**, **Lanke KHW**, **Meaden CSJ**, **Gadalla A**, **Ranford-Cartwright LC**, **Babiker HA**. 2015. Quantification of female and male Plasmodium falciparum gametocytes by reverse transcriptase quantitative PCR. Molecular and Biochemical Parasitology **199**:29–33.

70. **Vermeulen AN**, **Ponnudurai T**, **Beckers PJ**, **Verhave JP**, **Smits MA**, **Meuwissen JH**. 1985. Sequential expression of antigens on sexual stages of Plasmodium falciparum accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. J Exp Med **162**:1460–1476.

71. **Barr PJ**, **Green KM**, **Gibson HL**, **Bathurst IC**, **Quakyi IA**, **Kaslow DC**. 1991. Recombinant Pfs25 protein of Plasmodium falciparum elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. J Exp Med **174**:1203–1208.

72. **Eksi S**, **Williamson KC**. 2002. Male-specific expression of the paralog of malaria transmission-blocking target antigen Pfs230, PfB0400w. Molecular and biochemical parasitology **122**:127–130.

73. **Delves MJ**, **Ruecker A**, **Straschil U**, **Lelievre J**, **Marques S**, **Lopez-Barragan MJ**, **Herreros E**, **Sinden RE**. 2013. Male and Female Plasmodium falciparum Mature Gametocytes Show Different Responses to Antimalarial Drugs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **57**:3268–3274.

V. Chimiothérapie antipaludique conventionnelle (« anti-asexués ») et anti-transmission, deux mondes distincts qui doivent se compléter.

-Quelles sont les principales classes pharmacologiques d'antipaludiques, quels est leur spectre d'activité, leur mode d'action ?

-Comment expliquer les résistances aux antipaludiques, comment sont-elles définies et quelles classes pharmacologiques sont concernées?

-Quelles sont les stratégies chimiothérapeutiques développées ou proposées en réponse aux résistances ?

-Quelles classes pharmacologiques ciblent les gamétocytes et quelles sont leurs efficacité et limites?

-Quelles solutions sont adoptées ou proposées en réponse à ces limites ?

-Quel sont l'état actuel et les résultats espérés de la R&D pharmaceutique anti-transmission ?

-Quels sont les challenges rencontrés dans cet axe de recherche ?

1. La chloroquine a été intensément utilisée au cours des années 1950 à 1970.

L'arsenal chimio-thérapeutique antipaludique actuel regroupe essentiellement des composés à activité schizonticide ciblant le cycle intra-érythrocytaire asexué [1]. Ces derniers désignent :

-des dérivés semi-synthétiques de la quinine, un alcaloïde naturel extrait à partir de l'écorce de quinquina : les 4-aminoquinoléines et les arylamino-alcools.

-des anti-métabolites, comprenant les antifolates, les naphtoquinones et des antibiotiques.

-des dérivés semi-synthétiques du qinghaosu, ou dérivés de l'artémisinine, une lactone isolée à partir d'une plante appelée quinghao (=Artemisia annua).

Une autre fraction de cet arsenal, minoritaire, désigne les 8-aminoquinoléines. Faiblement actifs sur les parasites intra-érythrocytaires asexués, ces composés ne sont pas utilisés pour soigner les accès palustres mais pour prévenir les recrudescences d'accès à *Plasmodium vivax* ou *ovale* car ils sont actifs sur les formes dormantes intra-hépatiques. Ces molécules sont aussi de puissants gamétocytocides [2] exploités pour leur effet anti-transmission.

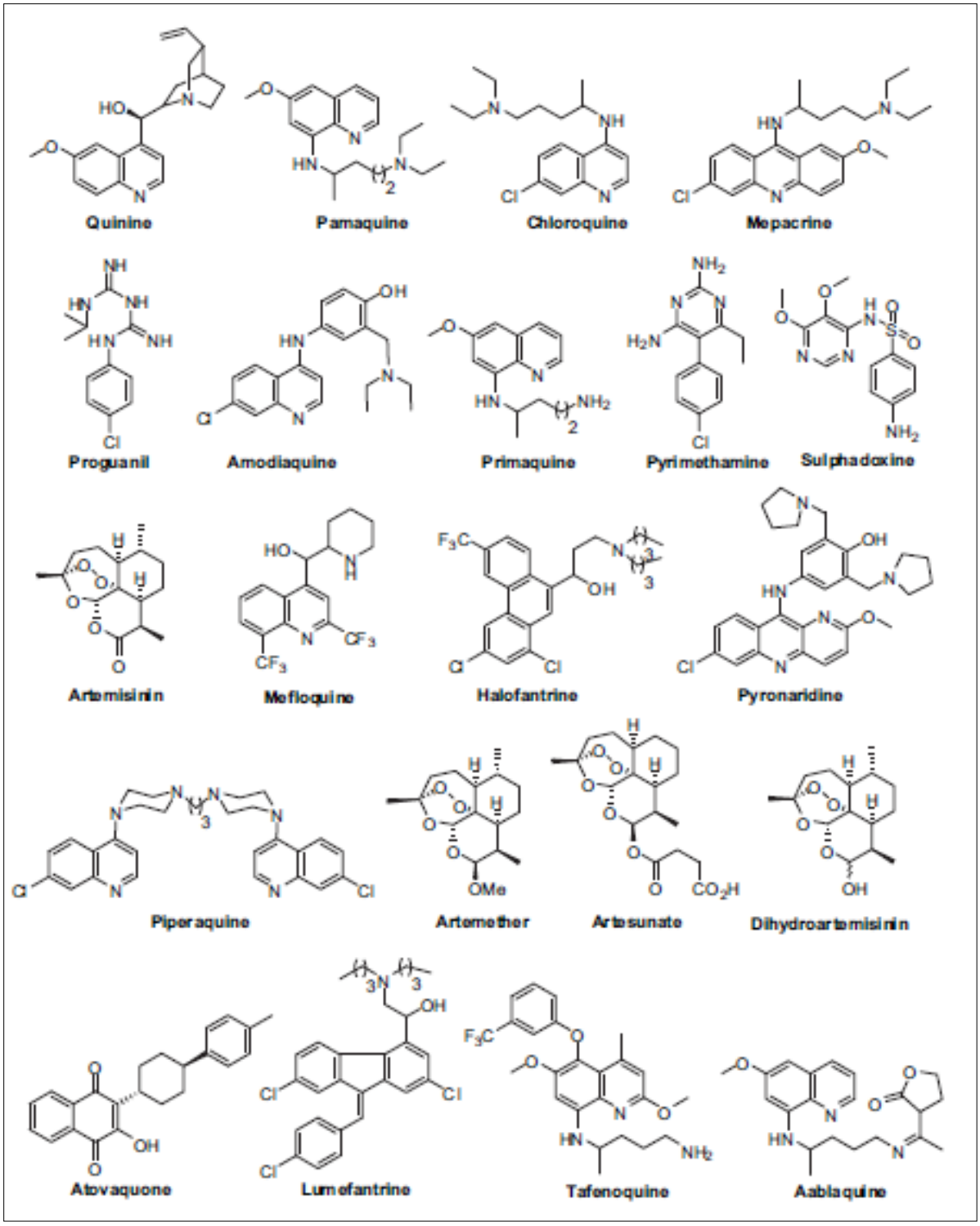


Figure I-13: Antipaludiques de référence. *La quinine, la pamaquine et la mépacrine ont été développées avant la 2nde Guerre Mondiale. L'amodiaquine, la primaquine et la pyriméthamine ont été exploitées dans les années 1950, la sulfadoxine dans les années 1960 et l'artémisinine dans les années 1970. D'autres molécules ont été introduites dans les années 1980, comme la méfloquine, l'halofantrine, l'ablaquine, la pyronaridine, la pipéraquine et les*

dérivés de l'artémisinine tels que l'artémether, l'artésunate et la dihydroartémisinine. Tirée de [3].

La famille des 4-aminoquinoléines peut être considérée comme l'une des plus importantes familles antipaludiques de l'histoire. Son principal représentant, la chloroquine, est connu pour son activité schizonticide (parasites asexués) rapide et importante sur toutes les espèces plasmodiales infectant l'être humain [4]. Elle n'affecte pas les formes intra-hépatiques plasmodiales (schizontes intra-hépatiques de toutes les espèces et hypnozoïtes de *Plasmodium vivax* et *ovale*) et bénéficie d'une excellente tolérance tant en curatif qu'en préventif. Les 4-aminoquinoléines ont été développées à partir de la quinine, un alcaloïde extrait du quinquina.

En utilisant la mépacrine comme un *lead*, Andersag et *al.* ont synthétisé la 7-chloroquinoléine (chloroquine) en 1934 [4]. La commercialisation internationale de la chloroquine a débuté dans les années 40 et s'est intensifiée dans les années 50, en tant que traitement de premier intension d'abord, puis dans le cadre de campagnes d'administration en masse annexées au programme d'élimination global (GMEP) contre le paludisme. Durant son âge d'or, la chloroquine a permis de traiter des milliards de cas cliniques et a sauvé des millions de vies partout sur le globe. L'émergence et la dispersion de la chloroquino-résistance dans les années 60 a néanmoins résulté en une réduction considérable de son utilisation. Le mécanisme d'action des 4-aminoquinoléines implique la formation de complexes avec l'hème, issu du catabolisme de l'hémoglobine par le parasite asexué. Cette interaction prévient la cristallisation de l'hème et maintient ainsi son potentiel cytotoxique [5]. L'efficacité de cette famille chimique repose sur une accumulation dans la vacuole digestive du parasite dépendante du gradient de pH transvacuolaire [6]. Les mécanismes moléculaires de la chloroquino-résistance font intervenir un efflux de chloroquine en dehors de la vacuole via des transporteurs membranaires spécifiques [7, 8].

Des programmes de pharmacomodulation importants ont été lancés afin de contourner ce mécanisme de résistance [3, 4]. Un grand nombre d'analogues ont été synthétisés, avec une focalisation sur les 4-aminoquinolines à chaînes latérales modifiées, les bisquinoléines et plus récemment les 4-aminoquinolines hybrides [9]. Les études de relation structure-activité font apparaître un noyau quinoléine et une chaîne latérale 4-amino essentiels à l'activité antipaludique *in vitro* et *in vivo*. Une substitution de la chaîne par un cycle hydroxy-aryle, caractérisant par exemple l'amodiaquine (AQ), accroît la stabilité métabolique de la molécule et augmente l'indice thérapeutique tout en préservant l'activité antipaludique *in vivo* [3, 4].

Les bénéfices portés par l'AQ ont été démontré en zone de chloroquino-résistance [3]. Son utilisation a néanmoins été limitée sur un axe curatif en raison d'un risque d'atteinte hépatique ou d'agranulocytose mortelle en traitement prolongé [10, 11]. Le développement de structures bisquinoléines, telle la dihydroxy-pipéraquine (DHP), permet par effet stérique de minimiser sa reconnaissance par les transporteurs responsables de l'efflux du principe actif en dehors de la vacuole digestive parasitaire [3]. La DHA et l'AQ sont actuellement utilisés en tant que partenaire pour la formulation des ACTs [11]. La chloroquine est encore prescrite en préventif ou pour le traitement des accès palustres simples dans les zones exemptes de chloroquino-résistance.

2. Les arylaminoalcools sont des quinoléines synthétisées pour contrer la chloroquino-résistance.

Cette famille regroupe les quinoléine-méthanols (quinine, méfloquine) et les phénanthrènes-méthanols (halofantrine). Ce sont des antipaludiques à forte activité schizonticide sanguine [1]. Ils sont employés pour le traitement des accès palustres simples en raison de leur administration exclusivement orale. La méfloquine, dont la demi-vie est longue, est aussi utilisée en prophylaxie.

La quinine est le plus ancien des antipaludiques, utilisé avant même que le paludisme ne soit reconnu comme maladie parasitaire. Elle est extraite à partir de l'écorce de quinquina (*Cinchona officinalis*). La quinine demeure l'un des principaux antipaludiques historiques recommandé jusqu'à récemment pour la prise en charge chimiothérapeutique des accès graves en Europe et en Afrique. Elle a été supplantée dans cette indication par l'artésunate intraveineux en 2005 chez l'adulte et en 2010 chez l'enfant. Elle garde comme indication en France le traitement des accès palustres simples avec vomissements incoercibles. Active sur les souches plasmodiales résistantes à la chloroquine ou la méfloquine [4], son mode d'action générale semble pourtant similaire. Tout comme la chloroquine, elle se lie à l'hème et inhibe sa cristallisation. Les complexes quinine-hème endommagent les parois cellulaires via la libération d'hème en présence de glutathion et par peroxydation lipidique. Les cas de résistance ont émergé dans les années 1960 et se sont étendus à partir des années 1980 [8]. Ils restent toutefois essentiellement limités à l'Asie du Sud-Est. Ses effets secondaires courants, incluant le cinchonisme, les troubles de conduction et l'hypoglycémie [11] sont à l'origine du développement de la chloroquine.

Développée dans les années 1970, la méfloquine (MQ) est un schizonticide à action longue très efficace sur toutes les espèces infectant l'être humain. À pH physiologique, son amine protonée établit une liaison hydrogène intramoléculaire avec l'hydroxyle de sa chaîne latérale [3]. Cette caractéristique partagée avec l'AQ contribue de façon importante à son activité sur les souches chloroquinorésistantes. La MQ présente une synergie avec les dérivés de l'artémisinine, tel l'artésunate, auquel elle est souvent associée pour le traitement des accès simples (thérapies combinées à base d'artémisinine) [12]. Les souches résistantes à la méfloquine augmentent en fréquence depuis une décennie en Asie du Sud-Est où la protection conférée par l'association aux dérivés de l'artémisinine est récemment devenue inopérante [8].

L'halofantrine est un dérivé synthétique de la quinine très proche de la luméfantrine, apparue plus récemment. Actifs sur toutes les formes asexuées du parasite, ces 2 molécules peuvent, à des degrés divers, entraîner un allongement de l'intervalle Q-T [11]. Cette cardiotoxicité limite l'utilisation de l'halofantrine. La luméfantrine est très utilisée dans le cadre de l'association à doses fixes artémether-luméfantrine pour le traitement de l'accès simple en zone endémique et chez le voyageur.

3. Les anti-métabolites sont administrés sous forme de combinaisons et ciblent également les parasites asexués.

Les antifolates sont administrés sous forme de combinaisons. Ils interfèrent avec la biosynthèse de l'acide folique [1] : en déplétant le stock de tétrahydrofolate, ils inhibent la production des acides nucléiques par le parasite. La sulfadoxine (un sulfamide à demi-vie longue) et la dapsone sont des antifoliques qui inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS) plasmodiale (enzyme absent chez les mammifères). La pyriméthamine (une diaminopyridine à demi-vie longue), le proguanil et le chlorproguanil (des biguanides) ont une activité antifolinique : ils inhibent avec une grande spécificité la dihydrofolate réductase parasitaire (DHFR).

L'association des partenaires synergiques sulfadoxine/pyriméthamine (SP) au rapport 20/1 tient son origine des cas de résistance à la monothérapie pyriméthamine détectée rapidement après son utilisation dans les zones endémiques avec chloroquino-résistances [13]. L'association SP a été utilisée en 1ere ligne pour le traitement des accès simples chloroquino-résistants dans les années 1960. Une résistance a émergé quelques années plus tard. Elle est

actuellement détectée dans de nombreuses régions du globe ou sévissent *Plasmodium falciparum* et *vivax*.

Le proguanil est un pro-médicament converti au niveau hépatique en un métabolite triaziné actif, le cycloguanil [4]. D'une demi-vie de 1 à 20 heures selon le profil métabolique du malade (lent ou rapide), c'est un schizonticide à action lente [15]. Bien toléré, il a été largement employé en association avec la chloroquine sur le volet chimioprophylactique en zone chloroquino-résistante, de façon similaire à la combinaison dapsone-pyriméthamine [4, 14]. Il est désormais surtout utilisé en association avec l'atovaquone, en curatif ou en prophylaxie, dans les deux cas chez le voyageur.

L'atovaquone est une naphtoquinone, analogue de l'ubiquinone (coenzyme Q), qui inhibe avec une grande efficacité la chaîne de transport électronique mitochondriale du parasite. En raison des taux de recrudescence élevés observés durant les 1ères évaluations, ce composé est administré en combinaison avec le proguanil. Bien qu'efficace sur les plasmodies multi-résistantes, son coût limite son utilisation en curatif en zone endémique [4, 14]. Son utilisation a été envisagée récemment en Asie du Sud-Est (zones de résistance à l'artémisinine) dans le cadre de multi-thérapies de sauvetage.

Les antibiotiques à activité antipaludique regroupent principalement les macrolides (l'érythromycine, l'azythromycine), les lincosamides (la clindamycine) et les tétracyclines (la tétracycline, la doxycycline) qui exercent un effet lent sur la synthèse protéique par inhibition des fonctions de l'apicoplaste parasitaire [16]. Une inhibition de la dihydroorotate déshydrogénase (DHOdase) plasmodiale par la tétracycline et la doxycyline est également mentionnée. Ces composés d'action lente et faible *in vivo* ont été utilisés en zones de multi-résistances pour le traitement du paludisme grave en association avec la quinine, ou en chimioprophylaxie du voyageur [14].

4. Les dérivés de l'artémisinine sont administrés en combinaison avec des médicaments partenaires à demi-vie longue.

L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique caractérisée par un pharmacophore trioxane portant un pont endopéroxide essentiel à son activité antipaludique [17]. Elle a été extraite à partir d'*Artemisia annua* par les scientifiques chinois en 1970. Son groupement carbonyl a été réduit afin de générer l'artésunate, l'artémether et la dihydroxy-artémisinine (DHA), des dérivés semi-synthétiques dotés d'une plus grande solubilité. Leur mode d'action

n'est pas entièrement décrypté. Les dérivés de l'artémisinine sont considérés comme des pro-médicaments qui, après activation métabolique (DHA) et diffusion dans le parasite libèrent des espèces réactives de l'oxygène et des radicaux libres [18]. Cette activation pourrait résulter d'une scission réductive du pont endopéroxyde, de sa protonation ou d'une réaction de compléxation avec des atomes de fer ferreux Fe^{2+} [19]. Les espèces radicalaires ainsi formées alkylent un panel de cibles moléculaires parasitaires, dont les cystéines protéases essentielles à la dégradation de l'hémoglobine. Les complexes hème-artémisinine peuvent interagir avec une hème polymérase putative, PfHRP2 (*Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II) et inhibent le processus de détoxification associé. De plus, l'artémisinine induit un désassemblage de l'hémozoïne. Une inhibition de l'ATPase SERCA PfATP6 [20] et de la chaîne de respiration mitochondriale ont également été rapportées [17]. L'activité antipaludique des dérivés de l'artémisinine est dépendante du catabolisme de l'hémoglobine par le parasite : l'inactivation par mutagenèse dirigée d'une hémoglobinase, la cystéine protéase falcipaïne-2, diminue considérablement la sensibilité *in vitro* des souches plasmodiales à cette famille chimique [21].

Les dérivés de l'artémisinine sont très bien tolérés et comptent parmi les plus efficaces des antipaludiques actuels. Ils sont des schizonticides sanguin très actifs et à effet rapide [17]. Caractérisés par une demi-vie d'élimination très courte de 1 à 3 heures, leur importante activité se manifeste très rapidement, après administration, par une réduction brutale des parasitémies jusqu'à un facteur 10 000 par cycle. Une activité plus modeste, mais significative a été mise en évidence sur les stades sexués intra-érythrocytaires (action gamétocytocide complémentaire) [22]. Comparativement aux autres antipaludiques, cette famille chimique a un effet marqué sur les formes parasitaires circulantes (stades annulaires asexués ne cytoadhérant pas). Afin de minimiser le risque d'émergence de résistance, les dérivés de l'artémisinine sont typiquement combinés à un médicament partenaire. Ce dernier présente généralement une demi-vie plus longue et un mode d'action complémentaire ou synergique (méfloquine, amodiaquine, pipéraquine, pyronaridine). Le médicament partenaire permet de tuer les rares parasites persistant après l'action rapide des endopéroxydes. Cinq principales combinaisons à base d'artémisinine (ACTs) sont actuellement exploitées [12] : l'artésunate-méfloquine (AS/MQ), l'artésunate-amodiaquine (AS/AQ), l'artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine (AS/S/P), l'artémether-luméfantrine (ART/LUM) et la DHA-pipéraquine (DHA/PP). L'OMS recommande actuellement l'utilisation de ces combinaisons en tant que

traitement de 1ere intention dans l'ensemble des pays endémiques. Cette recommandation est de plus en plus suivie.

5. L'expansion des résistances médicamenteuses dépend de facteurs épidémiologiques.

Depuis le 20ème siècle, un panel diversifié et puissant de composés antipaludiques ciblant principalement (mais pas seulement) les parasites intra-érythrocytaires asexués a été développé. En dépit de la mise en place des combinaisons thérapeutiques par les services de santé *–visant à étendre la durée d'utilisation des médicaments sur le plus long terme possible–*, *Plasmodium falciparum* conserve son potentiel intrinsèque à développer des pharmaco-résistances, complexifiant l'utilisation de l'arsenal chimiothérapeutique actuel [7, 8, 13, 23].

La grande diversité génétique qui caractérise le parasite intra-érythrocytaire asexué est étroitement dépendante de son potentiel d'amplification et de la stabilité de son génome. Bien que de très faible prévalence, une mutation conférant une pharmaco-résistance peut être sélectionnée sous l'action d'une pression de sélection médicamenteuse. Le développement d'un génotype pharmaco-résistant peut se produire au détriment de son potentiel de multiplication (*fitness cost of drug resistance*) [23]. Cependant, un équilibre entre multiplication et survie des différents génotypes présents chez l'hôte s'opère sous l'action d'une intense pression de sélection médicamenteuse, ce qui peut favoriser la sélection d'un génotype résistant à multiplication lente. L'expansion de cette pharmaco-résistance fait ensuite intervenir une diversité de facteurs épidémiologiques : parmi ceux-ci, l'intensité de transmission locale, les propriétés du médicament et les modalités de prise en charge chimiothérapeutique. La cessation de l'utilisation d'un antipaludique peut se traduire par une régression de la pharmaco-résistance associée. Il en est ainsi pour la chloroquine sur divers points du globe suite à la réduction de son utilisation en faveur des ACTs [24, 25, 26]. Ces rapports soulignent l'importance des stratégies de prise en charge chimiothérapeutique dans l'émergence et la propagation des pharmaco-résistances.

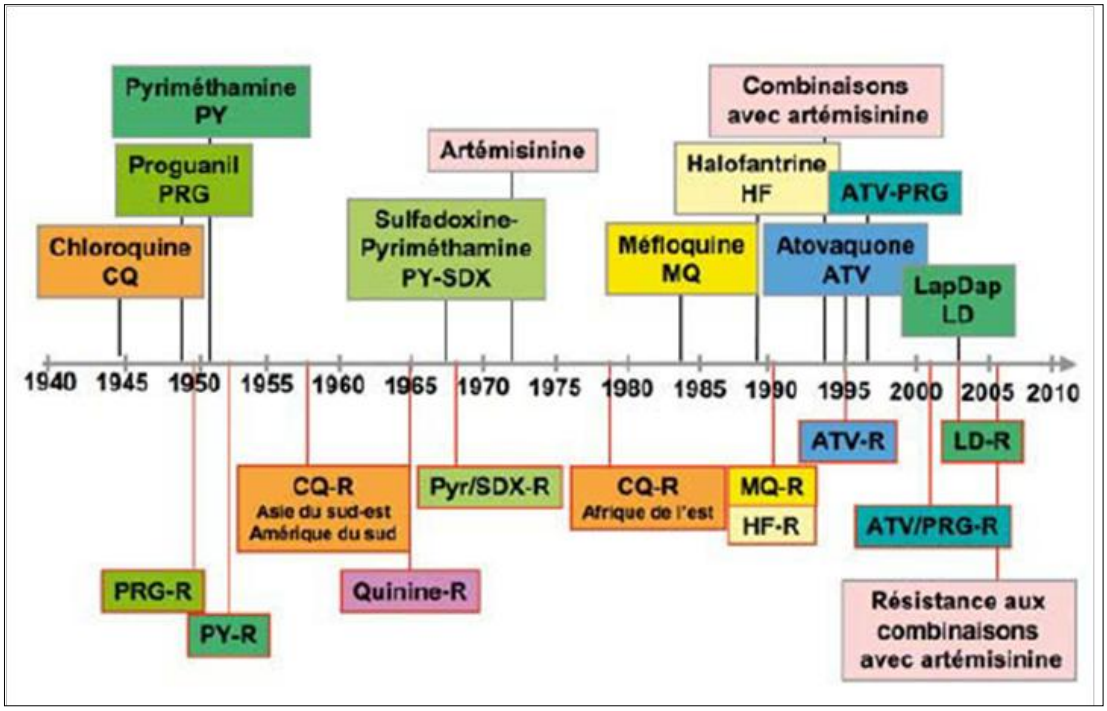


Figure I-14: Développement et exploitation chronologique des antipaludiques de référence (volet supérieur de la frise), en relation avec l'apparition des pharmaco-résistances respectives (volet inférieur). *Les premiers cas de résistance à la chloroquine, aux combinaisons sulfadoxine/pyriméthamine ou à bases d'artémisinine (2009) sont apparus dans la région du Mékong, épicentre des pharmaco-résistances. Tirée de [13].*

6. Des marqueurs génétiques sont associés aux pharmaco-résistances.

En raison de sa grande efficacité, de son excellente tolérance et de son coût, la chloroquine a été utilisée de façon importante durant plus de 20 ans sur la totalité du globe. Les résistances parasitaires à cette molécule ont été initialement décelées dans le bassin du Mékong en 1957, puis à la frontière vénézuélo-colombienne en 1959. La chloroquino-résistance est ensuite apparue en Afrique dans les années 1970 et s'est avérée être un problème majeur à l'échelle mondial à partir des années 1980 [7, 13]. La résistance à la chloroquine repose sur l'expression d'un transporteur vacuolaire codé par le gène Pfcrt (*Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*, chromosome 7) et dépend de la présence de la mutation K76T dans sa séquence [13]. Ce transporteur génère un efflux de chloroquine en dehors de la vacuole digestive parasitaire et contrecarre ainsi son activité. Plusieurs autres mutations ont été détectées dans la séquence Pfcrt et leur rôle est supposé compenser l'impact négatif de la mutation K76T sur le potentiel de multiplication du parasite

(*fitness compensation*). Le transporteur codé par Pfcrt muté est également identifié dans les souches résistantes à la quinine.

Le nombre de copies du gène Pfmdr1 (*Plasmodium falciparum multidrug resistance 1, chromosome 5*) détermine également le phénotype de chloroquino-résistance [13]. Ce gène code pour un homologue structural et fonctionnel de la glycoprotéine P humaine, une pompe à efflux de médicaments nommée Pgh1 (*P-Glycoprotein homologue* 1). Les pompes Pgh1 permettraient la concentration des médicaments dans des compartiments vacuolaires spécifiques de séquestration. L'amplification et/ou la surexpression de Pfmdr1 confère une résistance non seulement à la chloroquine, mais également *–et à un degré variable-* à l'amodiaquine, la pipéraquine et aux arylaminoalcools tels que la méfloquine, la luméfantrine et la quinine [7, 13]. Des profils de résistance complexes résultent du niveau d'expression de Pfmdr1 et/ou de Pfcrt ainsi que de leurs mutations respectives.

Durant la 2nde Guerre Mondiale les armées Alliées, privées de quinine suite à l'invasion de l'Indonésie par les Japonais, ont développé le proguanil (PG). L'efficacité de ce dernier a ensuite stimulé les recherches sur les dérivés des pyrimidines, ce qui a résulté en la découverte de la pyriméthamine (P). La combinaison sulfadoxine/pyriméthamine (SP) a été introduite quelques années plus tard suite à l'émergence des résistances au PG et à la P. Cette combinaison a été l'un des remèdes antipaludiques les plus prescrits avec la chloroquine et s'est avéré très efficace en curatif et en chimioprophylaxie. Actuellement, des échecs chimiothérapeutiques à SP sont reportés en Afrique, en Asie, en Indonésie et en Amérique latine [7]. Les résistances cliniques aux antifoli(ni)ques sont typiquement associées à des combinaisons de mutations affectant la DHFR et/ou la DHPS. Ainsi, la triple mutation dhfr S108N-N51I-C59R combinée à la double mutation dhps A437G-K540Q confère une résistance 5 fois supérieure à la SP, comparativement aux souches parasitaires sauvages [13]. Des mutations des gènes Pfdhfr et Pfdhp sont également associées aux cas de résistance à la dapsone et au cycloguanil.

Des marqueurs moléculaires ont été associés à d'autres pharmaco-résistances ou à une réduction de sensibilité aux antipaludiques. La résistance à la combinaison synergique atovaquone/proguanil, actuellement faiblement répandue, résulte de la mutation du gène mitochondrial Pfcytb codant pour le cytochrome b [13]. Des isolats à sensibilité *in vitro* réduite pour la doxycycline ont été reportés, associés à une répétition des gènes Pfmdt (*Plasmodium falciparum multidrug transporter*), un transporteur à médicaments analogue à la

protéine de résistance à la tétracycline TetA, et PftetQ (*Plasmodium falciparum tetracycline resistance TetQ*), codant une GTAPase putative impliquée dans la résistance aux cyclines.

D'autre part, un ralentissement de la clairance parasitaire après traitement aux ACTs a été reporté en 2009 parmi des malades du bassin du Mékong, épicentre des résistances aux antipaludiques [27]. Un accroissement de la prévalence du phénotype à clairance lente associé à des échecs thérapeutiques a été mis en évidence au Cambodge et dans les zones voisines, ainsi qu'en Chine. Une composante génétique a été associée à ce phénotype. Une association a été mise en évidence entre le polymorphisme génétique K13 (superfamille protéique à motifs Kelch) et la sensibilité diminuée d'isolats cliniques *in vitro* [28]. Plus précisément, des séquences alléliques K13 mutées ont été identifiées dans les isolats à phénotype de clairance lente et le retrait de ces mutations a restauré une sensibilité. Dans ce sens, le risque d'échec thérapeutique par rechute après traitement par DHA-PP au Cambodge a récemment été associé aux infections par des parasites portant des allèles K13 mutés [29]. Le mécanisme de résistance moléculaire hypothétique ferait intervenir la sur-activation de l'expression d'une machinerie anti-oxydante ciblée par les protéines K13 mutées [30], contrecarrant l'activité pharmacologique de la DHA.

7. Les 8-aminoquinoléines sont des gamétocytocides puissants induisant une hémolyse chez les patients déficients en glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Les 8-aminoquinoléines (8AQ) sont les seuls composés actifs sur les stades parasitaires quiescents de *Plasmodium vivax* et *ovale* (hypnozoïtes intra-hépatiques responsables des recrudescences à moyen et long terme, absents chez *Plasmodium falciparum*) et sont des gamétocytocides très puissants utilisés pour limiter la transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum*. La 1ère 8AQ a été synthétisée en 1925 et a été appelée pamaquine (= plasmochine). Gamétocytocide employé en combinaison avec la quinine, la pamaquine s'est avérée très efficace contre les recrudescences à *Plasmodium vivax.* Son exploitation thérapeutique a cependant été abandonnée en raison de sa faible activité schizonticide et de sa grande toxicité.

D'autres 8AQ, telles la pentaquine, l'isopentaquine et la primaquine sont apparues dans les années 1940 [31]. Parmi celles-ci, la primaquine, synthétisée en 1946 par Elderfield el *al.* [32], est la plus efficace et la moins toxique. Vers la fin de la 2nde Guerre Mondiale, la

primaquine a été exploitée pour son potentiel gamétocytocide anti-transmission, tout comme la chloroquine pour son activité schizonticide. Combinée à l'exploitation des moustiquaires imprégnées d'insecticides dans le cadre du GMEP (plan d'éradication mondial du paludisme, années 50-60), cette approche a permis d'éliminer le paludisme de plusieurs zones tempérées et sous-tropicales du globe dans les années 1960. La primaquine est efficace en prophylaxie anti-transmission contre toutes les espèces plasmodiales infectant l'être humain, et en prévention des recrudescences à *Plasmodium vivax* et *ovale* associée à un traitement curatif des patients infectés par ces 2 dernières espèces. Son mécanisme d'action n'est pas entièrement compris. Une altération du métabolisme mitochondrial par interférence avec les fonctions de l'ubiquinone et la production de métabolites très réactifs créant un stress oxydatif intra-parasitaire sont rapportées [31]. Aucune résistance à la primaquine n'a été rapportée en plus de 60 années d'utilisation. Cela est probablement dû à la stérilisation efficace des infections palustres (élimination efficace des gamétocytes) par les concentrations de primaquine initialement employées, potentiellement combinée au raccourcissement des infections par les agents schizonticides adminsitrés en combinaison (réduction rapide et importante de la population parasitaire asexuée se répercutant sur la densité gamétocytaire quelques jours plus tard).

En dépit de sa très grande efficacité à éliminer les gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum*, la primaquine est également caractérisée par une toxicité qui a divisé l'opinion médicale et résulté en des pratiques d'utilisation ou de recommandation divergentes [33]. La primaquine peut induire une hémolyse oxydative intravasculaire plus ou moins grave (se manifestant par une hémoglobinurie) chez les individus déficients en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Le déficit en G6PD (=favisme) est le déficit enzymatique le plus répandu à l'échelle mondiale. Ce polymorphisme génétique associé au chromosome X est commun dans les zones tropicales, avec une prévalence variant de 3 à 30%. Plus de 180 variants génétiques associés à ce déficit ont été répertoriés. Le degré de déficience pour l'activité G6PD, les doses de primaquine administrées et la durée du traitement déterminent la gravité de l'hémolyse induite par la primaquine. On distingue généralement les variants à déficit G6PD élevé, de type méditerranéens (prédominants dans plusieurs régions d'Europe, d'Asie et de l'Inde), des variants africains A- à déficience modérée (retrouvé en Afrique subsaharienne).

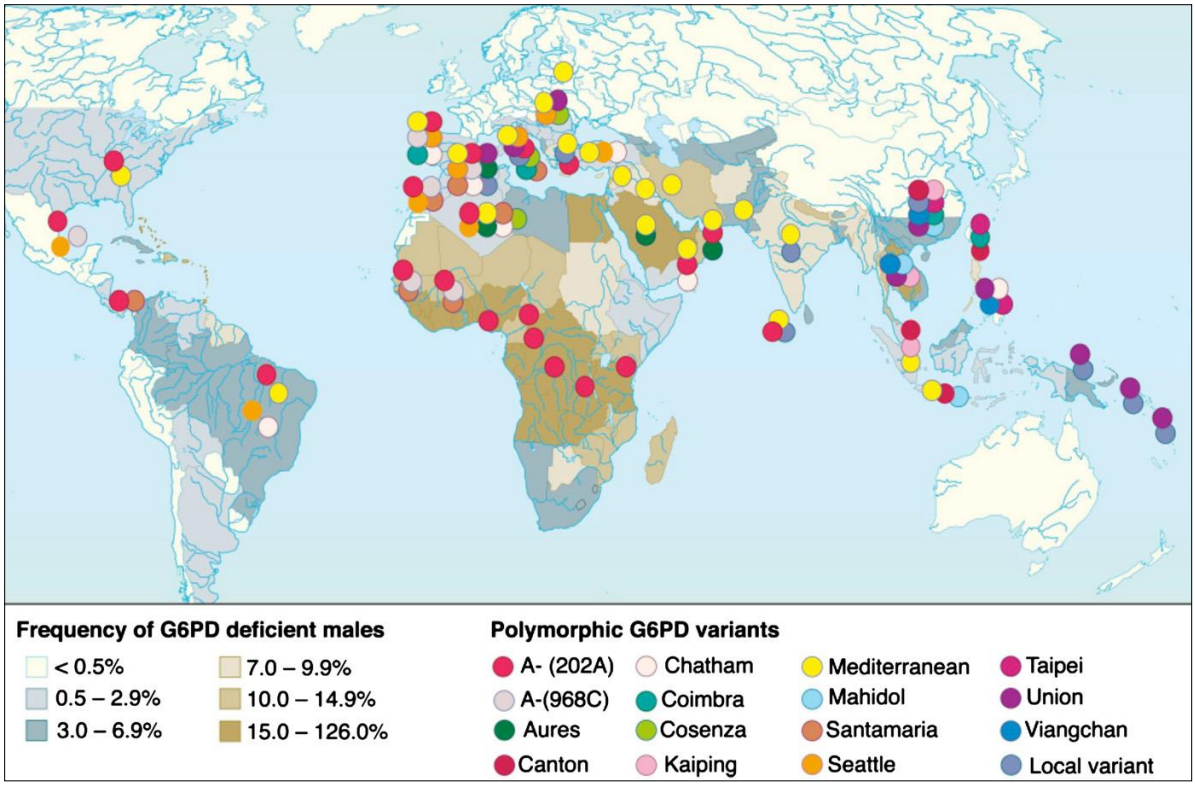


Figure I-15: Distribution mondiale du polymorphisme de déficience de la glucose-6-phosphate déshydrogénase. *Tirée de [34]*

8. La posologie de la primaquine a été modifiée au regard de la déficience G6PDH.

La primaquine a été intensément utilisée dans le cadre de campagnes d'administration de masse durant le 20ème siècle [35]. Un traitement radical de 5 à 14 jours, avec 3 à 30mg/kg par prise journalière ou en intermittence, a été recommandé durant plus de 50 ans dans les zones tropicales où *Plasmodium vivax* est prévalent. La prévention de la transmission des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* a quant à elle reposé sur l'administration d'une seule dose de primaquine, typiquement entre 0.5 et 0.75mg/kg [33].

Comparé à l'Asie -*où* Plasmodium vivax *est très présent*-, la fréquence des effets secondaires hémolytiques est moindre en Afrique -*où* Plasmodium falciparum *prédomine*-, car 1/la déficience G6PD associée au variant africain A- est assez peu marquée, 2/la posologie implique une courte exposition à une plus faible dose de primaquine.

Le profil type du variant A- se caractérise par une hémolyse évidente 2 à 3 jours après l'initiation du traitement, compensée par une production de réticulocytes (plus résistants au

stress oxydatif) remplaçant les érythrocytes lysés. L'hémolyse peut néanmoins s'aggraver si des doses de primaquine complémentaires plus élevées sont administrées. Les variants à déficit marqué en G6PD (variant méditerranéen) sont quant à eux sujets à une hémolyse graduelle qui s'amplifie avec la durée du traitement, pouvant alors remettre en jeu le pronostic vital si le traitement n'est pas stoppé.

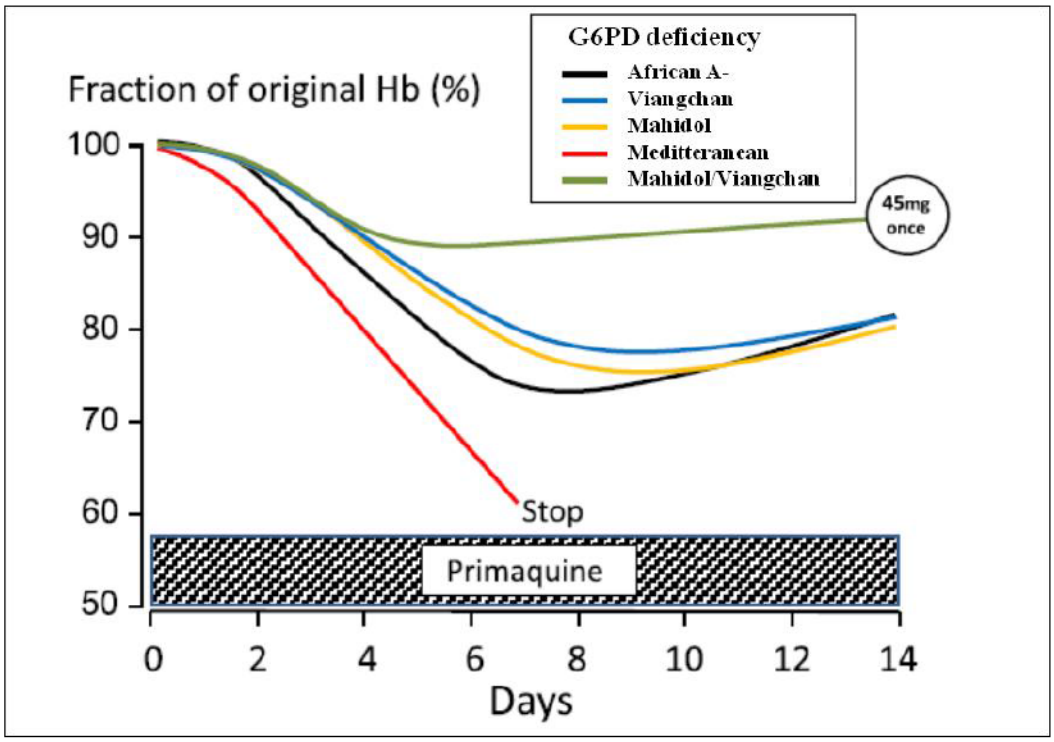


Figure I-16: Cinétique du taux sanguin d'hémoglobine associé à une hémolyse oxydative intravasculaire induite par un traitement quotidien à la primaquine, chez des adultes à déficience variable en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD). *Des individus portant les variants G6PD méditerranéen, africain A-, Mahidol ou Viangchan ont été traités durant 14 jours avec une dose quotidienne du médicament (traitement curatif,* Plasmodium vivax*). L'effet d'une dose unique de 45mg de primaquine chez des patients porteurs des variants Mahidol ou Viangchan est donné à titre de comparaison. Tirée de [33].*

Il est actuellement très difficile d'estimer le risque d'effet indésirable grave associé au traitement par la primaquine. Le nombre cumulé d'individus traités par primaquine est estimé à 200 millions [33]. Seuls 14 décès ont été recensés suite à un traitement à la primaquine, mais ce chiffre est probablement sous-estimé en raison, entre autres, des conditions de recueil et de communication des informations dans les pays ayant employé cette molécule en campagnes de masse (ex-URSS, Corée du Nord, Chine). Les tests de dépistage G6PD n'ont pas été systématiquement employés durant les campagnes d'administration de masse de la

primaquine. Parmi ces décès, la majorité concerne des malades de zones non endémiques ayant subi un traitement avec des doses multiples. Le risque de mort déduit (Chine exclue) serait de 1 pour 621 428 individus [33].

L'hémolyse induite chez les individus déficients en G6PD a suscité un intérêt scientifique croissant ces dernières décennies, en raison de la menace grandissante du paludisme d'importation dans les zones tempérées et sous-tropicales, concomitante à l'intérêt renouvelé pour l'objectif d'élimination du paludisme. Le risque lié à la primaquine n'étant pas clairement défini, l'OMS a recommandé en 2012 l'administration d'une dose unique de primaquine à 0.25mg/kg en complément d'un traitement aux ACTs en zone de transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum*, avec pour objectif le support des programmes d'élimination du paludisme et la prévention de l'extension de la résistance aux dérivés de l'artémisinine [36].

9. L'OMS encourage les études de l'impact d'un traitement ACT-primaquine monodose 0.25mg/Kg (ACT-PQ 0.25mg/Kg) sur la transmission du paludisme.

Le rapport du conseil OMS 2012 sur l'innocuité et l'efficacité anti-transmission d'une dose unique de primaquine rapporte les conclusions formulées par les experts intégrant les données disponibles, publiées ou non [34, 36]. Ces conclusions sont les suivantes :

-La relation existante entre densité gamétocytaire et transmission n'est pas linéaire, elle est complexe, affectée par différentes co-variables et varie donc substantiellement à l'échelle individuelle. La densité gamétocytaire n'est donc pas exploitable pour étudier le potentiel de transmission d'un individu impaludé, des expériences par gorgement de moustique sont nécessaires.

-Sept études réalisées entre 1929 et 2012 basées sur le gorgement de vecteurs Anophèles fournissent une base de réflexion pour l'évaluation de l'impact des 8AQs sur la transmission du paludisme. Ces études démontrent que l'effet anti-transmission de la primaquine (développement d'oocystes chez le vecteur) est plus marqué que l'effet gamétocytocide (diminution de la densité gamétocytaire) de la primaquine. Ces résultats suggèrent fortement que des gamétocytes morts (ou vivants mais incapables d'assurer la transmission une fois ingérés par l'anophèle) peuvent rester en circulation, et induisent une surestimation du potentiel de transmission déduit à partir des seules densités gamétocytaires.

-L'établissement d'une relation dose-réponse est nécessaire pour définir la concentration optimale de PQ permettant d'observer un effet anti-transmission efficace. Les données publiées et non publiées sur un total de 128 patients ayant reçu des doses variables de primaquine suggèrent qu'en combinaison avec une ACT, des doses de 0.125mg/Kg résultent en un blocage maximal de la transmission. Cela supporte l'utilisation d'une seule dose de primaquine à 0.25mg/Kg.

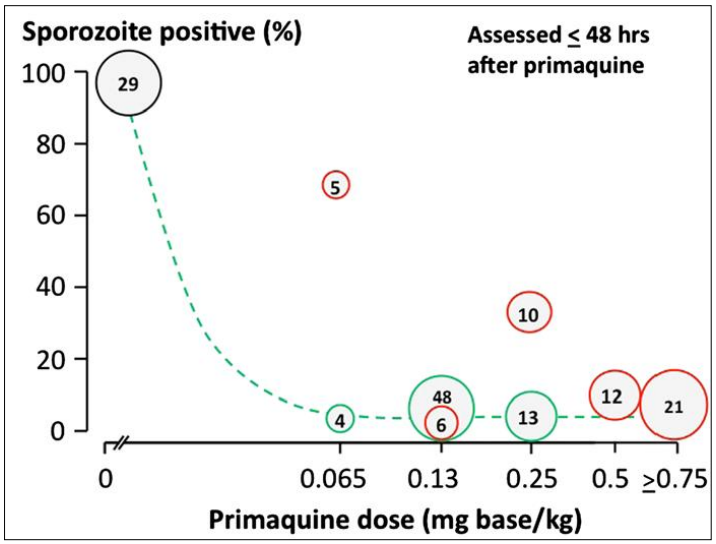


Figure I-17: Relation dose-réponse entre une prise unique de primaquine ≤ 0.75mg/Kg et le développement de sporozoïtes dans le vecteur Anophèle s'étant gorgé du sang des patients 48 heures après leur traitement. *La taille des cercle représente le nombre de patients considérés par condition, la couleur verte se réfère aux patients ayant un co-traitement curatif par ACTs, en rouge un traitement curatif non ACT. Tirée de [34].*

Depuis, les travaux d'une seule étude ont été publiés dans ce domaine. Il s'agit d'une étude randomisée en double aveugle menée en Ouganda en 2014 qui a évalué l'impact d'une dose unique de 0.1, 0.4 et 0.75mg/kg de primaquine sur les densités gamétocytaires (infectivité potentielle) chez des enfants de 1 à 10 ans non déficients pour la G6PD et traités pour un accès palustre simple avec une ACT (artémether-luméfantrine) [37]. Les résultats indiquent que les doses de 0.4 et 0.75mg/kg exercent une action gamétocytocide similaire, caractérisée par une réduction par 2 du temps de portage gamétocytaire, détecté par PCR (portage gamétocytaire observés durant ~6 jours post-traitement comparé à ~12 pour le contrôle placebo). Ces résultats ne permettent pas de conclure quant à une potentielle efficacité gamétocytocide à 0.1mg/Kg (portage gamétocytaire observé sur ~8 jours post-traitement).

En résumé, les données apportées par l'OMS concernant l'impact d'un traitement ACT-PQ 0.25mg/Kg sur la transmission du paludisme sont très limitées, mais suggèrent un effet anti-transmission efficace sous-estimé par la présence de gamétocytes morts (ou vivants mais incapables de transmission) circulants chez les malades traités. Le rapport OMS souligne le besoin de réaliser des travaux complémentaires afin de valider ou d'optimiser le dosage de la primaquine. Des travaux récents indiquent qu'une dose supérieure à 0.4mg/Kg réduit considérablement, de ~50 à ~66% [37, 38], les densités de gamétocytes chez les patients, avec un effet gamétocytocide plus modéré (~33%) en deçà de cette concentration. Ce type d'études, à répéter en divers points du globe, sera prochainement complété par des approches basées sur le gorgement de moustiques afin d'apprécier objectivement l'impact du traitement ACT-PQ 0.25mg/Kg sur la transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum* [39].

10. Le risque d'hémolyse associé au traitement ACT-PQ 0.25mg/Kg est incertain.

En ce qui concerne l'innocuité, les données avancées par le rapport OMS suggèrent un risque faible d'hémolyse oxydative intravasculaire et l'absence de risque d'anémie chez les sujets d'origine africaine même en cas de déficit en G6PD (variant A-, déficit modéré) [34, 36]. *A contrario*, une récente étude menée en Tanzanie sur des enfants ayant développé un accès palustre simple et traités par une combinaison ACT-primaquine (ACT/PQ) monodose 0.25mg/Kg rapporte la survenue 1/d'une anémie modérée chez 40% des patients homozygotes pour le variant muté G6PD Mahidol (déficit modérée), 2/d'une anémie grave chez un patient hétérozygote et 3/de façon intrigante, d'une anémie modérée chez ~5% des patients non déficitaires en G6PD [40]. Ainsi, un risque anémique accompagne la chimiothérapie ACT-PQ aux doses actuellement recommandées par l'OMS, ciblant principalement les individus déficitaires en G6PD et dans une moindre mesure les patients sans déficit. Des études complémentaires sont sollicitées par l'OMS afin d'évaluer le risque associé à la nouvelle posologie de la primaquine.

Ces données suggèrent que la considération du déficit en G6PD n'est pas suffisante pour appréhender le risque hémolytique associé à la nouvelle posologie de la primaquine. Elles soulèvent également le besoin de différencier le risque associé à la primaquine lorsqu'administrée en complément aux ACTs dans un milieu hospitalier, permettant le suivi quotidien des patients, de celui associé à son administration en masse, excluant une telle

rigueur de suivi sur le terrain et nécessitant le besoin crucial de mieux définir le bénéfice-risque apporté par cette option thérapeutique.

11. Le portefeuille antipaludique comporte une minorité d'agents gamétocytocides.

L'un des objectifs majeurs pour l'élimination du paludisme est le développement de nouveaux composés antipaludiques ciblant les stades parasitaires asexués, à l'origine de la symptomatologie de l'accès palustre, et les gamétocytes, support de la transmission du paludisme. Le portefeuille antipaludique mondial actuel [41], relativement diversifié, regroupe plusieurs composés en phase de développement préclinique et clinique. Parmi ceux-ci, une majorité présente une activité schizonticide prépondérante (cible = parasite asexués). Il s'agit par exemple :

-d'analogues 4-aminoquinoléiques [42, 43] actifs sur les souches chloroquinorésistantes, tels la ferroquine [44] développé par les équipes de recherche de l'Université de Lille en collaboration avec Sanofi et caractérisé par son motif ferrocénique, la naphtoquine à demi-vie de 742 heures administrée sous forme de monodose ou l'AQ-13, un analogue à courte chaîné amino latérale en évaluation au Mali.

-d'endopéroxides de 2nde génération, semi-synthétiques (artémisone) ou synthétiques, tels les ozonides OZ277 et OZ439 à demi-vie d'élimination prolongée [42-45].

-de composés synthétiques divers [42, 43], tel le GNF156 (une imidazolopipérazine), identifiés au terme de campagnes de criblages réalisées à partir de chimiothèques naturelles. Le composé DSM265 est un inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase bloquant la synthèse pyrimidique. Le composé MK4815 cible la chaîne de transport mitochondriale parasitaire.

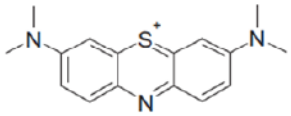
-d'antifolates [42, 43] actifs sur des parasites résistants à la combinaison sulfadoxine/pyriméthamine, comme le composé P218 DHFR

-d'antibiotiques [42, 43], comme la fosmidomycine qui cible l'apicoplaste et inhibe les voie de synthèse de l'isopentényl diphosphate et isoprénoïde.

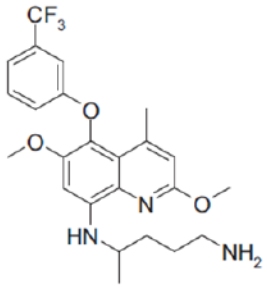
Figure I-18: « Global Malaria Portfolio », portefeuille antipaludique mondial actuel.

Tirée de [41]

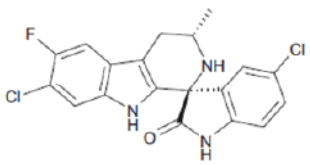
De façon intéressante, ce portefeuille comprend trois composés à action gamétocytocide marquée. Il s'agit de la tafénoquine, une 8-aminoquinoléine apparentée à la primaquine mais avec quelques modifications de radicaux et caractérisée par une demi-vie d'élimination plus longue [42, 43]. Ce composé provoque également des effets secondaires hémolytiques chez les patients [46]. Le bleu de méthylène (chlorure de méthylthioninium) interfère quant à lui avec le métabolisme de l'hémoglobine dans la vacuole digestive du gamétocyte. Il inhibe également la glutathion réductase, induit ainsi une déplétion en glutathion qui sensibilise le gamétocyte à l'activité pharmacologique de la chloroquine [47]. Il est actif contre les souches plasmodiales multi-résistantes, inhibe la gamétocytogénèse *in vitro* [48] et dispose d'une activité gamétocytocide confirmée en clinique [49]. Ce composé est également employé pour le traitement de la méthémoglobinémie, une donnée encourageante dans le combat anti-transmission. Toutefois, son administration clinique peut résulter en une réduction faible mais significative du taux sanguin d'hémoglobine dépendante du statut G6PD des patients impaludés [50]. Il présente également une toxicité sérotoninergique [51] par blocage des transporteurs 5-HT [52]. Le NITD609 (cipargamine) est une spiro-azépinindolone inhibant le développement précoce et tardif des gamétocytes *in vitro* et réduite leur infectivité sur les Anophèles [53]. Ce composé est également actif sur les isolats cliniques asexués multi-résistants avec des IC50 similaires à l'artésunate [54]. Son mode d'action fait intervenir le blocage de l'ATPase PfATP4, bouleversant l'homéostasie sodique intra-parasitaire [55]. Les premières évaluations cliniques indiquent une tolérance tempérée par des effets secondaires gastro-intestinaux et urogénitaux de gravité faible à modérée [56].



Bleu de méthylène



Tafénoquine



Cipargamine (NITD609)

L'activité gamétocytocide *in vitro* de plusieurs autres composés a récemment été établie. La bulaquine (8-aminoquinoléine apparentée à la primaquine), la trioxaquine, l'époxomicine, le tipranavir, la riboflavine, les 9-anilinoacridines et plus récemment, le thiostreptone et de nouvelles 4-aminoquinoléines [57]. Ces derniers ne sont pas inclus dans le portefeuille antipaludique mondial actuel. Leur activité gamétocytocide est souvent modérée (effet

optimal à une concentration de l'ordre du µM) *in vitro* ou *in vivo* et leur structure chimique parfois apparentée à des médicaments préexistants les prédisposent potentiellement à une activité réduite sur des souches plasmodiales pharmaco-résistantes et/ou à des profils de toxicité semblables.

Deux autres composés d'intérêt majeur pour l'axe de recherche anti-transmission ne sont pas inclus dans le portefeuille antipaludique mondial. Le composé DDD107498 est l'aboutissement réussi et très récent (2015) d'un projet en *drug design* basé sur le criblage phénotypique d'une collection d'inhibiteurs de kinases issus de la chimiothèque de l'Université de Dundee. Il est caractérisé par de puissantes activités pharmacologiques schizonticide *in vitro* et *in vivo* (modèle murin) et gamétocide *in vitro*. Il réduit considérablement la transmission du parasite à l'Anophèle par *standard membrane feeding assay*. Le composé DDD107498 inhibe la synthèse protéique parasitaire, via le ciblage d'eEF2 (*translation elongation factor 2*), bloquant ainsi la translocation du ribosome de long des ARNm en cours de la traduction [58]. Le 2^{e} composé est l'ivermectine, un anthelmintique employé pour lutter, entre autre, contre la cécité des rivières (l'onchocercose). Les campagnes d'administration en masse de ce composé (dirigées par le Programme Africain de Contrôle de l'Onchocerciasis) ont été rapportées pour réduire substantiellement, en parallèle, la transmission du paludisme par les moustiques au Sénégal [59] : les concentrations retrouvées chez les individus traités réduisent considérablement la durée de vie des Anophèles. Ce composé est dépourvu d'activité schizonticide ou gamétocytocide. Des recherches sont en cours afin d'évaluer le bénéfice-risque lié à son intégration dans l'éventail antipaludique en développement [60, 61].

Comme souligné par les résultats récents très encourageants du *Drug discovery*, le développement d'un arsenal anti-transmission diversifié, efficace et peu toxique demeure un objectif actuel important pour la R&D pharmaceutique antipaludique [62].

12. La découverte de composés anti-transmission par criblage pharmacologique phénotypique représente un défi expérimental en milieu académique et industriel.

La découverte de nouveaux squelettes chimiques actifs contre les gamétocytes de *Plasmodium falciparum*, bloquant ainsi la transmission du paludisme est essentielle pour maintenir les objectifs d'élimination. Le développement de résistances aux dérivés de

l'artémisinine, la toxicité redoutée des 8AQs et le faible nombre de molécules de réserve compris dans le portefeuille antipaludique global soulignent d'autant plus cette nécessité. Bien que plusieurs cibles moléculaires anti-transmission aient été identifiées au travers du cycle parasitaire, aussi bien chez l'Homme que dans le vecteur Anophèle, les gamétocytes représentent une cible privilégiée du criblage pharmacologique en raison de leur accessibilité expérimentale. Leur culture est certes laborieuse, difficilement standardisable et limitée à un nombre restreint de laboratoires à l'échelle mondiale, elle est cependant réalisable à une échelle compatible avec le criblage à moyen débit, ce qui n'est pas le cas d'autres stades comme les sporozoïtes et les schizontes hépatiques [63].

Toutefois plusieurs contraintes pèsent sur la production en masse de gamétocytes *in vitro* et déterminent la rentabilité (financière et humaine) de la méthode de criblage développée.

-l'efficacité des méthodes d'induction, celles-ci étant dépendantes d'un cycle parasitaire asexué conditionné par son environnement, et des caractéristiques de la souche parasitaire cultivée. Par exemple, le stress exercé sur le parasite asexué durant une étape de synchronisation (sorbitol ou séparation magnétique) ne se manifeste pas immédiatement, mais généralement au cours des cycles suivants par un taux variable de mortalité et de gamétocytogénèse spontanée (non désirée). Toutes les souches ne répondent pas de la même façon aux méthodes de synchronisation, et toutes ne sont pas capables de produire des gamétocytes. Les souches aptes à former des gamétocytes *in vitro* n'ont pas toutes les mêmes taux de conversion en gamétocytes.

-la durée de la gamétocytogénèse est de 10 jours minimum [63], et est précédée d'une phase de préparation et d'entretien des cultures. Une induction gamétocytaire *in vitro* représente donc au moins 3 semaines de culture rigoureuse. La préparation peut inclure une simple dilution et un changement régulier des cultures. Elle peut également impliquer une étape de synchronisation fine et/ou la combinaison de facteurs expérimentaux inducteurs (ex : ajout de lysat érythrocytaire, ou des étapes d'ajustement des parasitémies et de l'hématocrite, ou l'ajustement d'un volume de milieu conditionné inchangé, etc...) [64] nécessitant un investissement important de l'opérateur et à l'origine d'une variabilité dans le rendement des inductions.

-la « qualité » des cultures, dépendante du taux de dérive parasitaire et des modalités d'entretien en routine. Cette-ci conditionne la sensibilité des gamétocytes à l'environnement ou aux médicaments et le rapport des genres mâle et femelle.

-la persistance *in vitro* des gamétocytes matures viables et infectieux est limitée sur quelques jours. Entre 7 et 9 jours sont nécessaires aux gamétocytes stade V pour apparaître. Une période de 2 à 3 jours supplémentaire est nécessaire pour acquérir le potentiel de générer un zygote chez le vecteur Anophèle [63]. Or, au-delà de 15 jours de culture, une réduction progressive des nombres de gamétocytes est généralement observée, suite à leur activation ou dégénérescence. La « fenêtre temporelle de tir » est donc étroite, contrainte organisationnelle importante pour une campagne de criblage.

13. Différentes méthodes ont été proposées pour la découverte de composés anti-transmission par criblage phénotypique.

Des campagnes de criblage pharmacologique haut débit visant à identifier des composés actifs sur les parasites intra-érythrocytaires asexués ont résulté en l'identification de nouvelles familles chimiques. Les résultats de ces campagnes sont désormais accessibles dans le domaine public, ce qui a stimulé l'intérêt général des groupes de recherche académiques pour la découverte d'antipaludiques. Les composés actifs identifiés ont fait l'objet d'une caractérisation puis d'une sélection, ce qui a abouti en la création de mini-chimiothèques d'inhibiteurs asexués focalisées. De par leur accessibilité ces mini-chimiothèques représentent un excellent point de départ pour la découverte et la comparaison inter-laboratoires de composés actifs sur les gamétocytes et bloquant la transmission du paludisme [64].

A ce jour, les résultats d'aucune campagne de criblage haut débit (HTS) n'ont encore été publiés. Une majorité d'études rapporte le développement de méthodes de criblage phénotypique pour la découverte de composés gamétocytocides, généralement validées par le test de quelques antipaludiques de référence et/ou la réalisation d'un criblage à bas débit. La qualité de ces méthodes est déterminée par plusieurs paramètres :

-les caractéristiques des gamétocytes, essentiellement dépendantes de leur synchronicité, de leur rapport de genres (mâle et femelle) et de leur capacité à réaliser une gamétogénèse

(activation et formation d'un zygote chez le vecteur) dans des conditions contrôles. Une asynchronicité peut biaiser les résultats générés en raison d'une différence de réponses entre les stades gamétocytaires immatures et matures [65-67]. L'absence d'étapes d'enrichissement gamétocytaire peut également être une source d'artéfacts, en raison des débris ou des parasites asexués persistant dans les cultures [68]. Au contraire, la production de gamétocytes finement synchronisés puis isolés et concentrés implique un investissement humain et financier sur la culture pouvant influer négativement sur le débit du criblage [69, 70]. Le développement d'outils moléculaires peut aider à accroitre la spécificité des mesures en considérant la synchronicité des cultures. Dans ce sens, Adjalley et *al.* ont généré des souches parasitaires transgéniques dont la fluorescence/bioluminescence est sous le contrôle de l'expression de marqueurs de développement spécifiques (stade précoce : Pfs48/45 ; stade mature: mal8p1.16 : immature + matures : Pfs16) [48]. En ce qui concerne la différenciation des genres, Wang et *al*. ont développé une souche parasitaire transgénique générant des gamétocytes matures mâles discriminables par cytométrie de flux sur la base de l'expression de l'α–tubuline [71]. Néanmoins, l'expression résiduelle de ce marqueur par le genre femelle génère un biais analytique. D'autres marqueurs de genres ont été rapportés et permettront une discrimination moléculaire potentielle plus fine dans le futur [72, 73]. Enfin, l'évaluation de la capacité des gamétocytes à s'activer pour former des gamètes (information sur la potentielle infectivité pour le vecteur) est souvent combinée aux criblages phénotypiques. Cette méthode apporte une information complémentaire directe sur le potentiel de transmission. Les difficultés de standardisation de cette approche favorisent cependant la reproduction *in vitro* des conditions d'activation gamétocytaire, à l'origine des « *gametogenesis assays* » [74-79].

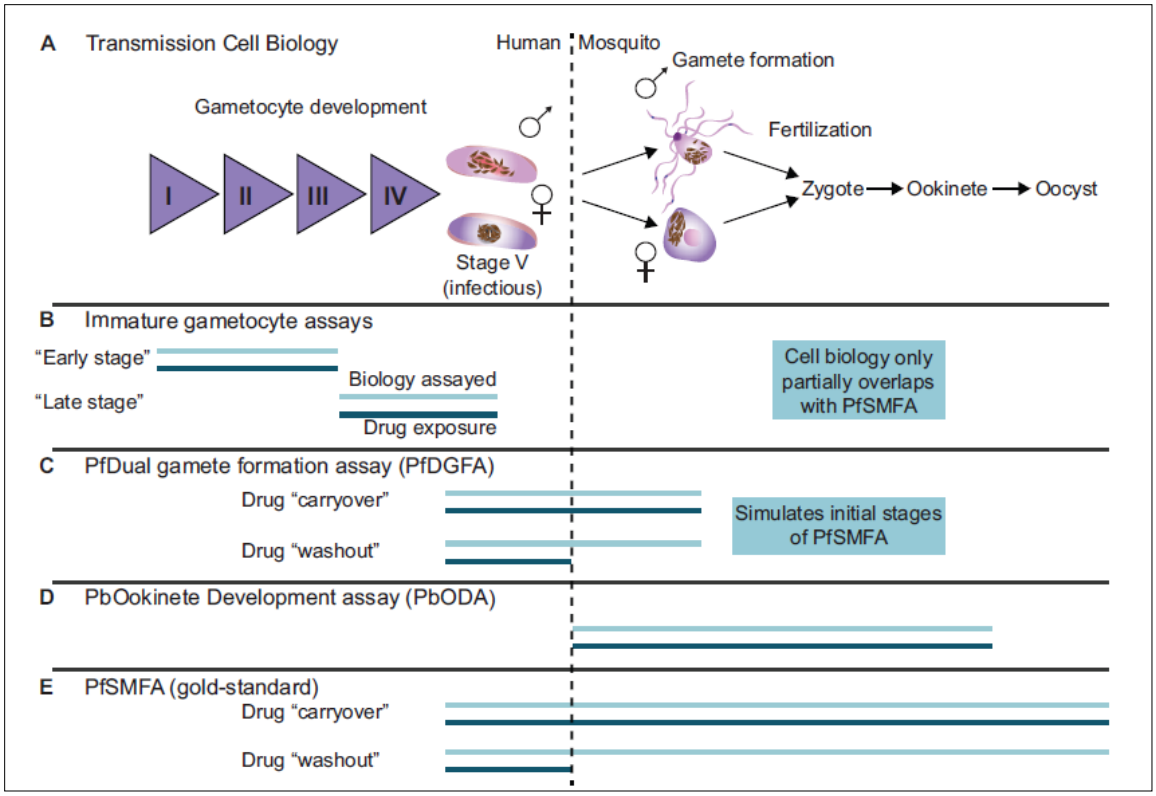


Figure I-19: Approches pharmacologiques actuelles pour la découverte de composés anti-transmission. *Dans ce domaine, le criblage phénotypique prédomine sur le criblage moléculaire. Cependant, il est souvent couplé à une investigation plus directe du potentiel anti-transmission, consistant en l'évaluation de l'effet des composés sur l'activation des gamétocytes mâles et femelles in vitro (*Plasmodium falciparum Dual Gamete Formation Assay, PfDGFA*), ou le développement d'ookinètes chez le vecteur Anophèle, via des expériences de gorgement sur modèle murin (*Plasmodium berghei Ookinete Development Assay, PbODA*) ou sur membrane artificielle (*Plasmodium falciparum Standard Membrane Feeding Assay, PfsMFA*). Extrait de [74].*

-les modalités d'exposition déterminent le profil pharmacodynamique des actifs recherchés. L'activité gamétocytocide d'un composé peut évoluer sur plusieurs jours d'exposition. Une période d'incubation de 72 heures est donc généralement privilégiée pour la sélection d'agents gamétocytocides ayant un impact prolongé [65, 68-70, 80, 83]. De plus, un délai de 3

jours est nécessaire aux gamétocytes stade V pour pouvoir procéder à une gamétogénèse dans le vecteur. Toutes les études ciblant ce stade de maturation ne prennent pas en compte cette caractéristique qui pourrait avoir un impact sur la sensibilité pharmacologique [76].

-la pertinence biologique de la séquence expérimentale développée et sa valeur informative. L'avantage d'une analyse mono-paramétrique basée sur une lecture de fluorescence ou de bioluminescence sont la simplicité, la sensibilité et la reproductibilité [65-68, 69, 70, 81-85]. Cependant, l'information apportée est limitée et peut être biaisée par une proportion variable de gamétocytes non viables exprimant tout de même le marqueur fluorescent. De plus, certains composés induisent une accumulation intracellulaire de la luciférase en interférant avec son recyclage intracellulaire, faussant les analyses [86]. Une analyse basée sur la quantification de l'activité lactate déshydrogénase fournit une indication sur la viabilité, mais une adaptation du délai d'acquisition du signal est nécessaire en raison de sa persistance dans les gamétocytes en cours de dégénérescence [81]. Récemment Duffy et *al.* ont employé le mitotracker Red CMXRos, pour la quantification de l'état d'activité mitochondriale à un temps donné, permettant la quantification spécifique des gamétocytes viables après un traitement pharmacologique [80]. Cependant, le prix de ce réactif est très élevé et un temps de marquage de plusieurs heures est nécessaire afin de pouvoir procéder à une analyse microscopique à haut débit. Ce temps d'incubation pourrait biaiser les mesures en générant une lyse complète d'une sous-population gamétocytaire. Le criblage à haut contenu représente un réel avantage dans le champ en permettant une analyse multiparamétrique relativement rapide et précise. Son accès est cependant limité en raison du coût de la technologie associée. La cytométrie de flux a été proposée [68, 71] pour la réalisation d'un criblage multiparamétrique mais la compatibilité avec un criblage haut débit est limitée par le débit d'échantillonnage des appareils commercialisés. Les dispositifs les plus avancés (bras

robotiques compatibles 96-puits) permettent une acquisition robuste sur plus de 30000 évènements en l'espace de 20-45 secondes/puits, impliquant un temps de lecture moyen de 90 minutes par microplaque 96 puits.

-le coût et l'investissement humain. Ces 2 derniers facteurs dépendent des technologies, des réactifs et consommables associés non seulement à la séquence expérimentale de criblage, mais aussi et surtout à la production des gamétocytes *in vitro*. Un format de criblage 384 [69, 80] ou 1536 [66, 67] est essentiel pour le criblage haut débit sur gamétocytes de *Plasmodium falciparum*. Les analyses monoparamétriques (ex : présence/absence du parasite mesurée à partir d'un signal de fluorescence unique) sont souvent moins couteuses mais requièrent en outre mesure une chaîne de validation plus importante comparativement aux criblages multiparamétrique (ex : présence/absence détectée par un signal fluorescent + viabilité quantifiée par marquage mitotracker parallèle). D'autre part, la production de gamétocytes *in vitro* représente un coût significatif dans un projet de criblage. Néanmoins, le criblage phénotypique a l'avantage de générer des données considérant la solubilité et la perméabilité des composés, contrairement au criblage moléculaire qui tôt ou tard nécessite une étude de validation sur cellules.

En résumé, les difficultés de production des gamétocytes sont une limitation importante dans l'exécution de campagnes de criblage pharmacologique phénotypique à haut débit. Les avancées réalisées dans le champ de la gamétocytogénèse *in vitro* favorisent le développement d'un nombre croissant d'études de criblages. La combinaison de différentes séquences expérimentales est souvent employée afin d'apporter une dimension multiparamétrique aux analyses, incluant les approches en gamétogénèse, apportant une information plus directe sur le potentiel pharmacologique anti-transmission. Ces études ont

permis l'identification de plusieurs nouvelles familles chimiques à profil gamétocytocide dont le meilleur exemple est représenté par le bleu de méthylène, inclus dans le portefeuille mondial antipaludique et en cours d'évaluation clinique.

Activité recherchée	Méthode	Criblage	Z'	Gamétocytes	Avantages	Limitations	Référence
Gamétocyde	Cytométrie de flux GFP 96 puits	Non N= 4 ref. compds Dose-réponse 24H	0.79	3D7α-tubulineII-GFP Immatures + Stade V Jours 7-13	Différenciation des genres mâle et femelle	-Débit analytique faible -Spécificité du marqueur de genre gamétocytaire	Wang et al. 2014
	Cytométrie de flux GFP-Hoechst 96 puits	Non N=7 ref. cmpds 72H	0.24	3D7, clone F2G12 –GFP Asexués + immatures stade I-II Jours 2	-Simplicité et rentabilité -Activité schizonticide et gamétocyde	-Débit analytique faible -Spécificité biaisée en raison de la présence d'asexués et de débris cellulaires	**Buchholz et al 2011**
	Fluorimétrie Sybr green I 96puits	1900 cmpds (FDA + MMV box) 10-20µM 48H 44 actifs identifiés	0.52	NF54 WT, Stade V, Jour 15	Rapidité, simplicité et coût	-Sensibilité biaisée par gamétocytes non viables -Gamétocytes détectés présumés viables -Double validation par microscopie nécessaire	**Sanders et al. 2014**
	Fluorimétrie Alamar blue (oxydoréduction) 96 puits	Non N= 6, ref. compds 72H	0.81	3D7, Stade III-V, Jour 13	Sensibilité, linéarité, rapidité -Viabilité métabolique	-Synchronicité des cultures -Aucune information phénotypique -Genres non différenciés	**Tanaka et al. 2011**
	Fluorimétrie Alamar blue (oxydoréduction) 1536 puits	1280 cmpds (LOPAC, Sigma-Aldrich) 1.8µM 24H 7 actifs identifiés	0.68		-Sensibilité, linéarité, rapidité -Viabilité métabolique -Compatible haut débit	-Synchronicité des cultures -Aucune information phénotypique -Genres non différenciés	**Tanaka et al 2013**
	Fluorimétrie Alamar blue (oxydoréduction) 1536 puits	5215 cmpds (FDA + malaria box) 4 conc.: 0.37-46µM 27 actifs identifiés	-	3D7, HB3 et Dd2			**Sun et al. 2013** **(Tanaka et al. 2011)**
	Fluorimétrie ATP- (*Bactiter glo reagent*) 96 puits	Non, N= 6 ref. cmpds 10µM 24H	0.81	3D7 Pfs16-GFP, stade IV-V	-Sensibilité, linéarité, rapidité -Viabilité métabolique	-Aucune information phénotypique -Genres non différenciés -Synchronicité des cultures	**Peatey et al. 2011**
		Oui N=44 cmpds 10µM 24H 3 actifs identifiés					**Peatey et al. 2012**
	Fluorimétrie ATP- (*Bactiter glo reagent*) 96 et 384 puits	Non, N=16 ref. cpmds Dose-réponse 48H	0.68	3D7HT-GFP, stade IV-V, jours 15-18			**Lelièvre et al. 2012**

Activité recherchée	Méthode	Criblage	Z'	Gamétocytes	Avantages	Limitations	Référence
Gamétocyde	Bioluminescence Luciférase- Réactif *Steadylite plus* 96 puits	N= 23 ref. compds + 400 cmpds (malaria box) 3 conc.: 5, 0.25 et 0.05µM 72H 135 actifs identifiés	0.8	NF54 Pfs16-Luc-GFP, 3D7 Stade I-III	-Sensibilité, linéarité, rapidité -Compatible haut débit	-Aucune information phénotypique/lyse des cellules -Genres non différenciés	Lucantoni et al. 2013
	Bioluminescence Luciférase Réactif D-luciférine 96 puits	Non N=2 ref. cmpds	0.92	3D7A –CBG99 (luciférase verte) et CBR (luciférase rouge) Stade V	-cellules entières non lysées (D-luciférine) / compatible HCS -différents stades de maturations (culture indépendantes) mélangés puis différenciés	-Genres non différenciés -Sensibilité biaisée par gamétocytes non viables	**Cevenini et al.2015**
	Bioluminescence Luciférase- 96 puits	Non, N= 9 ref cmpds 72H	-	NF54 aatb–Pfs16/Pfs48-45/mal8p1.16-GFP/Luc, Immature ou matures, Jours 2, 5, 8 et 11	Sensibilité, linéarité, rapidité -Compatible haut débit -activité Luc/GFP spécifique du stade de développement	-Aucune information phénotypique/lyse des cellules -Genres non différenciés	**Adjalley et al. 2013**
	Spectrophotométrie Lactate déshydrogénase (pLDH-réactif MalstatT) 96 puits	Non N= 8 ref. compds Dose-réponse 72H + 72H	0.86	3D7, Stade V, Jour8	-Sensibilité, linéarité, rapidité -Viabilité métabolique -gamétocytogénèse en microplaque, Synchronicité des cultures	-Activité gamétocyde dépendante du délai d'incubation avec le réactif pLDH -Aucune information phénotypique/lyse des cellules -Genres non différenciés	**D'Alessandro et al. 2013**
	Spectrophotométrie Lactate déshydrogénase 384 puits	Oui 72H	0.81	NF54, stade V, Jour 12	-Sensibilité, linéarité, rapidité -Viabilité métabolique -Compatible HTS		**Bolsher et al. 2015**
	Microscopie confocale en fluorescence à haut débit et haute résolution Eléments GFP-mitotracker 384 puits	Oui, N= 38 ref. cmpds + malaria box 72H	0.68 (st. II-III) 0.53 (st IV-V)	NF54 Pfs16-Luc-GFP Immature s stade II-III ou matures stade V, Jour 8	-compatible HTS -Synchronicité des cultures -Sensibilité, linéarité, rapidité -viabilité mitochondriale	-Genres non différenciés -Gamétocytes pas encore infectifs	**Duffy et al. 2013**

Tableau I-3: Méthodes de criblages pharmacologiques mono- ou poly-paramétriques rapportées depuis 2010, pour la découverte de composés gamétocytocides. *La réduction du nombre de gamétocytes suite à une exposition in vitro avec des composés peut reposer sur la détection d'un marqueur métabolique (lactate déshydrogénase, ATP, réduction de la résazurine avec l'Alamar Blue, activité de la chaîne de respiration mitochondriale avec le mitotracker) et/ou la quantification du contenu ADN ou ARN via des marqueurs fluorescents tels que le Sybr green, le DAPI ou le Hoechst. Le génie génétique a été employé pour créer des souches plasmodiales transgéniques exprimant de façon constitutive et spécifiquement au stade gamétocytaire la luciférase ou la GFP, à l'origine des «* HTS-ready luminometry assays *». Récemment, la microscopie confocale en fluorescence à haut débit et haute résolution a ouvert la voix au criblage à haut contenu. Des approches alternatives en cytométrie de flux ont été proposées.*

14. Résumé

L'inventaire chimiothérapeutique antipaludique développé au 20ème siècle regroupe majoritairement des médicaments ciblant les stades parasitaires intra-érythrocytaires asexués actifs principalement par inhibition des mécanismes de détoxification de l'hème, de l'activité mitochondriale ou apicoplastique, ou de la synthèse pyrimidique et des folates. *Plasmodium falciparum* a développé des pharmaco-résistances plus ou moins fortes à tous ces médicaments. Ces résistances résultent de la plasticité du génome parasitaire et de la pression de sélection pharmacologique exercée en zone endémique. Les dérivés de l'artémisinine sont des endopéroxydes dotés d'une activité schizonticide puissante. Ils sont très efficaces contre les souches poly-pharmacorésistantes, et sont rapidement éliminés par l'organisme. Ils sont actuellement employés en combinaison (ACTs) avec des partenaires à demi-vie d'élimination longue permettant d'éliminer les parasites résiduels. Leur activité gamétocytocide est modérée

comparativement à celle de la primaquine, une 8-aminoquinoléine utilisée depuis plusieurs décennies pour l'élimination des formes hépatiques dormantes de *Plasmodium vivax et Plasmodium ovale,* et pour la réduction de la transmission de *Plasmodium falciparum*. La primaquine peut induire une hémolyse oxydative intravasculaire mettant très rarement en jeu le pronostic vital chez les individus déficitaires en glucose-6-phosphate déshydrogénase. Son utilisation en zone endémique à un faible dosage, en prise unique, a été recommandée par l'OMS en complément du traitement curatif par ACTs, afin de prévenir la transmission des infections à *Plasmodium falciparum* à partir des sujets récemment symptomatiques. Des études validant le bénéfice-risque lié à cette posologie sont demandées par l'OMS.

L'évaluation du rapport bénéfice-risque de la primaquine est très difficile, particulièrement si l'on envisage sont utilisation non plus seulement en post-ACT mais en administration de masse concernant aussi les sujets asymptomatiques. Les exigences de sécurité d'emploi dans ce contexte « altruiste » sont en effet extrêmement élevées. Ce débat médical et éthique complexe pourrait être, à terme, contourné par l'identification de nouveaux composés efficaces et bien tolérés. La R&D pharmaceutique a récemment permis l'identification de plusieurs nouvelles familles chimiques à activité à la fois schizonticide et gamétocytocide. Des approches innovantes en criblage pharmacologique, majoritairement phénotypique, sont développées afin d'identifier des molécules interférant avec la gamétocytogénèse ou la gamétogénèse. La complexité de production en masse des gamétocytes limite néanmoins leur exécution à haut débit. La standardisation récente de méthodes d'induction à haut rendement et l'utilisation efficace de la microscopie confocale à haut débit et haute résolution représentent une avancée importante pour l'atteinte de cet objectif et l'exploration efficace de l'espace chimique anti-transmission. La mise à disposition de médicaments anti-transmission efficaces et bien tolérés permettrait de remplacer les amino-8-quinoléines, si ces dernières

s'avéraient moins bien tolérées qu'actuellement estimé, ou rendues moins efficaces par l'émergence de pharmaco-résistances.

15. Références

1. **Page CP**. 1999. Pharmacologie intégrée. De Boeck Supérieur.
2. **Bruce-Chwatt LJ**. 1962. Classification of antimalarial drugs in relation to different stages in the life-cycle of the parasite: commentary on a diagram. Bull World Health Organ **27**:287–290.
3. **Kaur K**, **Jain M**, **Reddy RP**, **Jain R**. 2010. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. European Journal of Medicinal Chemistry **45**:3245–3264.
4. **O'Neill PM**, **Barton VE**, **Ward SA**, **Chadwick J**. 2011. 4-Aminoquinolines: Chloroquine, Amodiaquine and Next-Generation Analogues, p. 19–44. *In* Staines, HM, Krishna, S (eds.), Treatment and Prevention of Malaria. Springer Basel, Basel.
5. **Padmanaban G**, **Rangarajan PN**. 2000. Heme Metabolism of Plasmodium Is a Major Antimalarial Target. Biochemical and Biophysical Research Communications **268**:665–668.
6. **Yayon A**, **Cabantchik ZI**, **Ginsburg H**. 1985. Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependent. Proc Natl Acad Sci USA **82**:2784–2788.
7. **Sibley CH**. 2014. Understanding drug resistance in malaria parasites: Basic science for public health. Molecular and Biochemical Parasitology **195**:107–114.
8. **Gamo F-J**. 2014. Antimalarial drug resistance: new treatments options for Plasmodium. Drug Discovery Today: Technologies **11**:81–88.
9. **Srivastava V**, **Lee H**. 2015. Chloroquine-based hybrid molecules as promising novel chemotherapeutic agents. European Journal of Pharmacology **762**:472–486.

10. **Phillips-Howard PA**, **West LJ**. 1990. Serious adverse drug reactions to pyrimethamine-sulphadoxine, pyrimethamine-dapsone and to amodiaquine in Britain. J R Soc Med **83**:82–85.

11. **Taylor WRJ**, **White NJ**. 2004. Antimalarial drug toxicity: a review. Drug Saf **27**:25–61.

12. 2015. Guidelines for the Treatment of Malaria, 3rd ed. World Health Organization, Geneva.

13. **Pradines B**, **Dormoi J**, **Briolant S**, **Bogreau H**, **Rogier C**. 2010. La résistance aux antipaludiques. Revue francophone des laboratoires **2010**:51–62.

14. **Winstanley P**, **Ward S**. 2006. Malaria Chemotherapy, p. 47–76. *In* Advances in Parasitology. Elsevier.

15. **Bullock S**, **Manias E**. 2013. Fundamentals of Pharmacology. Pearson Higher Education AU.

16. **Dahl EL**, **Rosenthal PJ**. 2007. Multiple Antibiotics Exert Delayed Effects against the Plasmodium falciparum Apicoplast. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **51**:3485–3490.

17. **Cui L**, **Su X**. 2009. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. Expert Review of Anti-infective Therapy **7**:999–1013.

18. **Kamchonwongpaisan S**, **Meshnick SR**. 1996. The mode of action of the antimalarial artemisinin and its derivatives. General Pharmacology: The Vascular System **27**:587–592.

19. **Olliaro PL**, **Haynes RK**, **Meunier B**, **Yuthavong Y**. 2001. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. Trends in Parasitology **17**:122–126.

20. **Krishna S**, **Pulcini S**, **Moore CM**, **Teo BH-Y**, **Staines HM**. 2014. Pumped up: reflections on PfATP6 as the target for artemisinins. Trends Pharmacol Sci **35**:4–11.

21. **Klonis N**, **Crespo-Ortiz MP**, **Bottova I**, **Abu-Bakar N**, **Kenny S**, **Rosenthal PJ**, **Tilley L**. 2011. Artemisinin activity against Plasmodium falciparum requires hemoglobin uptake and digestion. Proceedings of the National Academy of Sciences **108**:11405–11410.

22. **Chen PQ**, **Li GQ**, **Guo XB**, **He KR**, **Fu YX**, **Fu LC**, **Song YZ**. 1994. The infectivity of gametocytes of Plasmodium falciparum from patients treated with artemisinin. Chin Med J **107**:709–711.

23. **Escalante AA**, **Smith DL**, **Kim Y**. 2009. The dynamics of mutations associated with anti-malarial drug resistance in Plasmodium falciparum. Trends in Parasitology **25**:557–563.

24. **Hayward R**, **Saliba KJ**, **Kirk K**. 2005. pfmdr1 mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in Plasmodium falciparum: Fitness cost of chloroquine resistance. Molecular Microbiology **55**:1285–1295.

25. **Raman J**, **Mauff K**, **Muianga P**, **Mussa A**, **Maharaj R**, **Barnes KI**. 2011. Five Years of Antimalarial Resistance Marker Surveillance in Gaza Province, Mozambique, Following Artemisinin-Based Combination Therapy Roll Out. PLoS ONE **6**:e25992.

26. **Mwai L**, **Ochong E**, **Abdirahman A**, **Kiara SM**, **Ward S**, **Kokwaro G**, **Sasi P**, **Marsh K**, **Borrmann S**, **Mackinnon M**, **Nzila A**. 2009. Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. Malaria Journal **8**:106.

27. WHO | Global report on antimalarial efficacy and drug resistance: 2000-2010. WHO.

28. **Straimer J**, **Gnadig NF**, **Witkowski B**, **Amaratunga C**, **Duru V**, **Ramadani AP**, **Dacheux M**, **Khim N**, **Zhang L**, **Lam S**, **Gregory PD**, **Urnov FD**, **Mercereau-Puijalon O**, **Benoit-Vical F**, **Fairhurst RM**, **Menard D**, **Fidock DA**. 2015. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in Plasmodium falciparum clinical isolates. Science **347**:428–431.

29. **Leang R**, **Taylor WRJ**, **Bouth DM**, **Song L**, **Tarning J**, **Char MC**, **Kim S**, **Witkowski B**, **Duru V**, **Domergue A**, **Khim N**, **Ringwald P**, **Menard D**. 2015. Evidence of Plasmodium falciparum Malaria Multidrug Resistance to Artemisinin and Piperaquine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-Piperaquine Open-Label Multicenter Clinical Assessment. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **59**:4719–4726.

30. **Fairhurst RM**. 2015. Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. Curr Opin Infect Dis.

31. **Vale N**, **Moreira R**, **Gomes P**. 2009. Primaquine revisited six decades after its discovery. European Journal of Medicinal Chemistry **44**:937–953.

32. **Elderfield RC**, **Craig LC**. 1946. A study of plasmochin and the occurrence of rearrangements in the preparation of certain plasmo chin analogs. J Am Chem Soc **68**:1516–1523.

33. **Ashley EA**, **Recht J**, **White NJ**. 2014. Primaquine: the risks and the benefits. Malar J **13**:10–1186.

34. **White NJ**, **Qiao L**, **Qi G**, **Luzzatto L**. 2012. Rationale for recommending a lower dose of primaquine as a Plasmodium falciparum gametocytocide in populations where G6PD deficiency is common. Malaria Journal **11**:418.

35. **Kondrashin A**, **Baranova AM**, **Ashley EA**, **Recht J**, **White NJ**, **Sergiev VP**. 2014. Mass primaquine treatment to eliminate vivax malaria: lessons from the past. Malar J **13**:51.

36. WHO | Policy brief on single-dose primaquine as a gametocytocide in Plasmodium falciparum malaria. WHO.

37. **Eziefula AC**, **Bousema T**, **Yeung S**, **Kamya M**, **Owaraganise A**, **Gabagaya G**, **Bradley J**, **Grignard L**, **Lanke KH**, **Wanzira H**, **others**. 2014. Single dose

primaquine for clearance of Plasmodium falciparum gametocytes in children with uncomplicated malaria in Uganda: a randomised, controlled, double-blind, dose-ranging trial. The Lancet Infectious Diseases **14**:130–139.

38. **Graves PM**, **Gelband H**, **Garner P**. 2014. Primaquine or other 8-aminoquinoline for reducing P. falciparum transmission. The Cochrane Library.

39. **Okebe J**, **Bousema T**, **Affara M**, **DiTanna G**, **Eziefula AC**, **Jawara M**, **Nwakanma D**, **Amambua-Ngwa A**, **Van geertruyden J-P**, **Drakeley C**, **D'Alessandro U**. 2015. The gametocytocidal efficacy of primaquine in malaria asymptomatic carriers treated with dihydroartemisinin-piperaquine in The Gambia (PRINOGAM): study protocol for a randomised controlled trial. Trials **16**:70.

40. **Shekalaghe SA**, **Braak R ter**, **Daou M**, **Kavishe R**, **van den Bijllaardt W**, **van den Bosch S**, **Koenderink JB**, **Luty AJF**, **Whitty CJM**, **Drakeley C**, **Sauerwein RW**, **Bousema T**. 2010. In Tanzania, Hemolysis after a Single Dose of Primaquine Coadministered with an Artemisinin Is Not Restricted to Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-Deficient (G6PD A-) Individuals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **54**:1762–1768.

41. Interactive R&D portfolio | MMV : http://www.mmv.org/

42. **Schrader FC**, **Barho M**, **Steiner I**, **Ortmann R**, **Schlitzer M**. 2012. The antimalarial pipeline – An update. International Journal of Medical Microbiology **302**:165–171.

43. **Anthony MP**, **Burrows JN**, **Duparc S**, **Moehrle J**, **Wells TN**. 2012. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. Malar J **11**:18.

44. **Wani WA**, **Jameel E**, **Baig U**, **Mumtazuddin S**, **Hun LT**. 2015. Ferroquine and its derivatives: New generation of antimalarial agents. Eur J Med Chem **101**:534–551.

45. **Charman SA**, **Arbe-Barnes S**, **Bathurst IC**, **Brun R**, **Campbell M**, **Charman WN**, **Chiu FCK**, **Chollet J**, **Craft JC**, **Creek DJ**, **Dong Y**, **Matile H**, **Maurer M**, **Morizzi**

J, **Nguyen T**, **Papastogiannidis P**, **Scheurer C**, **Shackleford DM**, **Sriraghavan K**, **Stingelin L**, **Tang Y**, **Urwyler H**, **Wang X**, **White KL**, **Wittlin S**, **Zhou L**, **Vennerstrom JL**. 2011. Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. Proceedings of the National Academy of Sciences **108**:4400–4405.

46. **Shanks GD**, **Oloo AJ**, **Aleman GM**, **Ohrt C**, **Klotz FW**, **Braitman D**, **Horton J**, **Brueckner R**. 2001. A new primaquine analogue, tafenoquine (WR 238605), for prophylaxis against Plasmodium falciparum malaria. Clin Infect Dis **33**:1968–1974.

47. **Schirmer RH**, **Coulibaly B**, **Stich A**, **Scheiwein M**, **Merkle H**, **Eubel J**, **Becker K**, **Becher H**, **Müller O**, **Zich T**, **Schiek W**, **Kouyaté B**. 2003. Methylene blue as an antimalarial agent. Redox Rep **8**:272–275.

48. **Adjalley SH**, **Johnston GL**, **Li T**, **Eastman RT**, **Ekland EH**, **Eappen AG**, **Richman A**, **Sim BKL**, **Lee MCS**, **Hoffman SL**, **Fidock DA**. 2011. Quantitative assessment of Plasmodium falciparum sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. Proceedings of the National Academy of Sciences **108**:E1214–E1223.

49. **Coulibaly B**, **Zoungrana A**, **Mockenhaupt FP**, **Schirmer RH**, **Klose C**, **Mansmann U**, **Meissner PE**, **Müller O**. 2009. Strong gametocytocidal effect of methylene blue-based combination therapy against falciparum malaria: a randomised controlled trial. PLoS ONE **4**:e5318.

50. **Müller O**, **Mockenhaupt FP**, **Marks B**, **Meissner P**, **Coulibaly B**, **Kuhnert R**, **Buchner H**, **Schirmer RH**, **Walter-Sack I**, **Sié A**, **Mansmann U**. 2013. Haemolysis risk in methylene blue treatment of G6PD-sufficient and G6PD-deficient West-African children with uncomplicated falciparum malaria: a synopsis of four RCTs. Pharmacoepidemiol Drug Saf **22**:376–385.

51. **Gillman PK**. 2011. CNS toxicity involving methylene blue: the exemplar for understanding and predicting drug interactions that precipitate serotonin toxicity. Journal of Psychopharmacology **25**:429–436.

52. **Oz M**, **Isaev D**, **Lorke DE**, **Hasan M**, **Petroianu G**, **Shippenberg TS**. 2012. Methylene blue inhibits function of the 5-HT transporter: Methylene blue inhibits 5-HT transporter. British Journal of Pharmacology **166**:168–176.

53. **van Pelt-Koops JC**, **Pett HE**, **Graumans W**, **van der Vegte-Bolmer M**, **van Gemert GJ**, **Rottmann M**, **Yeung BKS**, **Diagana TT**, **Sauerwein RW**. 2012. The Spiroindolone Drug Candidate NITD609 Potently Inhibits Gametocytogenesis and Blocks Plasmodium falciparum Transmission to Anopheles Mosquito Vector. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **56**:3544–3548.

54. **Rottmann M**, **McNamara C**, **Yeung BKS**, **Lee MCS**, **Zou B**, **Russell B**, **Seitz P**, **Plouffe DM**, **Dharia NV**, **Tan J**, **Cohen SB**, **Spencer KR**, **Gonzalez-Paez GE**, **Lakshminarayana SB**, **Goh A**, **Suwanarusk R**, **Jegla T**, **Schmitt EK**, **Beck H-P**, **Brun R**, **Nosten F**, **Renia L**, **Dartois V**, **Keller TH**, **Fidock DA**, **Winzeler EA**, **Diagana TT**. 2010. Spiroindolones, a Potent Compound Class for the Treatment of Malaria. Science **329**:1175–1180.

55. **Spillman NJ**, **Allen RJW**, **McNamara CW**, **Yeung BKS**, **Winzeler EA**, **Diagana TT**, **Kirk K**. 2013. Na(+) regulation in the malaria parasite Plasmodium falciparum involves the cation ATPase PfATP4 and is a target of the spiroindolone antimalarials. Cell Host Microbe **13**:227–237.

56. **Leong FJ**, **Li R**, **Jain JP**, **Lefevre G**, **Magnusson B**, **Diagana TT**, **Pertel P**. 2014. A First-in-Human Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single- and Multiple-Ascending Oral Dose Study of Novel Antimalarial Spiroindolone KAE609

(Cipargamin) To Assess Its Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics in Healthy Adult Volunteers. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **58**:6209–6214.

57. **Lucantoni L**, **Avery V**. 2012. Whole-cell *in vitro* screening for gametocytocidal compounds. Future Medicinal Chemistry **4**:2337–2360.

58. **Baragaña B**, **Hallyburton I**, **Lee MCS**, **Norcross NR**, **Grimaldi R**, **Otto TD**, **Proto WR**, **Blagborough AM**, **Meister S**, **Wirjanata G**, **Ruecker A**, **Upton LM**, **Abraham TS**, **Almeida MJ**, **Pradhan A**, **Porzelle A**, **Martínez MS**, **Bolscher JM**, **Woodland A**, **Norval S**, **Zuccotto F**, **Thomas J**, **Simeons F**, **Stojanovski L**, **Osuna-Cabello M**, **Brock PM**, **Churcher TS**, **Sala KA**, **Zakutansky SE**, **Jiménez-Díaz MB**, **Sanz LM**, **Riley J**, **Basak R**, **Campbell M**, **Avery VM**, **Sauerwein RW**, **Dechering KJ**, **Noviyanti R**, **Campo B**, **Frearson JA**, **Angulo-Barturen I**, **Ferrer-Bazaga S**, **Gamo FJ**, **Wyatt PG**, **Leroy D**, **Siegl P**, **Delves MJ**, **Kyle DE**, **Wittlin S**, **Marfurt J**, **Price RN**, **Sinden RE**, **Winzeler EA**, **Charman SA**, **Bebrevska L**, **Gray DW**, **Campbell S**, **Fairlamb AH**, **Willis PA**, **Rayner JC**, **Fidock DA**, **Read KD**, **Gilbert IH**. 2015. A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. Nature **522**:315–320.

59. **Kobylinski KC**, **Sylla M**, **Chapman PL**, **Sarr MD**, **Foy BD**. 2011. Ivermectin Mass Drug Administration to Humans Disrupts Malaria Parasite Transmission in Senegalese Villages. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **85**:3–5.

60. **Chaccour CJ**, **Kobylinski KC**, **Bassat Q**, **Bousema T**, **Drakeley C**, **Alonso P**, **Foy BD**. 2013. Ivermectin to reduce malaria transmission: a research agenda for a promising new tool for elimination. Malar J **12**:10–1186.

61. **Chaccour CJ**, **Rabinovich NR**, **Slater H**, **Canavati SE**, **Bousema T**, **Lacerda M**, **Kuile F ter**, **Drakeley C**, **Bassat Q**, **Foy BD**, **Kobylinski K**. 2015. Establishment of

the Ivermectin Research for Malaria Elimination Network: updating the research agenda. Malaria Journal **14**.

62. **Bousema T**, **Eziefula AC**, **Pett H**, **Drakeley C**. 2014. Low-dose primaquine for falciparum malaria. The Lancet Infectious Diseases **14**:677.

63. **Baker DA**. 2010. Malaria gametocytogenesis. Mol Biochem Parasitol **172**:57–65.

64. **Spangenberg T**, **Burrows JN**, **Kowalczyk P**, **McDonald S**, **Wells TNC**, **Willis P**. 2013. The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases. PLoS ONE **8**:e62906.

65. **Tanaka TQ**, **Williamson KC**. 2011. A malaria gametocytocidal assay using oxidoreduction indicator, alamarBlue. Molecular and Biochemical Parasitology **177**:160–163.

66. **Tanaka TQ**, **Dehdashti SJ**, **Nguyen D-T**, **McKew JC**, **Zheng W**, **Williamson KC**. 2013. A quantitative high throughput assay for identifying gametocytocidal compounds. Molecular and Biochemical Parasitology **188**:20–25.

67. **Sun W**, **Tanaka TQ**, **Magle CT**, **Huang W**, **Southall N**, **Huang R**, **Dehdashti SJ**, **McKew JC**, **Williamson KC**, **Zheng W**. 2014. Chemical signatures and new drug targets for gametocytocidal drug development. Scientific Reports **4**.

68. **Buchholz K**, **Burke TA**, **Williamson KC**, **Wiegand RC**, **Wirth DF**, **Marti M**. 2011. A High-Throughput Screen Targeting Malaria Transmission Stages Opens New Avenues for Drug Development. Journal of Infectious Diseases **203**:1445–1453.

69. **Bolscher JM**, **Koolen KMJ**, **van Gemert GJ**, **van de Vegte-Bolmer MG**, **Bousema T**, **Leroy D**, **Sauerwein RW**, **Dechering KJ**. 2015. A combination of new screening assays for prioritization of transmission-blocking antimalarials reveals distinct dynamics of marketed and experimental drugs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

70. **Lucantoni L**, **Duffy S**, **Adjalley SH**, **Fidock DA**, **Avery VM**. 2013. Identification of MMV Malaria Box Inhibitors of Plasmodium falciparum Early-Stage Gametocytes Using a Luciferase-Based High-Throughput Assay. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **57**:6050–6062.

71. **Wang Z**, **Liu M**, **Liang X**, **Siriwat S**, **Li X**, **Chen X**, **Parker DM**, **Miao J**, **Cui L**. 2014. A Flow Cytometry-Based Quantitative Drug Sensitivity Assay for All Plasmodium falciparum Gametocyte Stages. PLoS ONE **9**:e93825.

72. **Schneider P**, **Reece SE**, **van Schaijk BCL**, **Bousema T**, **Lanke KHW**, **Meaden CSJ**, **Gadalla A**, **Ranford-Cartwright LC**, **Babiker HA**. 2015. Quantification of female and male Plasmodium falciparum gametocytes by reverse transcriptase quantitative PCR. Molecular and Biochemical Parasitology **199**:29–33.

73. **Cevenini L**, **Camarda G**, **Michelini E**, **Siciliano G**, **Calabretta MM**, **Bona R**, **Kumar TRS**, **Cara A**, **Branchini BR**, **Fidock DA**, **Roda A**, **Alano P**. 2014. Multicolor Bioluminescence Boosts Malaria Research: Quantitative Dual-Color Assay and Single-Cell Imaging in *Plasmodium falciparum* Parasites. Analytical Chemistry **86**:8814–8821.

74. **Ruecker A**, **Mathias DK**, **Straschil U**, **Churcher TS**, **Dinglasan RR**, **Leroy D**, **Sinden RE**, **Delves MJ**. 2014. A Male and Female Gametocyte Functional Viability Assay To Identify Biologically Relevant Malaria Transmission-Blocking Drugs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **58**:7292–7302.

75. **Bolscher JM**, **Koolen KMJ**, **van Gemert GJ**, **van de Vegte-Bolmer MG**, **Bousema T**, **Leroy D**, **Sauerwein RW**, **Dechering KJ**. 2015. A combination of new screening assays for prioritization of transmission-blocking antimalarials reveals distinct dynamics of marketed and experimental drugs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **70**:1357–1366.

76. **Delves M**, **Plouffe D**, **Scheurer C**, **Meister S**, **Wittlin S**, **Winzeler EA**, **Sinden RE**, **Leroy D**. 2012. The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of Plasmodium: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. PLoS Medicine **9**:e1001169.

77. **Delves MJ**, **Ruecker A**, **Straschil U**, **Lelievre J**, **Marques S**, **Lopez-Barragan MJ**, **Herreros E**, **Sinden RE**. 2013. Male and Female Plasmodium falciparum Mature Gametocytes Show Different Responses to Antimalarial Drugs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **57**:3268–3274.

78. **Miguel-Blanco C**, **Lelièvre J**, **Delves MJ**, **Bardera AI**, **Presa JL**, **López-Barragán MJ**, **Ruecker A**, **Marques S**, **Sinden RE**, **Herreros E**. 2015. Imaging-Based High-Throughput Screening Assay To Identify New Molecules with Transmission-Blocking Potential against Plasmodium falciparum Female Gamete Formation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **59**:3298–3305.

79. **Yerbanga RS**, **Lucantoni L**, **Ouédraogo RK**, **Da DF**, **Yao FA**, **Yaméogo KB**, **Churcher TS**, **Lupidi G**, **Taglialatela-Scafati O**, **Gouagna LC**, **others**. 2014. Transmission blocking activity of Azadirachta indica and Guiera senegalensis extracts on the sporogonic development of Plasmodium falciparum field isolates in Anopheles coluzzii mosquitoes. Parasites & vectors **7**:1–10.

80. **Duffy S**, **Avery VM**. 2013. Identification of inhibitors of Plasmodium falciparum gametocyte development. Malar J **12**:408.

81. **D'Alessandro S**, **Silvestrini F**, **Dechering K**, **Corbett Y**, **Parapini S**, **Timmerman M**, **Galastri L**, **Basilico N**, **Sauerwein R**, **Alano P**, **Taramelli D**. 2013. A Plasmodium falciparum screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **68**:2048–2058.

82. **Lelièvre J**, **Almela MJ**, **Lozano S**, **Miguel C**, **Franco V**, **Leroy D**, **Herreros E**. 2012. Activity of Clinically Relevant Antimalarial Drugs on Plasmodium falciparum Mature Gametocytes in an ATP Bioluminescence "Transmission Blocking" Assay. PLoS ONE **7**:e35019.

83. **Peatey CL**, **Leroy D**, **Gardiner DL**, **Trenholme KR**. 2012. Anti-malarial drugs: how effective are they against Plasmodium falciparum gametocytes. Malar J **11**:34.

84. **Peatey CL**, **Spicer TP**, **Hodder PS**, **Trenholme KR**, **Gardiner DL**. 2011. A high-throughput assay for the identification of drugs against late-stage Plasmodium falciparum gametocytes. Molecular and Biochemical Parasitology **180**:127–131.

85. **Sanders NG**, **Sullivan DJ**, **Mlambo G**, **Dimopoulos G**, **Tripathi AK**. 2014. Gametocytocidal Screen Identifies Novel Chemical Classes with Plasmodium falciparum Transmission Blocking Activity. PLoS ONE **9**:e105817.

86. **Auld DS**, **Thorne N**, **Maguire WF**, **Inglese J**. 2009. Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression. Proceedings of the National Academy of Sciences **106**:3585–3590.

VI. Rôle de la rate dans les accès palustres.

Voir :

Ndour PA, **Safeukui I**, **Diakité S**, **Duez J**, **Jauréguiberry S**, **Buffet P**. 2015. Role of the Spleen in Human Malaria, p. 1–24. *In* Hommel, M, Kremsner, PG (eds.), Encyclopedia of Malaria. Springer New York.

Objectifs de l'étude

I. Contexte focalisé

La transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum* repose sur la différenciation intra-érythrocytaire de parasites sexués, les gamétocytes. Cette différenciation s'accompagne d'une restructuration profonde du parasite et de l'érythrocyte hôte. En utilisant la filtration érythrocytaire sur microsphères (microsphiltration), Tibùrcio et *al.* ont démontré que les érythrocytes abritant des gamétocytes immatures sont rigides, tandis que ceux abritant des gamétocytes matures sont déformables (Introduction, Chapitre IV, sous-chapitres 5 et 6). Pareillement aux érythrocytes sains, la capacité des gamétocytes à se déformer de façon intense afin de traverser les étroites fentes interendothéliales spléniques -*un contrôle qualité mécanique essentiel pour le maintient d'une homoéostasie érythrocytaire fonctionnelle*- est essentielle à leur circulation chez l'être humain. Ainsi, un traitement pharmacologique induisant une rigidification des gamétocytes se traduirait par leur rétention splénique et donc leur élimination de la circulation sanguine : les gamétocytes rigidifiés seraient ainsi exclus du cycle de transmission.

II. Objectif général de l'étude

L'objectif de cette étude, financée par la fondation *Bill & Melinda Gates*, est la découverte de composés pharmacologiques rigidifiant les gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum*, basée sur une approche de criblage par microsphiltration.

III. Mes objectifs principaux

En tant que doctorant CIFRE financé par la filiale française d'HRA Pharma Laboratoires (Paris, France – superviseur Michèle Resche-Rigon, à la tête de la division R&D), mes objectifs ont été :

-la miniaturisation au format microplaque du dispositif de microsphiltration développé par l'équipe.

-l'optimisation d'une méthode de criblage par microsphiltration employant ces microplaques à microsphiltration.

-apporter une preuve de concept supportant la faisabilité d'un criblage pharmacologique par microsphiltration, pour la découverte de composés rigidifiant les érythrocytes abritant des gamétocytes matures et bloquant ainsi la transmission du paludisme.

Pour l'atteinte de ces objectifs, j'ai été amené à travailler dans 2 laboratoires académiques :

-CIMI-Paris U1135 équipe 4, Hôpital La Pitié-Salpêtrière, Paris, France, dirigée par Pierre Buffet : l'équipe scientifique ayant développé la méthode de microsphiltration au format colonne.

- *Eskitis Institute for Drug Discovery, Malaria group*, Queensland, Australie, dirigé par Vicky Avery : une équipe scientifique hautement spécialisée dans le criblage phénotypique sur gamétocytes de *Plasmodium falciparum*.

IV. Mes objectifs spécifiques :

1-Appropriation de la méthode de préparation de l'outil microsphiltration

2-Développement et validation d'une méthode de production automatisée de microplaques à microsphiltration

3-Calibration et validation des performances en utilisant des parasites asexués.

4-Appropriation des méthodes de production de gamétocytes *in vitro*.

5-Optimisation de la rétention des gamétocytes par les filtres de microsphères.

6-Automatisation/standardisation de la quantification des taux de rétention.

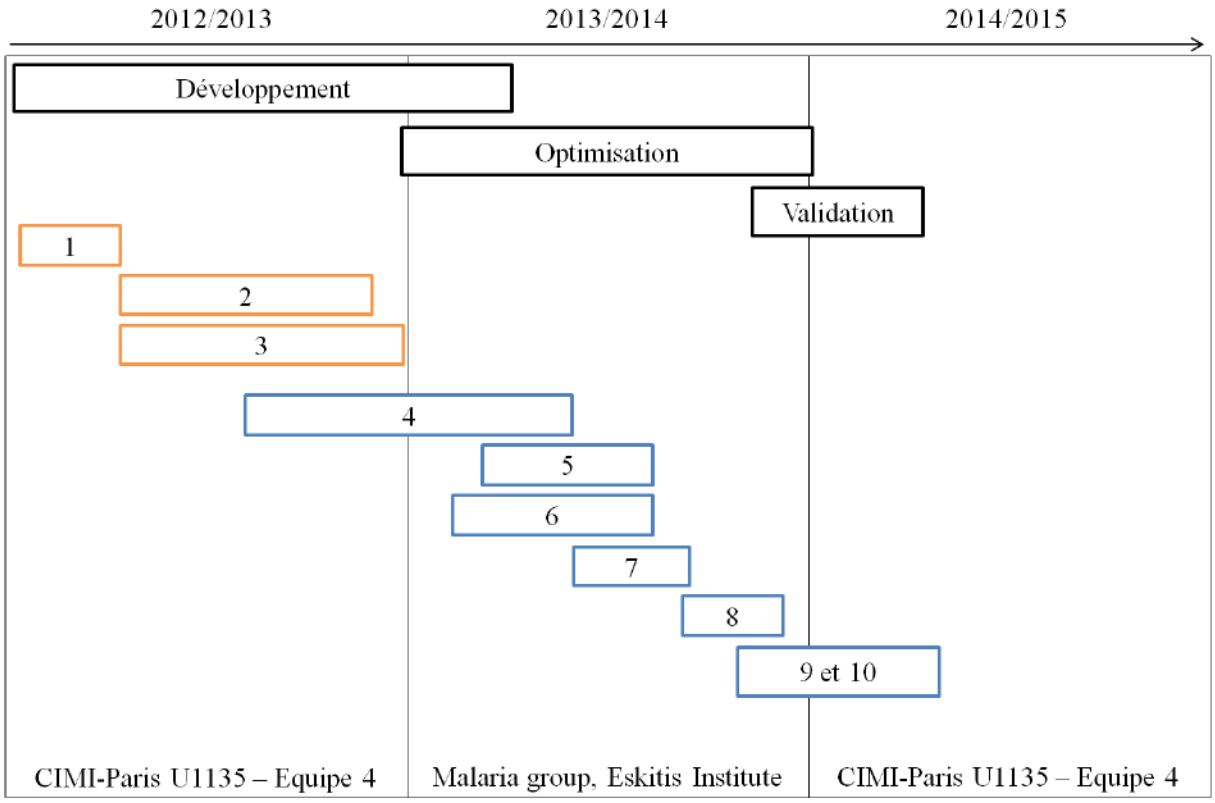
7-Définition d'une fenêtre de criblage.

8-Pré-criblage.

9-Automatisation d'une séquence méthodologique de criblage par microsphiltration.

10-Criblage « preuve de principe » d'antipaludiques de référence.

V. Echéancier



Echéancier

Matériel et Méthodes

En complément de:

Duez J, **Holleran JP**, **Ndour PA**, **Loganathan S**, **Amireault P**, **Français O**, **Nemer W El**, **Le Pioufle B**, **Amado IF**, **Garcia S**, **Chartrel N**, **Le Van Kim C**, **Lavazec C**, **Avery VM**, **Buffet PA**. 2015. Splenic Retention of Plasmodium falciparum Gametocytes To Block the Transmission of Malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **59**:4206–4214.

I. Culture des parasites asexués de *Plasmodium falciparum*

Equipe d'accueil parisienne: Les souches plasmodiales FUP et NF54, clone B10 ont été cultivées en milieu RPMI 1640 contenant 10mM d'hépès, supplémenté avec 10% sérum AB humain (Etablissement Français du Sang, EFS, Paris) décomplémenté, 42nM gantamycine et 0.3mM hypoxanthine (Life Technologies), en flasques de culture non ventilées (Dutscher) (milieu statique) sous atmosphère contrôlée (5% O2, 5% CO2, 90% N), à un hématocrite de 5%. Un milieu exempt d'antibiotique a été utilisé lors des tests pharmacologiques.

Les parasites ont été sous-cultivés à des parasitémies de 1-5% et 0.3-2% pour les stades annulaires et pigmentés, respectivement, avec des culots érythrocytaires O+ humains (EFS) déleucocytés et conservés au maximum 10 jours après prélèvement à +4°C. La synchronisation des parasites a été effectuée par resuspension transitoire en sorbitol (Sigma-Aldrich) (lyse des parasites asexués matures pigmentés) [1], par sédimentation différentielle en plasmion [2] ou par séparation magnétique des parasites (colonne MACs, Miltenyi Biotech) [3]. La synchronisation fine des cultures (fenêtre de 4-8 heures) pour

expérimentation en microsphiltration a été opérée par double séparation magnétique, durant la ré-invasion (récupération des schizontes) et 4-8 heures après (extraction des schizontes restants). Les parasitémies ont été mesurées à partir d'observations de frottis sanguins colorés au Bleu de Giemsa (Sigma Aldrich) [4] en microscopie optique, objectif 50-100, sur >5000 érythrocytes (entretien en routine) ou >20000 érythrocytes (calcul des taux de rétention en microsphiltration).

II. Production *in vitro* des gamétocytes de *Plasmodium falciparum*

Equipe d'accueil australienne: (Duez & Holleran et *al*., AAC 2015; [5]) Une synchronisation par sorbitol est réalisée sur une culture asexuée contenant ≥50% de parasites jeunes annulaires (Jour -8). Au jour 6, un sorbitol est réalisé dans la matinée afin d'éliminer des trophozoïtes-schizontes. Un second sorbitol est réalisé 8 heures plus tard, délimitant ainsi une fenêtre de synchronisation de 8-10 heures. Les cultures parasitaires sont amplifiées.

Au jour -3, les schizontes sont alors isolés par séparation magnétique, resuspendus à une parasitémie de 2-3% dans des érythrocytes fraichement prélevés (<15 jours), à un hématocrite de 2.5%, puis placés en agitation douce (pour maximiser le monoparasitisme érythrocytaire) jusqu'au lendemain. Au jour -2, les parasitémies annulaires (pic parasitémique initialement >15%) sont alors ajustées à 8-12%, l'hématocrite à 1.25%. Le changement du milieu est incomplet (75-90%). Au jour -1, les parasitémies asexuées pigmentées "stressées" sont ajustées à 2-3%, à un hématocrite 2.5% puis placées sous agitation douce jusqu'au jour suivant.

Au jour 0, les cultures contiennent une fraction de parasites annulaires engagés sur une gamétocytogénèse. Une séparation magnétique est réalisée afin d'éliminer les gamétocytes spontanés. Les parasites sont ensuite entretenus quotidiennement en milieu "gamétocyte"

(Duez & Holleran et *al.*, AAC 2015), supplémenté avec 11mM D-glucose et 0.5M N-acétyl-D-glucosamine (NAG) et dépourvu de blasticidine (Sigma-Aldrich) (antibiotique de sélection des parasites exprimant le transgène Pfs16-GFP-Luc). Au jour +8, les gamétocytes (stade IV-V) sont isolés par séparation magnétique puis concentrés à 3-5% avec des érythrocytes récemment prélevés (<10 jours), à un hématocrite 2%. Des gamétocytes matures sont utilisés aux jours 11-14 pour expérimentation.

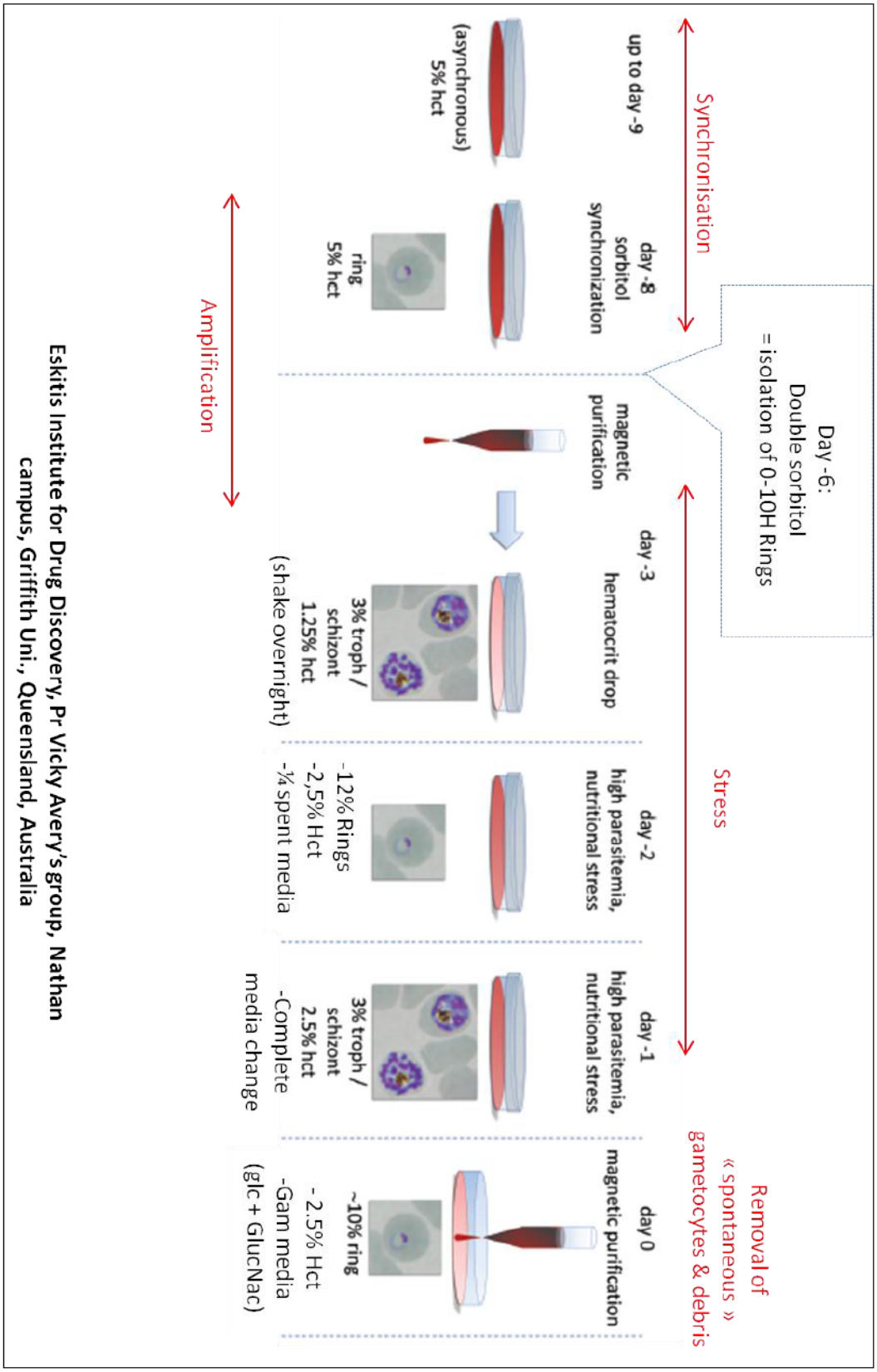


Figure M-1: Principales étapes du protocole d'induction gamétocytaire développé par Avery et *al.*. *Adaptée à partir de [6].*

Equipe d'accueil parisienne: Une culture parasitaire asynchrone est amplifiée jusqu'à l'obtention de parasitémies > 15% (pic parasitémique, = Jour -1), à un hématocrite 1-1.5%. Les cultures sont alors entretenues à partir du jour 0 en milieu RPMI 1640 contenant 10mM d'hépès, supplémenté avec 10% sérum AB humain (EFS) décomplémenté, 42nM gantamycine, 0.3mM hypoxanthine, 11mM glucose et 0.5M NAG (Sigma Aldrich). Une extraction des gamétocytes est réalisée entre les jours 10-13. Ces derniers sont alors concentrés à 3-5% avec des érythrocytes récemment prélevés (<10 jours), à un hématocrite 2%.

III. Préparation des microplaques à microsphiltration

Des microplaques à microsphiltration ont été préparées avec un automate de pipetage Freedom EVO 100 (TECAN ; Plateforme Post-génomique de la Pitié Salpétrière - P3S. UMS-2 / US-29 "Omique") ou Biomek 3000 (Beckman Coulter ; *Malaria group*, *Eskitis Institute*) caractérisés par un bras robotique avec 8 têtes de pipetages. Des microsphères métalliques (96.5% étain, 3% argent, 0.5% cuivre) de diamètre 5-15, 15-25 et 25-45µM commercialisées par IPS (Industrie des Poudres Sphériques, Anemasse, France) ou de calibre 5-15 et 25-45µM commercialisées par AMTech (Connecticut, USA) ont été utilisées. Ces microsphères sont déposées dans le réservoir de l'automate, resuspendues en tampon phosphate PBS 1X supplémenté avec 1% albumax II. Après sédimentation, un volume de 50µL de microsphères 25-45µm (IPS ou AmTech) est transféré dans les puits de microplaques filtrantes (Millipore ou Harvard Apparatus) afin de générer une première couche de microsphères de support. Un volume de 60µL de microsphères 5-15 : 15-25µm (IPS, 50 : 50) ou 5-15µm (AMTech) est transféré, résultant en une seconde couche superficielle de microsphères à propriété filtrante spléno-mimétique. L'excès de tampon est

ensuite éliminé par aspiration puis par capillarité en plaçant les microplaques sur papier absorbant.

Les microplaques sont référencées, puis placées dans un sac plastique hermétique pour congélation à -20°C, ou sous un flux d'air à 37°C durant 24 heures dans un compartiment non hermétique, puis stockées dans un sac aluminium hermétique (Protective Packaging) en présence de sachets de silice 25-50g. Le jour de l'expérience, les microplaques sont éventuellement décongelées à température ambiante durant 1 heure et rincées en microsphiltrant un volume de 600µL de tampon /puit.

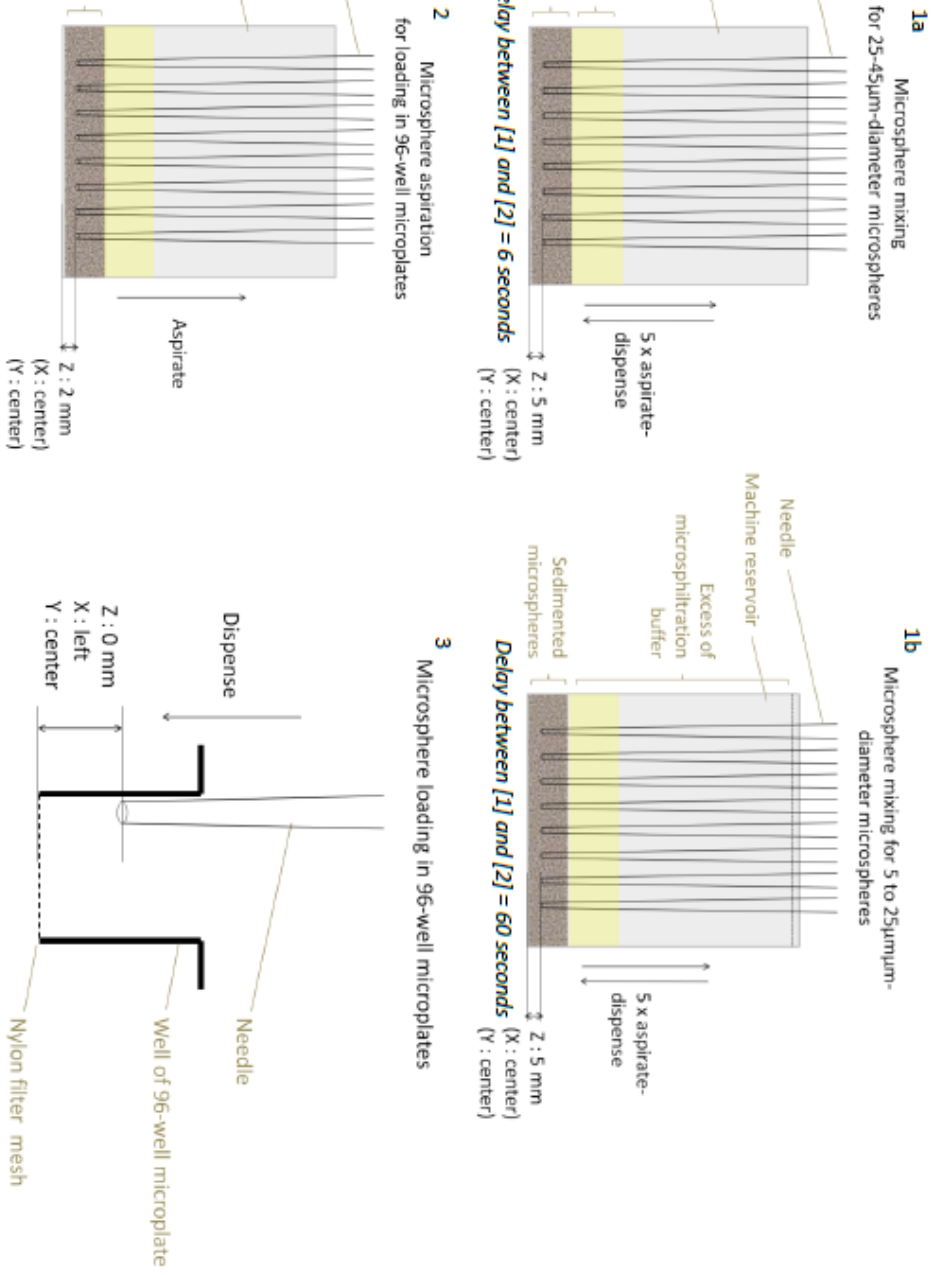


Figure M-2: Transfert automatisé des microsphères depuis le réservoir du robot jusqu'aux puits des microplaques. *La resuspension des microsphères est suivie par leur sédimentation, dont la durée est déterminée par leur calibre (1a/ 25-45µm = 6 secondes, 1b/ 5-15/15-25µm = 60 secondes, puis par leur transfert en microplaque.*

IV. Préparation des colonnes à microsphiltration

Trois volumes de 60µL de microsphères 5-15 (AmTech) sont successivement déposés sur le filtre anti-aérosol de cônes de micropipettes (Neptune, BarrierTips) inversés et à capacité volumique 1mL. L'excès de tampon est éliminé par filtration à l'aide d'une seringue reliée à l'extrémité des cônes par un système de perfusion. Les cônes sont ensuite référencés, puis placés dans des tubes 50mL à -20°C ou sous un flux d'air à 37°C durant 48 heures dans un compartiment non hermétique, puis stockés dans un sac aluminium hermétique en présence de sachets de silice 25-50g. Le jour de l'expérience, les cônes sont éventuellement décongelés à température ambiante durant 1 heure et rincés en microsphiltrant un volume de 600µL de tampon.

V. Microsphiltration

Pour le format microplaque, un volume de 200µL de suspension érythrocytaire, 2% hématocrite, renfermant les érythrocytes d'étude concentrés à 1-10% dans des érythrocytes diluants déformables (<10 jours post-prélèvement), est transféré dans les puits des microplaques. Ces dernières sont couplées à leur plaque réceptrice correspondante dans un boîtier hermétique résistant au vide (Millipore ou Beckman Coulter), relié à une pompe à vide électrique (Millipore) par un tube en polymère plastique via un piège à vide de 1-10L. Une pression de 10 In.Hg est imposée, permettant la filtration de l'échantillon. Une seconde étape de filtration d'un volume 1.6mL de tampon de microsphiltration permet secondairement le rinçage des couches de microsphères, résultant en la dilution du culot érythrocytaire filtré (hématocrite ~0.2%).

La microsphiltration au format colonne est réalisée selon le protocole publié dans [7, 8].

VI. Criblage de la *Gambox* par microsphiltration.

GamBox, Equipe d'accueil parisienne: Le jour de l'expérience, 200µL de suspension érythrocytaire à hématocrite 2.5% et contenant 3-5% de gamétocytes ont été déposés manuellement dans des microplaques de culture 96 puits en polyéthylène contenant 50µL des composés dilués à 50µM en milieu de culture, 2.5% DMSO. Les échantillons de cutlure gamétocytaire, 250µL/puit, ont été exposés aux composés 10µM, 0.5% DMSO (final) durant 2 heures, sous atmosphère contrôlée (5% CO2), sous membrane perméable au gaz. Comme contrôle, les gamétocytes ont été exposés à la calyculine, 100nM ou 0.5% DMSO. Un marquage de l'acide ribonucléotidique gamétocytaire et du potentiel de membrane gamétocytaire a ensuite été réalisé, sur une période de 30 minutes, par ajout de Sybr green 1x et de mitotracker, 500nM. Les échantillons ont ensuite été resuspendus manuellement, un volume de 200µL a été transféré en microplaque pour microphiltration subséquente. Les échantillons filtrés et contrôles non filtrés correspondants ont ensuite été analysés par cytométrie de flux (ACCURI BD C6), sur >30000 évènements sous excitation à λ530/30 nm (FL1 ; Sybr green) et λ661/16 nm (FL4 ; mitotracker).

VII. Formules mathématiques employées

Taux de rétention (Δ rétention):

$$\Delta = 100 \times \frac{(\%\ \text{parasites avant microsphiltration}) - (\%\ \text{parasites après microsphiltration})}{(\%\ \text{parasites avant microsphiltration})}$$

Activité gamétocytocide (AG) :

$$AG = \frac{100 \times (\%\ \text{parasites})}{(\%\ \text{parasites DMSO})}$$

Facteur d'enrichissement (dans les filtres de microsphères) (FE) :

$$FE = \frac{(\%\ \text{parasites retenus dans les filtres de microsphères})}{(\%\ \text{parasites avant microsphiltration})}$$

Les indices staitistiques de robustesse de la méthode de criblage (facteur Z', rapports signal/bruit (S/N) et signal/bruit de fond (S/B) ont été calculés selon les formules décrites dans [9].

VIII. Références

1. **Lambros C**, **Vanderberg JP**. 1979. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. J Parasitol **65**:418–420.
2. **Ranford-Cartwright LC**, **Sinha A**, **Humphreys GS**, **Mwangi JM**. 2010. New synchronization method for Plasmodium falciparum. Malaria Journal **9**:170.
3. **Mata-Cantero L**, **Lafuente MJ**, **Sanz L**, **Rodriguez MS**. 2014. Magnetic isolation of Plasmodium falciparum schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and synchronized in vitro culture. Malaria Journal **13**:112.
4. **Wery M**. 1995. Protozoologie médicale. De Boeck Supérieur.
5. **Duffy S**, **Avery VM**. 2013. Identification of inhibitors of Plasmodium falciparum gametocyte development. Malar J **12**:408.

6. **Lucantoni L**, **Duffy S**, **Adjalley SH**, **Fidock DA**, **Avery VM**. 2013. Identification of MMV Malaria Box Inhibitors of Plasmodium falciparum Early-Stage Gametocytes, Using a Luciferase-based High-Throughput Assay. Antimicrob Agents Chemother.

7. **Deplaine G**, **Safeukui I**, **Jeddi F**, **Lacoste F**, **Brousse V**, **Perrot S**, **Biligui S**, **Guillotte M**, **Guitton C**, **Dokmak S**, **Aussilhou B**, **Sauvanet A**, **Cazals Hatem D**, **Paye F**, **Thellier M**, **Mazier D**, **Milon G**, **Mohandas N**, **Mercereau-Puijalon O**, **David PH**, **Buffet PA**. 2010. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. Blood **117**:e88–e95.

8. **Lavazec C**, **Deplaine G**, **Safeukui I**, **Perrot S**, **Milon G**, **Mercereau-Puijalon O**, **David PH**, **Buffet P**. 2013. Microsphiltration: a microsphere matrix to explore erythrocyte deformability. Methods Mol Biol **923**:291–297.

9. **Zhang null**, **Chung null**, **Oldenburg null**. 1999. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. J Biomol Screen **4**:67–73.

Résultats

I. Développement d'une plateforme de criblage.

1. Développement de microplaques 96-puits à microsphiltration.

1.1 Dessin conceptuel de la microsphiltration en microplaque.

L'accroissement du débit d'échantillonnage de la méthode de microsphiltration repose sur l'utilisation d'un support microplaque à fonds de puits poreux (diamètre des pores = 20µm) et résistants à une aspiration sous vide. Dans chacun des puits, une première couche de microsphères de diamètre 25-45µm assure le soutien d'une seconde couche de microsphères de diamètre 5-15µm à propriété filtrante (Duez & Holleran et *al*. AAC 2015 ; Fig1). Les espaces inter-sphères générés au sein de cette matrice permettent la restitution du patron de déformation complexe subit par un érythrocyte traversant des fentes interendothéliales spléniques [1, 2].

1.2 Microplaques de première génération.

Détermination par pipetage manuel de l'épaisseur des couches de microsphères adéquate pour la filtration: Des expérimentations ont été réalisées afin d'identifier l'épaisseur optimale des couches de microsphères permettant la reproduction des résultats du format de microsphiltration initial [1]. L'épaisseur des couches microsphériques a tout d'abord été dégrossie en filtrant des érythrocytes infectés (iRBC) par des stades asexués de *Plasmodium falciparum* au travers d'épaisseurs croissantes de couches microsphériques générées manuellement (FigR1-A). Moins de 70% des formes annulaires (Rings : 68,01 ± 6,73%) et plus de 85% des formes matures pigmentées (Trophozoïtes : 85,07 ± 7,15% et Schizontes : 98 ± 2,83%) ont été retenues dans des filtres microsphériques dont l'épaisseur des couches [25-45µm] et [5-15µm] était de 1mm et 2mm, respectivement. Dans ces conditions, la couche [25-

45µm] a contribué de façon importante à la rétention des formes asexuées matures quelque soit l'épaisseur (1 ou 2mm) testée (1mm : Trophozoïtes = 30,5 ± 27,97% et Schizontes 62,27 ± 8,36% ; 2mm : Trophozoïtes = 40,11 ± 14,26% et Schizontes 58,07 ± 14,22%). Le volume de tampon utilisé pour l'étape de rinçage (initialement 600µL) a été augmenté à 1.8mL afin d'assurer la récupération en aval d'une plus grande proportion d'érythrocytes déformables.

Développement d'une séquence automatisée de dépôt de microsphères pour la préparation de microplaques filtrantes: Un automate de pipetage (Tecan EVO100) a ensuite été utilisé afin d'opérer, de façon plus précise et reproductible, le dépôt de couches de microsphères plus fines dans les puits des microplaques. Une séquence de dépôt automatisée a été programmée (Fig M2). En résumé, les microsphères étaient mises en suspension dans un volume défini de tampon, suivi d'un délai de sédimentation permettant la génération d'une épaisse couche de microsphères au fond d'un réservoir à partir de laquelle s'effectue un transfert en puits de microplaques de capacité volumique 250µL. Un volume de microsphères de calibre 5-25µm (mélange 5-15 + 15 :25µm, 50 : 50, en solution) égal à 60µL résulta en une couche de 1.3mm d'épaisseur associée à des taux de rétention les plus proches de ceux escomptés. La reproductibilité des performances de l'ensemble des puits des microplaques ainsi préparées a été évaluée en filtrant de jeunes formes asexuées annulaires. Une rétention anormalement faible a été observée pour les puits des 2 premières colonnes (colonnes 1-2 : 20-25% contre 40-45% pour les colonnes 3-10), suggérant une composition microsphérique inappropriée (FigR1-Bi). La séquence de dépôt automatisée a alors été corrigée de façon à exclure les volumes de microsphères correspondant aux 2 ou aux 6 premières volumes de microsphères pipetés (séquences de dépôt n°2 et 3, respectivement ; FigR1-B-ii et B-iii). Cette optimisation a permis d'obtenir des taux de rétention reproductibles centrés sur une moyenne de 44,16 ± 13.4% et 45.12 ± 11.90 et caractérisés par un coefficient de variation égal à 30.93 et 26.29% pour les séquences 2 et 3, respectivement. La robustesse, les volumes morts de microsphères

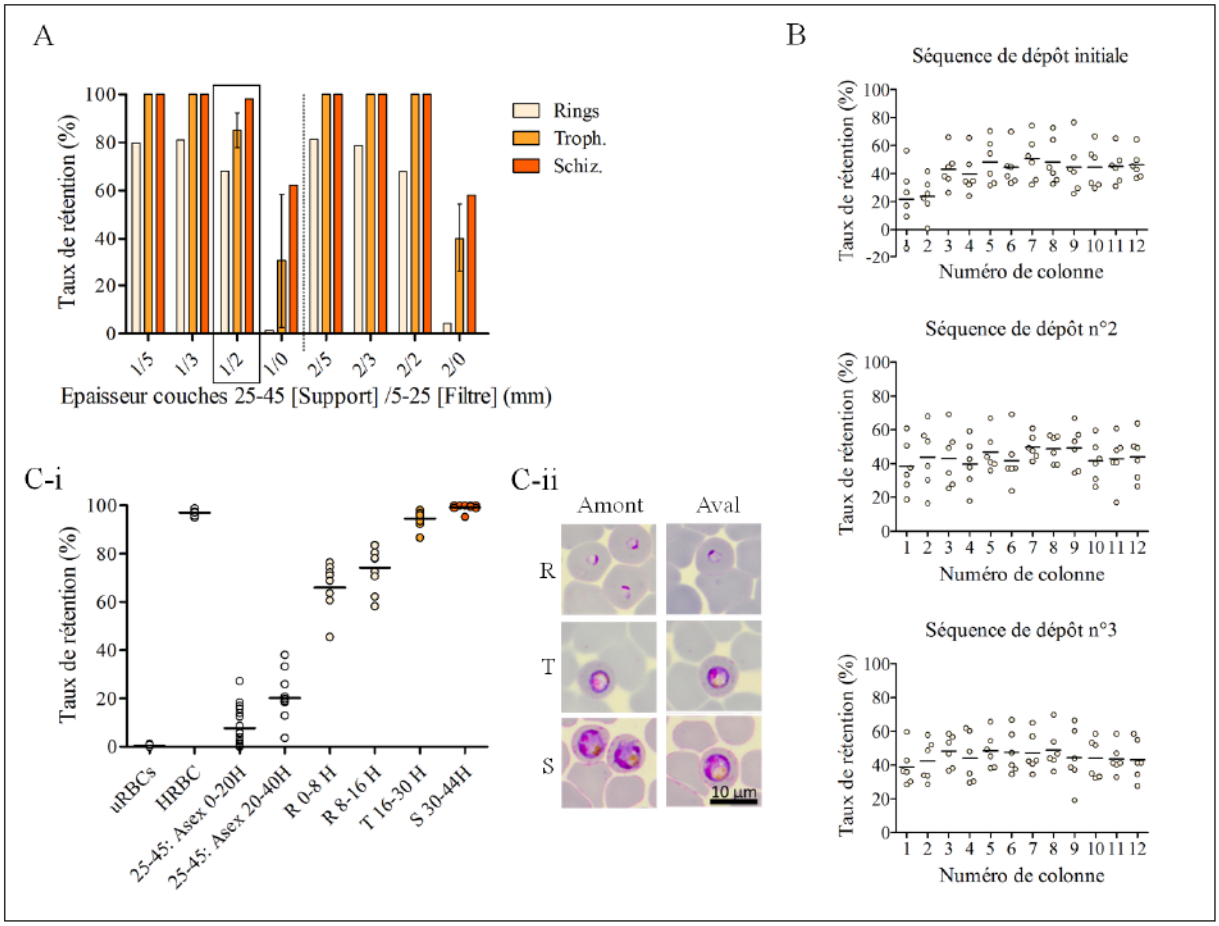
requis pour la préparation des microplaques et la durée d'implémentation de la séquence automatisée ont été pris ne compte pour la sélection d'une séquence optimale. La séquence n°2 fut ainsi retenue afin d'assurer le dépôt sur plaque entière en l'espace de 60 minutes avec une quantité de microsphères [5-15µm] égale à 90g.

Principales caractéristiques du prototype développé : Avec le support microplaque à capacité volumique 250µL/puits, une microsphiltration se décomposait en 2 étapes : 1/la filtration de l'échantillon érythrocytaire, suivie par 2/ un rinçage des couches de microsphères avec un volume total de 1.6mL de tampon et opéré sur 8 cycles successifs d'aspiration sous vide (8 x 200µL). Dans ces conditions, la microsphiltration de 96 échantillons en parallèle pouvait s'effectuer en approximativement 45-60 minutes. Les couches de microsphères demeurent humides entre chaque étape de filtration ou de rinçage. Les matrices microsphériques assurent ainsi par capillarité la préservation d'un environnement inter-sphères aqueux favorable au maintien d'une intégrité des érythrocytes au cours de leur microsphiltration (FigR1-C-ii).

Conditions expérimentales associées à une rétention différente des formes annulaires et des formes matures pigmentées dans les microplaques filtrantes produites par robot : Des érythrocytes infectés par des parasites à différents stades de maturation asexuée ont été microsphiltrés avec le prototype automatisé. Des taux de rétention de 65.98 ± 9.58%, 74.25 ± 9.07%, 94.55 ± 3.45% et 99.20 ± 1.53% ont été observés respectivement avec des formes annulaires jeunes (0-8H) et avancées (8-16H), des trophozoïtes (16-30H) et des schizontes (30-44H). La morphologie des parasites asexués en aval des microsphiltres était intacte (FigR1-C-ii) et aucun changement de couleur n'a été observé quant au surnageant des échantillons correspondants. Ce résultat indique une hémolyse minime voire absente lors de la microsphiltration. Moins de 10% (7.81 ± 7.98) des parasites asexués immatures (0-20H ; FigR1-C-i : R25-45) ont été retenus par des filtres constitués uniquement de microsphères [25-45µm], indiquant que la rétention mesurée en microsphiltration résulte bien d'une

sollicitation mécanique et non d'une interaction de surface avec adhésion entre érythrocytes (RBC) et microsphères. De plus, 20.19 ± 9.10% des parasites asexués matures (20-44H) ont été retenus dans cette même condition contrôle, indiquant une participation minime de la couche [25-45µm] à la rétention d'érythrocytes très faiblement déformables. Enfin, moins de 5% et plus de 95% des érythrocytes normaux déformables (nRBC) et des érythrocytes rigidifiés par traitement thermique (HRBC) ont été retenus dans ces conditions, excluant un phénomène de saturation pouvant biaiser les taux de rétention mesurés.

Résumé : La microsphiltration apparaît donc comme une méthode standardisable, adaptable au format microplaque, reposant sur la rétention mécanique spécifique de populations érythrocytaires à déformabilité réduite.



FigR1 : Développement d'un prototype d'essai à format microplaque en utilisant l'outil robotique. *A/ Rétention d'érythrocytes parasités par des stades de développement asexués de* Plasmodium falciparum *dans des microsphiltres préparés manuellement et d'épaisseur croissante (1 expérience en triplicata : N=1 ; n=3). B/ Optimisation d'une séquence de dépôt automatisée des microsphères (Tecan EVO 100, plateforme post-génomique p3s, La Salpêtrière) afin de corriger un effet plaque (N=1 ; n=3). C-i/Profils de rétention asexués associés à la séquence de dépôt automatisée n°2, validant la reproduction des résultats obtenus avec le prototype de microsphiltration initial (format cônes) développé par l'équipe d'accueil [1] (N=3 ; n=3). C-ii/Morphologie d'érythrocytes normaux ou parasités microsphiltrés (Aval), par comparaison avec des érythrocytes non microsphiltrés (Amont) (Objectif x100 en microscopie à transmission sur frottis sanguins colorés au bleu de Giemsa).*

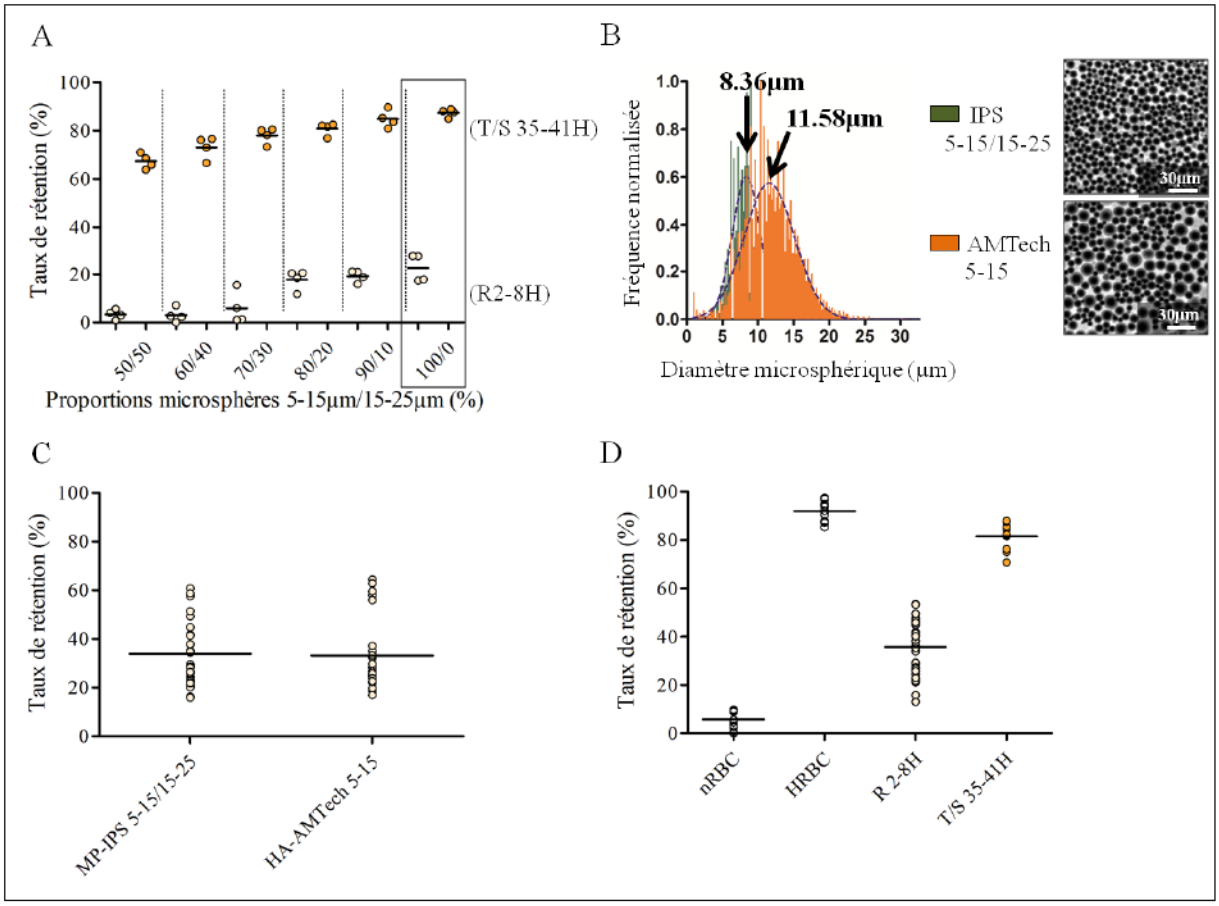
1.3 Microplaques de seconde génération.

Le développement d'une seconde génération de microplaques à microsphiltration a pris place à l'Institut Eskitis (Université Griffith) en Australie, sur la plateforme de criblage haut débit du groupe *Malaria* dirigé par le Pr. Vicky Avery. Plusieurs optimisations furent portées au prototype afin de garantir sa compatibilité avec une approche en criblage pharmacologique. Un support microplaque à puits profonds (capacité volumique des puits = 2mL) avec bec directeur permit de réduire considérablement (de 8 à 1) le nombre de cycles de rinçages associés au protocole de microsphiltration et de minimiser les contaminations inter-puits.

Des microsphères commercialisées par AMTech (Etats-Unis), un fournisseur capable d'assurer des volumes de production plus importants que le fournisseur français (IPS, Industrie des Poudres Sphériques, Annemasse en France), ont été utilisées pour la préparation des microsphiltres. La distribution des différents calibres formant les mélanges de microsphères AMTech et IPS a été examinée par microscopie confocale. L'analyse a mis en évidence un calibre majoritaire de 11.58 et 8.36µm dans les mélanges [5-15µm] AmTech et [5-15/15-25µm] (50 : 50) IPS, respectivement (FigR2-A). Les performances de filtres préparés avec un automate de pipetage Biomek 3000 (Beckman Coulter) à partir de mélanges de microsphères Amtech à différents ratios [5-15/15-25µm] ont été évaluées en filtrant des formes parasitaires jeunes annulaires (Rings : R2-8H) et matures (Trophozoïtes-Schizontes : T/S 35-41H). Un mélange de microsphères [5-15µm] 100% AmTech a permis de reproduire des taux de rétention optimaux, avec 22.63 ± 5.73% et 87.40 ± 1.73% de rétention pour les formes annulaires (2-8H) et matures (35-41H), respectivement (FigR2-B). Ainsi, un mélange [5-15µm] 100% Amtech restitue une contrainte mécanique sollicitant la déformabilité érythrocytaire, similaire à celle imposée par un mélange de microsphères [5-15/15-25µm] (50 : 50) IPS.

Les performances de microplaques de première et seconde génération ont été comparées en filtrant de jeunes formes asexuées annulaires (FigR2-C). Des taux de rétention similaires ont été observés (Génération 1 MP-IPS : 33.86 ± 12.77% ; Génération 2 : 33.19 ± 14.33%). Avec ces microplaques de seconde génération, 5.86 ± 3.66% et 91.96 ± 4.14% des nRBC et des HRBC ont été retenus, indiquant une microsphiltration optimale sans saturation des filtres (FigR2-D). D'autre part, 35.82 ± 10.73% et 81.51 ± 5.13% des formes parasitaires asexuées annulaires et matures (T/S) ont été retenues suite à leur microsphiltration, résultant en un différentiel de rétention de 45.69%.

En résumé : La préparation automatisée de microplaques à microsphiltration est possible en utilisant des supports microplaques, des automates de pipetage et des microsphères d'origines commerciales différentes.



FigR2 : Seconde génération de microplaques filtrantes compatibles avec l'exécution d'une campagne de criblage. *A/ Distribution des calibres de microsphères composant un mélange IPS (5-15/15-25µm en 50 :50) ou AmTech (100% 5-15µm) par microscopie confocale puis traitement des clichés par Image J. B/ Rétention de stades asexués annulaires (Rings : R2-8H) et matures pigmentés (Trophozoïtes/Schizontes : T/S 35-41H) suite à leur microsphiltration au travers d'une proportion croissante de microsphères AmTech de calibre 5-15µm (N=1, n=3). C/ Taux de rétention de jeunes formes asexuées annulaires filtrées avec le prototype de microsphiltration microplaque n°1 (microplaques MP, microsphères IPS) et n°2 (microplaques HA, microsphères AmTech) (N=3 ; n=3). Rétention d'érythrocytes normaux (nRBC), rigidifiés par traitement thermique (HRBC) ou parasités avec des stades de annulaires (R 2-8H) ou pigmentés (T/S 35-41H) dans le prototype microplaque de 2nde génération (microplaques HA et microsphères AmTech) (N=3, n=4).*

2. Identification de paramètres modulant les taux de rétention.

Plusieurs expériences ont été réalisées afin d'identifier les paramètres modulant les taux de rétention mesurés en microsphiltration. Ce travail était important afin de maximiser le différentiel de rétention entre gamétocytes immatures et matures et par extension, entre gamétocytes matures exposés ou non avec un composé pharmacologique à activité rigidifiante (définissant une fenêtre de criblage).

Formulation du tampon de microsphiltration : La formulation du tampon dans lequel les érythrocytes (parasités ou non) sont resuspendus pour microsphiltration a un impact sur les taux de rétention mesurés (FigR3-A). Une rétention des formes asexuées annulaires (R 0-10H) de 65.98 ± 9.59, 47.01 ± 10.89 et 40.00 ± 9.78% a été observée lorsque ces derniers ont été resuspendus et microsphiltrés en tampon PBS-Albumax 1%, en RPMI1640-Albumax 1% et en RPMI1640-sérum 10%, respectivement (FigR3-A). Ce résultat souligne l'effet modulateur majeur joué par un tampon de culture classique (composé majoritairement d'acides aminés, de vitamines et de glucose) sur la rétention érythrocytaire, contrasté par une influence plus fine des concentrations d'albumine (synthétique ou naturelle).

Influence d'un poly-parasitisme érythrocytaire (FigR3-B): La microsphiltration d'érythrocytes issus d'une culture de routine a montré un taux de rétention global de 33.86 ± 12.77% (R2-8H). La quantification du nombre de parasites par érythrocyte en microscopie a permis de mesurer une rétention spécifique de 25.23 ± 13.79% et 64.64 ± 12.50% pour des érythrocytes mono (1xR/RBC) et poly-parasités (2-5R/RBC), respectivement. Ce résultat suggère un cumul des déterminants parasitaires provoquant la rigidification d'un érythrocyte hôte infecté par des formes asexuées de *Plasmodium falciparum*.

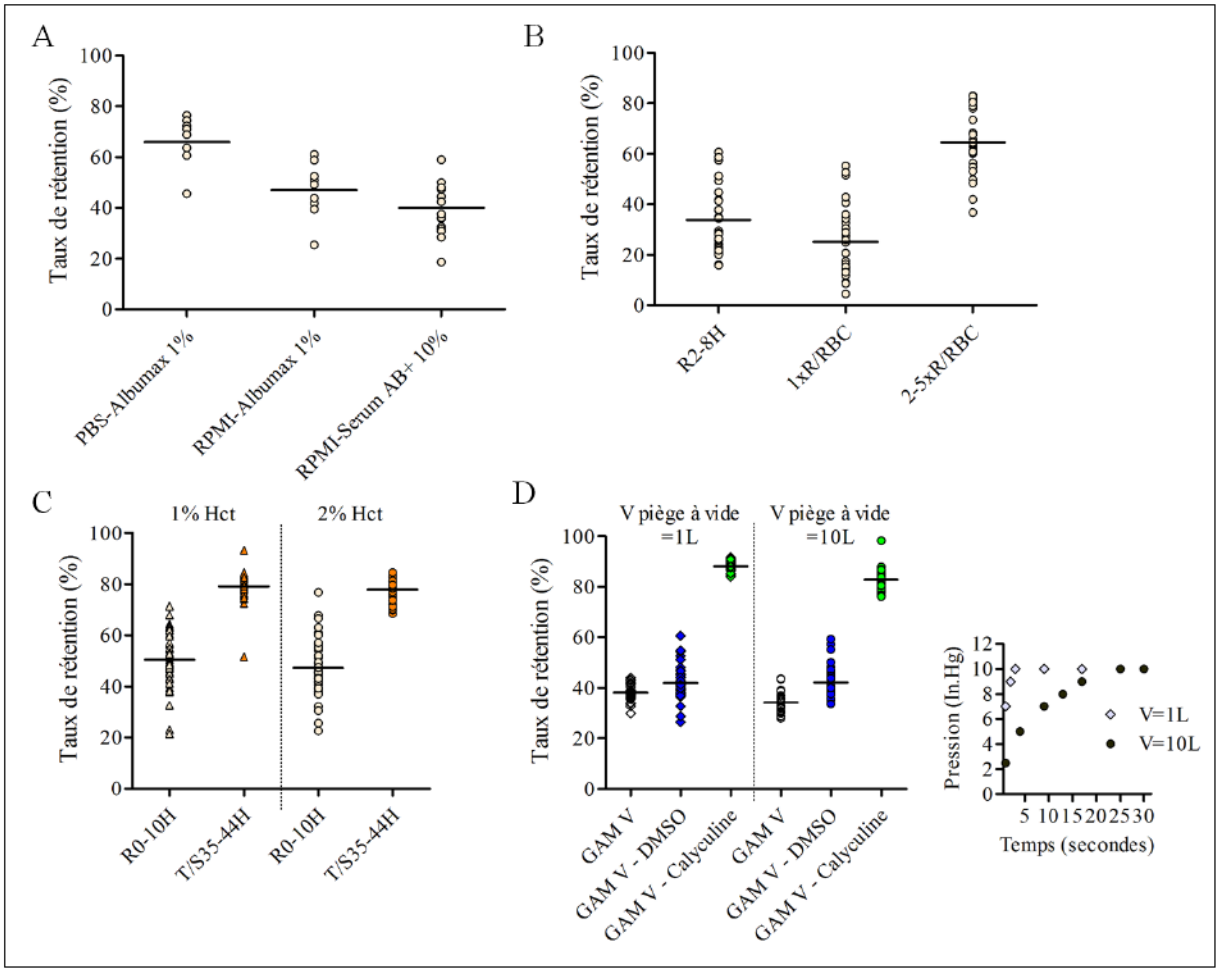
Influence de l'hématocrite de l'échantillon microsphiltré : La microsphiltration de populations asexuées annulaires et matures resuspendues à un hématocrite de 1 ou 2% a

résulté en des taux de rétention similaires, indiquant que l'hématocrite de travail à volume d'échantillon filtré constant (200µL) n'influe pas -*dans les limites de cette gamme*- sur les mesures de rétention en microsphiltration (Fig R3-C). Ainsi, les taux de rétentions mesurés en microsphiltration ne sont pas affectés par une variabilité inhérente à l'étape de dilution-resuspension de culots érythrocytaires testés.

Influence de la cinétique de dépressurisation : La microsphiltration de gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum* exposés ou non à la calyculine (= déformables ou rigidifiés par traitement pharmacologique) selon 2 cinétiques de dépressurisation (rapide ou lente) a été associée à des taux de rétention similaires (rapide – DMSO : 42.00 ± 6.66 % et calyculine : 88.10 ± 2.15% ; lente – DMSO : 42.25 ± 6.8 et calyculine : 82.84 ± 3.84%). Ce résultat montre l'absence d'influence de ce paramètre sur les taux de rétention mesurés. D'autre part il indique que les gammes de pression dans lesquelles sont réalisées les aspirations ne semblent pas avoir d'effet sur la morphologie et la biomécanique érythrocytaire (FigR3-D).

La température de l'échantillon filtré (ambiante contre 37°C) a été ultérieurement identifiée comme un paramètre d'importance négligeable (donnée non montrée).

En résumé, ce volet expérimental a désigné la formulation du tampon et le poly-parasitisme (asexué et sexué) comme les facteurs de variabilité à considérer pour le développement d'une méthode de criblage phénotypique en déformabilité gamétocytaire par microsphiltration. Cela a permis également d'esquiver une étape manuelle d'ajustement de l'hématocrite en hémocytométrie augmentant la flexibilité opératoire pour l'exécution du criblage.



FigR3 : Identification de paramètres majeurs conditionnant la rétention des érythrocytes (RBC) anormalement rigides en microsphiltration. *Impact de la formulation du tampon de microsphiltration (A ; N=1, n=3), du poly-parasitisme (B ; N=3, n=3), de l'hématocrite (Hct) de travail (C ; N=2, n=8) et de la cinétique de dépressurisation (D ; N=1, n=8) sur les taux de rétention d'érythrocytes parasités par Plasmodium falciparum. Deux cinétiques de dépressurisation (Pression en In.Hg), rapide (gris) et lente (noir), ont été imposées en modulant le volume du piège à vide (1 ou 10L) reliant la pompe à vide au dispositif de microsphiltration.*

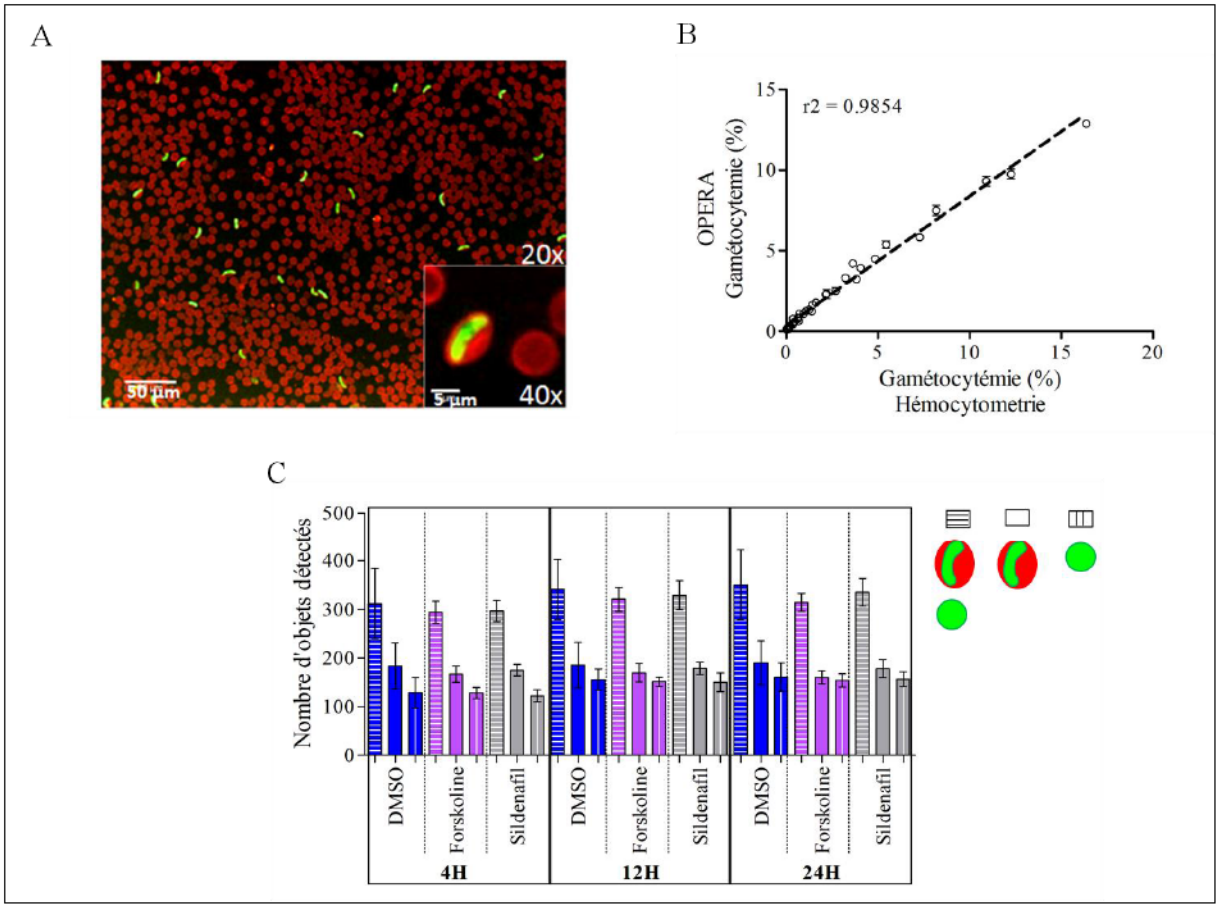
3. Quantification automatisée des taux de rétention par microscopie confocale à haut débit et haute résolution et identification d'un contrôle positif.

Afin de standardiser la mesure des taux de rétention, la quantification des gamétocytémies avant et après microsphiltration a été automatisée en utilisant la microscopie confocale à haut débit et haute résolution (Opera Perkin Elmer). Ceci a permis d'évoluer vers le développement d'une méthode de criblage à haut contenu (*HCS*, *High Content Screening*) (Duez & Holleran et *al.* AAC 2015). Une séquence de traitement multiparamétrique des clichés, centrée sur la détection et caractérisation géométrique des éléments fluorescents, a été programmée. Cette séquence permit de quantifier les pourcentages de gamétocytes exprimant constitutivement la protéine fluorescente verte (*Green fluorescent protein, GFP*) et disséminés au sein d'une monocouche d'érythrocytes dont les membranes sont marquées avec un marqueur fluorescent, le *CellMask Orange* (FigR4-A).

Des échantillons à gamétocytémies décroissantes de 10 à 1% furent analysés avec la méthode HCS développée et par hémocytométrie (méthode de référence) en parallèle. La comparaison des résultats par régression linéaire résultat en un coefficient de corrélation supérieur à 0.95, démontrant une excellente sensibilité et représentativité. Une cinétique d'acquisition en microscopie confocale a été réalisée sur cultures de gamétocytes exposées ou non (DMSO 0.4%) à la forskoline 150µM ou au citrate de sildénafil 100µM (composés à action rigidifiante communiquée par le Dr. Catherine Lavazec) afin de délimiter une fenêtre de temps de lecture au sein de laquelle la quantification des taux de rétention peut être réalisée automatiquement (Fig R4-B).

Les nombres de gamétocytes allongés (phénotype morphologique viable), arrondis (phénotype morphologique non viable ou viable activés donc engagés sur la gamétogénèse) demeurèrent stables sur 24 heures.

En résumé : la microscopie confocale à haut débit et haute résolution s'avère ainsi totalement compatible avec une approche de criblage par microsphiltration.



FigR4 : Couplage de la microsphiltration à la microscopie confocale à haut débit et haute résolution. *A/ Les échantillons microsphiltrés sédimentent dans les puits des microplaques d'imagerie, générant une monocouche d'érythrocytes abritant des gamétocytes à partir de laquelle les acquisitions microscopiques en fluorescence sont réalisées à l'objectif x20 à immersion H2O. Les gamétocytes expriment de façon stable la GFP sous le contrôle de la séquence promotrice du gène Pfs16. Un marquage au CellMask Orange permet l'identification des membranes érythrocytaires. B/ Linéarité des gamétocytémies mesurées en parallèle par microscopie confocale en fluorescence HCS et par hémocytométrie, résultant en un facteur de corrélation R2 supérieur à 0.98. C/ Stabilité des nombres d'éléments fluorescents détectés par imagerie confocale à fluorescence sur une période de 24 heures,*

après une exposition de 2H au citrate de sildénafil 100µM ou à la forskoline 150µM, 0.4% DMSO.

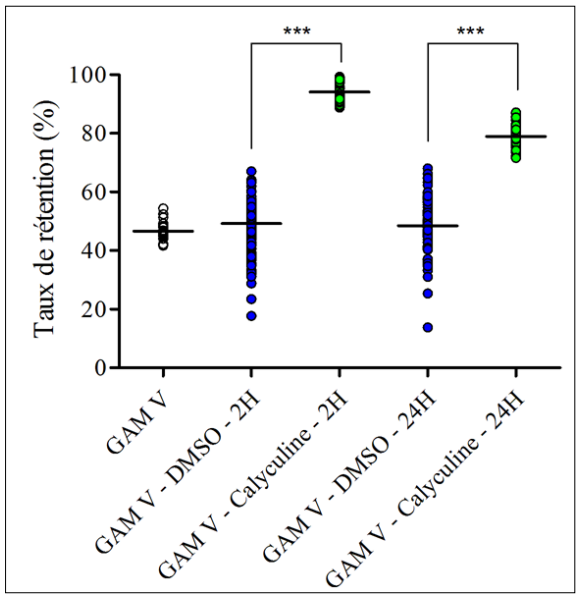
4. Définition d'une fenêtre de criblage.

L'un des objectifs de l'équipe du Dr. Catherine Lavazec (en collaboration avec notre équipe) a été d'identifier et valider une ou plusieurs voies de signalisation modulant la déformabilité des gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum* via une approche moléculaire et/ou pharmacologique. Les résultats de cette équipe ont révélé le rôle majeur joué par la voie de signalisation dépendante de l'AMPc dans le processus de dé-rigidification subit par le gamétocyte atteignant maturité [3]. La calyculine A, connue pour inhiber l'activité de Phosphoprotéines Ser/Thr Phosphatases de type 1 du parasite *Plasmodium falciparum*, bloque la déphosphorylation des substrats de la protéine kinase A (PKA) et induit la rigidification des gamétocytes matures. Ce composé nous a été proposé comme potentiel contrôle positif pour le criblage.

Des gamétocytes matures (stade V) ont été exposés avec la calyculine (50nM) puis microsphiltrés (FigR5). Un accroissement significatif de +44.93% ($p < 0.0001$) et +30.53% ($p < 0.0001$) en rétention a été mesuré suite à une exposition de 2 et 24 heures, respectivement, avec ce composé. L'activité pharmacologique rigidifiante exercée par la calyculine (50nM) sur les gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum* apparait ainsi réversible. Des expériences supplémentaires ont révélé que cette activité rigidifiante s'opère à des concentrations non létales pour les gamétocytes (Duez & Holleran et *al.* 2015 AAC).

Par ailleurs, les rétentions contrôles (DMSO 0.4%) correspondantes (2H : 49.18 ± 7.06% et 24H : 48.43 ± 9.16%) se sont alignées sur celle des gamétocytes non traités (PBS : 46.59 ± 3.23%). Ce résultat est en parfait accord avec de précédents résultats propres au laboratoire d'accueil démontrant une innocuité de la concentration en DMSO utilisée pour cette étude.

En résumé : la calyculine A accroît significativement la rigidité des gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum* et peut être utilisée comme contrôle positif pour un criblage par microsphiltration.



FigR5 : Rétention des gamétocytes matures microsphiltrés suite à une exposition de 2 ou 24 heures avec la calyculine A, 50nM, 0.4% DMSO final. *Ce composé induit une augmentation significative de la rétention. Les taux de rétention plus faibles à 24 heures suggèrent une activité pharmacologique réversible (N=3, n=32).*

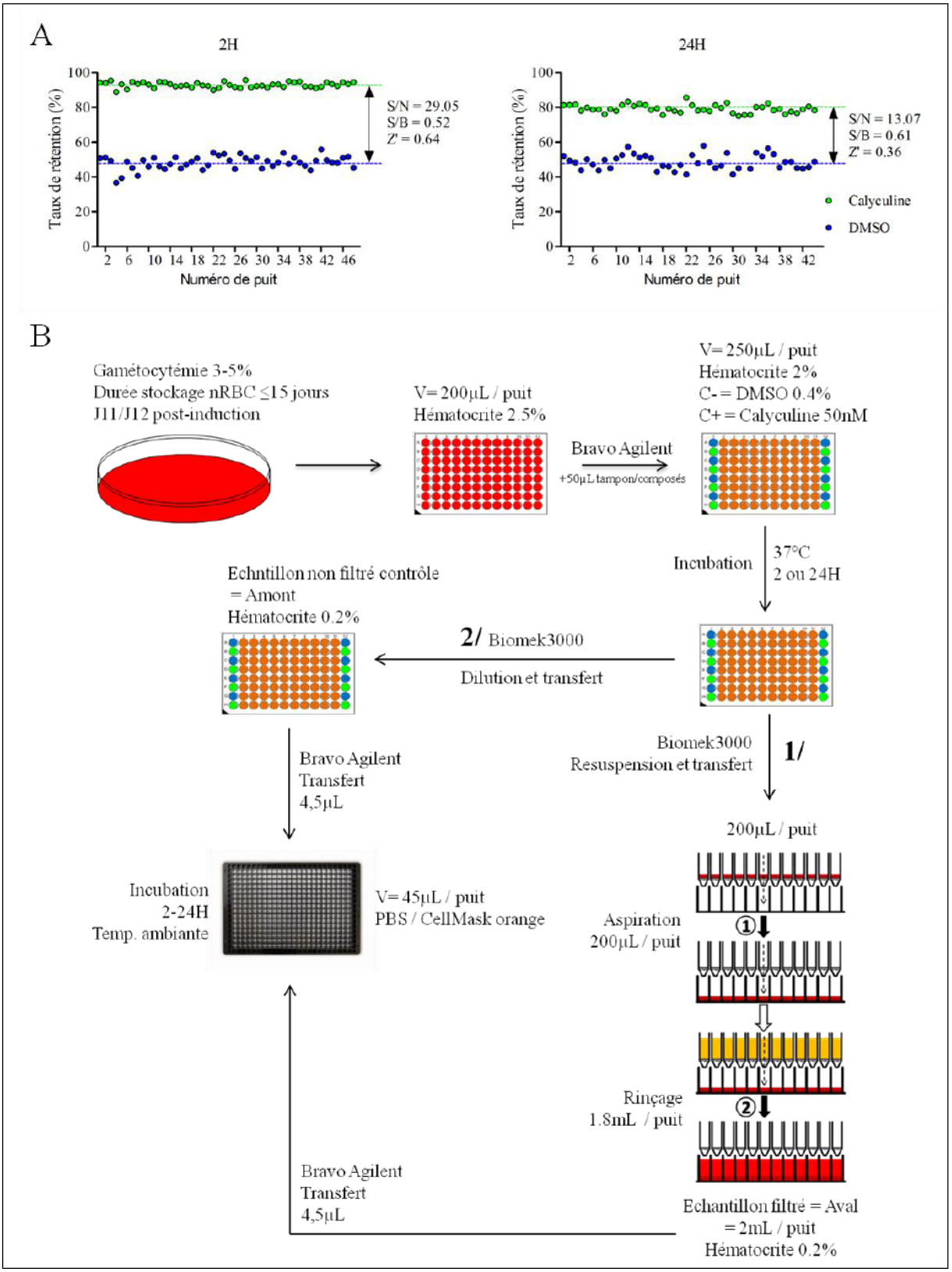
5. Optimisation et validation d'une séquence technique de criblage par microsphiltration.

Les paramètres statistiques classiques de caractérisation d'une méthode de criblage ont été calculés suite à la microsphiltration parallèle, sur 3 microplaques entières, de gamétocytes matures exposées ou non (DMSO 0.4%) avec la calyculine (50nM) durant 2 et 24 heures (FigR6-A). Un différentiel de rétention [Δcalyculine-DMSO] de 44.71% et 30.62% a été mesuré à 2 et 24 heures, confirmant les résultats obtenus durant la phase de développement initiale (FigR5). Une excellente répétitivité (Coeff. Variation/ 2H – DMSO : 7.87% et

calyculine : 1.66% ; 24H : DMSO : 8.64% et calyculine : 2.86%) s'est traduite par des valeurs de facteur Z' égales à 0.64 et 0.36 à 2 et 24 heures d'exposition, respectivement. Dans ces conditions, la contamination inter-puits mesurée a été minime (0.15%), aucun effet de position n'a été observé et un ratio *signal/background* inférieur à 0.7 a été calculé (2H : 0.52 et 24H : 0.61).

La mise en place d'une séquence technique automatisée a été entreprise afin de standardiser et minimiser la variabilité des résultats liée au traitement manuel des échantillons à microsphiltrer. Plusieurs automates ont été utilisés afin d'opérer l'exposition des gamétocytes avec de petites molécules en microplaques de culture, leur resuspension et transfert en microplaques à microsphiltration, suivi de l'ajustement de l'hématocrite de travail et le transfert des gamétocytes exposés en microplaques d'imagerie (FigR6-B).

Plusieurs optimisations ont été portées progressivement à cette chaîne de traitement automatisée permettant l'exécution théorique d'une séquence de criblage sur 4 à 6 microplaques en 48 heures, correspondant au test de 640 à 960 points par un opérateur autonome en une semaine ouvrable.



FigR6 : Définition d'une fenêtre de criblage et développement d'une séquence technique automatisée pour la réalisation d'une campagne de criblage par microsphiltration. *A/*

Etude de la répétitivité des mesures et calcul des indicateurs statistiques de criblage suite à la microsphiltration de gamétocytes exposés ou non (DMSO 0.4%) à la calyculine A durant 2 ou 24 heures (N=3, n=48). B/ Séquence expérimentale automatisée : des gamétocytes intra-érythrocytaires dilués à 5% dans des érythrocytes non parasités sont resuspendus à un hématocrite 2.5% et déposés par volume de 200µL/puits dans des microplaques 96 puits. Des composés concentrés 5x dans du tampon sont ensuite ajoutés avec un automate de pipetage Bravo Agilent, 50µL/puits (Concentrations finales : DMSO = 0.4%, composé = 1x, hématocrite = 2%). Après incubation à 37°C en incubateur durant 2 ou 24 heures, un automate de pipetage Beckman 3000 resuspend les gamétocytes exposés avec les composés, puis en transfère 200µL en microplaque à microsphiltration (1/). Les échantillons sont filtrés (échantillons « aval »). Une seconde étape d'aspiration permet le lavage des microsphères ce qui résulte en une dilution de l'échantillon à un hématocrite final de 0.2%. Ce même automate permet d'ajuster en parallèle l'hématocrite des échantillons non filtrés (échantillon « amont ») au même hématocrite, puis un transfert de tous les échantillons (amont non filtré et aval filtré) en microplaque d'imagerie 384 puis, 4.5µL/puits) (2/). Un volume de 45µL de tampon phosphate contenant du CellMask Orange 1 : 15,000 est préalablement déposé dans les puits de ces plaques d'imagerie. Après sédimentation durant la nuit à température ambiante, une monocouche cellulaire homogène est formée : les acquisitions en microscopie confocale à fluorescence sont réalisées.

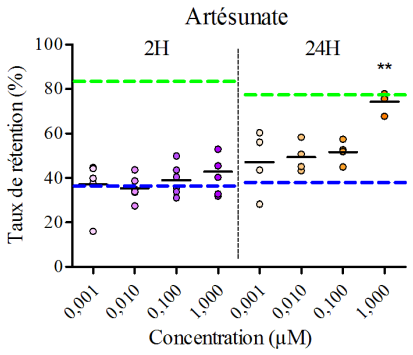
6. Pré-criblage.

Une campagne de pré-criblage a été entreprise, basée sur le test de l'activité de 9 composés antipaludiques de référence, plus un composé contrôle (zaprinast) sur 2 durées d'exposition et 4 concentrations en sextuplicata (2H) ou quadruplicata (24H) (FigR7). Les gammes de concentrations testées ont été définies en considérant l'activité gamétocytocide *in vitro* de

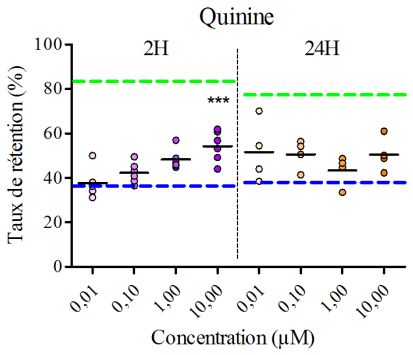
chacun des composés (IC50 à 72 heures [4]) ainsi que leur profil pharmacocinétique révélé par les études cliniques sur patients impaludés (*Cmax* et *Tmax*) [5-12].

Les valeurs contrôles mesurées ont délimité une fenêtre de rétention [Δcalyculine-DMSO] égale à 48.12 et 40.56% pour une durée d'exposition de 2 et 24 heures, respectivement (FigR7-C). Une exposition des gamétocytes matures avec la Quinine (Q), la Méfloquine (MF), la chloroquine (CQ), la sulfadoxine (S) et le zaprinast (Zap) a résulté en un accroissement significatif de la rétention des gamétocytes matures suite à une exposition de 2 heures aux plus fortes concentrations testées (Q 10µM : p = 0.0005 ; MF 10µM et CQ 50µM : p = 0,0002 ; S 50µM et Zap 130µM : p value = 0,0003). Une exposition avec l'artésunate (Art), la méfloquine (MF), la pyronaridine (Pyr), la pyriméthamine (P), la Primaquine (PQ), la chloroquine (CQ) et le zaprinast (Zap) a provoqué un accroissement significatif (p = 0.0044) de la rétention des gamétocytes matures suite à une exposition de 24 heures aux concentrations maximales testées (Art : 1µM ; MF et Pyr : 10µM ; P, PQ et CQ : 50µM ; Zap : 150µM) (FigR7-A et B). La méfloquine induit donc un accroissement significatif de la rétention des gamétocytes matures dans des conditions *in vitro* proches du physiologique (MF – *Cmax* : 7.3µM et Tmax : 33.6 heures ; rétention à 10µM : 2H = 79.4 ± 4.9% et 24H = 70.5 ± 3.7%).

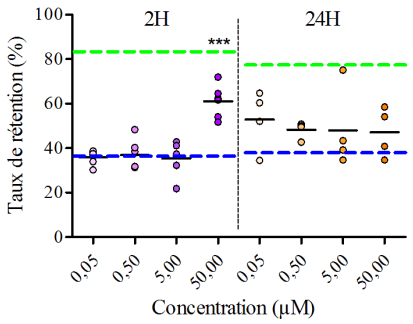
En résumé : l'activité rigidifiante observée en microsphiltration pour la majorité des antipaludiques de référence testés n'apparaît être qu'une conséquence de leur activité gamétocytocide. Les résultats suggèrent d'autre part un double mode d'action rigidifiant-gamétocytocide pour la méfloquine *in vivo*. Finalement, la robustesse et la sensibilité des résultats générés durant ce pré-criblage avec la plateforme de microsphiltration automatisée m'a permit d'avancer sur la réalisation d'un criblage à bas débit au format 96 puits.



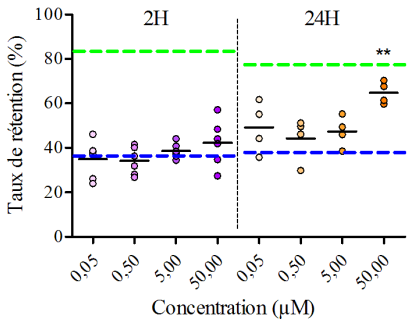
Saunders et *al*. 2012: *Cmax* = 0.22µM; *Tmax* = 0.48H
Duffy & Avery 2013: *IC50* = 2.53 ± 1.10nM (72H)



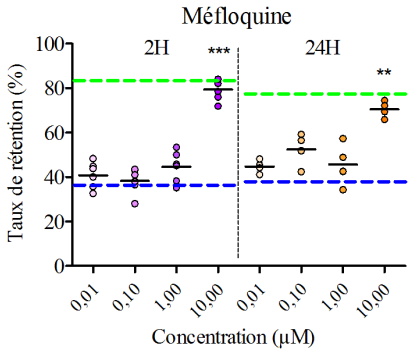
Pukrittayakamee et *al*. 2003: *Cmax* = 35.23µM; *Tmax* = 1.5H
Duffy & Avery 2013: *IC50* = 318 ± 180nM (72H)



Barnes et *al*. 1980: *Cmax* = 0.2µM; *Tmax* = 187.2H
Duffy & Avery 2013: *IC50* = non gamétocide à 40µM (72H)

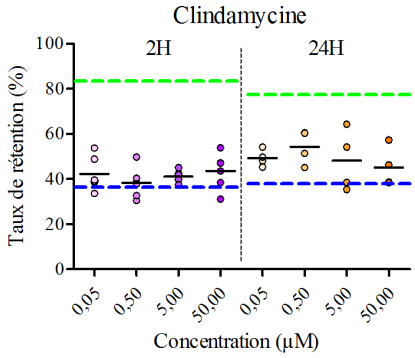


Barnes et *al*. 1980: *Cmax* = 1.12µM; *Tmax* = 78.48H
Duffy & Avery 2013: *IC50* = non gamétocide à 40µM (72H)

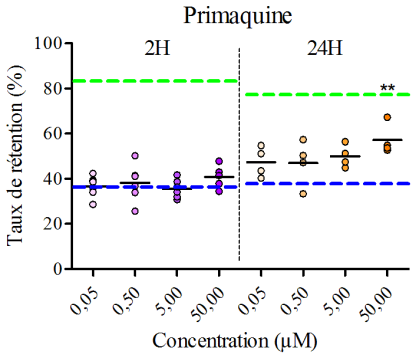


Boudreau et *al*. 1990: *Cmax* = 7.3µM; *Tmax* = 33.6H
Duffy & Avery 2013: *IC50* = 100 ± 3.6nM (72H)

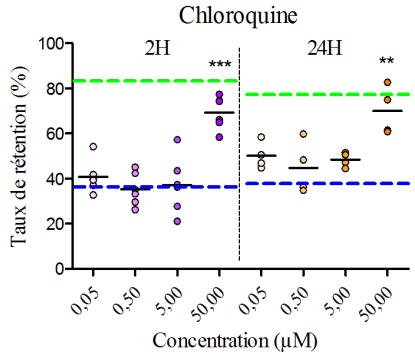
FigR7-A : Rétention de gamétocytes matures suite à leur exposition à 9 antipaludiques de référence + 1 composé contrôle (zaprinast) en concentrations croissantes durant 2 et 24 heures au cours d'une campagne de pré-criblage. *(DMSO 0.4%, 24H : N=2, n=4, 2H : N=3, n=6)*



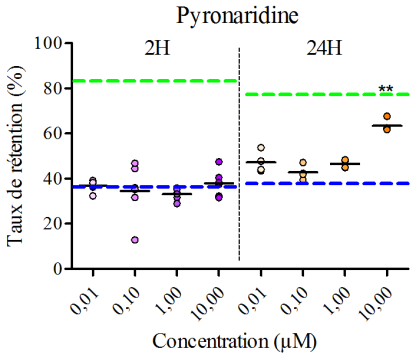
Mazur et *al*. 1980: *Cmax* = 0.80µM; *Tmax* = 0.83H
Duffy & Avery 2013: *IC50* = non gamétocide à 40µM (72H)



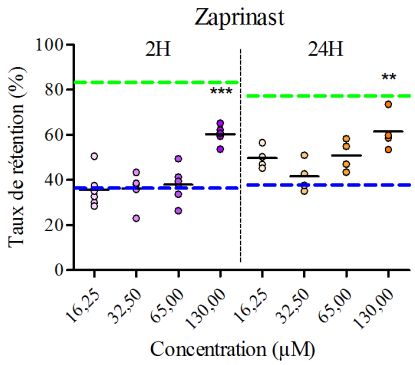
Edwards et *al*. 1993: *Cmax* = 0.89µM; *Tmax* = 4H
Duffy & Avery 2013: *IC50* = 74% inhibition à 40µM (72H)



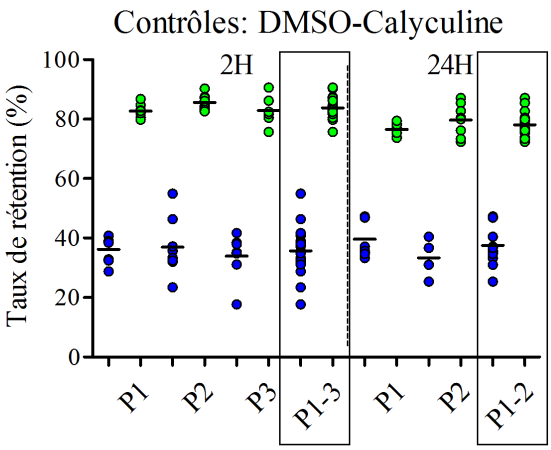
Dua et *al*. 2002: *Cmax* = 1.42µM; *Tmax* = 4H
Duffy & Avery 2013: *IC50* = 45% inhibition à 40µM (72H)



***Methaneethorn et al*. 2013:** *Cmax* = 0.73µM; *Tmax* = 1.42H
Duffy & Avery 2013: *IC50* = 4260 ± 240nM (72H)



FigR7-B : Rétention de gamétocytes matures suite à leur exposition à 9 antipaludiques de référence + 1 composé contrôle (zaprinast) en concentrations croissantes durant 2 et 24 heures au cours d'une campagne de pré-criblage. *(DMSO 0.4%, 24H : N=2, n=4, 2H : N=3, n=6)*



	2H				24H		
	P1	P2	P3	**P1-3**	P1	P2	**P1-2**
Z'	0,58	0,25	0,24	**0,34**	0,32	0,22	**0,18**
S/N	20,99	18,96	9,61	**13,88**	17,55	8,59	**9,49**
S/B	0,44	0,43	0,41	**0,43**	0,52	0,42	**0,48**

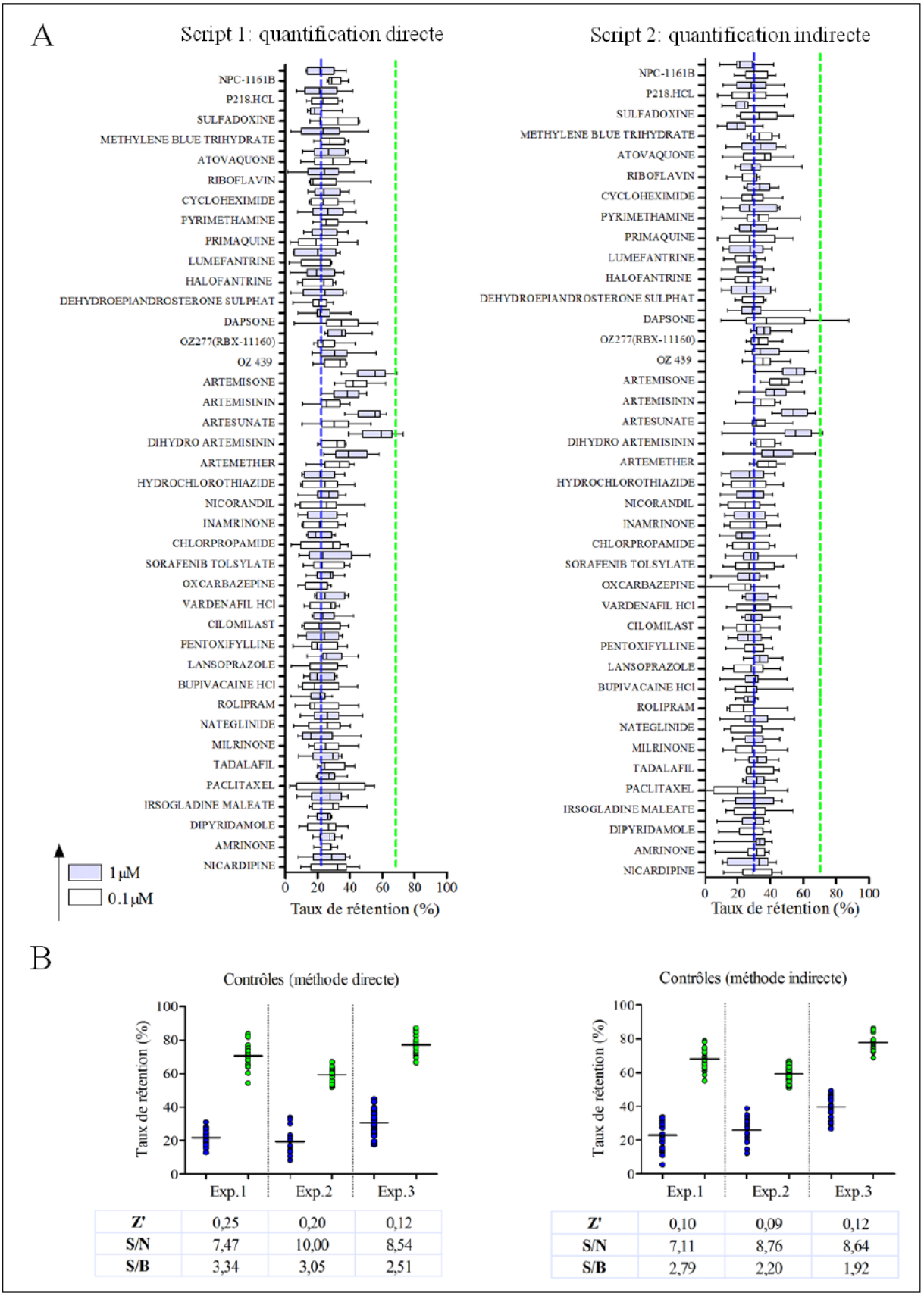
FigR7-C : Rétentions contrôles associées au pré-criblage (2 et 24H) et paramètres statistiques associés. *(N=1, n=8 ; P = microplaque)*

7. Criblage à bas débit par microsphiltration au format 96 puits.

Le criblage pharmacologique de 40 composés sélectionnés à partir de 2 chimiothèques distinctes a ensuite été entrepris (Duez & Holleran et *al*. AAC 2015). Les 20 premiers composés testés sont des antipaludiques de référence issus de la *malaria box* [13], une mini-chimiothèque focalisée comprenant 400 composés en accès libre, à profils *drug-like* et *probe-like,* sélectionnés à partir de ~20 000 molécules actives contre les stades asexués de *Plasmodium falciparum* et révélés par GlaxoSmithKline (GSK), Novartis et *St. Jude Children's Research Hospital*. Les 20 autres composés testés ont été sélectionnés sur la base d'un mécanisme d'action pouvant potentiellement interférer avec la déformabilité gamétocytaire. Ils sont issus d'une petite chimiothèque de repositionnement regroupant des composés approuvés par la *Food Drug Administration* (*FDA*) ou ayant suivi une phase de développement clinique avancée.

L'activité de ces 40 agents pharmacologiques a été évaluée sur une période d'exposition de 24 heures à une concentration de 0.1 et 1µM (0.4% DMSO final), en triplicata sur 3 expériences indépendantes (FigR8). Un différentiel de rétention [Δcalyculine-DMSO] égal à 48.75, 39.87 et 46.43% a été mesuré au cours des 3 expériences indépendantes successives. Ce résultat s'est associé à un facteur Z' égal à 0.25, 0.20 et 0.12. Parmi l'ensemble des composés testés, seule la classe des endopéroxides a induit un accroissement significatif de la rétention (Duez & Holleran et *al*. AAC 2015). La quantification indirecte des taux de rétention, à l'aide d'une séquence de traitement des images annexe utilisée comme contrôle-qualité, a aboutit à des résultats similaires, confirmant les résultats générés sous ce format expérimental.

En résumé : la plateforme de criblage par microsphiltration automatisée a permis de tester l'activité rigidifiante d'un panel de composés en parallèle.



Z'	0,25	0,20	0,12
S/N	7,47	10,00	8,54
S/B	3,34	3,05	2,51

Z'	0,10	0,09	0,12
S/N	7,11	8,76	8,64
S/B	2,79	2,20	1,92

FigR8 : Activité rigidifiante de 40 composés pharmacologiques évaluée par microsphiltration au format microplaque 96-puits. *A/Rétention (%) de gamétocytes matures exposés à une concentration de 0.1 et 1µM (0.4% DMSO final) durant 24 heures, mesurée par microscopie confocale à haut débit et haute résolution (Opéra Perkin Elmer) par méthode directe (volet gauche) ou indirecte (volet droit, contrôle-qualité). B/Taux de rétention pour les contrôles négatifs (DMSO0.4% : bleu) et positif (calyculine A, 50nM : vert) et paramètres statistiques associés.*

II. Gamétocytogénèse *in vitro* : appropriation et optimisation de méthodes de rendements compatibles avec une campagne de criblage.

La production à grande échelle de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* a probablement été le plus gros challenge que j'ai rencontré durant l'exécution de ce projet de criblage. La méconnaissance des déterminants moléculaires spécifiques responsables de l'engagement des parasites sur une différenciation sexuée, le temps de maturation gamétocytaire (≈2 semaines *in vitro*), le faible taux de conversion gamétocytaire résultant des méthodes disponibles (≤ 20%) et le suivi chronophage, instinctif et délicat des cultures sont les principales raisons expliquant pourquoi, à ce jour, un faible nombre de campagnes de criblage a été reporté dans le champs.

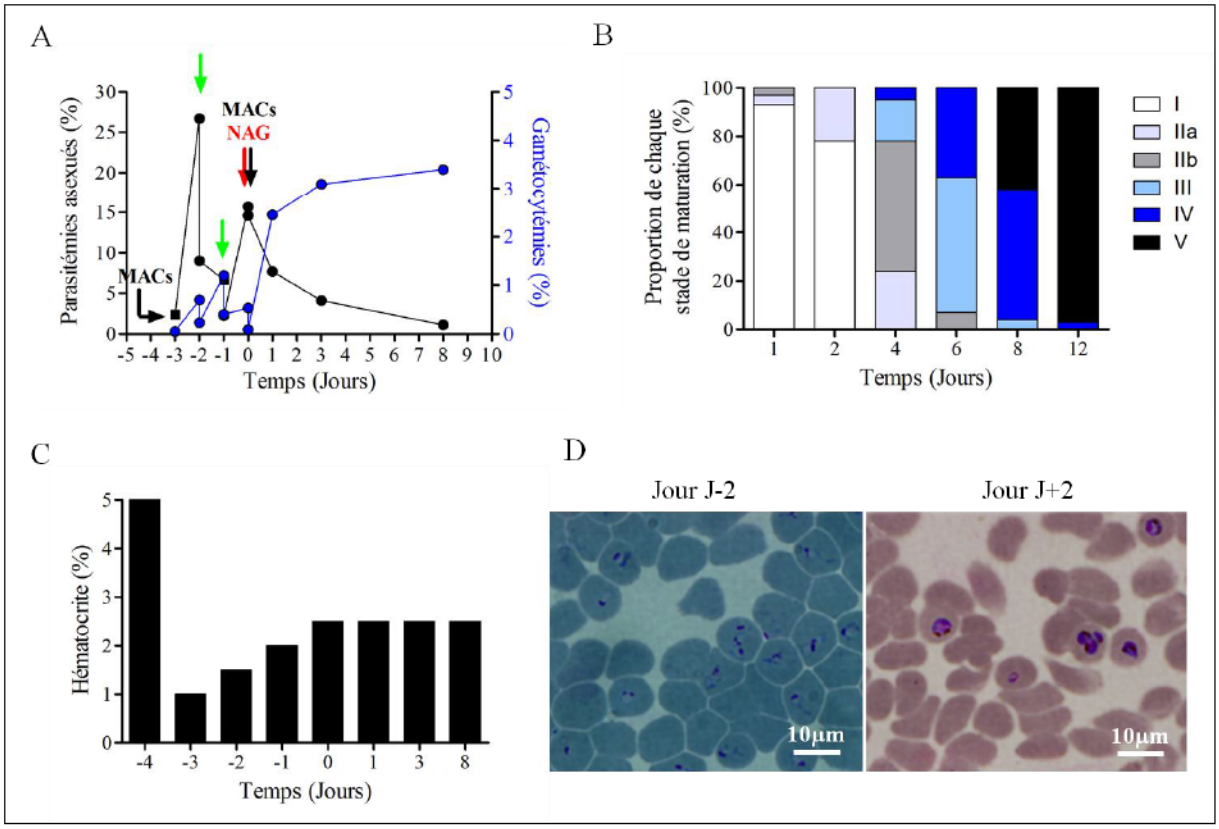
1. Induction de la gamétocytogénèse sur la plateforme australienne.

Le savoir-faire de mon équipe d'accueil australienne a été d'importance considérable, le groupe Malaria ayant récemment optimisé une méthode d'induction de la gamétocytogénèse *in vitro* préalablement publiée par Fivelman et *al*. en 2007 [14, 4]. Le protocole initial communiqué par Fivelman QL. décrit un engagement des parasites asexués sur une différenciation sexuée (gamétocytaire) suite à l'induction d'un stress oxydatif par

privation nutritive. Ce stress oxydatif/métabolique, se traduisant visuellement par une couleur jaune orangée des milieux de culture (pH acide), repose sur un contrôle précis des paramètres de culture que sont la formulation des milieux utilisés, l'hématocrite et la parasitémie asexuée. Le stress par privation nutritive est notamment amplifié par un changement incomplet du milieu de culture le jour de l'induction. Une fois que le processus de gamétogénèse est induit *in vitro*, les cultures sont finalement traitées avec la N-acétyl-D-glucosamine afin d'éliminer les formes asexuées des cultures.

Plusieurs optimisations ont été portées à cette méthode afin de standardiser et maximiser le rendement et la qualité des cultures de gamétocytes produites [14].

Les rendements de cette méthode obtenus sur 7 inductions indépendantes réalisées en autonome sont décrits dans le tableau R1. Un taux de conversion général de 8-16% a été atteint. Une gamétocytémie moyenne de 3.02 ± 0.68% a été quantifiée au terme du protocole d'induction, représentant $2.27 \times 10^8 \pm 5.47 \times 10^4$ gamétocytes par mL de culot érythrocytaire brut (100%) cultivé. Avec un volume de culot de 10 à 20mL par induction, cette méthode m'a donc permis de récolter (après isolement par séparation magnétique, MACs) entre 8.22×10^8 et 1.64×10^9 gamétocytes. Cet effectif a permit une microsphiltration sur 4 à 8 microplaques 96 puits (= de 384 à 768 points). Pour un coût approximatif de 147,71€ par mL de culot érythrocytaire brut cultivé, des cultures comprenant ≥95% de gamétocytes stade V matures synchrones sur une fenêtre de 48 heures ont été utilisables aux jours J10→J14 post-induction (FigR9-B et D).



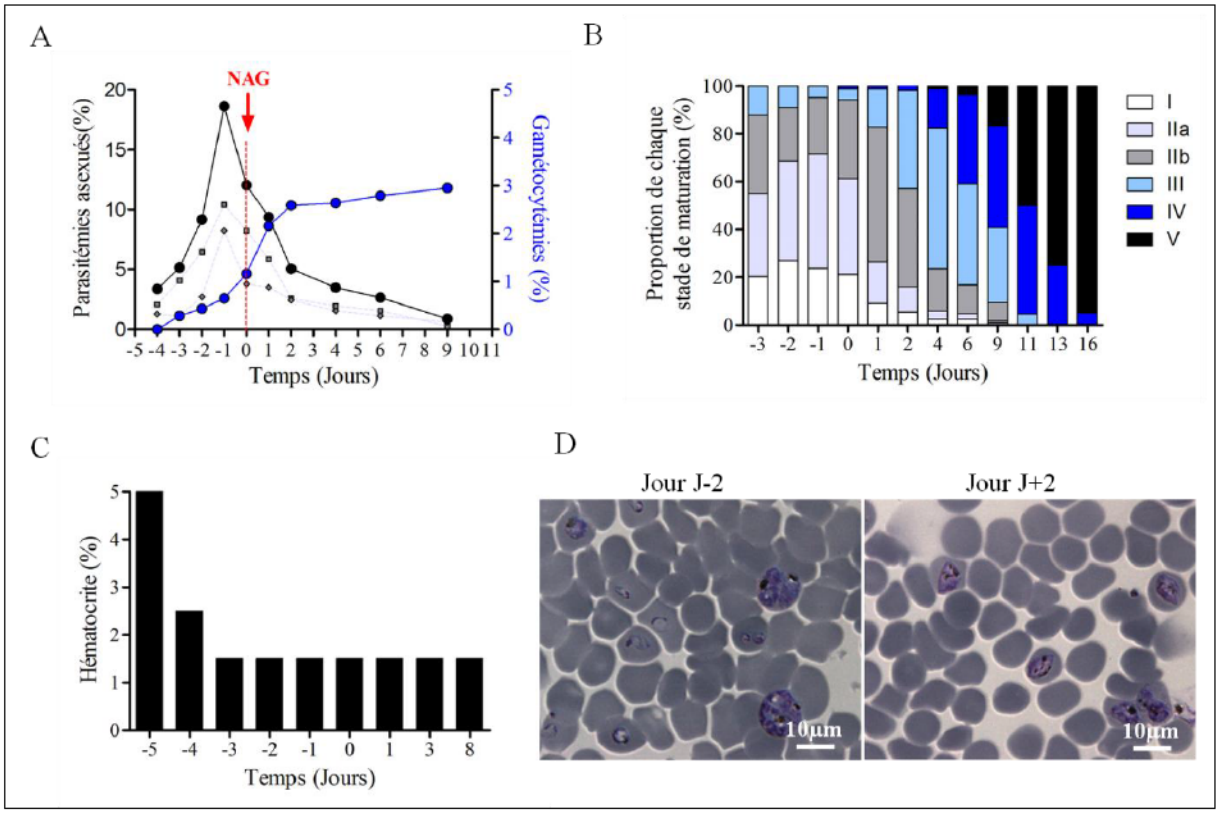
FigR9 : Suivi d'une induction gamétocytaire exécutée selon le protocole de mon équipe d'accueil australienne (Duffy & Avery et *al.*). *La synchronisation fine des stades asexués de la souche NF54 Pfs16-GFP-Luciférase par la technique du sorbitol et la séparation magnétique (MACs) permet l'application d'un stress nutritif ponctuel sur formes annulaires à haute parasitémie (A et D : jour -2) et à hématocrite fixé en défaut (C), sur 2 cycles de réinvasion subséquents (dilution des parasites : flèches vertes). Suite à l'exclusion des gamétocytes spontanés par séparation magnétique au jour 0 (MACs) et au traitement des cultures avec la N-acétyl-D-glucosamine (NAG) (A), des cultures érythrocytaires infectées exclusivement par des gamétocytes synchrones sur 48 heures (B et D : jour +2) deviennent utilisables pour un criblage par microsphiltration entre les jours J10 et J14.*

2. Expatriation et adaptation d'une méthode de production de gamétocytes en France.

L'optimisation d'une méthode de production de gamétocytes *in vitro* au sein de mon équipe d'accueil française s'est effectuée en utilisant un clone de la souche NF54 transmis par le Dr. Catherine Lavazec. Avec cette souche, la reproduction du protocole australien s'est avérée problématique en raison d'une plus grande sensibilité des parasites asexués à l'action stringente du sorbitol (utilisé pour la synchronisation des cultures) et d'une incompatibilité du matériel disponible dans le laboratoire d'accueil français. Le protocole australien a donc été simplifié. L'étape de synchronisation et la séparation magnétique au jour J0 (permettant l'exclusion des gamétocytes spontanés) ont été exclues du protocole.

La méthode résultante consiste en l'entretien journalier d'une culture asexuée asynchrone (FigR10-D : Jour J-2) jusqu'à l'obtention de parasitémies comprises entre 15 et 25% (FigR10-A). Une réduction progressive contrôlée de l'hématocrite de travail (FigR10-C) jusqu'à une valeur limite de 1-1.5% au pic parasitémique (jour J-1) se traduit par une privation nutritive d'intensité contrôlée et compatible avec un taux de conversion gamétocytaire compris entre 10 et 15%. Les rendements de cette méthode calculés à partir de 6 inductions indépendantes sont précisés dans le tableau R1. Une gamétocytémie moyenne de 2.74 ± 0.40% a été mesurée (FigR10-D : Jour J+2), ce qui représente $2.05 \times 10^8 \pm 3.16 \times 10^4$ gamétocytes par mL de culot érythrocytaire brut cultivé. En partant d'un volume de culot initial de 10 à 20mL, entre 7.44×10^8 et 1.49×10^9 gamétocytes sont récupérables après isolement magnétique par colonne MACs, permettant une microsphiltration sur 3 à 6 microplaques 96 puits (= de 288 à 576 points). Pour un coût approximatif de 129.04€ par mL de culot érythrocyte brut cultivé, des gamétocytes stade V matures à ≥95% synchrones sur une fenêtre de 96 heures (FigR10-B) sont ainsi utilisables entre les jours J16 et J18 post-induction.

En résumé : L'ensemble de ces résultats souligne l'apprentissage réussi d'une méthode de production standardisée de gamétocytes *in vitro* dans des volumes compatibles avec une étude R&D par microsphiltration. Cette méthode apparait modulable pour adaptation au contexte biotechnologique de laboratoires d'accueil différents.



FigR10 : Suivi d'une induction gamétocytaire réalisée au sein de mon équipe d'accueil française. A/*Une culture asexuée asynchrone (Formes annulaires : carrés gris ; formes matures pigmentées = T/S : losanges gris ; Total asexués : ronds noirs) est amplifiée jusqu'à l'obtention d'une parasitémie entre 15-25%. En parallèle, l'ajustement de l'hématocrite (C) permet d'induire un stress nutritif d'intensité et de durée contrôlées, responsable de l'engagement progressif sur 96 heures des parasites sur une voix de différenciation sexuée (B). Au terme de cette période de stress, un traitement des cultures avec la N-acétyl-D-glucosamine (NAG) permet l'élimination des stades asexués. Des gamétocytes matures*

synchrones sont exploitables pour étude en microsphiltration entre les jours 16 et 18 post-induction.

	Duffy & Avey et *al.*	**Duez & *al.***
n inductions	7	6
% Gamétocytes Jour 10	3.02 ± 0.68%	2.74 ± 0.40%
n Gamétocytes / mL de culot érythrocytaire	$2.27 \times 10^8 \pm 5.47 \times 10^4$	$2.05 \times 10^8 \pm 3.16 \times 10^4$
Synchronicité	24-48 heures	72-96 heures
Prix du mL de culot érythrocytaire brut contenant des Gamétocytes	141.71€	129.04€
n Gamétocytes après isolement (MACs) / mL de culot érythrocytaire	9.86×10^7	8.93×10^7
95% Gamétocytes matures stade V	Jour 10-14	Jour 15-18

Tableau R1 : Rendement des 2 méthodes d'induction de la gamétocytogénèse appliquées durant ma thèse au sein de mes équipes d'accueil australienne (Dufy & Avey et *al.*) et française (Duez et *al.*).

III. Développement et validation d'une plateforme de microsphiltration multi-formats.

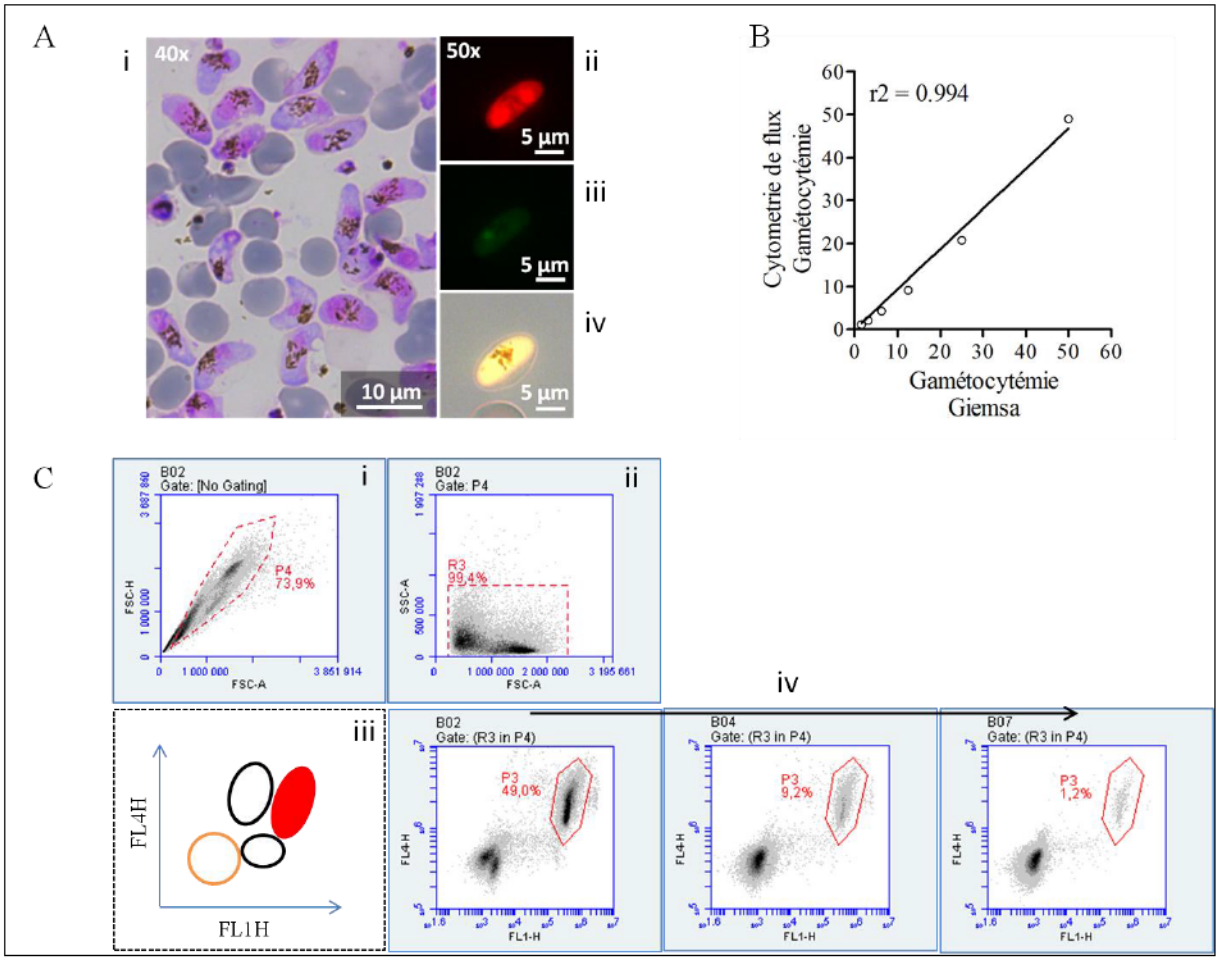
De retour d'Australie, le développement d'une plateforme de microsphiltration parisienne est apparue nécessaire afin d'assurer une continuité du projet de criblage et le développement d'axes de recherches transversaux.

1. Quantification automatisée des taux de rétention par cytométrie en flux.

Une méthode de double marquage en fluorescence des gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum* a été optimisée pour la quantification automatisée de leur rétention après microsphiltration. Celle-ci repose sur le marquage parallèle, sans fixation préalable, de l'ADN double brun parasitaire avec le *Sybr green I*, couplé au marquage potentiel-dépendant de la membrane mitochondriale avec le Mitotracker CMXRos (FigR11-A) [4]. Le Mitotracker CMXRos est un marqueur à propriété fluorescente intrinsèque capable de lier de façon covalente les membranes mitochondriales polarisées. Ce marqueur a donc l'avantage de permettre l'étude d'un paramètre de viabilité à un temps T, indépendamment du moment de l'analyse. Suite au double marquage Sybr green I-Mitotracker CMXRos, il devient alors possible de discriminer au sein même d'une population érythrocytaire les gamétocytes viables des gamétocytes dégénérés ou des débris cellulaires connus pour biaiser la précision et la pertinence des mesures (FigR11-A et C).

Des échantillons de culture à gamétocytémies décroissantes de ~50 à ~1% ont été analysées avec cette méthode, avec pour comparatif parallèle une quantification visuelle microscopique sur frottis colorés au bleu de Giemsa (méthode de référence). La comparaison des résultats par régression linéaire a mis en évidence en un facteur de corrélation égal à 0.994 (FigR11-B).

En résumé : La microsphiltration de gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum* apparait compatible avec une analyse automatisée des taux de rétention par cytométrie en flux.



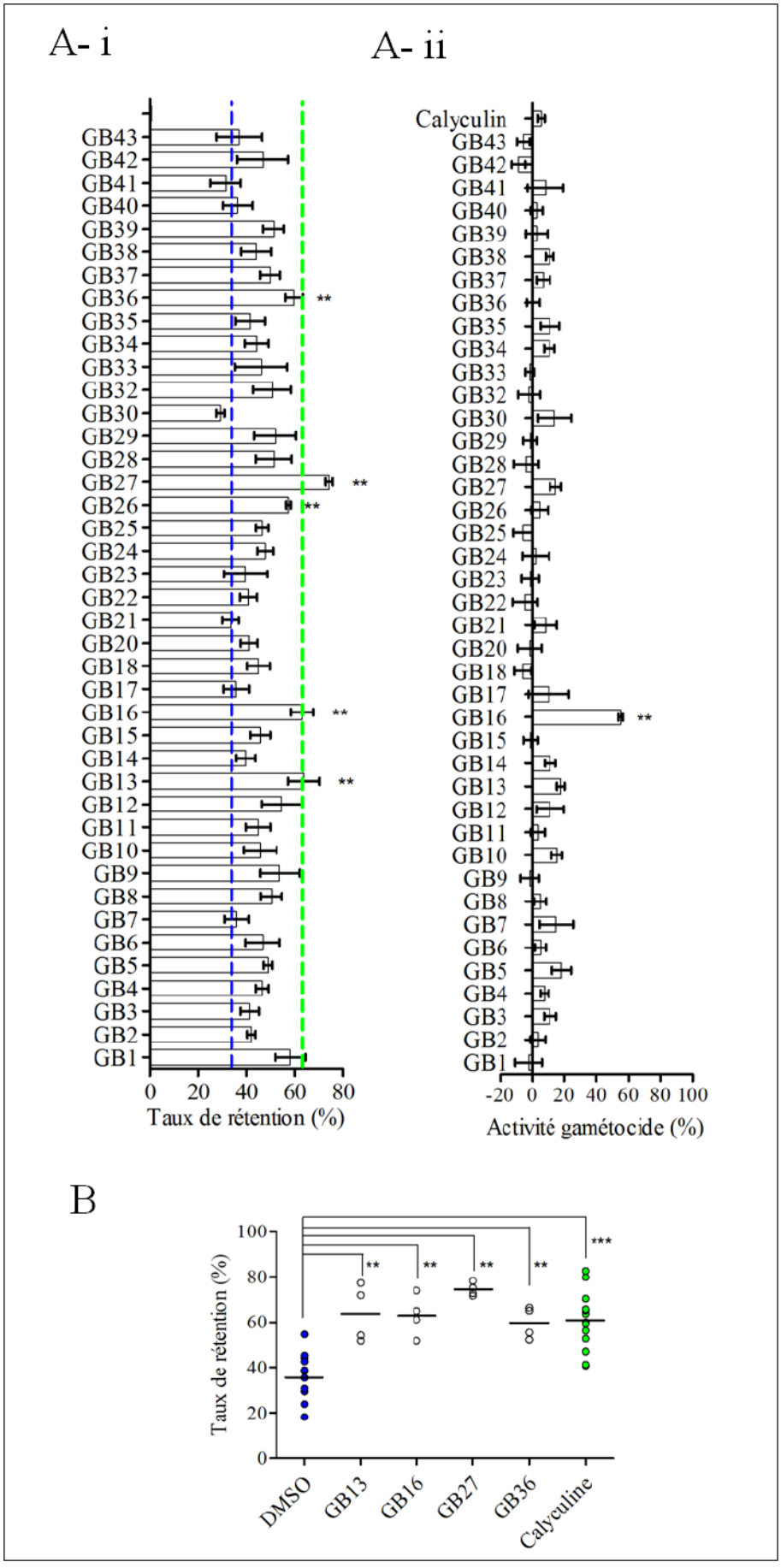
FigR11 : Double marquage fluorescent des gamétocytes matures pour quantification automatisée en cytométrie de flux compatible 96-puits (ACCURI C6 avec bras robotique). *A/Double marquage fluorescent (30 minutes) des gamétocytes matures (A-i) avec le Sybr Green I, 1x (A-iii) et le Mitotracker deep Red CMXRos, 500nM (A-ii). B/Validation de la sensibilité d'analyse par comparaison à la microscopie (méthode de référence) pour des gamétocytémies décroissante de 50 à 1%. C/Séquence d'analyse en cytométrie de flux basée sur l'exclusion des débris (C-i) et des agglomérats cellulaires (C-i et ii) pour la discrimination fine des gamétocytes viables (C-iii : cercle rouge, marquage Sybr+/mitotracker+ et C-iv) des gamétocytes dégénérés, des débris nucléotidiques (C-iii : cercles noirs, marquage Sybr+/mitotracker-) et des érythrocytes non parasités (C-iii : cercle orange). Acquisitions réalisées sur 30 000 évènements.*

2. Criblage de la *Gambox* : adaptation aux souhaits d'un financeur majeur et participation à un réseau de laboratoires académiques.

L'activité rigidifiante de 40 composés a été évaluée en aveugle sur gamétocytes matures par microsphiltration dans le cadre d'un exercice de criblage commun proposé par les représentants de la fondation *Bill & Melinda Gates* aux équipes de recherches financées sur un axe anti-transmission. Ces 40 composés, formant la *gametocyte box*, ont été testés sur gamétocytes matures en duplicata sur une durée d'exposition de 2 heures à une concentration 10µM lors de 2 expériences indépendantes. Les taux de rétention ont été mesurés après double marquage fluorescent par cytométrie en flux, ce qui a permis d'ajouter à l'étude un complément informationnel en viabilité (activité gamétocytocide).

Un différentiel de rétention [Δcalyculine-DMSO] global de 25.53% a été mesuré pour les 2 expériences (FigR12-A). De façon intéressante, l'exposition des gamétocytes matures avec les composés GB13, GB16 et GB27 a résulté en des taux de rétention de 63.76 ± 12.76% (+28.31%, p = 0.0093), 62.98 ± 9.14% (+27.53%, p = 0.0063) et 74.46 ± 2.92% (+39.01%, p = 0.0043), concomitants à une activité gamétocytocide respective de 17.94 ± 4.69, 54.98 ± 2.63 et 14.61 ± 6.90%. Parmi l'ensemble des composés testés, seul GB36 a induit un accroissement significatif en rétention (+24.34%, p = 0.0063) sans affecter les gamétocytémies mesurées (activité gamétocytocide = 0.44 ± 7.74%) (FigR12B).

En résumé : les résultats générés au cours de cette étude désignent le composé GB16 comme le plus puissant agent gamétocytocide à action rapide de la *gametocyte box*. Ils confirment l'importance de considérer le paramètre de viabilité pour l'interprétation des rétentions mesurées en microsphiltration. Par ailleurs cet exercice m'a permit de valider une séquence méthodologique basée sur une analyse en cytométrie de flux et adaptée à une étude pharmacologique par microsphiltration.


A- i
A- ii
GB43
GB42
GB41
GB40
GB39
GB38
GB37
GB36
GB35
GB34
GB33
GB32
GB30
GB29
GB28
GB27
GB26
GB25
GB24
GB23
GB22
GB21
GB20
GB18
GB17
GB16
GB15
GB14
GB13
GB12
GB11
GB10
GB9
GB8
GB7
GB6
GB5
GB4
GB3
GB2
GB1
**
0 20 40 60 80
Taux de rétention (%)
Calyculin
-20 0 20 40 60 80 100
Activité gamétocide (%)
B
Taux de rétention (%)
0 20 40 60 80 100
***
DMSO
GB13
GB16
GB27
GB36
Calyculine

FigR12 : Activités rigidifiante et gamétocytocide de 40 composés (*gametocyte box*) évaluée en aveugle dans mon laboratoire d'accueil parisien. *A/Taux de rétention (volet gauche) de gamétocytes matures exposés durant 2 heures à une concentration 10µM, 0.5% DMSO final, puis microsphiltrés au format 96-puits. Un double marquage en fluorescence Sybr green I, 1x et Mitotracker CMXRos, 500nM durant 30 minutes permet d'évaluer l'impact d'une exposition sur les gamétocytémies, apportant un complément informatif en viabilité (activité gamétocytocide (volet droit). Contrôles = calyculine A, 50nM (positif) et DMSO, 0.5% (négatif). (N=2, n=4) B/Activité rigidifiante des composés GB13, GB16, GB27 et GB36 résultant en un accroissement significatif des taux de rétention mesurés.*

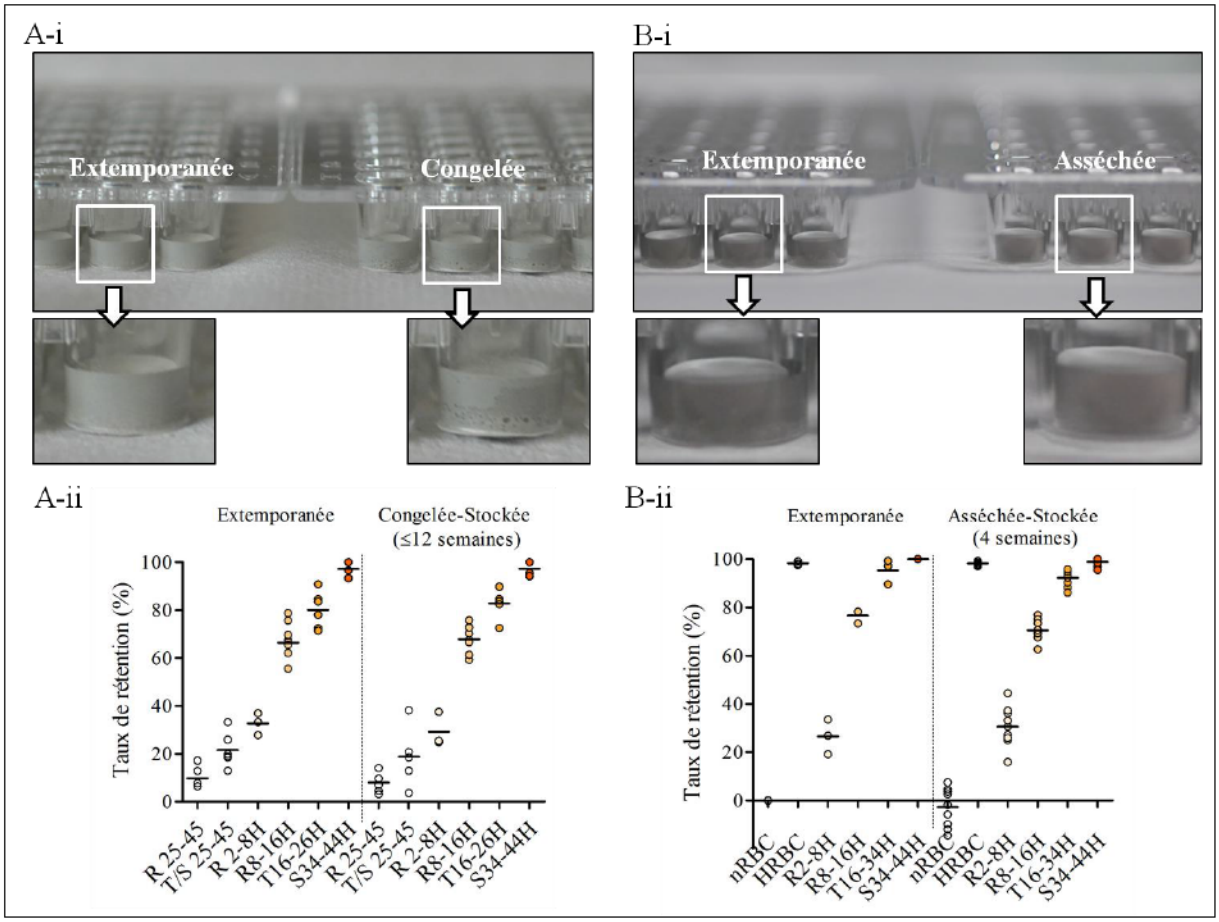
3. Développement d'une méthode de stockage des microplaques à microsphiltration pour transport et utilisation différée.

Un procédé de stockage des microplaques 96 puits à microsphiltration a été développé dans un but pratique initial (débit expérimental important), puis afin de pouvoir permettre des échanges inter-laboratoires futurs dans le cadre de collaborations ou de prestations de services. L'impact d'une cryopréservation (-20°C) des microplaques à microsphiltration sur leurs performances a été évalué suite à une période de stockage égale à ~3 mois. La microsphiltration de formes parasitaires asexuées avec des microplaques contrôles (filtres exclusivement constitués de microsphères 25-45µm) ou « *spleen-like* » (couche 1 : 25-45µm et couche 2 : 5-15µm), cryopréservées ou non, a résulté en des taux de rétention similaires (FigR13-A-ii). Ces données démontrent l'innocuité d'une étape de cryopréservation au court et moyen terme sur les résultats générés à l'aide du prototype. De façon intrigante, l'inspection visuelle de la structure des filtres a mis en évidence la présence de macrocavités au sein de la couche microsphérique basale dite « de support » (microsphères de calibre 25-45µm) (Fig13-A-i).

Le coût, la logistique et le suivi-qualité relatif à un envoie de microplaques à microsphiltration cryopréservées par transporteur spécialisé sont les principales raisons nous ayant amenés à développer un mode de stockage à température ambiante.

Des microplaques à microsphiltration furent exposées à une période d'assèchement de 24 heures à 37°C en compartiment ouvert, ventilé et non stérile. La mesure du poids des microplaques avant et après ce traitement a mis en évidence un différentiel de 6 grammes (ΔP évaporation= 166.5g – 160.5g = 6g), ce qui implique que chaque filtre microsphérique miniature retient par capillarité un volume de 62.5µL de tampon. Les microplaques asséchées ont été conservées durant ~2 mois dans des étuis à film barrière aluminium scellés hermétiquement en présence de sachets déshydratants de silice à volume adapté. La comparaison des taux de rétention mesurés suite à la microsphiltration de populations érythrocytaires, contrôles ou impaludées, avec ces microplaques asséchées-stockées ou des microplaques contrôles (extemporanées) n'a mis en évidence aucune différence (FigR13-B-ii). L'aspect morphologique des filtres microsphériques est apparut totalement intact en visuel (FigR13-B-i). Ainsi, l'assèchement puis le stockage en conditionnement adapté permet la préservation au moyen terme de microplaques à microsphiltration.

En résumé : deux procédés de stockage ont été développés avec succès pour le transport et l'utilisation différée de microplaques à microsphiltration 96 puits.



FigR13 : Validation de 2 méthodes pour le stockage des microplaques à microsphiltration. *A/Une cryopréservation des microplaques jusqu'à 3 mois n'affecte pas leur performances (A-ii) bien qu'une examination visuelle des couches microsphériques met en évidence l'apparition de microcavités (A-i) dans la couche de support 25-45µm (N=9). L'assèchement des microplaques (24 heures, 37°C, compartiment ventilé) n'a pas d'impact sur les taux de rétention mesurés (B-ii) et préserve l'intégrité structurale (B-i) des filtres microsphériques (N=3, n=3).*

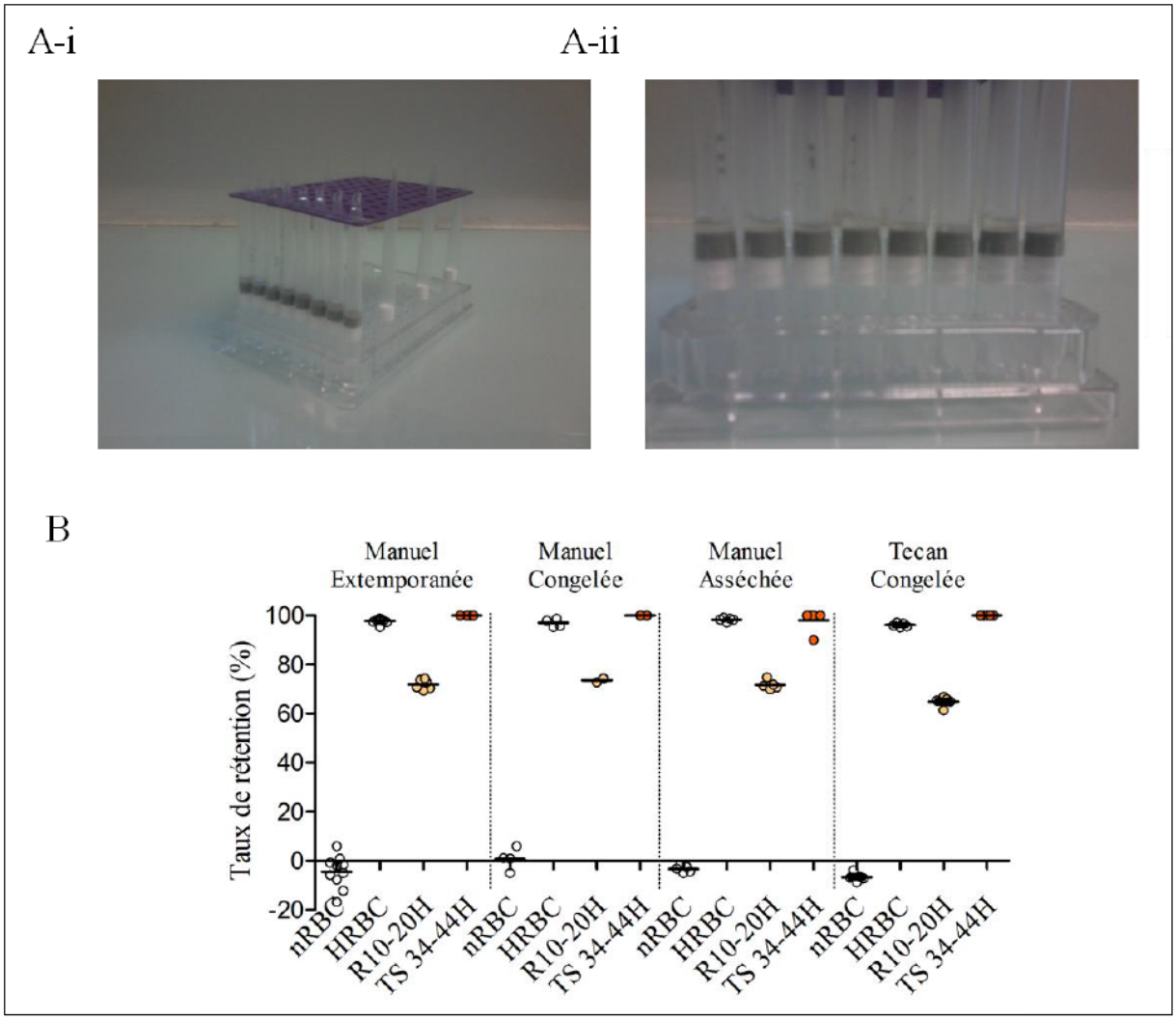
4. Préparation automatisée et stockage de cônes à microsphiltration

Le développement d'une séquence robotique de pipetage pour la préparation standardisée de cônes à microsphiltration a été entreprise afin de pouvoir disposer d'une plateforme automatisée multi-format française. Brièvement, la séquence de dépôt consiste au

dépôt cumulé de 3 x 60µL de microsphères AmTech de calibre 5-15µm (solubilisées en tampon phosphate supplémenté avec de l'albumine synthétique) dans des cônes adaptés maintenus en position verticale inversée (FigR14-A-i). L'épaisseur (4mm) des filtres microsphériques ainsi préparés (FigR14-A-ii) est apparue reproductible sur plusieurs cycles de production indépendants. Les performances de cônes à microsphiltration automatisés et cryopréservés durant 10 jours ont été confrontées à celles de cônes préparés manuellement (microsphères IPS, [1]) et stockés ou non selon les 2 méthodes précédemment décrites.

Les taux de rétention mesurés (Fig14-B) pour des érythrocytes normaux (nRBC) ou rigidifiés par traitement thermique (HRBC) se sont alignés, quelque soit la condition testée, sur des valeurs <5% et >95%, respectivement. Ce résultat permet d'exclure tout phénomène de saturation biaisant l'analyse des résultats. De même, aucune différence n'a été observée, toutes conditions confondues, pour la rétention des formes asexués matures. En accord avec nos prévisions, les taux de rétention mesurés suite à la microsphiltration de formes asexuées annulaires sont de 72.06 ± 1.83% et 64.85 ± 2.07% pour les cônes préparés manuellement et automatiquement, de façon respective. Cette différence, faible mais significative ($p = 0.0016$) s'explique par l'utilisation de microsphères différentes pour la préparation automatiséé (AmTech) et manuelle (IPS) des cônes à microsphiltration.

En résumé : la mise au point d'une séquence robotique pour la préparation des cônes à microsphiltration a permis de minimiser l'erreur standard (inter- et intra-opérateur) des résultats générés sous ce format expérimental. De plus, ces résultats valident un procédé de traitement des cônes pour leur transport et utilisation différée.



FigR14 : Préparation automatisée de cônes à microsphiltration (plateforme post-génomique p3s, campus La Salpêtrière). *A/Dépôt automatisé de microsphères dans des cônes inversés figés (A-i), résultant en une épaisseur de filtre microsphérique de 4mm à reproductibilité validée (A-ii). B/Rétention mesurées suite à la microsphiltration de populations érythrocytaires contrôles (nRBC et HRBC) ou impaludées (R10-20H et T/S34-44H) avec des cônes préparés manuellement et stockés (cryopréservation ou assèchement durant 48 heures) et des cônes préparés à l'aide d'un automate de pipetage (Freedom EVO100, Tecan) et cryopréservées durant 10 jours.*

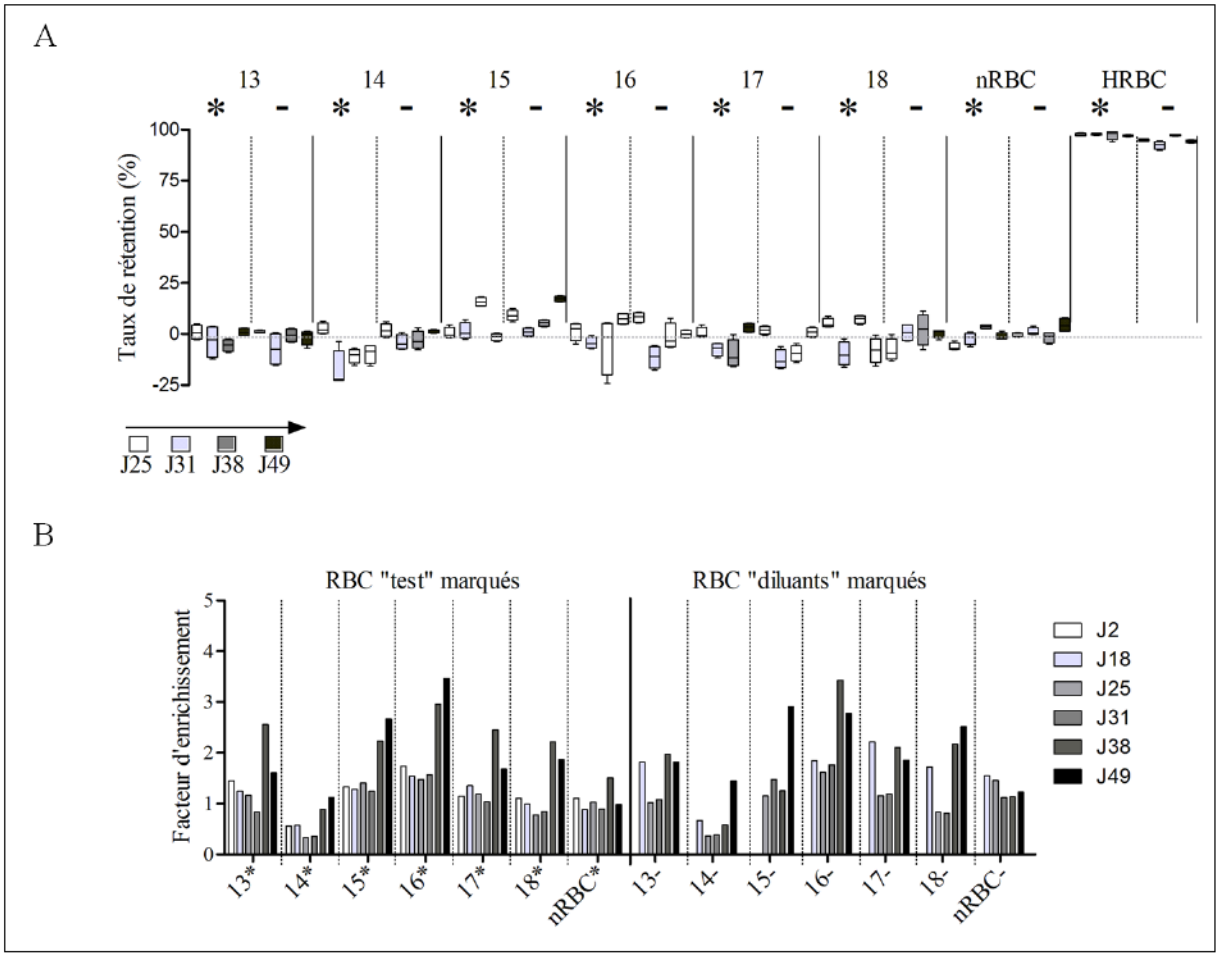
V. Ouverture des applications de la microsphiltration sur le champ thérapeutique de la transfusion.

Le contexte scientifique résumant les applications potentielles de la microsphiltration au format microplaque dans le champ thérapeutique de la transfusion sont résumées dans notre revue (Duez & Holleran et *al.*, Transfusion clinique et biologique 2015).

Les objectifs de cette étude exploratrice ont été d'évaluer l'impact du temps de préservation en conditions standards EFS (Etablissement Français du Sang) de culots érythrocytaires déleucocytés sur leur rétention en microsphiltration. Un suivi longitudinal des taux de rétention correspondants à 6 poches de sang (échantillons 14, 15, 16, 17 et 18) a été réalisé sur une période de stockage de 7 semaines post-prélèvement (FigR15). Les échantillons érythrocytaires ont été prélevés directement à partir des poches le jour de l'expérience, lavés en PBS supplémenté avec 1% d'Albumine synthétique puis resuspendus en tampon *CellStab* (Tampon salin phosphaté avec glycine permettant la stabilisation des hématies). Afin de standardiser les taux de rétention mesurés, les échantillons testés au cours du suivi ont été séparément dilués à 5% dans des érythrocytes contrôles issus d'une même poche de sang (aliquots décongelés la veille de l'expérience). La différenciation des érythrocytes « tests » des érythrocytes « diluants » a impliqué le marquage fluorescent d'une des 2 populations avec du *CellTrace* (CFSE, 5-*(and*-6)-*carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester*). La rétention des érythrocytes par les filtres microsphériques a été évaluée de 2 façons : -indirectement, en quantifiant par cytométrie les fractions érythrocytaires CFSE+ avant puis après microsphiltration. –directement, en quantifiant les fractions érythrocytaires CFSE+ retenues dans les filtres de microsphères et isolées par resuspension-sédimentation des microsphères.

Quelque soit la modalité de marquage (population érythrocytaire « test » ou « diluante » marquée), le suivi longitudinal effectué n'a mis en évidence aucune variation quant aux taux de rétention (méthode indirecte, classique) mesurés suite à la microsphiltration des 6 échantillons (FigR15-A), ces taux fluctuants autour de 0%. Les taux de rétention contrôles mesurés pour des érythrocytes normaux (nRBC) et rigidifiés par traitement thermique (HRBC) ont été <5% et >95%, respectivement, excluant tout phénomène de saturation des filtres pouvant biaiser l'interprétation des résultats générés au cours du suivi. La quantification directe, supposée plus précise, des proportions d'érythrocytes CFSE+ retenus par les filtres microsphériques a fait apparaître un enrichissement d'amplitude variable pour l'ensemble des échantillons testés aux jours J38 et J49 du suivi (FigR15-B).

En résumé : la séquence expérimentale classique, basée sur une quantification indirecte des taux de rétention, n'est pas adaptée à l'étude de la déformabilité d'érythrocytes stockés en condition EFS par microsphiltration. A *contrario*, une approche expérimentale plus sensible et directe, basée sur la récupération et l'analyse des cellules retenues dans les filtres microsphériques, permet de mettre en évidence un enrichissement érythrocytaire sous-jacent à l'apparition de lésions de stockage.



FigR15 : Suivi longitudinal sur 7 semaines de la rétention de culots érythrocytaires déleucocytés issus de 6 poches de sang conservés en condition EFS. *Les populations érythrocytaires « test » ont été diluées à 3-10% dans une population d'érythrocytes « diluants » cryopréservés et fraîchement décongelés le jour de l'expérience. Un marquage fluorescent avec l'agent CFSE a été opéré en miroir (CFSE+ : * ; CFSE- : -) sur ces 2 populations pour l'analyse des résultats par cytométrie en flux (ACCURI C6, acquisition sur 30 000 évènement, λexc=530/30 nm, FL1) A/Taux de rétention déduits à partir du nombre d'érythrocytes « test » ou contrôles (nRBC et HRBC) quantifié avant puis après microsphiltration. B/Enrichissement mesuré après récupération des érythrocytes bloqués dans les filtres après microsphiltration, indiquant une accumulation aux jours J38 et J49 du suivi non décelée en mesure de rétention classique.*

VI. Références

1. **Deplaine G**, **Safeukui I**, **Jeddi F**, **Lacoste F**, **Brousse V**, **Perrot S**, **Biligui S**, **Guillotte M**, **Guitton C**, **Dokmak S**, **Aussilhou B**, **Sauvanet A**, **Cazals Hatem D**, **Paye F**, **Thellier M**, **Mazier D**, **Milon G**, **Mohandas N**, **Mercereau-Puijalon O**, **David PH**, **Buffet PA**. 2010. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. Blood **117**:e88–e95.
2. **Tiburcio M**, **Niang M**, **Deplaine G**, **Perrot S**, **Bischoff E**, **Ndour PA**, **Silvestrini F**, **Khattab A**, **Milon G**, **David PH**, **Hardeman M**, **Vernick KD**, **Sauerwein RW**, **Preiser PR**, **Mercereau-Puijalon O**, **Buffet P**, **Alano P**, **Lavazec C**. 2012. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. Blood **119**:e172–e180.
3. **Ramdani G**, **Naissant B**, **Thompson E**, **Breil F**, **Lorthiois A**, **Dupuy F**, **Cummings R**, **Duffier Y**, **Corbett Y**, **Mercereau-Puijalon O**, **Vernick K**, **Taramelli D**, **Baker DA**, **Langsley G**, **Lavazec C**. 2015. cAMP-Signalling Regulates Gametocyte-Infected Erythrocyte Deformability Required for Malaria Parasite Transmission. PLOS Pathogens **11**:e1004815..
4. **Duffy S**, **Avery VM**. 2013. Identification of inhibitors of Plasmodium falciparum gametocyte development. Malar J **12**:408.
5. **Saunders D**, **Khemawoot P**, **Vanachayangkul P**, **Siripokasupkul R**, **Bethell D**, **Tyner S**, **Se Y**, **Rutvisuttinunt W**, **Sriwichai S**, **Chanthap L**, **Lin J**, **Timmermans A**, **Socheat D**, **Ringwald P**, **Noedl H**, **Smith B**, **Fukuda M**, **Teja-isavadharm P**. 2012. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oral Artesunate Monotherapy in Patients with Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria in Western Cambodia. Antimicrob Agents Chemother **56**:5484–5493.

6. **Pukrittayakamee S**, **Wanwimolruk S**, **Stepniewska K**, **Jantra A**, **Huyakorn S**, **Looareesuwan S**, **White NJ**. 2003. Quinine Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships in Uncomplicated Falciparum Malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**:3458–3463.

7. **Barnes KI**, **Little F**, **Smith PJ**, **Evans A**, **Watkins WM**, **White NJ**, **Barnes KI**, **Little F**, **Smith PJ**, **Evans A**, **Watkins WM**, **White NJ**. 2006. Sulfadoxine-pyrimethamine pharmacokinetics in malaria: Pediatric dosing implications. Clin Pharmacol Ther **80, 80**:582, 582–596.

8. **Boudreau EF**, **Fleckenstein L**, **Pang LW**, **Childs GE**, **Schroeder AC**, **Ratnaratorn B**, **Phintuyothin P**. 1990. Mefloquine kinetics in cured and recrudescent patients with acute falciparum malaria and in healthy volunteers. Clin Pharm Ther **48**:399–409.

9. **Mazur D**, **Schug BS**, **Evers G**, **Larsimont V**, **Fieger-Büschges H**, **Gimbel W**, **Keilbach-Bermann A**, **Blume HH**. 1999. Bioavailability and selected pharmacokinetic parameters of clindamycin hydrochloride after administration of a new 600 mg tablet formulation. Int J Clin Pharmacol Ther **37**:386–392.

10. **Edwards G**, **McGrath CS**, **Ward SA**, **Supanaranond W**, **Pukrittayakamee S**, **Davis TM**, **White NJ**. 1993. Interactions among primaquine, malaria infection and other antimalarials in Thai subjects. Br J Clin Pharmacol **35**:193–198.

11. **Lim H-S**, **Im J-S**, **Cho J-Y**, **Bae K-S**, **Klein TA**, **Yeom J-S**, **Kim T-S**, **Choi J-S**, **Jang I-J**, **Park J-W**. 2009. Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine and Its Clinical Implications in Chemoprophylaxis against Malaria Caused by Plasmodium vivax. Antimicrob Agents Chemother **53**:1468–1475.

12. **Methaneethorn J**. 2013. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of pyronaridine. Theses and Dissertations.

13. **Spangenberg T**, **Burrows JN**, **Kowalczyk P**, **McDonald S**, **Wells TNC**, **Willis P**. 2013. The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases. PLoS ONE **8**:e62906.

14. **Fivelman QL**, **McRobert L**, **Sharp S**, **Taylor CJ**, **Saeed M**, **Swales CA**, **Sutherland CJ**, **Baker DA**. 2007. Improved synchronous production of Plasmodium falciparum gametocytes in vitro. Molecular and Biochemical Parasitology **154**:119–123.

Conclusion-Discussion-Perspectives

I. Résumé

La filtration d'érythrocytes sur couches de microsphères (microsphiltration) a été miniaturisée au format microplaque 96-puits. Cette avancée technique ouvre la voie à un procédé de criblage phénotypique visant à identifier des composés rigidifiant les gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum*. Cette rigidification induirait leur rétention par la rate, les excluant ainsi de la circulation, donc du cycle de transmission. En utilisant des microplaques à microsphiltration, nous avons observé qu'un agent pharmacologique peut altérer, indépendamment d'un effet gamétocytocide, la capacité des gamétocytes à traverser des filtres de microsphères spléno-mimétiques. Ce résultat a été confirmé *in vitro* via l'utilisation de puces microfluidiques, et *in vivo* en utilisant un modèle murin. Ces données soulignent le développement réussi d'une cascade incluant criblage et post-criblage et axée sur la découverte de nouvelles familles chimiques bloquant la transmission du paludisme par un mécanisme d'action orignal. Lorsqu'un érythrocyte est soustrait de la circulation par la rate, sa destruction est opérée par phagocytose macrophagique. La rétention mécanique des érythrocytes est fonctionnelle chez les individus impaludés. Ainsi, la rétention mécanique splénique d'érythrocytes abritant des gamétocytes rigidifiés par traitement pharmacologique représente une approche anti-transmission dont la validation physiologique est solide. Des applications de la microsphiltration à haut débit dans d'autres champs d'études thérapeutiques sont envisagées.

II. Difficultés et verrous technologiques rencontrés au cours de la thèse

1. Le pouvoir filtrant d'une microsphiltration est conditionné par le pipetage des microsphères.

Le développement d'une méthode de criblage a reposé dans un premier temps sur la miniaturisation du dispositif de microsphiltration au format microplaque 96-puits. Dans un second temps, la microsphiltration a été couplée à une plateforme robotique pour la standardisation du traitement des échantillons et de l'analyse des taux de rétention. Le débit

analytique de cette plateforme est de 5000 à 10000 composés chimiques sur une période de 5 à 10 semaines. Une méthodologie R&D a été essentielle afin d'assurer une progression efficace considérant à la fois les obstacles techniques rencontrés et les contraintes de temps imposés par les organismes financeurs.

La première difficulté a été de développer une méthode de dépôt automatisée des microsphères dans des microplaques, pour la production de filtres à performances optimales. La gestuelle acquise en préparant manuellement des filtres de microsphères a permis d'identifier les principaux facteurs déterminant leurs performances. La sédimentation des microsphères après resuspension dans un tampon induit très probablement un gradient de calibre au fond des réservoirs. Ce gradient s'opère d'autant plus intensément que le rapport volumique microsphères/tampon est élevé. La présence d'albumine dans ce tampon est essentielle pour le maintien de la structure des couches de microsphères et assure leur *coating*. Ce *coating* est crucial pour la prévention d'interactions de surface non spécifiques (par exemple interactions de charges ou ligand-récepteur) entre les érythrocytes et les microsphères, qui pourraient induire une rétention artéfactuelle des globules rouges testés, sans rapport avec leurs propriétés biomécaniques.

Plusieurs corrections ont été apportées à la séquence de dépôt robotique afin de considérer la viscosité des suspensions de microsphères, la sédimentation des microsphères dans les aiguilles de dépôt et la modification progressive du gradient de microsphères dans le réservoir du robot au cours des 12 cycles de transferts nécessaires à la préparation d'une microplaque. Les volumes de microsphères transférés ont été ajustés pour la production standardisée de filtres de microsphères en série. Les performances de ces filtres dépendent de l'épaisseur des couches de microsphères et de la distribution des différents calibres de microsphères au sein de ces couches. Au cours de ma thèse, la production de microplaques a été opérée sur 2 sites distincts, en employant 2 automates différents, par 2 séquences spécifiques. Cette donnée indique que la production des microplaques est adaptable en fonction des technologies disponibles. Cette production s'est avérée possible à un débit moyen d'une plaque à l'heure.

2. Des microplaques à puits profonds ont permis de réduire la durée des microsphiltrations.

La récupération de l'ensemble des érythrocytes déformables est essentielle au calcul d'un taux de rétention représentatif de la contrainte mécanique qui leur est imposée lors du

passage du filtre. Suite à la microsphiltration d'érythrocytes parasités, le rinçage des filtres à microsphères avec des volumes de tampon croissants fait apparaître une réduction progressive des taux de rétention, avec un plateau atteint à partir de 1,2mL. Afin de garantir la robustesse de cette étape, un volume de tampon de rinçage de 1,6mL (excès de 33%) a été retenu. La capacité volumique des plaques filtrantes et réceptrices caractérisant le prototype de 1ère génération était de 300 µL. Sous ce format, la microsphiltration des échantillons a donc nécessité une filtration de l'échantillon, suivie de 8 cycles de rinçages consécutifs. Ces 9 étapes d'aspiration représentent un temps d'exécution expérimental de 60 à 90 minutes selon le nombre de conditions analysées. Cette caractéristique n'est pas compatible avec l'exécution d'une campagne de criblage haut débit sur gamétocytes. L'adaptation du système à des microplaques de capacité volumique 2mL à puits profonds jupés, caractérisant le prototype de 2nde génération, a été une avancée considérable en permettant une microsphiltration en 5-10 minutes opérée en 2 aspirations (filtration de l'échantillon puis rinçage).

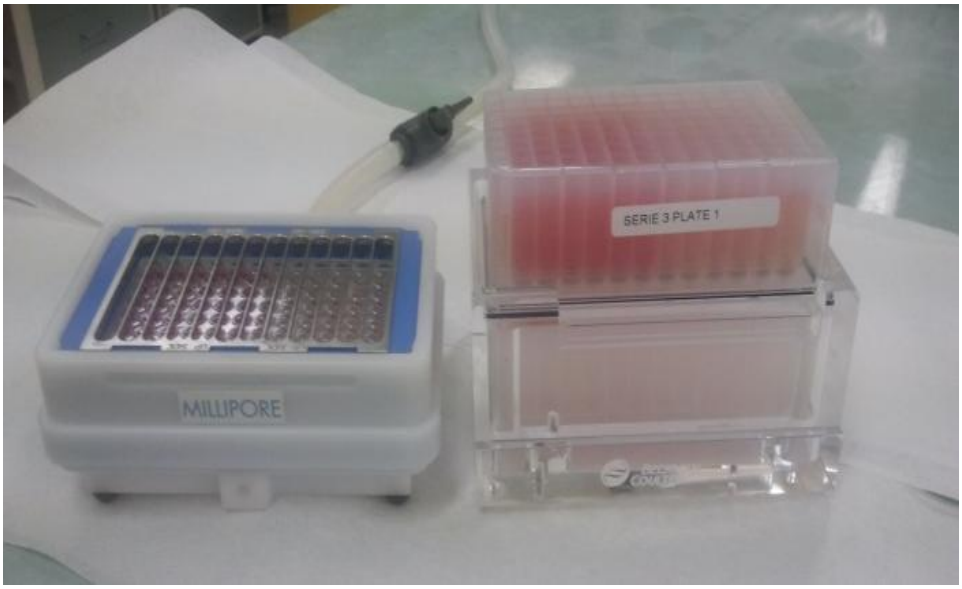


Figure D-1 : photographie des prototypes de microsphiltration de première (gauche, Millipore) et seconde génération (droite, Harvard Apparatus). *Les capacités volumiques des microplaques filtrantes et réceptrices correspondantes sont de 250µL et 2mL.*

3. Les parasites asexués ont été initialement employés comme outil de calibrage des performances de la microsphiltration.

En raison de leur cycle de développement court et de l'investissement modéré requis pour la production de volumes adaptés à un haut débit expérimental, les cultures de parasites

asexués ont été intensément employées durant ma première année de thèse pour le calibrage des performances du prototype. Les parasites asexués jeunes et matures sont retenus à des taux proches de ceux observés avec les gamétocytes matures et immatures, respectivement [1, 2]. La déformabilité des parasites asexués jeunes annulaires et/ou des gamétocytes matures a été mise en évidence par différentes approches expérimentales *in vitro*, *ex vitro* et *in vivo* (Duez et *al.* AAC 2015) et ils sont identifiables sur les frottis sanguins périphériques réalisés avec le sang des patients [3]. La déformabilité des gamétocytes matures est indispensable à leur la traversée répétée (toutes les ~2 heures) des étroites fentes interendothéliales spléniques, donc pour leur circulation et accessibilité au vecteur Anophèle. *A contrario*, les parasites asexués matures et les gamétocytes immatures sont rigides, ils séquestrent dans le corps humain et ne sont pas, ou très rarement détectés sur les frottis de sang de patients.

4. Une ré-optimisation de la méthode de production des gamétocytes est nécessaire afin de maximiser son rendement.

Les tests d'optimisation employant des gamétocytes ont été réalisés suite au développement des microplaques de 2nde génération. Avery et *al*. ont optimisé une méthode de production en masse de gamétocytes *in vitro*, compatible avec l'exécution d'une campagne de criblage [4]. Le protocole opératoire transmis repose sur la culture en routine des parasites asexués maintenus à un niveau de parasitémie standardisé (0.5-3%), suivi d'une étape de synchronisation fine pour l'obtention d'un pic parasitémique transitoire (parasitémie >10%). Ce pic atteint, l'ajustement de l'hématocrite par défaut induit un stress par privation nutritive de 24 heures accompagnant l'engagement d'une fraction des parasites asexués dans la gamétocytogénèse au cycle suivant. Une grande variabilité dans l'intensité du pic parasitémique a été observée (parasitémies variables de 16 à 35%). Cette variabilité est associée à un facteur de multiplication parasitaire asexuée pouvant fluctuer entre 8 et 15 (sur un cycle) selon les inductions. J'ai observé une influence des modalités d'entretien en routine des parasites avant leur amplification, tels que la régularité des dilutions, les facteurs de dilution opérés et les parasitémies d'entretien, sur l'efficacité de l'induction gamétocytaire. Un rôle important joué par des facteurs non standardisables, tels que la qualité des érythrocytes ou du sérum, est également suspecté. L'intensité du stress imposé aux parasites a été adaptée en fonction de la valeur du pic parasitémique. Cette adaptation a reposé sur la modulation de l'hématocrite de travail et l'ajustement des parasitémies asexuées annulaires. Un taux de mortalité de 15 à 35% des parasites a été observé au terme du stress imposé. Un

facteur de conversion asexué → sexué de 8 à 16% a été mesuré pour 7 inductions réalisées en autonome, résultant en une gamétocytémie moyenne approximative de 3% (avant extraction et concentration), en continuité avec les rendements de l'équipe d'accueil.

5. Le comportement des parasites diffère selon le site de culture, limitant l'utilisation internationale d'un unique protocole de production de gamétocytes.

La répétition du protocole dans mon laboratoire d'accueil parisien avec la même souche plasmodiale transgénique NF54 Pfs16-GFP-Luc a résulté en une perte massive des parasites suite à leur synchronisation et en un taux de conversion gamétocytaire inférieur à 8% (plusieurs expériences indépendantes exécutées par des opérateurs différents). La méthode de production a donc été simplifiée puis optimisée, en utilisant une souche sauvage NF54. La culture des parasites non synchronisés a été opérée à un hématocrite en excès, avec du milieu de culture contenant une concentration doublée en sérum, jusqu'à l'obtention d'un pic parasitémique à partir duquel des gamétocytes se sont différenciés. Un taux de mortalité parasitaire quasi nul a été observé. Cette optimisation a résulté en des taux de conversion gamétocytaires optimaux compatibles avec une approche en criblage. Ce résultat indique que le stress oxydatif par privation nutritive n'est pas le seul paramètre contrôlant l'engagement sur une différenciation sexuée. Il s'accorde avec l'intensification progressive d'échanges vésiculaires entre parasites stimulant la gamétocytogénèse, parallèle à la levée de leur effectif dans les cultures. Mes données soulignent une variabilité dans le comportement parasitaire entre laboratoires, prévenant l'utilisation d'un protocole standard unique à l'échelle internationale.

6. Une combinaison complexe de paramètres expérimentaux conditionne la rétention des érythrocytes parasités dans les filtres à microsphères.

La déformabilité érythrocytaire est déterminée par 3 paramètres majeurs : 1/le rapport entre l'aire de surface érythrocytaire et son volume, 2/sa viscosité interne et 3/la composition de sa membrane et du cytosquelette sous-membranaire composé en grande partie de spectrine [5].

La formulation du tampon de microsphiltration influence la rétention des parasites intra-érythrocytaires asexués dans les filtres à microsphères. Une modification des taux de rétention

peut être observée très rapidement (15-30 minutes) suite à la resuspension d'une culture d'érythrocytes parasités dans un tampon donné. Nos résultats suggèrent que la viscosité, la force ionique et l'osmolarité du tampon de microsphiltration ont un impact sur la rétention érythrocytaire, vraisemblablement en modulant le rapport surface/volume (Résultats-FigR3A) de la sous-population d'intérêt ou des globules rouges diluants (dénominateur). La présence de sérum humain amplifie la réduction de rétention sous-jacente à la resuspension d'érythrocytes parasités dans un milieu de culture contenant, entre autre, des ions, sucres et acides aminés. Un impact de déterminants moléculaires contenus dans le sérum ou le milieu sur les propriétés mécaniques du cytosquelette et de la membrane érythrocytaire et/ou gamétocytaire est très probable.

Le nombre de parasites asexués dans chaque globule rouge (mono-polyparasitisme) influence aussi la rétention, sans doute par impact cumulatif du nombre de parasites intracellulaires sur la rigidité de l'érythrocyte hôte (Résultats-FigR3B). De récents travaux indiquent que l'invasion d'un érythrocyte par un mérozoïte s'accompagne d'une perte de membrane affectant le rapport surface-volume, expliquant potentiellement ce résultat [6]. Il est également possible que la présence d'un ou plusieurs corps parasitaires dans le cytoplasme, en affectant la viscosité interne de l'érythrocyte, ainsi que l'exportation cumulée de protéines de remodelage d'origine parasitaire y contribuent.

Les données expérimentales récoltées indiquent un impact minoritaire de la pression d'aspiration et de la cinétique de pressurisation sur la capacité des gamétocytes intra-érythrocytaires à franchir les filtres de microsphères (Résultats-FigR3D). Néanmoins, la séquence d'aspiration a un impact sur les taux de rétentions gamétocytaires. Nos résultats montrent qu'une microsphiltration en 2 étapes (filtration de l'échantillon, 200µL puis lavage des filtres avec 1.6mL de tampon) est essentielle à la récupération de l'ensemble des gamétocytes matures déformables (Figure Dis). La cinétique de déformation gamétocytaire explique probablement cette observation : le volume de tampon de lavage déterminerait la durée durant laquelle la force d'entraînement du gamétocyte est exercée et conditionnerait ainsi la capacité des gamétocytes à franchir un ou plusieurs espaces inter-sphères filtrants sur un temps donné, donc à franchir le filtre de microsphères. La forme en faucille des gamétocytes pourrait également conditionner cette cinétique de déformation [7].

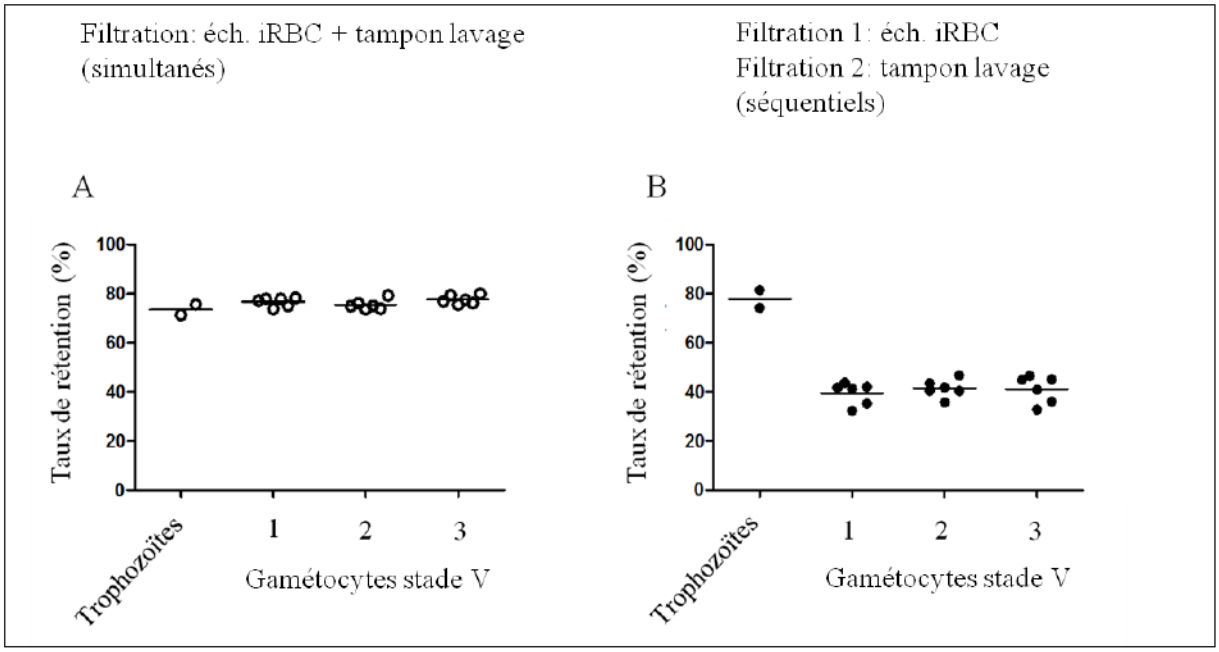


Figure D-2: Impact de la séquence d'aspiration sur les taux de rétention gamétocytaires. *La rétention d'échantillons d'érythrocytes abritant des gamétocytes matures stade V (iRBC) de Plasmodium falciparum a été mesurée dans 2 configurations d'aspiration différentes. A/ La filtration simultanée de l'échantillon avec le tampon de lavage résulte en une rétention artéfactuellement élevée, s'alignant avec la rétention contrôle de parasites asexués matures rigides (trophozoïtes). B/ La filtration séquentielle de l'échantillon puis du volume 1.6mL de tampon de lavage en 2 étapes résulte en un taux de rétention gamétocytaire faible en accord avec sa capacité à se déformer pour franchir des fentes interendothéliales spléniques.*

De façon intéressante, la mesure des calibres des microsphères composant les filtres (Résultats-FigR2B), par microscopie, suggère une proportion majoritaire d'espaces inter-sphères non filtrants générés par la juxtaposition de microsphères de calibre moyen (supérieur à 10µm). Les taux de rétention mesurés pour les parasites rigides indiquent cependant que plus de 90% des parasites sont confrontés à un challenge mécanique durant une microsphiltration (Rétention ≥90% pour des érythrocytes rigidifiés par traitement thermique). Ces 2 observations suggèrent que 1/tous les érythrocytes d'un échantillon doivent traverser au moins un espace inter-sphère filtrant, de diamètre moyen 2-3.5µm de diamètre, pour franchir le filtre de microsphères 2/ que dans les filtres, un volume mort délimite un circuit microfluidique, représenté par des points de filtrations facultatifs reliés entre eux par une majorité d'espaces inter-sphères non filtrants, mimant en quelque sorte la double circulation splénique. Ce postulat s'accorde avec la relation forte reliant le ratio petites/larges microsphères aux taux de rétention mesurés en microsphiltration.

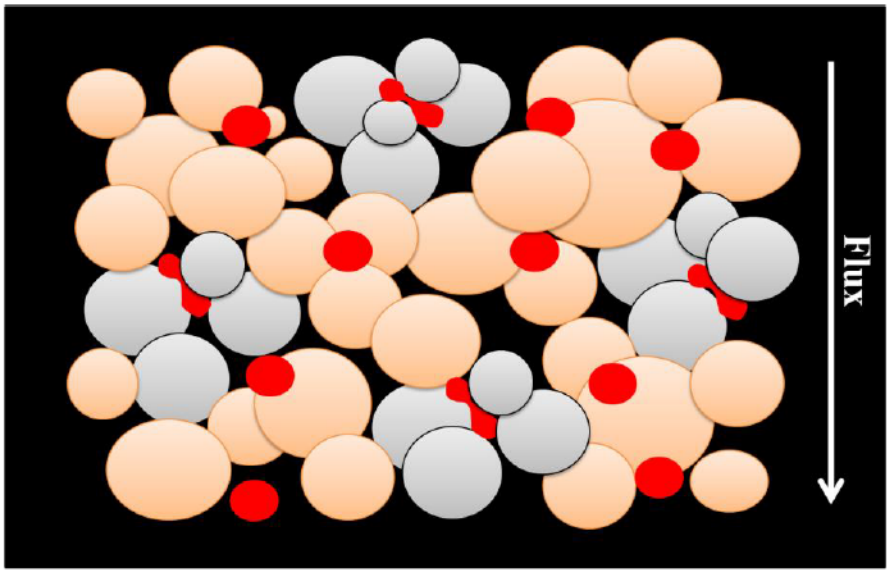


Figure D-3 : Représentation schématique conceptuelle d'une population d'érythrocytes traversant un filtre de microsphères. *Les érythrocytes (cercles rouges) transitent dans un circuit microfluidique sous l'action d'une force d'aspiration générée par une pompe à vide électrique. Ce circuit microfluidique est délimité par l'espace mort généré entre les microsphères de diamètre 5 à 15 µm (AMTech). Les espaces intersphères délimitant un orifice de passage de diamètre ≥8-10µm (et résultant de la juxtaposition des microsphères de couleur orange) sont non filtrants, génèrent les principaux axes de transit. Ces axes principaux sont reliés entre eux par des espaces filtrants (résultant de la juxtaposition de microsphères de couleur grise) délimitant un orifice de passage de diamètre de 2-4µm spléno-mimétiques. La traversée de ces espaces filtrants requière la déformation des érythrocytes (forme d'altère). Plus de 90% des érythrocytes sont amenés à traverser un ou plusieurs espaces filtrants lors d'une microsphiltration.*

Ainsi, une combinaison complexe de paramètres expérimentaux (biologiques, physiques, géométriques) conditionne les résultats d'une microsphiltration. Leur considération progressive au cours des phases d'optimisation a été essentielle pour maximiser la robustesse de la méthode de criblage développée.

III. Perspectives expérimentales

1. Portes ouvertes par la microsphiltration au format microplaque.

De multiples méthodes ont été développées pour étudier la déformabilité érythrocytaire [8, 9]. L'aspiration d'érythrocytes dans des micropipettes de diamètre calibré, la microscopie à force atomique, l'imagerie en phase quantitative et l'étirement érythrocytaire par des pinces optiques sont des approches techniques quasi-statiques laborieuses permettant l'étude de la déformabilité sur un effectif d'érythrocytes limité, mais à l'échelle de la cellule unique. Un nombre plus important d'érythrocytes peut être étudié par filtration au travers de membrane polycarbonées poreuses ou par ektacytométrie en gradient osmotique. Bien que dynamiques, ces méthodes sont pour l'instant difficilement exploitables pour l'étude parallèle de multiples sous-populations érythrocytaires à déformabilité spécifique. De façon générale, les résultats générés par l'ensemble de ces méthodes font intervenir la mesure de relations complexes entre la biologie de l'érythrocyte et les forces physiques qui lui sont imposées. L'extrapolation de ces résultats à l'échelle physiologique du système vasculaire humain (exemple : capacité à naviguer dans des capillaires étroits ou à passer les fentes interendothéliales spléniques) repose ensuite sur une modélisation mathématique probabiliste.

La traversée d'une fente inter-endothéliale splénique, contrainte mécanique la plus rigoureuse rencontrée par l'érythrocyte circulant, s'accompagne d'une déformation complexe en forme d'haltère qui n'est pas, ou seulement partiellement restituée par ces méthodes. L'outil microfluidique est une avancée dans l'étude dynamique de la déformabilité érythrocytaire [10-12]. Néanmoins, son débit d'échantillonnage, tout comme celui des autres méthodes disponibles pour le moment, n'est pas encore adapté à une approche en criblage pharmacologique à haut débit.

La microsphiltration se caractérise par un challenge mécanique très proche du physiologique, via la restitution d'un phénotype érythrocytaire transitoire en forme d'haltères, sous une force de dépressurisation mimant le flux lent de la circulation splénique ouverte. Les résultats générés sont directement extrapolables à l'échelle physiologique circulatoire, sous forme d'un taux de rétention spléno-mimétique *in-vitro* distinct d'une unité de déformabilité classique [13]. La microsphiltration au format microplaque est également la première méthode permettant l'étude d'un phénotype mécanique dont le débit d'échantillonnage est compatible

avec une approche en criblage. Une altération de la déformabilité érythrocytaire ayant été mise en évidence dans plusieurs situations cliniques, des maladies héréditaires ou acquises du globule rouge à la transfusion, des investigations innovantes à visée thérapeutique sont désormais envisageables grâce à cet outil [14-18] (Duez et *al.* Transfusion clinique et biologique 2015).

2. Rétention mécanique des gamétocytes exposés à la méfloquine et prédictivité de la méthode

La validation de la méthode de criblage par microsphiltration a été opérée en 2 temps. Le pré-criblage de 10 composés a été entrepris en établissant une relation concentration-effet sur une durée d'exposition de 2 et 24 heures (Résultats-FigR7A/B). Les gammes de concentration testées ont été sélectionnées sur la base des IC50 (effet gamétocytocide) générées par des projets de recherches parallèles du laboratoire d'accueil australien (Pr Vicky Avery, Griffith University). Un accroissement significatif de la rétention des gamétocytes matures a été mesuré *in vitro* suite à leur exposition avec une concentration de méfloquine 10µM, proche mais supérieure à son pic plasmatique *in vivo* (Cmax=7.3µM, Tmax=33.6 heures [19]).

Ce résultat pourrait suggérer, sous réserve d'investigations *in vitro* plus poussées, une double activité rigidifiante-gamétocytocide *in vivo*. Néanmoins, l'impact de la méfloquine sur la densité des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* n'a que très rarement fait l'objet d'une investigation clinique ciblée. Les données disponibles n'ont pas été générées de façon comparative. L'absence d'effet clinique sur ce stade parasitaire (pas de modification du portage post-thérapeutique), donc sur le potentiel de transmission est rapportée par Harinasuta et *al.* [20]. De façon contradictoire, les études *in vitro* indiquent une activité gamétocytocide et gamétocide significative [21-23]. Une inhibition de la formation d'oocystes chez le vecteur par cette molécule à 10µM a été démontrée par *standard membrane feeding assay*, en accord avec les données *in vitro* [21]. En résumé, il y a de très fortes chances que l'activité rigidifiante de la méfloquine soit confinée aux études *in vitro* dû aux propriétés pharmacocinétiques de ce composé (concentration 10µM non atteinte *in vivo*). Cette activité rigidifiante *in vitro* pourrait n'être qu'une conséquence de son activité gamétocytocide (exemple : altération des composantes membranaires ou cytosquelettiques secondaire au stress oxydatif généré par interférence du composé avec le catabolisme de l'hémoglobine). La méfloquine ne représente donc pas une piste d'intérêt pour le développement d'une étude en

pharmacomodulation axée sur la rigidification des gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum*.

Une démonstration de l'utilisation des microplaques à microsphiltration pour une application en criblage a été apportée en évaluant l'activité de 40 composés sur une exposition de 24 heures (Résultats-FigR8B). Un accroissement significatif de la rétention a été mesuré suite à l'exposition des gamétocytes matures avec des endopéroxydes semi-synthétiques, à des concentrations (0.1 et 1µM) proches du physiologique (*Cmax* artémisinine = 1.10µM [24]) ou supraphysiologiques (*Cmax* artésunate = 0.22µM [25] ; *Cmax* dihydroxyartémisinine = 0.56µM [26]; *Cmax* artémisone = 0.34µM [27]; *Cmax* artémether = 0.5-0.78µM [26, 28]) affectant significativement la viabilité gamétocytaire *in vitro* (Duez et *al.* AAC 2015). La puissante activité gamétocytocide des dérivés de l'artémisinine a été démontrée *in vivo* [29, 30]. La contribution de l'activité rigidifiante à l'activité anti-transmission de cette famille chimique n'est qu'hypothétique et tout comme la méfloquine, probablement secondaire à son activité gamétocytocide. Des investigations futures potentielles exploitant cet axe de recherche sont donc d'intérêt mineur pour notre projet.

3. Optimisation de la méthode de quantification

Nos données indiquent donc une rigidification gamétocytaire, supposée secondaire à l'activité gamétocytocide puissante d'antipaludiques de référence *in vitro*. La méthode de criblage développée repose sur la quantification d'un taux de rétention par microscopie confocale en fluorescence à haut débit et haute résolution. Ce taux de rétention est calculé à partir des pourcentages de gamétocytes exprimant la GFP et dont l'aspect en forme de faucille est préservé, dans une population érythrocytaire avant et après microsphiltration. Bien que sensible et reproductible, cette méthode d'analyse ne considère pas les gamétocytes exprimant la GFP mais de forme arrondie (macrogamétocytes femelles activés ou dégénérés), exclus par défaut de l'analyse. Une proportion de gamétocytes femelles pourrait s'être activée dans les minutes suivant la microsphiltration, à l'origine d'un biais potentiel dans l'analyse des résultats. Je propose donc une configuration analytique optimisée pour le calcul des taux de rétention, dans laquelle un marquage de l'activité mitochondriale par *mitotracker* apporterait une information supplémentaire en viabilité [31]. Les gamétocytes à forme de faucille et arrondis dont l'activité mitochondriale est intacte seraient ainsi considérés pour l'évaluation de l'activité rigidifiante des composés pharmacologiques testés. En parallèle, ce marquage

mitochondrial par *mitotracker* ouvrirait une visibilité sur l'activité gamétocytocide, octroyant à la méthode le statut de *double assay*.

4. Un format microplaque 384 puits a été développé et validé par un criblage à bas débit.

Mes travaux ont supporté le développement subséquent d'une version microplaque 384-puits du dispositif de microsphiltration par mon équipe d'accueil australienne. Sous ce format, une campagne de criblage à bas débit a été exécutée. Environ 4500 composés chimiques ont été sélectionnés puis testés sur une durée d'incubation de 24 heures avec des gamétocytes matures, sur plusieurs points de concentrations. Ces composés ont été sélectionnés à partir de 3 chimiothèques : la *malaria box* (activité schizonticide) [32], une chimiothèque de médicaments approuvés FDA (chimiothèque de réorientation) et une chimiothèque diversifiée GDB-01. Ce criblage a résulté en l'identification de 5 actifs (concentrations micromolaires) qui nous ont été récemment transmis pour étude complémentaire *in vitro* par micropuces microfluidiques et *in vivo* sur modèle murin. Ce rapport apporte une preuve de concept supplémentaire : un criblage par microsphiltration est possible et peut aboutir à la découverte de composés altérant la capacité des gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum* à se déformer pour traverser des espaces intersphères spléno-mimétiques.

5. Exportation du procédé de criblage par microsphiltration pour l'exécution d'une campagne de criblage haut débit en milieu industriel.

Sous le financement de la fondation *Bill & Melinda Gates*, le projet *BlockbackMalaria* axé sur la découverte de composés anti-transmission par criblage en microsphiltration est entré en phase d'industrialisation. Ce projet implique un partenariat avec la fondation *Tres Cantos Open Lab*, *GlaxoSmithKline*, Madrid (terrain d'accueil expérimental) et l'Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris (INTS, employeur du personnel scientifique de Pierre Buffet). Les objectifs du projet prévus sur 2 années sont l'établissement d'une plateforme automatisée de microsphiltration au format 384-puits et l'exécution d'une campagne de criblage à haut débit pour la découverte de composés rigidifiant les gamétocytes matures et/ou les parasites asexués annulaires de *Plasmodium falciparum*.

Ma contribution en tant que post-doctorant financé pour une durée d'un an sur ce projet est définie par les objectifs spécifiques suivants :

-développement d'une méthode de production automatisée de microplaques à microsphiltration 384-puits.

-optimisation des méthodes de culture de gamétocytes en masse de rendements compatibles avec une campagne de criblage haut débit via l'utilisation d'une souche parasitaire adaptée.

-optimisation d'une méthode d'analyse pour la mesure standardisée des taux de rétention via une approche d'imagerie confocale en fluorescence à haut débit et haute résolution.

-optimisation d'une fenêtre de criblage par recherche de composés positifs potentiels révélés par des travaux publiés

-développement et validation d'une séquence de criblage automatisée supportée par l'outil robotique disponible sur la plateforme industrielle.

-contribution au criblage à haut contenu et haut débit de la chimiothèque *Global Health Chemical Diversity Library* de 68689 composés chimiques, une chimiothèque diversifiée (>14000 *familles chimiques*) proposée par l'Université britannique de Dundee.

IV. Questions en suspens

1. Quelle profil d'activité devrait caractériser un *Lead* identifié par microsphiltration ayant un impact significatif sur la transmission du paludisme ?

Scénario 1 : l'activité pharmacologique du composé n'affecte pas le sex ratio.

Le composé idéal sélectionné par notre approche devrait induire une rétention splénique irréversible *in vivo* >95% afin de pouvoir réduire par >90% le nombre de moustiques développant des sporozoïtes infectieux par *direct skin feeding assay* [33]. Il devrait être caractérisé par une demi-vie d'élimination longue > 10 jours afin d'assurer un recouvrement de la période de portage gamétocytaire chez les malades traités par ACT en un minimum de prises. La relation entre les gamétocytémies détectées chez les sujets infectés et le potentiel de transmission au moustique ne serait pas linéaire. La modélisation de Churcher

et *al.* suggère qu'une réduction de 99% de la gamétocytémie chez un sujet abritant 200 gamétocytes/µL de sang aurait un impact minime sur la contribution immédiate au réservoir de transmission, tandis qu'un impact significatif serait observé pour des gamétocytémies ≥ 300 gamétocytes/µL et inférieure à 2 gamétocytes/µl [39].

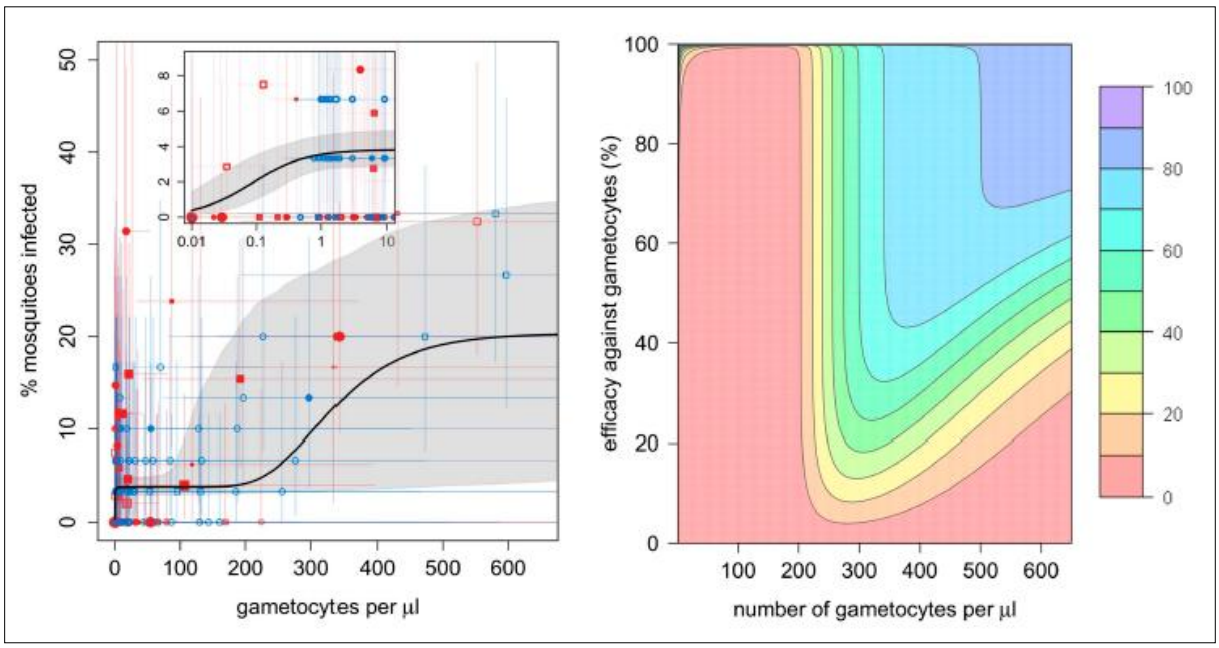


Figure D-4 : Relation entre densité gamétocytaire et infection des vecteurs Anophèles en relation avec l'efficacité des interventions anti-transmissions. *Volet gauche : la relation entre les densités de gamétocytes chez les individus impaludés et l'infection des vecteurs est globalement positive, mais non linéaire. Volet droit : niveau d'efficacité des interventions anti-transmission (ordonnée) en fonction de l'impact sur les gamétocytémies. L'échelle des couleurs dénote la réduction des infections Anophèles nécessaires pour réduire la transmission avec une efficacité croissante de 0 (rouge) à 100% (violet).Méta-analyse tirée de [39].*

Scénario 2 : l'activité pharmacologique du composé affecte le sex ratio.

Les cultures de laboratoires se caractérisent généralement par un sex ratio favorisant une prédominance de gamétocytes femelles. Dans une optique de criblage, la prédominance de femelles (généralement moins sensibles que les mâles à une action pharmacologique) risque ainsi de masquer l'effet d'un composé très actif sur les mâles, car son impact observé sur la densité gamétocytaire totale sera minime. Le sex ratio (rapport du nombre de gamétocytes mâles / femelles) gamétocytaire a un impact sur le potentiel de transmission du paludisme. Il est modulé par un grand nombre de paramètres épidémiologiques. A forte

densité gamétocytaire, une forte prédominance de femelles favorise la transmission (car un seul mâle peut féconder plusieurs femelles). A faibles densités (proche d'un gamétocyte/µl) une forte prédominance de femelles devient défavorable car augmente le risque que le moustique n'ingère que des femelles [40]. Il est donc logique de supposer qu'un composé ciblant préférentiellement les gamétocytes femelles puisse exercer son effet maximal anti-transmission chez des individus à forte gamétocytémies. Au contraire, un composé ciblant préférentiellement les gamétocytes mâles serait d'autant plus efficace que les gamétocytémies sont faibles.

2. Le Viagra est-il le prochain médicament anti-transmission ?

L'activité *in vitro* du citrate de sildénafil (Viagra) se traduit par une rétention moyenne >90% des gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum* suite à une exposition de 30 minutes avec ce composé à 100µM [41], indépendamment d'une activité gamétocytocide. Une activité pharmacologique réversible dans les premières heures suivant l'exposition des gamétocytes est probable. Les études pharmacocinétiques rapportent une concentration au pic plasmatique *Cmax* = 2.5µM et une demi-vie d'élimination *T1/2el* <4 heures (dose = 25-100 mg, administration orale) [42]. Ce *Cmax* laisse entrevoir au mieux un taux de rétention splénique maximal de 70-80% *in vivo* en triplant la dose administrée. L'activité anti-transmission potentielle du citrate de sildénafil *in vivo* serait aussi tempérée par une posologie putative de 3 à 4 prises journalières durant 2-4 semaines pour des doses supérieures à 100mg. Les notions d'observances (bénéfice individuel faible) et de coût du médicament dans les zones endémiques pourraient alors devenir des facteurs limitants pour une utilisation future en tant que médicament anti-transmission.

La démonstration de l'activité rigidifiante du citrate de sildénafil sur les gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum* représente donc une percée scientifique très importante pour la démonstration du concept anti-transmission via un ciblage moléculaire des mécanismes de régulation de la mécanique parasitaire. Néanmoins, son intérêt thérapeutique immédiat est peu probable sauf à envisager une optimisation pharmacocinétique sans perte d'efficacité. Dans ce sens, des études exploratrices centrées sur le tadalafil à *T1/2el* un peu plus longue (17,5 heures [43]) ont été initiées.

L'inhibition de la PDE-δ représente donc une option intéressante pour cibler la voie AMPc et rigidifier les gamétocytes matures. L'adénylate cyclase-α en est une autre, surexprimée aux

stades de développement immature gamétocytaire [44]. La caractérisation fine des voies de signalisation dépendantes de l'AMPc dans le parasite et la découverte des cibles moléculaires effectrices (protéines STEVORs ? [45]) de cette signalisation, régulant spécifiquement la déformabilité du gamétocyte mature de *Plasmodium falciparum*, seront importantes pour le développement de composés ayant le profil pharmacocinétique et pharmacodynamique ciblés par ce projet. Enfin, d'autres mécanismes, indépendants de la signalisation AMPc, régulent probablement la déformabilité des érythrocytes abritant des gamétocytes matures. Un bouleversement du gradient ionique par des inhibiteurs de pompes membranaires, par exemple PfATP4 [46], pourraient en accroissant le volume cellulaire induire un phénotype rigide. Le criblage reste donc la voie la plus robuste pour trouver des composés à modes d'actions diversifiés et dont l'efficacité se manifesterait au-dessous du micromolaire, offrant ainsi des perspectives solides de développement ultérieur dans l'indication anti-transmission.

3. Sera-t-il bénéfique d'employer la primaquine en masse pour bloquer la transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum* ? Avons-nous vraiment besoin de nouveaux médicaments anti-transmission ?

La primaquine est une arme précieuse pour la prévention de résurgences à *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* (hypnozoïtes hépatiques dormants) et la lutte contre la transmission de *Plasmodium vivax* et *falciparum* (activité gamétocytocide) [33]. Cependant, ce médicament peut induire une hémolyse oxydative intravasculaire chez les patients déficitaires en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Dans les zones endémiques, il est très difficile de pratiquer un test de dépistage G6PD systématique et d'assurer un suivi continu de l'infection palustre durant plusieurs jours ou semaines consécutives. L'administration de primaquine sans dépistage préalable relève alors d'une prise de décision considérant le bénéfice apporté par le médicament en rapport au risque d'effets secondaires graves [34].

La gravité de l'hémolyse induite par la primaquine est liée au type et l'intensité du déficit en G6PD des patients ainsi qu'à la dose unitaire et aux nombre de prises. En conséquence, la notion de bénéfice/risque associé à l'administration en masse de primaquine est nuancée par la différence de posologie employée pour le traitement des infections à *Plasmodium vivax* (0.25→30mg/Kg durant 14 jours) et à *falciparum* (monodose 0.25mg/Kg en complément d'une ACT). D'autre part, tandis qu'il n'existe actuellement aucune alternative thérapeutique à l'utilisation de la primaquine pour la prévention des récidives des infections à *Plasmodium*

vivax, la prise en charge des infections à *Plasmodium falciparum* est généralement opérée de façon très efficace via l'administration des ACTs. L'administration de primaquine dans cette indication anti-transmission n'apporte pas de bénéfice individuel direct.

Le débat éthique concernant l'administration systématique d'une dose de primaquine en complément au traitement ACT pour la prise en charge des infections à *Plasmodium falciparum* est complexe. L'attitude conventionnelle actuelle est centrée sur le bénéfice individuel d'une intervention médicale. Le développement d'un médicament exige une démonstration de la supériorité du bénéfice sur le risque. Dans le cas de la primaquine en dose unique pour limiter la transmission, le bénéfice résulterait de l'impact sur la transmission, le risque est hémolytique. Cette appréciation est extrêmement complexe car la détermination de la réduction du risque inhérent à une réinfection individuelle, réduction liée à la prise de primaquine par le patient lui-même et par la population alentour, ne s'appuie aujourd'hui sur aucune donnée réelle. Cette approche rejoint les discussions éthiques complexes entourant le développement de vaccins anti-transmission. Un bénéfice conceptuellement appréhendable - mais très difficile à mesurer avant de mettre en œuvre la mesure envisagée - est confronté à l'incidence très faible d'un effet indésirable très rarement mortel.

Les données actuelles sur lesquelles s'appuie l'OMS indiquent qu'une dose de primaquine 0.25mg/Kg réduit la durée de portage gamétocytaire [29] et le potentiel d'infectivité pour les Anophèles [33]. De façon apparemment contradictoire, une modélisation suggère que la contribution de la primaquine serait mineure par rapport à l'effet anti-transmission exercé par des ACTs en zone de forte transmission [35]. L'ajout d'une approche anti-transmission est surtout utile quand le niveau d'endémie est plus faible, ce qui est précisément le cas de l'Asie du Sud-Est où cette approche a été mise en œuvre. D'autre part, une optimisation du timing d'administration de la primaquine considérant ses propriétés pharmacocinétiques et l'évolution des parasitémies individuelles lors de l'infection pourrait maximiser le bénéfice apporté par ce médicament [36]. Les outils à disposition ne permettent pas de définir avec certitude le bénéfice apporté par l'administration en masse (MDA) de primaquine aux objectifs d'éradication du paludisme. La majorité des rapports souligne un impact transitoire sur la transmission même après plusieurs cycles de MDA, parallèles ou non aux mesures de contrôle vectorielles. Une interruption de la transmission suite à de telle campagne a cependant été rapportée est semble plus souvent atteinte dans les zones à faible endémicité. L'adaptation des stratégies MDA-primaquine aux caractéristiques des zones ciblées semble importante pour favoriser leur efficacité, par exemple via l'ajustement du nombre de cycle

MDA, l'optimisation de la distribution des médicaments ou l'optimisation de la communication afin de maximiser la coopération de la population, donc l'observance thérapeutique [37]. Bien que des millions de doses de primaquine aient été distribuées à l'échelle mondiale, notamment dans le cadre de MDA, et qu'un faible nombre de décès y ait été associés, les rapports de pharmacovigilance ne sont que peu documentés et il est très probable que les nombres d'incidents et de réactions indésirables graves soient sous-représentés. Un plus grand nombre de données est donc nécessaire afin de mieux définir le risque lié à ce médicament avant de pouvoir envisager son inclusion dans des MDA supportant les stratégies anti-transmission déjà déployées.

La découverte de nouveaux composés gamétocytocides dépourvus d'une telle toxicité est donc importante pour diversifier les options chimiothérapeutiques anti-transmissions. La démonstration d'une meilleure tolérance pour un nouveau médicament en comparaison avec la primaquine demandera un temps considérable, mais le développement d'un inventaire chimiothérapeutique anti-transmission de réserve représente une option stratégique d'autant plus importante lorsqu'un risque d'émergence de résistance à la primaquine est considéré [38]. L'éradication du paludisme est un objectif qui ne peut être atteint que sur le long terme. Il sera certainement marqué par des obstacles majeurs, tels que des changements de dynamique humaine, le paludisme d'importation, des épidémies de pré-élimination ou peut être l'expansion des cas de résistances aux ACTs. Les expériences du passé ont montré que dans ce genre de bataille, des stratégies et outils de réserve sont indispensables.

V. Références :

1. **Deplaine G**, **Safeukui I**, **Jeddi F**, **Lacoste F**, **Brousse V**, **Perrot S**, **Biligui S**, **Guillotte M**, **Guitton C**, **Dokmak S**, **Aussilhou B**, **Sauvanet A**, **Cazals Hatem D**, **Paye F**, **Thellier M**, **Mazier D**, **Milon G**, **Mohandas N**, **Mercereau-Puijalon O**, **David PH**, **Buffet PA**. 2010. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. Blood **117**:e88–e95.
2. **Tibúrcio M**, **Niang M**, **Deplaine G**, **Perrot S**, **Bischoff E**, **Ndour PA**, **Silvestrini F**, **Khattab A**, **Milon G**, **David PH**, **Hardeman M**, **Vernick KD**, **Sauerwein RW**, **Preiser PR**, **Mercereau-Puijalon O**, **Buffet P**, **Alano P**, **Lavazec C**. 2012. A switch in

infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. Blood **119**:e172–180.

3. **Bousema T**, **Drakeley C**. 2011. Epidemiology and Infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. Clinical Microbiology Reviews **24**:377–410.
4. **Duffy S**, **Avery VM**. 2013. Identification of inhibitors of Plasmodium falciparum gametocyte development. Malar J **12**:408.
5. **Chien S**. 1987. Red cell deformability and its relevance to blood flow. Annu Rev Physiol **49**:177–192.
6. **Safeukui I**, **Buffet PA**, **Perrot S**, **Sauvanet A**, **Aussilhou B**, **Dokmak S**, **Couvelard A**, **Hatem DC**, **Mohandas N**, **David PH**, **Mercereau-Puijalon O**, **Milon G**. 2013. Surface area loss and increased sphericity account for the splenic entrapment of subpopulations of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes. PLoS ONE **8**:e60150.
7. **Dixon MWA**, **Dearnley MK**, **Hanssen E**, **Gilberger T**, **Tilley L**. 2012. Shape-shifting gametocytes: how and why does P. falciparum go banana-shaped? Trends in Parasitology **28**:471–478.
8. **Stuart J**. 1985. Erythrocyte rheology. Journal of clinical pathology **38**:965–977.
9. **Kim Y**, **Kim K**, **Park Y**. 2012. Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances, p. . *In* Moschandreou, T (ed.), Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology. InTech.
10. **Antia M**, **Herricks T**, **Rathod PK**. 2008. Microfluidic approaches to malaria pathogenesis. Cell Microbiol **10**:1968–1974.
11. **Rigat-Brugarolas LG**, **Elizalde-Torrent A**, **Bernabeu M**, **De Niz M**, **Martin-Jaular L**, **Fernandez-Becerra C**, **Homs-Corbera A**, **Samitier J**, **del Portillo HA**. 2014. A

functional microengineered model of the human splenon-on-a-chip. Lab Chip **14**:1715–1724.

12. **Picot J**, **Ndour PA**, **Lefevre SD**, **Nemer W El**, **Tawfik H**, **Galimand J**, **Da Costa L**, **Ribeil J-A**, **de Montalembert M**, **Brousse V**, **Le Pioufle B**, **Buffet P**, **Le Van Kim C**, **Français O**. 2015. A biomimetic microfluidic chip to study the circulation and mechanical retention of red blood cells in the spleen. Am J Hematol **90**:339–345.
13. **Lavazec C**, **Deplaine G**, **Safeukui I**, **Perrot S**, **Milon G**, **Mercereau-Puijalon O**, **David PH**, **Buffet P**. 2013. Microsphiltration: a microsphere matrix to explore erythrocyte deformability. Methods Mol Biol **923**:291–297.
14. **Keymel S**, **Heiss C**, **Kleinbongard P**, **Kelm M**, **Lauer T**. 2011. Impaired red blood cell deformability in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus. Horm Metab Res **43**:760–765.
15. **De Backer D**, **Orbegozo Cortes D**, **Donadello K**, **Vincent J-L**. 2014. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. Virulence **5**:73–79.
16. **Brousse V**, **Buffet P**, **Rees D**. 2014. The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. Br J Haematol **166**:165–176.
17. **Frank SM**, **Abazyan B**, **Ono M**, **Hogue CW**, **Cohen DB**, **Berkowitz DE**, **Ness PM**, **Barodka VM**. 2013. Decreased Erythrocyte Deformability After Transfusion and the Effects of Erythrocyte Storage Duration: Anesthesia & Analgesia **116**:975–981.
18. **Cooke BM**, **Mohandas N**, **Coppel RL**. 2001. The malaria-infected red blood cell: structural and functional changes. Adv Parasitol **50**:1–86.
19. **Boudreau EF**, **Fleckenstein L**, **Pang LW**, **Childs GE**, **Schroeder AC**, **Ratnaratorn B**, **Phintuyothin P**. 1990. Mefloquine kinetics in cured and recrudescent patients with acute falciparum malaria and in healthy volunteers. Clin Pharm Ther **48**:399–409.

20. **Harinasuta T**, **Bunnag D**, **Lasserre R**, **Leimer R**, **Vinijanont S**. 1985. Trials of mefloquine in vivax and of mefloquine plus “fansidar” in falciparum malaria. Lancet **1**:885–888.

21. **Delves M**, **Plouffe D**, **Scheurer C**, **Meister S**, **Wittlin S**, **Winzeler EA**, **Sinden RE**, **Leroy D**. 2012. The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of Plasmodium: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. PLoS Medicine **9**:e1001169.

22. **Ruecker A**, **Mathias DK**, **Straschil U**, **Churcher TS**, **Dinglasan RR**, **Leroy D**, **Sinden RE**, **Delves MJ**. 2014. A Male and Female Gametocyte Functional Viability Assay To Identify Biologically Relevant Malaria Transmission-Blocking Drugs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **58**:7292–7302.

23. **Miguel-Blanco C**, **Lelièvre J**, **Delves MJ**, **Bardera AI**, **Presa JL**, **López-Barragán MJ**, **Ruecker A**, **Marques S**, **Sinden RE**, **Herreros E**. 2015. Imaging-Based High-Throughput Screening Assay To Identify New Molecules with Transmission-Blocking Potential against Plasmodium falciparum Female Gamete Formation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **59**:3298–3305.

24. **Ashton M**, **Hai TN**, **Sy ND**, **Huong DX**, **Huong NV**, **Niêu NT**, **Công LD**. 1998. Artemisinin Pharmacokinetics is Time-Dependent during Repeated Oral Administration in Healthy Male Adults. Drug Metab Dispos **26**:25–27.

25. **Saunders D**, **Khemawoot P**, **Vanachayangkul P**, **Siripokasupkul R**, **Bethell D**, **Tyner S**, **Se Y**, **Rutvisuttinunt W**, **Sriwichai S**, **Chanthap L**, **Lin J**, **Timmermans A**, **Socheat D**, **Ringwald P**, **Noedl H**, **Smith B**, **Fukuda M**, **Teja-isavadharm P**. 2012. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oral Artesunate Monotherapy in Patients with Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria in Western Cambodia. Antimicrob Agents Chemother **56**:5484–5493.

26. **van Agtmael MA**, **Cheng-Qi S**, **Qing JX**, **Mull R**, **van Boxtel CJ**. 1999. Multiple dose pharmacokinetics of artemether in Chinese patients with uncomplicated falciparum malaria. Int J Antimicrob Agents **12**:151–158.

27. **Teja-Isavadharm P**, **Watt G**, **Eamsila C**, **Jongsakul K**, **Li Q**, **Keeratithakul G**, **Sirisopana N**, **Luesutthiviboon L**, **Brewer TG**, **Kyle DE**. 2001. Comparative pharmacokinetics and effect kinetics of orally administered artesunate in healthy volunteers and patients with uncomplicated falciparum malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene **65**:717–721.

28. **Na Bangchang K**, **Karbwang J**, **Thomas CG**, **Thanavibul A**, **Sukontason K**, **Ward SA**, **Edwards G**. 1994. Pharmacokinetics of artemether after oral administration to healthy Thai males and patients with acute, uncomplicated falciparum malaria. Br J Clin Pharmacol **37**:249–253.

29. **Bousema T**, **Okell L**, **Shekalaghe S**, **Griffin JT**, **Omar S**, **Sawa P**, **Sutherland C**, **Sauerwein R**, **Ghani AC**, **Drakeley C**. 2010. Research Revisiting the circulation time of Plasmodium falciparum gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs.

30. **Sawa P**, **Shekalaghe SA**, **Drakeley CJ**, **Sutherland CJ**, **Mweresa CK**, **Baidjoe AY**, **Manjurano A**, **Kavishe RA**, **Beshir KB**, **Yussuf RU**, **Omar SA**, **Hermsen CC**, **Okell L**, **Schallig HDFH**, **Sauerwein RW**, **Hallett RL**, **Bousema T**. 2013. Malaria transmission after artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine: a randomized trial. J Infect Dis **207**:1637–1645.

31. **Duffy S**, **Avery VM**. 2013. Identification of inhibitors of Plasmodium falciparum gametocyte development. Malar J **12**:408.

32. **Spangenberg T**, **Burrows JN**, **Kowalczyk P**, **McDonald S**, **Wells TNC**, **Willis P**. 2013. The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases. PLoS ONE **8**:e62906.

33. **White NJ**, **Qiao LG**, **Qi G**, **Luzzatto L**. 2012. Rationale for recommending a lower dose of primaquine as a Plasmodium falciparum gametocytocide in populations where G6PD deficiency is common. Malaria journal **11**:418.

34. **Ashley EA**, **Recht J**, **White NJ**. 2014. Primaquine: the risks and the benefits. Malar J **13**:10–1186.

35. **Eziefula AC**, **Gosling R**, **Hwang J**, **Hsiang MS**, **Bousema T**, **von Seidlein L**, **Drakeley C**, **others**. 2012. Rationale for short course primaquine in Africa to interrupt malaria transmission. Malar J **11**:360.

36. **Lawpoolsri S**, **Klein EY**, **Singhasivanon P**, **Yimsamran S**, **Thanyavanich N**, **Maneeboonyang W**, **Hungerford LL**, **Maguire JH**, **Smith DL**. 2009. Optimally timing primaquine treatment to reduce Plasmodium falciparum transmission in low endemicity Thai-Myanmar border populations. Malaria Journal **8**:159.

37. **Newby G**, **Hwang J**, **Koita K**, **Chen I**, **Greenwood B**, **von Seidlein L**, **Shanks GD**, **Slutsker L**, **Kachur SP**, **Wegbreit J**, **Ippolito MM**, **Poirot E**, **Gosling R**. 2015. Review of Mass Drug Administration for Malaria and Its Operational Challenges. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **93**:125–134.

38. **Fernando D**, **Rodrigo C**, **Rajapakse S**. 2011. Primaquine in vivax malaria: an update and review on management issues. Malar J **10**:10–1186.

39. **Churcher TS**, **Bousema T**, **Walker M**, **Drakeley C**, **Schneider P**, **Ouédraogo AL**, **Basáñez M-G**. 2013. Predicting mosquito infection from Plasmodium falciparum gametocyte density and estimating the reservoir of infection. Elife **2**:e00626.

40. **West SA**, **Reece SE**, **Read AF**. 2001. Evolution of gametocyte sex ratios in malaria and related apicomplexan (protozoan) parasites. Trends in parasitology **17**:525–531.

41. **Ramdani G**, **Naissant B**, **Thompson E**, **Breil F**, **Lorthiois A**, **Dupuy F**, **Cummings R**, **Duffier Y**, **Corbett Y**, **Mercereau-Puijalon O**, **Vernick K**, **Taramelli D**, **Baker DA**, **Langsley G**, **Lavazec C**. 2015. cAMP-Signalling Regulates Gametocyte-Infected Erythrocyte Deformability Required for Malaria Parasite Transmission. PLOS Pathogens **11**:e1004815.

42. **Nichols DJ**, **Muirhead GJ**, **Harness JA**. 2002. Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. Br J Clin Pharmacol **53 Suppl 1**:5S–12S.

43. **Seftel AD**. 2004. Phosphodiesterase type 5 inhibitor differentiation based on selectivity, pharmacokinetic, and efficacy profiles. Clinical cardiology **27**:14–19.

44. **Muhia DK**, **Swales CA**, **Eckstein-Ludwig U**, **Saran S**, **Polley SD**, **Kelly JM**, **Schaap P**, **Krishna S**, **Baker DA**. 2003. Multiple Splice Variants Encode a Novel Adenylyl Cyclase of Possible Plastid Origin Expressed in the Sexual Stage of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum. Journal of Biological Chemistry **278**:22014–22022.

45. **Tiburcio M**, **Niang M**, **Deplaine G**, **Perrot S**, **Bischoff E**, **Ndour PA**, **Silvestrini F**, **Khattab A**, **Milon G**, **David PH**, **Hardeman M**, **Vernick KD**, **Sauerwein RW**, **Preiser PR**, **Mercereau-Puijalon O**, **Buffet P**, **Alano P**, **Lavazec C**. 2012. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. Blood **119**:e172–e180.

46. **Spillman NJ**, **Allen RJW**, **McNamara CW**, **Yeung BKS**, **Winzeler EA**, **Diagana TT**, **Kirk K**. 2013. Na(+) regulation in the malaria parasite Plasmodium falciparum involves the cation ATPase PfATP4 and is a target of the spiroindolone antimalarials. Cell Host Microbe **13**:227–237.

Article#1 → Introduction Chapitre VI

Ndour PA, **Safeukui I**, **Diakité S**, **Duez J**, **Jauréguiberry S**, **Buffet P**. 2015. Role of the Spleen in Human Malaria, p. 1–24. *In* Hommel, M, Kremsner, PG (eds.), Encyclopedia of Malaria. Springer New York.

Role of Spleen in Human Malaria

Synonyms

Fast microcirculation, closed circulation; Mature forms, trophozoites and schizonts; Parasitized, infected; Pitted RBC, once-infected RBC; RBC, erythrocytes; Rings, young infected RBC; Slow microcirculation, open circulation; Thrombocytopenia, thrombopenia

Introduction

Splenomegaly is a hallmark of malaria in endemic countries, and splenectomy increases the risk of severe malaria (Fig. 1) (Buffet et al. 2011). Both observations point to an important role for the spleen in malaria pathogenesis, generally considered as related to its influence on the expression of adhesins on red blood cells (RBC) parasitized by Plasmodium falciparum (David et al. 1983; Hommel et al. 1983) and to its ability to filter out parasitized RBC (iRBC). This is a logical assumption based on a major function of the spleen: the quality control of circulating RBC (Groom et al. 1991), although how the spleen operates this filtration is probably more complex than often thought. In theory, RBC infected with either young (rings) or mature (trophozoites and schizonts) asexual stages of P. falciparum should not be filtered (White et al. 2013; Cooke et al. 2014). Mature forms should not enter the splenic circulation because they efficiently adhere to endothelial cells in small vessels (Scherf et al. 2001). Rings are expected to efficiently cross the spleen, as they are observed in the peripheral blood (Cooke et al. 2014). No parasite antigens expressed on the external surface of rings that would form the target for adaptive effector mechanisms have been identified so far (Safeukui et al. 2008). Old and new tools (Miller et al. 1971; Cranston et al. 1984; Nash et al. 1989; Buffet et al. 2006; Deplaine et al. 2011) to study RBC deformability and their ability to cross narrow slits have revealed original mechanisms by which the spleen "filters out" parasitized RBC. Biophysical properties can indeed trigger retention without intervention of a conventional ligand-receptor interaction. These findings clarify - though still incompletely - how the spleen can be protective or harmful during the course of acute or chronic malaria, both before and after therapy. Importantly, this recent knowledge is now translating into potential medical applications. In the "spleen-and-malaria" context, exploration of blood components other than RBC has been limited. A mechanistic study (Karanikas et al. 2004) suggests that thrombocytopenia - almost constant in malaria - is related to a shorter life span due to a diffuse non-splenic sequestration. We are not aware of mechanistic studies on the fate of white blood cells in human malaria. This entry is thus focused on mechanisms involving RBC.

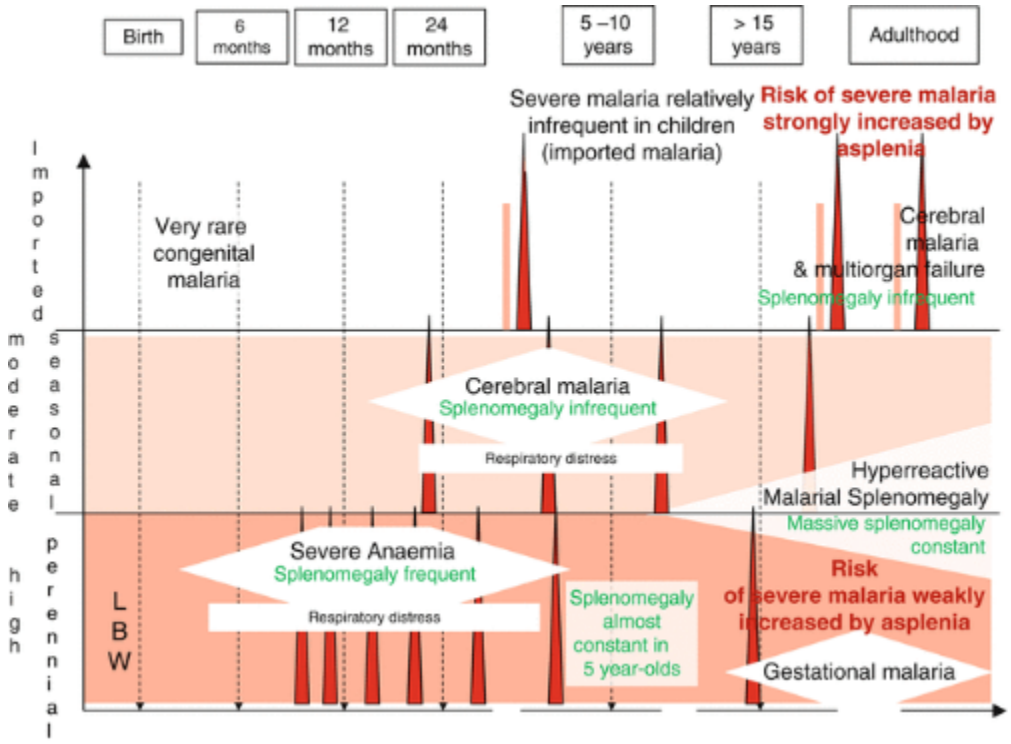


Fig. 1 Severe forms of Plasmodium falciparum malaria as functions of patient age and transmission intensity. Presence of splenomegaly and influence of asplenia on malaria severity

. Typical patterns of severe malaria across different age groups (X axis) and three simplified levels of transmission (Y axis), from non-endemic areas where malaria occurs in travelers or migrants (white background) to areas of very high endemicity (dark red background) through areas of low or seasonal transmission (light red background). Simple indications on the prevalence of splenomegaly are indicated in green. The influence of asplenia (essentially splenectomy) on the severity of P. falciparum infection is indicated in dark red. Narrow red triangles: symptomatic malaria attacks. Red vertical bars: small period of exposure to transmission in travelers, leading to the symptomatic attack. LBW low birth weight, the main fetal consequence of gestational malaria. Gestational malaria results in an increase in parasite carriage, anemia, and (to a lesser extend) clinical attacks affecting primiparous pregnant women in highly endemic areas. Except for inconstant severe anemia, women with gestational malaria do not suffer from conventional signs and symptoms of severe malaria

Background

The "Red Spleen" Physiology: Quality Control of RBC Deformability and RBC Surface

RBC directed to the splenic circulation engage into parallel, fast, or slow microcirculations (Groom et al. 1991). In the fast microcirculation, RBC transit directly from the perifollicular circulatory spaces to the venous sinuses - a circulation considered similar to that of conventional capillaries in terms of mechanical challenges (Figs. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9). By contrast, in the slow open microcirculation, RBC must squeeze through very narrow slits between endothelial cells in the wall of sinuses (Fig. 4) (Groom et al. 1991; Buffet et al. 2006; Safeukui et al. 2008), on their way from the cords of the red pulp back to the venous system (Figs. 4 and 9). Crossing splenic inter-endothelial slits is the most stringent challenge on RBC deformability in the body (Mohandas and Gallagher 2008) and can result in the retention of less deformable RBC or in removal of intraerythrocytic bodies (pitting) from host erythrocytes (Fig. 7) (Koyama et al. 1964; Schnitzer et al. 1972; Groom et al. 1991). Unlike the channel-shaped capillaries, the labyrinthine microcirculatory beds in the cords are devoid of endothelium, hence the "open" microcirculation that accounts for 10-20 % of spleen RBC flow (Groom et al. 1991; Safeukui et al. 2008). Quality control of RBC deformability is thus expected to occur on average every 2-3 h. In healthy subjects, the clearance half-life of stiff-heated RBC is approximately 1 h (Looareesuwan et al. 1987). In physiology and disease, other putative signals for retention and phagocytosis of RBC in the slow circulation of the spleen include more conventional ligand-receptor interactions such as opsonization of clustered band 3 (among others), deposition of complement, sensing of flipped phosphatidylserine by macrophages, or conformational changes in CD47 that turn its

2SpringerReferenceDr. Papa Alioune Ndour, Dr. Innocent Safeuki, Dr. Seidina Ouakité, Dr. Julien Duez, Dr. Stéphane Jauréguiberry and Dr. Pierre BuffetRole of Spleen in H

baseline "do not eat me" signal into a TSP-1-mediated "eat me" signal (Turrini et al. 1992; Lutz 2004; Burger et al. 2012). These ligand-receptor interactions can occur in macrophage-rich organs other than the spleen such as the liver. RBC velocity is approximately 20 times slower in the slow circulation of the spleen than in capillaries, likely facilitating strong interactions with macrophage receptors and allowing weak interactions to take place (Groom et al. 1991). Retention of RBC in the splenic red pulp - be it based on surface alterations or reduced deformability - portends their subsequent destruction. Macrophages account for approximately half the volume of the red pulp (Groom et al. 1991), and the peculiarities of the milieu in the cords possibly play a role in RBC modifications that follow mechanical retention, ultimately resulting in phagocytosis (Groom et al. 1991). In summary, the ability of the spleen to innately filter out altered RBC, either through ligand-receptor interactions or by sensing their abnormal mechanical properties, is expected to play a key role in malaria.

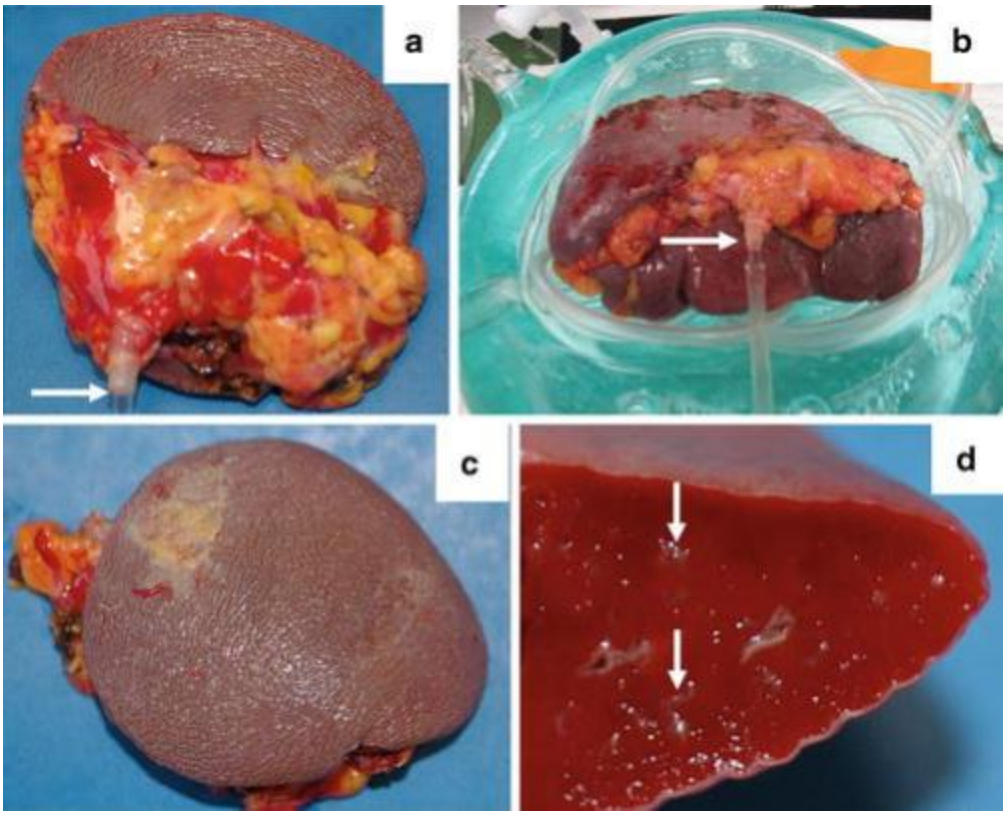
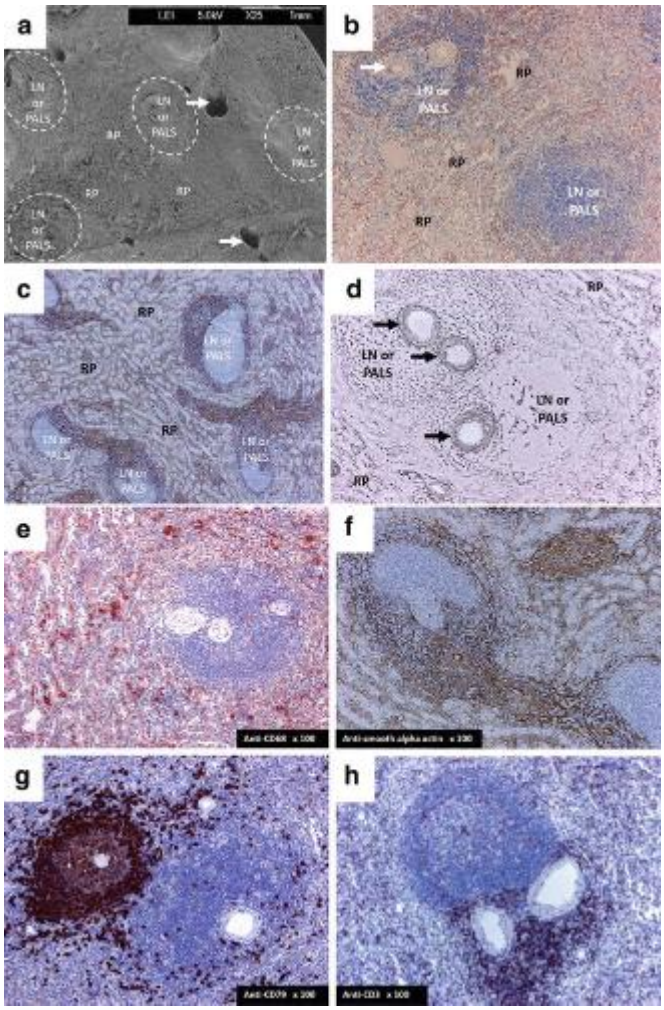


Fig. 2 Macroscopic aspect of the human spleen

. Hilar (a) and posterior (c) faces of a normal human spleen retrieved following left spleno-pancreatectomy for a pancreas tumor. Position of the spleen in the warming reservoir of the spleen perfusion device (b). The splenic artery has been cannulated with a specific catheter for perfusion at physiological pressure (a, b, horizontal arrows). A fresh section (d) shows gray/yellow dots (vertical arrows) corresponding to the white pulp, the surrounding red pulp occupying approximately 75 % of the parenchyma

3SpringerReferenceDr. Papa Alioune Ndour, Dr. Innocent Safeuki, Dr. Seidina Ouakité, Dr. Julien Duez, Dr. Stéphane Jauréguiberry and Dr. Pierre BuffetRole of Spleen in H



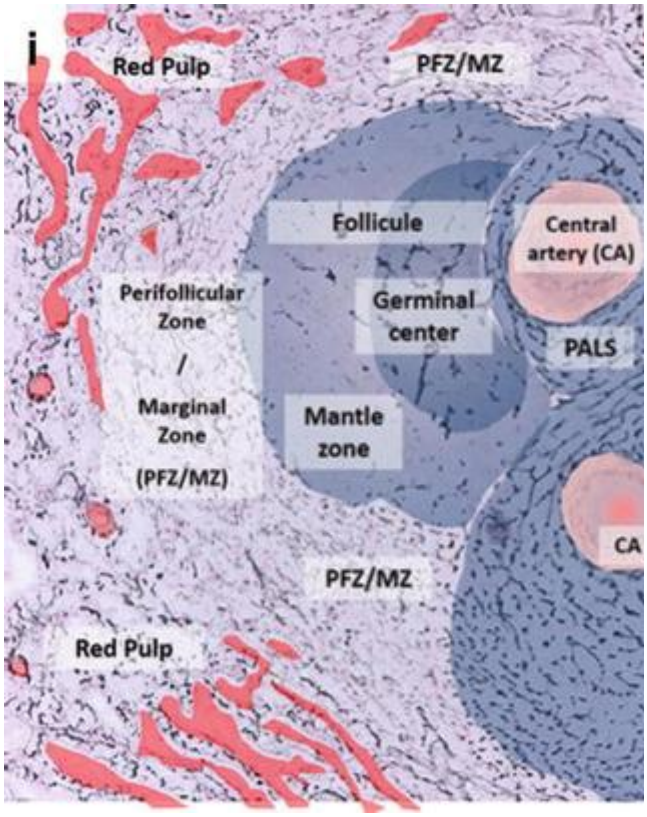


Fig. 3 General histological features of the human spleen . Analyzed either by scanning electron microscopy at low magnification (a), conventional histology with Giemsa staining (b), immunohistochemistry (c, anti-smooth alpha actin antibody), or silver staining (d, Gordon-Sweet special staining); the splenic parenchyma contains round or oval zones of densely packed mononuclear cells centered or not by large vessels generally named central arterioles (CA, horizontal arrows). These zones correspond either to lymphoid nodules (LN) or to periarterial lymphatic sheaths (PALS). The spongelike red pulp (RP) is made up of sinuses. Some lymphoid nodules are partially surrounded by microcirculatory spaces that correspond to the smooth alpha actin-positive perifollicular zone (PFZ, f and i). Macrophages are abundant in the red pulp and at the frontier between the PFZ and the red pulp (anti-CD68, g). B lymphocytes (anti-CD79, g) are abundant in primary and secondary follicles, while T lymphocytes are abundant in the PALS (Immunohistochemistry, courtesy Pr. Thierry Molina)

4SpringerReferenceDr. Papa Alioune Ndour, Dr. Innocent Safeuki, Dr. Seidina Ouakité, Dr. Julien Duez, Dr. Stéphane Jauréguiberry and Dr. Pierre BuffetRole of Spleen in H

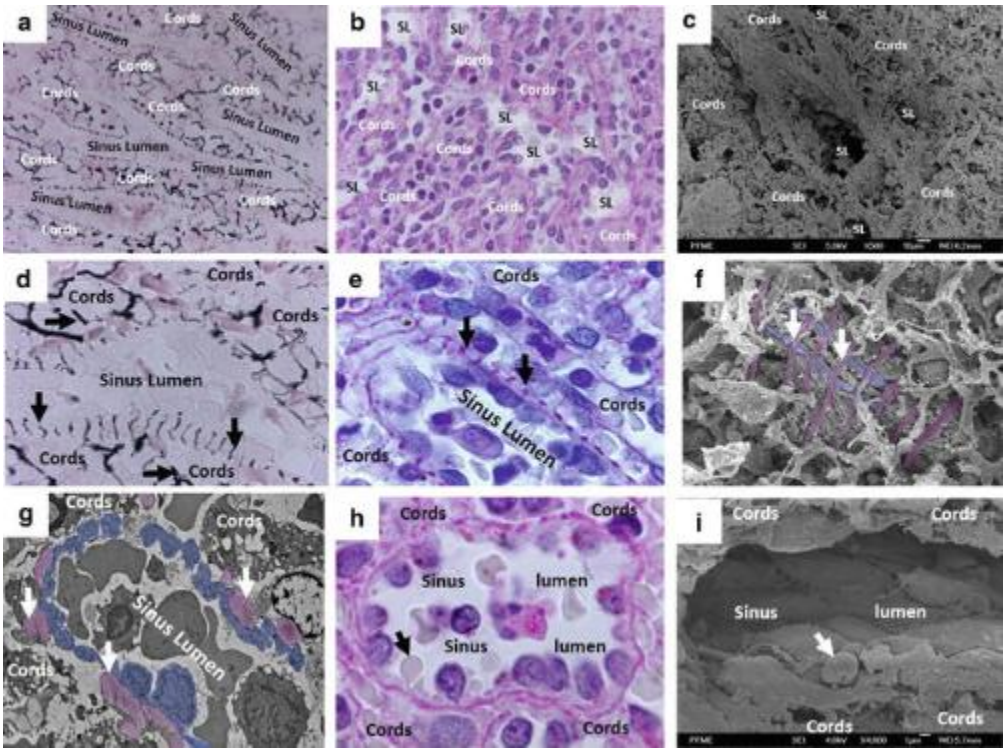


Fig. 4 Structure of sinus walls in the red pulp of the human spleen

. In the red pulp, RBC navigate slowly in the cords then cross the sinus wall to return to the circulation as they enter the sinus lumen (sl). On sections stained with silver (a, 100×, d, 600×), periodic acid-Schiff (PAS, b, e, h), or observed by transmission (g) or scanning electron microscopy (c, f, i), sinuses appear as almost empty spaces bordered by thin basal fibers very regularly spaced every 2-4 μm (vertical arrows). These fibers are colored in purple to help identification on electronic microscopy pictures (f, g). Cords between sinus lumens contain thick fibers (horizontal arrows) and nucleated cells (b). The periodic disposition of thin basal fibers facilitates the identification of the luminal and abluminal sides of sinus walls on sections. Endothelial cells are on the luminal side of the sinus wall, and their nucleus is often prominent in the lumen (colored in blue on electronic microscopy pictures f, g). Red blood cells can be observed as they squeeze through inter-endothelial slits (black arrow) in the sinus wall (oblique arrows, g, i). Please see Fig. 9 for a 3-dimensional reconstruction of the sinus structure. The panel (g) was originally published in Blood. Buffet el al Blood. 2011 Jan 13;117(2):381-92 © the American Society of Hematology

5SpringerReferenceDr. Papa Alioune Ndour, Dr. Innocent Safeuki, Dr. Seidina Ouakité, Dr. Julien Duez, Dr. Stéphane Jauréguiberry and Dr. Pierre BuffetRole of Spleen in H

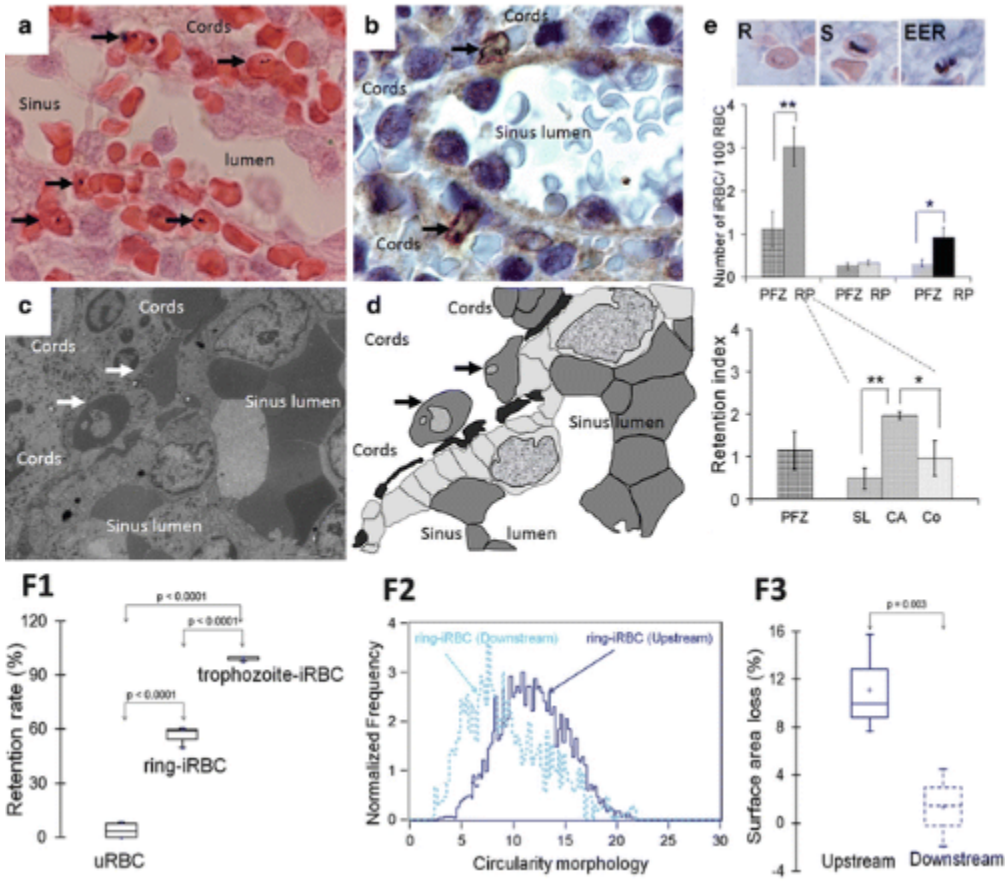


Fig. 5 Mechanical retention of rings in the splenic red pulp

. Giemsa-stained section (a, 100×) and IHC aspect with an anti-P. falciparum antibody (b, 200×), histological section of a human spleen perfused with a culture containing rings (horizontal arrows). Rings with a reduced deformability are retained in the rep pulp along the abluminal side of the sinus wall. Transmission electronic microscopy (c, 1,000×) shows rings in close contact with either basal fibers (c) colored in black on key (d) or the abluminal side of endothelial cell bodies colored in light gray on key (d). As opposed to schizonts (S), rings (R) and extraerythrocytic remnants (EER) accumulate in the red pulp (RP) but not in the perifollicular zone (PFZ, e). In the red pulp, rings accumulate exclusively along the abluminal side of sinus walls (CA, lower panel on e) but not in the cords distant from the sinus wall (Co) or in the sinus lumen (SL). Approximately 50 % of rings from in vitro cultures are retained when filtered through layers of microspheres that mimic the mechanical sensing of red blood cells by the human spleen (Deplaine et al. 2011; Safeukui et al. 2013) (F1), whereas only a small proportion of rings from patients' blood are retained (Deplaine et al. 2011) (not shown). Populations of rings up- and downstream from human spleens and filters differ significantly with regard to shape (F2) and surface area (F3) (e, Adapted from Safeukui et al. Blood 2008, F1-3, Adapted from Safeukui et al. PLoS One 2013)

6SpringerReferenceDr. Papa Alioune Ndour, Dr. Innocent Safeuki, Dr. Seidina Duakité, Dr. Julien Duez, Dr. Stéphane Jauréguiberry and Dr. Pierre BuffetRole of Spleen in H

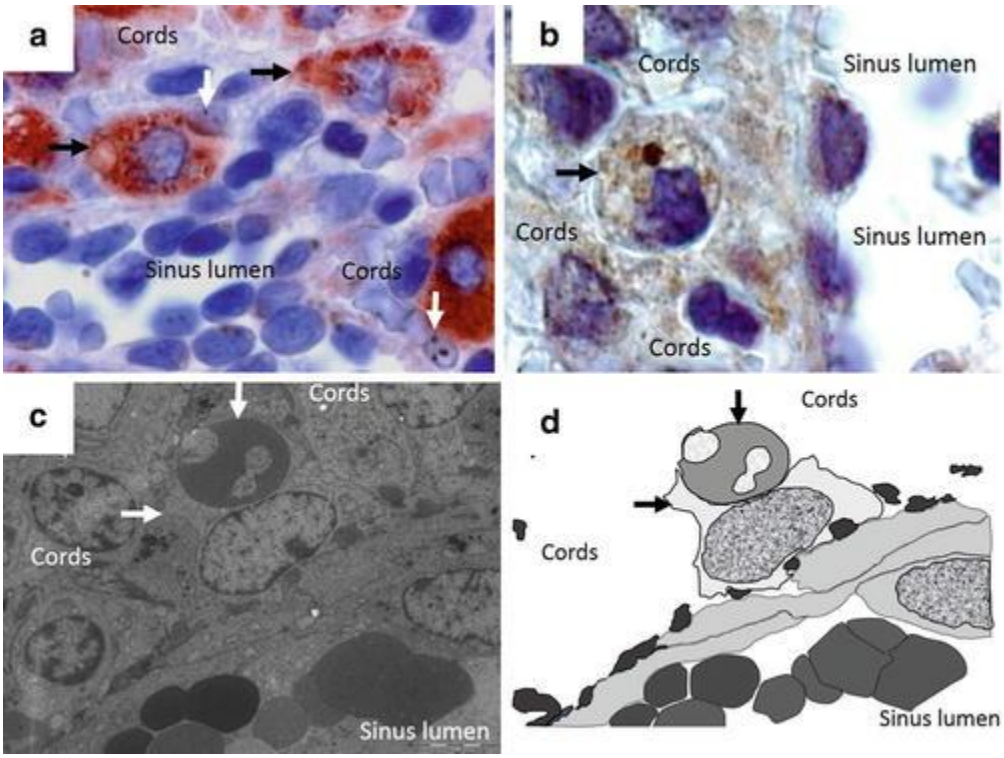


Fig. 6 Phagocytosis of rings in the cords of the red pulp

. Immunohistochemistry with an anti-CD68 (a, 400×), an anti-P. falciparum antibody (b, 600×), and transmission electron microscopy (2,000×) of a human spleen perfused ex vivo show rings (vertical arrows) either in close contact with macrophages (a, horizontal arrows) or as a small parasite remnant in a phagocytic cell in the cords (b)

7SpringerReferenceDr. Papa Alioune Ndour, Dr. Innocent Safeukui, Dr. Seidina Diakité, Dr. Julien Duez, Dr. Stéphane Jauréguiberry and Dr. Pierre BuffetRole of Spleen in H

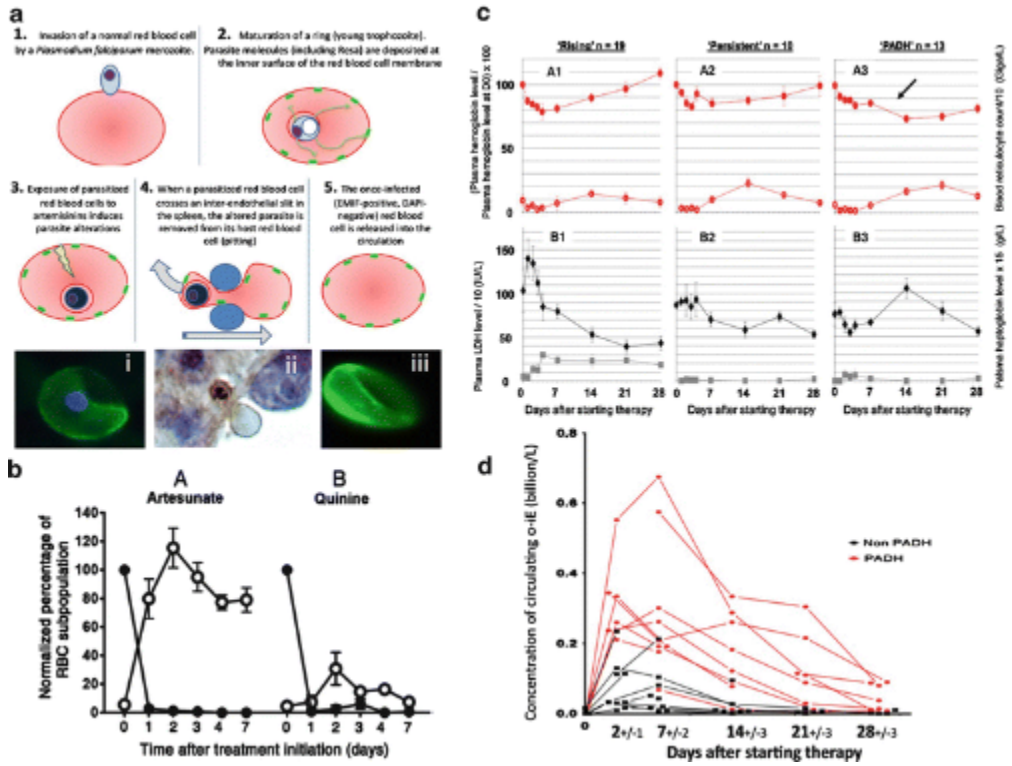


Fig. 7 Pitting in malaria

. Pitting of parasitized red blood cells exposed to artemisinins (a 1-5, i) occurs in the spleen (A4 and ii), and the concentration of once-infected RBC (iii) can be determined by visualizing the parasite antigen RESA by immunofluorescence (i, iii) or flow cytometry. Pitting accounts for the bulk of parasite clearance in a majority of travelers treated with artesunate but is far less intense in those treated with quinine (b, adapted from Ndour et al. JID 2015). In 15-25 % of travelers treated with artesunate for severe malaria, hemolytic episodes occur 1-3 weeks after treatment initiation (c, A3-B3), a separate entity related to pitting (d, From Jauréguiberry, Ndour et al. Blood 2014). The panel (b) was originally published in Ndour et al. J Infect Dis. 2015 Jan 15;211(2):290-7 and panel (c and d) were originally published in Jauréguiberry, Ndour et al Blood. 2014 Jul 10;124(2):167 © the American Society of Hematology

8SpringerReferenceDr. Papa Alioune Ndour, Dr. Innocent Safeuki, Dr. Seidina Duakité, Dr. Julien Duez, Dr. Stéphane Jauréguiberry and Dr. Pierre BuffetRole of Spleen in H

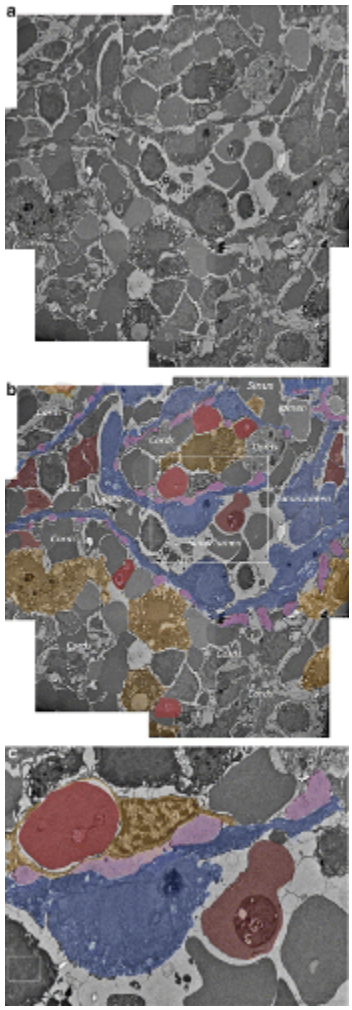


Fig. 8 Deposition of parasitized red blood cells in human spleens perfused ex vivo
. Transmission electron microscopy (2,000×, fusion of nine pictures) of a human spleen perfused with a mixture of rings and schizonts from an in vitro culture (FUP strain). On panel (b), basal fibers around sinuses are colored in purple, endothelial cells forming the wall of sinuses in blue, rings in light red, schizonts in dark red, and macrophages in orange. In the limits of this particular zone, most rings are in the cords along the abluminal side of sinus walls, and their external membrane is similar to that of uninfected red blood cells (c). Most schizonts are in the sinus lumen in close contact with endothelial cells. These features suggest mechanical retention of rings and cytoadherence of schizonts (see Fig. 9 for a 3-dimensional interpretation of these observations). A ring is surrounded by thin cytoplasmic extensions from a nucleated cell in the cords (c)

9SpringerReferenceDr. Papa Alioune Ndour, Dr. Innocent Safeuki, Dr. Seidina Diakité, Dr. Julien Duez, Dr. Stéphane Jauréguiberry and Dr. Pierre BuffetRole of Spleen in H

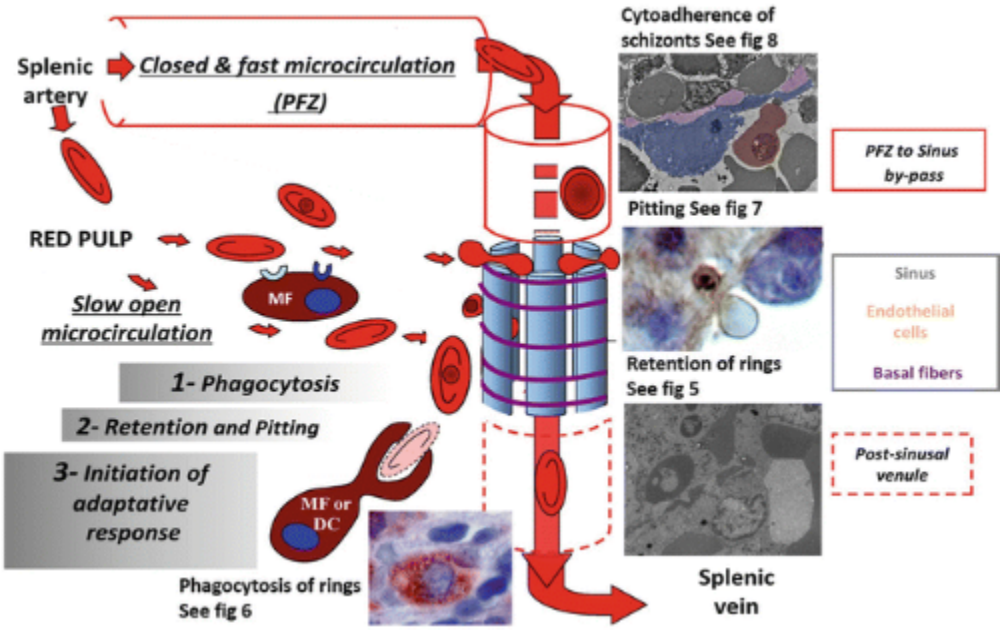


Fig. 9 Microanatomy of the filtering unit in the human spleen, a 3D framework to interpret the deposition of parasitized red blood cells in human malaria

. Blood from the splenic artery flows either in the fast or the closed microcirculation (see text). In the slow, open microcirculation, RBC leave endothelialized vessels to reach the cords. Mechanical retention and pitting occur preferentially at the sinus wall (see corresponding figures), while conventional cytoadherence of schizonts occurs preferentially in the sinus lumen that undeformable RBC reach following the fast microcirculation. This figure is adapted from Buffet et al. originally published in Blood. Buffet el al Blood. 2011 Jan 13;117(2):381-92 © the American Society of Hematology

Specificities of the Adaptive Immune Response in the Spleen

The spleen is also the largest lymphoid organ in the body (Figs. 2 and 3) and plays a key role in the control of infections by encapsulated bacteria, including Streptococcus pneumonia, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, and non-typhoid Salmonella. Besides conventional antigen-driven responses, the spleen hosts specific, original B-cell subpopulations that blur the boundaries of innate and adaptive immunity, the marginal zone B lymphocytes (Weill et al. 2009; Reynaud et al. 2012).

Malaria and Splenectomy

Features of P. falciparum infection in splenectomized patients have been reviewed (Bach et al. 2005; Buffet et al. 2011). With regard to malaria, splenectomized subjects can be either poorly immune (essentially travelers) or immune (subjects living in endemic countries) (Fig. 1). In naïve or poorly immune subjects, severe and fatal P. falciparum infections are approximately 10 times more frequent in splenectomized than in spleen-intact subjects. Also, parasitemia is higher, and circulating mature forms are observed more frequently in splenectomized than in non-splenectomized patients. These data strongly suggest that the splenic function innately protects patients from severe malaria. The situation seems different in immune subjects, in whom severity and fatality of P. falciparum infection is possibly increased but not to a large extent (Bach et al. 2005), although mature forms also circulate in excess. Taken together, these observations show that the spleen plays a specific role in the control of P. falciparum parasite loads, more intensely so in the absence than in the presence of preexisting acquired immunity. The peculiar observation of acute malaria attacks in chronic parasite carriers undergoing splenectomy is analyzed at the Hyperreactive Malarial Splenomegaly section.

Splenomegaly, Pathological and Functional Observations of the Spleen in P. falciparum Infection

The prevalence of splenomegaly in young children frequently exceeds 50 % in areas endemic for malaria and is a surrogate for the intensity of P. falciparum transmission (Snow et al. 1997) (Fig. 1). By contrast, spleen enlargement in travelers with acute malaria is generally too mild to translate into palpable splenomegaly (Price et al. 2001; Giha et al.

10SpringerReferenceDr. Papa Alioune Ndour, Dr. Innocent Safeukui, Dr. Seidina Diakité, Dr. Julien Duez, Dr. Stéphane Jauréguiberry and Dr. Pierre BuffetRole of Spleen in I

2009). In adults with severe malaria, spleen volume doubles or triples after 4-8 days of acute symptomatic infection, this process rarely culminating in pathological splenic rupture (Imbert et al. 2009). At autopsy, the spleen is darker than normal, reflecting the presence of malaria pigment, either in intact RBC harboring mature parasite forms or in macrophages (Figs. 7 and 8) (Pongponratn et al. 1987; Aikawa et al. 1990; Prommano et al. 2005). At the acute phase of fatal infection, infected and uninfected RBC preferentially accumulate in the spleen (Prommano et al. 2005). Cytoadherent mature forms are observed in the splenic sinuses (Prommano et al. 2005) (Fig. 8), RBC containing either parasites or parasite remnants are sometimes observed "squeezed" in inter-endothelial slits (Fig. 6) (Prommano et al. 2005; Urban et al. 2005) (Buffet 06), and phagocytosis of RBC is frequent (Pongponratn et al. 1987). Increased spleen weight results from the expansion of both the red and the white pulps (Urban et al. 2005). The red pulp is congested with RBC and numbers of macrophages are increased (Urban et al. 2005). The organ is modified with disappearance of the marginal zone and relative decrease in the number of B cells (Urban et al. 2005). Concentrations of MZB cells may be low also in the periphery in infants from malaria-endemic areas (Asito et al. 2011).

Experimental Observations

Experimental studies in P. falciparum-infected patients have shown that the clearance of normal RBC and RBC with surface or mechanical alterations (or both) is accelerated either before treatment in patients with splenomegaly or after the initiation of antimalarial therapy in most patients (Looareesuwan et al. 1987; Lee et al. 1989; Looareesuwan et al. 1991). This post-malarial, nonspecific splenic activation persists for several weeks after the attack (Lee et al. 1989; Looareesuwan et al. 1991), potentially explaining the higher risk of anemia in patients with recrudescent infection (Price et al. 2001; Phiri et al. 2012). There is no obvious indication of hyposplenism in studies performed in adults (Looareesuwan et al. 1987), but this may exist in young children (Gomez-Perez et al. 2014) or in very intense, severe infections (Dondorp et al. 1997; 1999). Macrophages overwhelmed by parasitized and uninfected RBC accumulating in the spleen may less efficiently play their physiological scavenging role. Because specific labeling or injection of infected RBC is not feasible, identifying how the spleen clears infected RBC before the initiation of antimalarial therapy is difficult. This question has been explored by challenging normal adult spleens perfused ex vivo with parasitized RBC from a culture, a model that replicates some of the features of early stages of infection in a naïve subject (Buffet et al. 2006; Safeukui et al. 2008). As expected, sticky and stiff mature forms were completely and rapidly retained. Surprisingly, a rapid, antibody-independent retention of a proportion of rings was also observed (Safeukui et al. 2008). This process was later related to the moderately but significantly reduced ability of rings to cross narrow spaces in vitro (Deplaine et al. 2011), induced itself by a reduction of the surface-to-volume ratio of these infected RBC (Safeukui et al. 2012, 2013) (Fig. 5). The potential impact of this process on the pathogenesis of P. falciparum infection in naïve or poorly immune subjects is discussed at the "Clinical Forms" section. The mechanisms and impact of splenic clearance of infected RBC after initiation of antimalarial therapy are discussed at the "Clearance of Parasitized RBC Exposed to Antimalarials" section.

The Spleen and the Diversity of Clinical Forms in P. falciparum Infection

Major Mechanisms of Malarial Anemia

Continuous or intermittent administration of antimalarial agents in African children partially prevents severe anemia (Greenwood 2006). Despite its high prevalence (Wickramasinghe and Abdalla 2000), dyserythropoiesis is not a major contributor to acute/subacute malarial anemia, as complete abrogation of erythropoiesis alone cannot induce a decrease in RBC biomass greater than 1 % per day (Seed et al. 1980). Conversely, in patients with relapse or prolonged infection, dyserythropoiesis likely plays a predominant role (Miller et al. 1994; Buffet et al. 2009; Fendel et al. 2010). At the chronic end of the continuum, hypersplenism and antibody-mediated hemolysis are predominant in hyperreactive malarial splenomegaly (Bates and Bedu-Addo 1997). When malarial anemia has an acute or subacute evolution (Lackritz et al. 1992; Seboxa and Snow 1997; Giha et al. 2009), RBC loss likely predominates (Price et al. 2001; Douglas et al. 2012). Rupture of iRBCs upon merozoite release is a smaller contributor to RBC loss than the loss of uninfected RBC (uRBC) (Price et al. 2001; Douglas et al. 2012).

How the Spleen May Drive P. falciparum Infection into Discrete Severe Clinical Forms

Profound anemia and impaired consciousness, the two major manifestations of severe malaria in African children, differ in

several aspects (Marsh et al. 1995; Reyburn et al. 2005). As compared to cerebral malaria, severe malarial anemia tends to occur sooner in life, in infants and very young children with frequent and large splenomegaly (Giha et al. 2009). Spleen size on admission inversely correlates with hemoglobin level. In non- or poorly immune children, acute cerebral malaria and severe malarial anemia thus likely result from distinct mechanisms with a variable involvement of the spleen. Although severely anemic children often have a longer evolution of fever than children with cerebral malaria, parasitemia is generally similar or lower (Snow et al. 1997; Buffet et al. 2009). This is reminiscent of the negative correlation between parasitemia and RBC loss at the time of diagnosis in nonimmune adults with malaria (Price et al. 2001). Taken together, these observations suggest that evolution toward severe malarial anemia is linked to the presence of a spleen-related mechanism absent in cerebral malaria. This mechanism could be the innate, mechanical retention of rings in the spleen (Buffet et al. 2011). Because this retention of rings in the spleen corresponds to the clearance of circulating parasites, the extent of splenic retention of RBC would determine parasite load increase and the pace at which initial steps of infection proceed. This connection between innate retention of rings and anemia is perfectly in line with the correlation between splenomegaly and decreased hematocrit or hemoglobin level and slower evolution of infection in anemic patients (Giha et al. 2009). Spleen volume measured by ultrasounds is significantly greater in children with severe anemia (lethality 1.9 %) than in those with cerebral malaria (lethality 29 %) (Kotlyar et al. 2014). Spleen weight is also significantly and markedly greater in children who survive the malaria attack than in those who die (Kotlyar et al. 2014). The "ring splenic retention" model thus parsimoniously reconciles several epidemiological, clinical, and experimental aspects of P. falciparum malaria. However, it has not been directly confirmed in infected subjects and leaves several questions unanswered. How and why do some infected children tolerate high parasitemia with few symptoms and no severe manifestations? From the parasite perspective, what is the selective advantage of engaging into the costly process of parasite production (multiplication) followed by destruction (retention in the spleen) rather than directly regulating parasite loads through slower multiplication? Not least, splenic retention of parasitized RBC is expected to result in parasite death before reinvasion can occur, but this assumption has not yet been explored experimentally.

How Age of the Infected Subject Influences the Severity of Malaria

In high-transmission areas, P. falciparum infection is severe only in young children, likely because older children and adults are protected by acquired immunity (Seboxa and Snow 1997; Bull and Marsh 2002). By contrast, naïve children have a smaller risk of life-threatening severe malaria than naïve adults (Legros et al. 2007). Age of the host as a risk factor for cerebral malaria and severe malarial anemia is partially independent from the intensity of transmission (Snow et al. 1997; Reyburn et al. 2005) thus not only reflects acquisition of immunity but also age-dependent innate protective mechanisms. Older patients may therefore have less efficient innate parasite clearance mechanisms than do younger patients (Dondorp et al. 2008). If a single, age-related mechanism altogether precipitates severe malarial anemia and protects against cerebral malaria (Buffet et al. 2009), this explains why the risk of cerebral malaria increases and the risk of severe malarial anemia decreases as children grow older (Reyburn et al. 2005). A critical determinant of survival to malaria attacks on a life scale is thus "the ability to develop antigen-specific immunity early in life during a period when innate protective mechanisms may operate" (Snow et al. 1997). Interestingly, there are striking similarities between malaria and babesiosis in that perspective. In areas of intense Babesia transmission, hosts become infected early in life and develop immunity to infection. A fully protected adult herd favors enzootic stability (Zintl et al. 2005). In areas of low transmission, severe babesiosis is common because some animals acquire infection while the window of innate resistance (in young subjects) has passed. Like P. falciparum, Babesia bovis and B. divergens infect RBC, and their biomass increases faster in splenectomized hosts (Zintl et al. 2005). The generic mechanisms of innate resistance of young hosts may be similar in babesiosis and malaria: a spleen-dependent retention or destruction (or both) of circulating parasitized RBC.

The Spleen and the Transmission of P. falciparum

For a P. falciparum population in a human host, sustained survival means achieving transmission to an Anopheles vector. Before transmission occurs, the parasite population is exposed to two opposed deadly threats: generating too few transmissible individuals to achieve transmission and generating too many individuals who will kill the host before transmission occurs. Cerebral malaria and multiorgan failure are associated with a high parasite biomass, rarely last more than a few days and, when fatal, abrogate any possibility of transmission. Severe malarial anemia is associated with a moderately high parasite biomass, has a relatively slow evolution, and is rarely fatal. This form is thus more

advantageous for the host and for the parasite, as the pace and extent of parasite load increase are compatible with both host survival and parasite transmission (Buffet et al. 2009). In P. falciparum-infected travelers, gametocyte carriage on admission is more frequent in patients with uncomplicated attacks and anemia than in travelers with intense attacks (Roberts et al. 2013). In P. falciparum infection, only mature stage gametocytes circulate, and their maturation takes 10-14 days. Maturation starts during asymptomatic infection (prepatent period) and reaches fruition at the end of the first week of symptomatic infection. In travelers, this symptomatic stage generally lasts less than 5 days, too short a period for gametocytes to complete their maturation and appear in circulation. By contrast, duration of fever before diagnosis in patients with malarial anemia is generally longer, leaving enough time for mature gametocytes to reach moderate or high density in circulation (Price et al. 1999). This is a reasonable explanation for their higher prevalence in anemic patients (as assessed by the poorly sensitive microscopy), but anemia per se may also directly enhance gametocyte circulation. Thus, by contributing to the innate control of asexual loads, the spleen paradoxically and indirectly favors transmission, if only by allowing the host to survive the first days of a severe symptomatic infection. However, because it senses mechanical alterations of RBC, the spleen also directly impacts on the circulation of gametocytes. Immature gametocytes accumulate in extravascular spaces of the bone marrow (Farfour et al. 2012; Aguilar et al. 2014; Joice et al. 2014) and are generally absent from the peripheral circulation. Immature gametocytes have been observed in the peripheral blood of a few splenectomized or hyposplenic patients but generally not in spleen-intact P. falciparum-infected patients (Israeli et al. 1987; Bachmann et al. 2009; Tiburcio et al. 2012). Interestingly, immature gametocytes are stiff and unable to cross narrow slits in vitro (Aingaran et al. 2012; Tiburcio et al. 2012). The spleen is therefore expected to mechanically retain any immature gametocyte that would end up in the circulation after escaping its niche in the bone marrow or elsewhere (Buffet et al. 2011) (Silvestrini et al. 2012). By contrast, mature gametocytes are deformable, and a majority of them can cross narrow slits, an observation consistent with their presence in the peripheral blood (Tiburcio et al. 2012). Whether deformability changes are related to modifications of the RBC (Tiburcio et al. 2012), the parasite, or both is controversial although several observations point to predominant alterations in the parasite itself (Dearnley et al. 2012; Dixon et al. 2012; Hanssen et al. 2012). One strategy toward P. falciparum-malaria elimination currently focuses on the discovery of compounds which can interrupt the transmission of the mature stage V gametocytes, from humans to the Anopheles vector (Blagborough et al. 2013; Churcher et al. 2013). Several screening assays have been proposed during the last few years, in a bid to discover agents that will kill gametocytes (Duffy et al. 2013). An alternative approach would identify agents that stiffen mature gametocytes, thus triggering their mechanical retention in the spleen (Duez and Holleran, SLAS conference 2015). Once cleared from the circulation, mature gametocytes will be removed from the transmission cycle.

The Spleen and Clearance of P. falciparum-Infected RBC Exposed to Antimalarials, Pitting, and Post-Artemisinin Delayed Hemolysis

Pitting

Following the administration of artesunate or quinine, the clearance of RBC containing dying parasites or dead parasite remnants is prolonged in splenectomized patients (Lee et al. 1989; Chotivanich et al. 2000; Pongponratn et al. 2000; Chotivanich et al. 2002) Because differentiating RBC harboring live parasites from RBC harboring dead parasites ("coffin-RBC") is not easy, many splenectomized patients receive a second line of antimalarial therapy for suspected treatment failure. However, appropriate fever clearance and sustained cure in most of those who are not re-treated indicate that killing parasites is more important for cure than removing "coffin-RBC" from the circulation. In patients with a functional spleen (Newton et al. 2001; Jauréguiberry et al. 2014), expulsion of dead parasites from their coffin-RBCs (the pitting process) operates parasite clearance, more intensely so after treatment with artemisinin derivatives than after treatment with quinine. The rapid action of artemisinins on circulating rings (Watkins et al. 1993; Udomsangpetch et al. 1996) likely explains this difference. Interestingly, artemisinin-induced parasite remnants are morphologically reminiscent of Howell-Jolly bodies (i.e., erythroblast nuclear remnants observed on Giemsa-stained smears in a proportion of RBC from splenectomized patients). Pitting of coffin-RBC may thus result from the subversion of a physiological phenomenon (i.e., removal of Howell-Jolly bodies from circulating RBC).

Pitting and Slow Parasite Clearance in Artemisinin-Treated Patients

Rising parasite resistance to artemisinin derivatives in Southeast Asia induces slow parasite clearance (Dondorp et al.

2009), a parasite-encoded trait (Anderson et al. 2010) related to multiple alleles in the parasite propeller Kelch-13 (Ariey et al. 2014). Slow clearance may be partly explained by a slower transformation of ring stage parasites into undeformable parasite remnants, thereby delaying pitting. There are geographical differences in pitting. Pitting accounts indeed for a variable proportion of parasite clearance in malaria patients treated with artemisinins. In travelers, and in nonimmune patients in Thailand, the vast majority of circulating rings are replaced by pitted RBC in the 24-48 h following initiation of intravenous artesunate for severe malaria (Chotivanich et al. 2000; Newton et al. 2001; Chotivanich et al. 2002; Jauréguiberry et al. 2014; Ndour et al. 2015). In Africa, pitting-related clearance is predominant in children aged 1.5-4 years and starts after a 6-h lag phase that corresponds to the time required for the pitting process to be triggered. In older African children, the peak concentration of circulating pitted RBC is low (approximately one third of initial parasitemia), but parasite clearance is faster than in younger children. Part of parasite clearance in older children is thus operated by mechanisms more rapid than pitting (Ndour et al. 2015). Antimalarial immunity correlates with fast artemisinin-induced parasite clearance and low pitting rates, suggesting that these very fast, pitting-independent mechanisms involve immune effectors, the nature and target of which remain to be identified (Ndour et al. 2015). More detailed studies in Africa and in Southeast Asia will delineate how the diversity of parasite clearance mechanisms may or may not impact the spread of P. falciparum resistance in Africa.

Pitting and Post-Artemisinin Delayed Hemolysis

Pitting of coffin-RBCs has been related to a recently described adverse event of artemisinins, post-artemisinin delayed hemolysis (PADH) (Jauréguiberry et al. 2014). One tenth to one fourth of travelers and children in endemic countries treated with artesunate for severe malaria are affected by hemolytic episodes that occur a few weeks after initial cure (Zoller et al. 2011), (Kreeftmeijer-Vegter et al. 2012; Rolling et al. 2013, 2014). These episodes affect patients in whom fever has resolved and complete parasite clearance has occurred. After parasite expulsion, pitted RBC return to the circulation, almost intact. Pitting is thus a very original mechanism of antimicrobial clearance that spares the host cell. Pitted RBC look normal on conventional blood smears but can be detected by labeling the parasite antigen RESA associated with cytoplasmic layer of the RBC membrane (Angus et al. 1997). In travelers, the peak concentration of circulating pitted RBC is higher in patients who had subsequent PADH than in those with other patterns of anemia (Jauréguiberry et al. 2014). Quantification of pitted RBC during the first week posttreatment discriminated patients with PADH with high sensitivity and specificity. In summary, circulating infected RBC spared by pitting during artesunate treatment were subsequently cleared a few weeks later, triggering PADH. Whereas the deferred clearance of pitted RBC explains all the RBC loss during hemolytic episodes or whether complementary mechanisms exist remains to be elucidated. The WHO has called for the urgent setup and validation of a test predicting PADH. Current methods to count pitted RBC (immunofluorescence and flow cytometry) can be used at reference hospitals on fresh samples but cannot be widely deployed in Africa. Research is needed to generate simple tests to predict PADH at the bedside.

Malaria, the Spleen, and Hemoglobinopathies

A few hemoglobin polymorphisms protect against severe falciparum malaria, including the homozygous carriage of hemoglobin C (HbC) (Modiano et al. 2001) and the heterozygous carriage of hemoglobin S (Marsh et al. 1989). Protection conferred by heterozygous carriage (HbAS) is well established for clinical attacks of malaria and even stronger for cerebral malaria and severe malarial anemia (Marsh et al. 1989). HbAS patients also have higher circulating IgG antibody levels to P. falciparum antigens than controls (Marsh et al. 1989; Cabrera et al. 2005), but in hyperendemic areas, HbAS-mediated protection is displayed soon in life (Aidoo et al. 2002; Kreuels et al. 2010). Reduced expression of surface adhesins on mature forms is a convincing explanation for the protection against cerebral malaria (Cholera et al. 2008). Antimalarial protection related to HbAS carriage may be due also to the reduced parasite growth in HbAS RBC at low oxygen tensions or to their enhanced clearance from the circulation (Weatherall 2008), either as rings or as poorly adherent mature forms. Upon exposure to low oxygen partial pressure, HbAS rings sickle faster than do HbAS uninfected RBC (Luzzatto et al. 1970; Roth et al. 1978). This process is expected to occur in priority in the slow microcirculation of the spleen, where exposure to low oxygen tension lasts longer that in most (if not all) microcirculatory beds. Whether experimental conditions used to induce sickling in vitro (Luzzatto et al. 1970; Roth et al. 1978) correspond or not to conditions in vivo remains to be confirmed. Recent evidence indicates that homozygous HbS carriage also attenuates the clinical severity of infection (Komba et al. 2009; Makani et al. 2010). Prevalence and density of parasitemia are lower in HbSS children than in control children (Komba et al. 2009). However, protection is partial, and malaria is associated with

severe anemia and death in hospitalized homozygous HbS patients (Makani et al. 2010). The prevalence of parasitemia was identical or slightly greater in HbSS than in HbAS subjects (Komba et al. 2009; Sadarangani et al. 2009; Makani et al. 2010). Two mutually counteracting processes may explain the more limited protection afforded by HbSS compared to HbAS: high concentration of HbS would limit growth and adherence of parasitized RBC, but functional asplenia (almost constant in SCD patients) would limit this benefit. Prospective analysis of splenic function in HbSS children with/without acute malaria is needed, but the slow parasite clearance in HbSS patients treated with ACT is already a strong indicator of impaired splenic function in these patients (Adjei et al. 2014). Sickle cell trait has been also associated with a higher transmission of P. falciparum (Gouagna et al. 2010; Lawaly et al. 2010), likely related to higher prevalence of asymptomatic parasitemia (including gametocytemia) in these children. The spleen likely favors this process by maintaining parasitemia below the symptomatic threshold.

Malaria Attacks Following Splenectomy and Hyperreactive Malarial Splenomegaly

Symptomatic malaria attacks may occur a few weeks after splenectomy in subjects no longer living in an endemic country but carrying very low numbers of parasites (Bidegain et al. 2005; Bachmann et al. 2009). In this context, splenectomy is generally performed for suspected splenic lymphoma in a patient without fever and no overt sign of malaria but with unexplained splenomegaly and signs of hypersplenism (fatigue, abdominal discomfort, anemia, thrombocytopenia). When performed before splenectomy, conventional search for parasitized RBC on thin or thick smears is generally negative, but PCR for P. falciparum is positive; antibody titers to P. falciparum antigens are very high as well as total IgM concentrations. These are the major diagnostic features of hyperreactive Malarial splenomegaly (HMS), a relatively rare, ethnicity-dependent clinical form of malaria that many clinicians ignore (Hommel et al. 2014). The reasons why low-grade carriage of P. falciparum is tolerated without conventional attacks but with massive splenomegaly are not clear. If left untreated for years or decades, HMS portends a significant risk of evolution to splenic marginal zone lymphoma, highly reminiscent of the same complication observed in patients with chronic HCV infection (Hermine et al. 2002; Suarez et al. 2006). If treated soon enough with antimalarial agents, HMS has a positive outcome with regression of splenomegaly and signs of hypersplenism (Bryceson et al. 1983). A short conventional course is enough if the patient lives in a non-endemic country (Van den Ende et al. 2000). In patients still exposed to the risk of transmission, antimalarial prophylaxis is indicated as reinfection would lead to relapse that may remain unnoticed until lymphoma occurs. How can low parasite loads persist for several years in patients with HMS? In the single patient in whom this has been explored to date, there was no expression of genes for surface adhesins and cytoadherence of parasitized RBC during the first cycle after sample collection, but both were progressively restored in culture (Bachmann et al. 2009). This likely reflects the selection of adhesin-less variants (Bachmann et al. 2009) that undergo intrasplenic development at very low levels (Bates and Bedu-Addo 1997; Bachmann et al. 2009). This chronic parasite carriage is associated with an almost constant positivity of the antinuclear antibody test with a specific nucleocytoplasmic fluorescence pattern (Hommel et al. 2014). When the spleen is removed in such patients, mechanical retention, the only powerful mechanism able to clear adhesin-less variants, disappears, giving rise to a rapid increase of parasite loads and an acute clinical attack.

Role of the Spleen in Malaria Due To Plasmodium Species Other than P. falciparum

Although available data is relatively limited, it suggests that the spleen is also central in the pathogenesis of malaria due to non-falciparum species. There are several similarities with regard to the impact the spleen on malaria be it due to P. falciparum or P. vivax, including the possible involvement of both species in hyperreactive malarial splenomegaly (Torres et al. 2003; A-Elgayoum et al. 2011), slower parasite clearance after antimalarial therapy (Singh et al. 2002), and possible (Mahmoudvand et al. 2012) though inconstant (Looareesuwan et al. 1993) severity of infection in splenectomized patients. P. vivax induces a proliferation of plasmablasts in the splenic red pulp and accumulation of parasitized reticulocytes in the cords (Machado Siqueira et al. 2012). As opposed to P. falciparum, P. vivax increases rather than decreases the deformability of parasitized RBC (Suwanarusk et al. 2004; Handayani et al. 2009) which suggests parasite-host interactions based on different cellular processes (del Portillo et al. 2004; Lacerda et al. 2012). Ongoing and future explorations will likely explain why and how, in spite of lower parasitemia, P. vivax infection is associated with a

similar level of splenomegaly, a similar (or greater) risk of pathological splenic rupture and splenic infarction (Imbert et al. 2009). The risk of anemia is moderately lower in P. vivax malaria than in P. falciparum malaria (Douglas et al. 2013). Data on P. ovale are limited to case reports of splenic rupture (Imbert et al. 2009), those on P. malariae on late attacks in patients with splenomegaly (Vinetz et al. 1998; Schwartz et al. 2003) or hyposplenism (Hommel et al. 2013). When P. knowlesi was still thought to infect only nonhuman primates, major pathophysiological mechanisms such as cytoadherence and antigenic variations were uncovered in this model (Brown and Brown 1965; Barnwell et al. 1982; Howard et al. 1982; Barnwell et al. 1983; Howard et al. 1983), including the observation that SICAvar products were expressed on the surface of parasitized RBC in spleen-intact but not in splenectomized animals (Barnwell et al. 1982; Lapp et al. 2013). Whether this process results from the selection of parasites in an "off state" with regard to adhesion expression or to the induction of SICAvar expression by a spleen-related signal remains to be determined. This may help understand the frequent liver and lung involvement and frequent presence of mature forms in circulation in humans suffering severe P. knowlesi infection (Singh et al. 2004; Barber et al. 2013).

Conclusion

Mechanical sensing of RBC in the spleen (Safeukui et al. 2008) explains part of its role in malaria pathogenesis (Buffet et al. 2011; Del Portillo et al. 2012). Although the exact intensity of the mechanical retention of rings in the spleen of infected subjects is still unknown, this process has now been dissected in vitro (Herricks et al. 2009; Deplaine et al. 2011; Herricks et al. 2012), ex vivo (Safeukui et al. 2013), and in silico (Bowl et al. 2011). The parasite antigen RESA has been associated with increased retention of rings exposed for a few hours to 40-41 °C (Diez-Silva et al. 2012). Is the spleen protective against severe malaria only by mechanically clearing rings? During the first days of infection in naïve subjects, spleen-specific cell subsets such as marginal zone B cells could also play an important protective role, but the target antigens that would trigger their effect on rings have not been identified yet and may not exist. Their potential effect on adherent mature forms deserves further investigations. Observations on rings (Cranston et al. 1984; Safeukui et al. 2008; Deplaine et al. 2011) have triggered explorations on gametocytes (Aingaran et al. 2012; Tiburcio et al. 2012), revealing abrupt changes in deformability upon maturation, a new, convincing explanation for the presence of mature gametocytes in the circulation. Pharmacological "stiffening" of mature gametocytes may efficiently reduce the transmission of P. falciparum. Not least, the spleen-specific parasite clearance process in patients treated with artemisinins and pitting (Angus et al. 1997) triggers an unexpected adverse event of artesunate in severe malaria: delayed hemolysis (Zoller et al. 2011; Jauréguiberry et al. 2014). Early quantification of pitted RBC may help predict these anemic episodes. This is a second potential medical application resulting from the better understanding of the role of the spleen in malaria. In return, splenic explorations in malaria have consolidated knowledge on the physiology of the spleen, on clearance kinetics (Looareesuwan et al. 1987), and on microcirculatory pathways (Safeukui et al. 2008) and provided new tools to explore its filtering function (Herricks et al. 2009; Deplaine et al. 2011; Ferrer et al. 2012; Herricks et al. 2012; Cooke et al. 2014; Ferrer et al. 2014; Rigat-Brugarolas et al. 2014).

Cross-References

- Alteration of the Red Blood Cell Membrane
- Case Management Diagnosis of Malaria, Overview
- Cytoadherence
- Fluorescent Microscopy and Fluorescent Labelling
- Protection from Malaria By Hemoglobinopathies
- Red Cell Deformability and Malaria Pathophysiology

References

- Adjei GO, Goka BQ, et al. A randomized trial of artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine in Ghanaian paediatric sickle cell and non-sickle cell disease patients with acute uncomplicated malaria. Malar J. 2014;13(1):369.
- A-Elgayoum SM, El-Rayah el AE, et al. Validation of PCR for detection and characterization of parasitaemia in massive splenomegaly attributed clinically to malaria infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70(2):207-12.

- Aguilar R, Magallon-Tejada A, et al. Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. Blood. 2014;123(7):959-66.
- Aidoo M, Terlouw DJ, et al. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. Lancet. 2002;359(9314):1311-2.
- Aikawa M, Iseki M, et al. The pathology of human cerebral malaria. Am J Trop Med Hyg. 1990;43(2 Pt 2):30-7.
- Aingaran M, Zhang R, et al. Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Cell Microbiol. 2012;14(7):983-93.
- Anderson TJ, Nair S, et al. High heritability of malaria parasite clearance rate indicates a genetic basis for artemisinin resistance in western Cambodia. J Infect Dis. 2010;201(9):1326-30.
- Angus BJ, Chotivanich K, et al. In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria. Blood. 1997;90(5):2037-40.
- Ariey F, Witkowski B, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. Nature. 2014;505(7481):50-5.
- Asito AS, Piriou E, et al. Suppression of circulating $IgD^{+}CD27^{+}$ memory B cells in infants living in a malaria-endemic region of Kenya. Malar J. 2011;10:362.
- Bach O, Baier M, et al. Falciparum malaria after splenectomy: a prospective controlled study of 33 previously splenectomized Malawian adults. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005;99(11):861-7.
- Bachmann A, Esser C, et al. Absence of erythrocyte sequestration and lack of multicopy gene family expression in Plasmodium falciparum from a splenectomized malaria patient. PLoS One. 2009;4(10):e7459.
- Barber BE, William T, et al. A prospective comparative study of knowlesi, falciparum, and vivax malaria in Sabah, Malaysia: high proportion with severe disease from Plasmodium knowlesi and Plasmodium vivax but no mortality with early referral and artesunate therapy. Clin Infect Dis. 2013;56(3):383-97.
- Barnwell JW, Howard RJ, et al. Altered expression of Plasmodium knowlesi variant antigen on the erythrocyte membrane in splenectomized rhesus monkeys. J Immunol. 1982;128(1):224-6.
- Barnwell JW, Howard RJ, et al. Splenic requirement for antigenic variation and expression of the variant antigen on the erythrocyte membrane in cloned Plasmodium knowlesi malaria. Infect Immun. 1983;40(3):985-94.
- Bates I, Bedu-Addo G. Review of diagnostic criteria of hyper-reactive malarial splenomegaly. Lancet. 1997;349(9059):1178.
- Bidegain F, Berry A, et al. Acute Plasmodium falciparum malaria following splenectomy for suspected lymphoma in 2 patients. Clin Infect Dis. 2005;40(11):e97-100.
- Blagborough AM, Churcher TS, et al. Transmission-blocking interventions eliminate malaria from laboratory populations. Nat Commun. 2013;4:1812.
- Bow H, Pivkin IV, Diez-Silva M, Goldfless SJ, Dao M, Niles JC, Suresh S, Han J. A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria. Lab Chip. 2011 Mar 21;11(6):1065-73.
- Brown KN, Brown IN. Immunity to malaria: antigenic variation in chronic infections of Plasmodium knowlesi. Nature. 1965;208(5017):1286-8.
- Bryceson A, Fakunle YM, et al. Malaria and splenomegaly. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983;77(6):879.
- Buffet PA, Milon G, et al. Ex vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions. Blood. 2006;107(9):3745-52.
- Buffet PA, Safeukui I, et al. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. Curr Opin Hematol. 2009;16(3):157-64.
- Buffet PA, Safeukui I, et al. The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology. Blood. 2011;117(2):381-92.
- Bull PC, Marsh K. The role of antibodies to Plasmodium falciparum-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. Trends Microbiol. 2002;10(2):55-8.
- Burger P, Hilarius-Stokman P, et al. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. Blood. 2012;119(23):5512-21.
- Cabrera G, Cot M, et al. The sickle cell trait is associated with enhanced immunoglobulin G antibody responses to Plasmodium falciparum variant surface antigens. J Infect Dis. 2005;191(10):1631-8.
- Cholera R, Brittain NJ, et al. Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(3):991-6.
- Chotivanich K, Udomsangpetch R, et al. The mechanisms of parasite clearance after antimalarial treatment of

Plasmodium falciparum malaria. J Infect Dis. 2000;182(2):629-33.
- Chotivanich K, Udomsangpetch R, et al. Central role of the spleen in malaria parasite clearance. J Infect Dis. 2002;185(10):1538-41.
- Churcher TS, Bousema T, et al. Predicting mosquito infection from Plasmodium falciparum gametocyte density and estimating the reservoir of infection. Elife. 2013;2:e00626.
- Cooke BM, Stuart J, et al. The cellular and molecular rheology of malaria. Biorheology. 2014;51(2-3):99-119.
- Cranston HA, Boylan CW, et al. Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability. Science. 1984;223(4634):400-3.
- David PH, Hommel M, et al. Parasite sequestration in Plasmodium falciparum malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983;80(16):5075-9.
- Dearnley MK, Yeoman JA, et al. Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of Plasmodium falciparum gametocytes. J Cell Sci. 2012;125(Pt 8):2053-63.
- del Portillo HA, Lanzer M, et al. Variant genes and the spleen in Plasmodium vivax malaria. Int J Parasitol. 2004;34(13-14):1547-54.
- Del Portillo HA, Ferrer M, et al. The role of the spleen in malaria. Cell Microbiol. 2012;14(3):343-55.
- Deplaine G, Safeukui I, 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.
- Diez-Silva M, Park Y, et al. Pf155/RESA protein influences the dynamic microcirculatory behavior of ring-stage Plasmodium falciparum infected red blood cells. Sci Rep. 2012;2:614.
- Dixon MW, Dearnley MK, et al. Shape-shifting gametocytes: how and why does P. falciparum go banana-shaped? Trends Parasitol. 2012;28(11):471-8.
- Dondorp AM, Angus BJ, et al. Prognostic significance of reduced red blood cell deformability in severe falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 1997;57(5):507-11.
- Dondorp AM, Angus BJ, et al. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 1999;60(5):733-7.
- Dondorp AM, Lee SJ, et al. The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. Clin Infect Dis. 2008;47(2):151-7.
- Dondorp AM, Nosten F, et al. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. N Engl J Med. 2009;361(5):455-67.
- Douglas NM, Anstey NM, et al. The anaemia of Plasmodium vivax malaria. Malar J. 2012;11:135.
- Douglas NM, Lampah DA, et al. Major burden of severe anemia from non-falciparum malaria species in Southern Papua: a hospital-based surveillance study. PLoS Med. 2013;10(12):e1001575. discussion e1001575.
- Duffy S, Avery VM. Identification of inhibitors of Plasmodium falciparum gametocyte development.Malar J. 2013 Nov 11;12:408. doi: 10.1186/1475-2875-12-408.
- Duez J, Holleran H, Ndour PA, Loganathan S, Amireault P, Français O, El Nemer W, Le Pioufle B, Amado IF, Garcia S, Chartrel N, Le Van Kim C, Lavazec C, Avery VM, Buffet PA. Block parasitized red blood cells in the human spleen to block the transmission of Plasmodium falciparum malaria. 4th SLAS 2015 annual conference poster #1004, Washington, USA.
- Farfour E, Charlotte F, et al. The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for Plasmodium falciparum gametocyte maturation? Malar J. 2012;11(1):285.
- Fendel R, Brandts C, et al. Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia. PLoS One. 2010;5(4):e10038.
- Ferrer M, Martin-Jaular L, et al. Intravital microscopy of the spleen: quantitative analysis of parasite mobility and blood flow. J Vis Exp. 2012;59:3609.
- Ferrer M, Martin-Jaular L, et al. Imaging of the spleen in malaria. Parasitol Int. 2014;63(1):195-205.
- Giha HA, Elghazali G, et al. Severe malaria in an unstable setting: clinical and laboratory correlates of cerebral malaria and severe malarial anemia and a paradigm for a simplified severity scoring. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(6):661-5.
- Gomez-Perez GP, van Bruggen R, et al. Plasmodium falciparum malaria and invasive bacterial co-infection in young African children: the dysfunctional spleen hypothesis. Malar J. 2014;13(1):335.
- Gouagna LC, Bancone G, et al. Genetic variation in human HBB is associated with Plasmodium falciparum transmission. Nat Genet. 2010;42(4):328-31.

- Greenwood B. Review: intermittent preventive treatment-a new approach to the prevention of malaria in children in areas with seasonal malaria transmission. Trop Med Int Health. 2006;11(7):983-91.
- Groom AC, Schmidt EE, et al. Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. Scanning Microsc. 1991;5(1):159-73. discussion 173-154.
- Handayani S, Chiu DT, et al. High deformability of Plasmodium vivax-infected red blood cells under microfluidic conditions. J Infect Dis. 2009;199(3):445-50.
- Hanssen E, Knoechel C, et al. Soft X-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of Plasmodium falciparum. J Struct Biol. 2012;177(2):224-32.
- Hermine O, Lefrere F, et al. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. N Engl J Med. 2002;347(2):89-94.
- Herricks T, Antia M, et al. Deformability limits of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. Cell Microbiol. 2009;11(9):1340-53.
- Herricks T, Seydel KB, et al. Estimating physical splenic filtration of Plasmodium falciparum-infected red blood cells in malaria patients. Cell Microbiol. 2012;14(12):1880-91.
- Hommel M, David PH, et al. Surface alterations of erythrocytes in Plasmodium falciparum malaria. Antigenic variation, antigenic diversity, and the role of the spleen. J Exp Med. 1983;157(4):1137-48.
- Hommel B, Galloula A, et al. Hyposplenism revealed by Plasmodium malariae infection. Malar J. 2013;12:271.
- Hommel B, Charuel JL, et al. Chronic malaria revealed by a new fluorescence pattern on the antinuclear autoantibodies test. PLoS One. 2014;9(2):e88548.
- Howard RJ, Barnwell JW, et al. Radioiodination of new protein antigens on the surface of Plasmodium knowlesi schizont-infected erythrocytes. Mol Biochem Parasitol. 1982;6(6):343-67.
- Howard RJ, Barnwell JW, et al. Antigenic variation of Plasmodium knowlesi malaria: identification of the variant antigen on infected erythrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983;80(13):4129-33.
- Imbert P, Rapp C, et al. Pathological rupture of the spleen in malaria: analysis of 55 cases (1958-2008). Travel Med Infect Dis. 2009;7(3):147-59.
- Israeli A, Shapiro M, et al. Plasmodium falciparum malaria in an asplenic man. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;81(2):233-4.
- Jauréguiberry S, Ndour PA, et al. Post-artesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the live-saving effect of artemisinin in severe malaria. Blood. 2014 Jul 10;124(2):167-75.
- Joice R, Nilsson SK, et al. Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. Sci Transl Med. 2014;6(244):244re245.
- Karanikas G, Zedwitz-Liebenstein K, et al. Platelet kinetics and scintigraphic imaging in thrombocytopenic malaria patients. Thromb Haemost. 2004;91(3):553-7.
- Komba AN, Makani J, et al. Malaria as a cause of morbidity and mortality in children with homozygous sickle cell disease on the coast of Kenya. Clin Infect Dis. 2009;49(2):216-22.
- Kotlyar S, Nteziyaremye J, et al. Spleen volume and clinical disease manifestations of severe Plasmodium falciparum malaria in African children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2014;108(5):283-9.
- Koyama S, Aoki S, et al. Electron microscopic observations of the splenic red pulp with special reference to the pitting function. Mie Med J. 1964;14(2):143-88.
- Kreeftmeijer-Vegter AR, van Genderen PJ, et al. Treatment outcome of intravenous artesunate in patients with severe malaria in the Netherlands and Belgium. Malar J. 2012;11:102.
- Kreuels B, Kreuzberg C, et al. Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth. Blood. 2010;115(22):4551-8.
- Lacerda MV, Fragoso SC, et al. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of Plasmodium vivax malaria: to what extent does this parasite kill? Clin Infect Dis. 2012;55(8):e67-74.
- Lackritz EM, Campbell CC, et al. Effect of blood transfusion on survival among children in a Kenyan hospital. Lancet. 1992;340(8818):524-8.
- Lapp SA, Korir-Morrison C, et al. Spleen-dependent regulation of antigenic variation in malaria parasites: Plasmodium knowlesi SICAvar expression profiles in splenic and asplenic hosts. PLoS One. 2013;8(10):e78014.
- Lawaly YR, Sakuntabhai A, et al. Heritability of the human infectious reservoir of malaria parasites. PLoS One.

2010;5(6):e11358.
- Lee SH, Looareesuwan S, et al. Antibody-dependent red cell removal during P. falciparum malaria: the clearance of red cells sensitized with an IgG anti-D. Br J Haematol. 1989;73(3):396-402.
- Legros F, Bouchaud O, et al. Risk factors for imported fatal Plasmodium falciparum malaria, France, 1996-2003. Emerg Infect Dis. 2007;13(6):883-8.
- Looareesuwan S, Ho M, et al. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. N Engl J Med. 1987;317(11):675-9.
- Looareesuwan S, Davis TM, et al. Erythrocyte survival in severe falciparum malaria. Acta Trop. 1991;48(4):263-70.
- Looareesuwan S, Suntharasamai P, et al. Malaria in splenectomized patients: report of four cases and review. Clin Infect Dis. 1993;16(3):361-6.
- Lutz HU. Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand). 2004;50(2):107-16.
- Luzzatto L, Nwachuku-Jarrett ES, et al. Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. Lancet. 1970;1(7642):319-21.
- Machado Siqueira A, Lopes Magalhaes BM, et al. Spleen rupture in a case of untreated Plasmodium vivax infection. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(12):e1934.
- Mahmoudvand H, Farivar L, et al. Fatal case of Plasmodium vivax malaria in a splenectomized patient. Iran J Parasitol. 2012;7(3):99-102.
- Makani J, Komba AN, et al. Malaria in patients with sickle cell anemia: burden, risk factors, and outcome at the outpatient clinic and during hospitalization. Blood. 2010;115(2):215-20.
- Marsh K, Otoo L, et al. Antibodies to blood stage antigens of Plasmodium falciparum in rural Gambians and their relation to protection against infection. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989;83(3):293-303.
- Marsh K, Forster D, et al. Indicators of life-threatening malaria in African children. N Engl J Med. 1995;332(21):1399-404.
- Miller LH, Usami S, et al. Alteration in the rheologic properties of Plasmodium knowlesi-infected red cells. A possible mechanism for capillary obstruction. J Clin Invest. 1971;50(7):1451-5.
- Miller LH, Good MF, et al. Malaria pathogenesis. Science. 1994;264(5167):1878-83.
- Modiano D, Luoni G, et al. Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. Nature. 2001;414(6861):305-8.
- Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. Blood. 2008;112(10):3939-48.
- Nash GB, O'Brien E, et al. Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by Plasmodium falciparum. Blood. 1989;74(2):855-61.
- Ndour PA, Lopera-Mesa TM, et al. Plasmodium falciparum clearance is rapid and pitting independent in immune Malian children treated with artesunate for malaria. J Infect Dis. 2015 Jan 15;211(2):290-7.
- Newton PN, Chotivanich K, 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):450-7.
- Phiri K, Esan M, et al. 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.
- Pongponratn E, Riganti M, et al. Spleen in falciparum malaria: ultrastructural study. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1987;18(4):491-501.
- Pongponratn E, Viriyavejakul P, et al. Absence of knobs on parasitized red blood cells in a splenectomized patient in fatal falciparum malaria. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2000;31(4):829-35.
- Price R, Nosten F, et al. Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 1999;60(6):1019-23.
- Price RN, Simpson JA, et al. Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 2001;65(5):614-22.
- Prommano O, Chaisri U, et al. A quantitative ultrastructural study of the liver and the spleen in fatal falciparum malaria. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005;36(6):1359-70.
- Reyburn H, Mbatia R, et al. Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe Plasmodium falciparum malaria. JAMA. 2005;293(12):1461-70.

- Reynaud CA, Descatoire M, et al. IgM memory B cells: a mouse/human paradox. Cell Mol Life Sci. 2012;69(10):1625-34.
- Rigat-Brugarolas LG, Elizalde-Torrent A, et al. A functional microengineered model of the human splenon-on-a-chip. Lab Chip. 2014;14(10):1715-24.
- Roberts CH, Armstrong M, et al. Gametocyte carriage in Plasmodium falciparum-infected travellers. Malar J. 2013;12(1):31.
- Rolling T, Wichmann D, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis. Malar J. 2013;12:241.
- Rolling T, Agbenyega T, et al. Delayed hemolysis after treatment with parenteral artesunate in African Children with severe malaria - a double-center prospective study. J Infect Dis. 2014 Jun 15;209(12):1921-1928
- Roth Jr EF, Friedman M, et al. Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with Plasmodium falciparum malaria. Science. 1978;202(4368):650-2.
- Sadarangani M, Makani J, et al. An observational study of children with sickle cell disease in Kilifi, Kenya. Br J Haematol. 2009;146(6):675-82.
- Safeukui I, Correas JM, et al. Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen. Blood. 2008;112(6):2520-8.
- Safeukui I, Buffet PA, et al. Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen. Blood. 2012;120(2):424-30.
- Safeukui I, Buffet PA, 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.
- Scherf A, Pouvelle B, et al. Molecular mechanisms of Plasmodium falciparum placental adhesion. Cell Microbiol. 2001;3(3):125-31.
- Schnitzer B, Sodeman T, et al. Pitting function of the spleen in malaria: ultrastructural observations. Science. 1972;177(4044):175-7.
- Schwartz E, Parise M, et al. Delayed onset of malaria-implications for chemoprophylaxis in travelers. N Engl J Med. 2003;349(16):1510-6.
- Seboxa T, Snow RW. Epidemiological features of severe paediatric malaria in north western Ethiopia. East Afr Med J. 1997;74(12):780-3.
- Seed TM, Cullen SM, et al. Hemopathologic consequences of protracted gamma irradiation: alterations in granulocyte reserves and granutocyte mobilization. Blood. 1980;56(1):42-51.
- Silvestrini F, Tiburcio M, et al. Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of Plasmodium falciparum on human endothelial cells are tissue independent. PLoS One. 2012;7(2):E31567.
- Singh N, Nagpal AC, et al. Failure of chloroquine therapy in a splenectomized child infected with Plasmodium vivax. Ann Trop Med Parasitol. 2002;96(1):109-11.
- Singh B, Kim Sung L, et al. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. Lancet. 2004;363(9414):1017-24.
- Snow RW, Omumbo JA, et al. Relation between severe malaria morbidity in children and level of Plasmodium falciparum transmission in Africa. Lancet. 1997;349(9066):1650-4.
- Suarez F, Lortholary O, et al. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. Blood. 2006;107(8):3034-44.
- Suwanarusk R, Cooke BM, et al. The deformability of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum and P. vivax. J Infect Dis. 2004;189(2):190-4.
- Tiburcio M, Niang M, et al. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. Blood. 2012;119:e172-80.
- Torres JR, Villegas L, et al. Low-grade parasitaemias and cold agglutinins in patients with hyper-reactive malarious splenomegaly and acute haemolysis. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97(2):125-30.
- Turrini F, Ginsburg H, et al. Phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. Blood. 1992;80(3):801-8.
- Udomsangpetch R, Pipitaporn B, et al. Antimalarial drugs reduce cytoadherence and rosetting Plasmodium falciparum. J Infect Dis. 1996;173(3):691-8.
- Urban BC, Hien TT, et al. Fatal Plasmodium falciparum malaria causes specific patterns of splenic architectural

disorganization. Infect Immun. 2005;73(4):1986-94.
- Van den Ende J, van Gompel A, et al. Hyperreactive malaria in expatriates returning from sub-Saharan Africa. Trop Med Int Health. 2000;5(9):607-11.
- Vinetz JM, Li J, et al. Plasmodium malariae infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. N Engl J Med. 1998;338(6):367-71.
- Watkins WM, Woodrow C, et al. Falciparum malaria: differential effects of antimalarial drugs on ex vivo parasite viability during the critical early phase of therapy. Am J Trop Med Hyg. 1993;49(1):106-12.
- Weatherall DJ. Genetic variation and susceptibility to infection: the red cell and malaria. Br J Haematol. 2008;141(3):276-86.
- Weill JC, Weller S, et al. Human marginal zone B cells. Annu Rev Immunol. 2009;27:267-85.
- White NJ, Turner GD, et al. Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. J Infect Dis. 2013;208(2):192-8.
- Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol. 2000;13(2):277-99.
- Zintl A, Gray JS, et al. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. Parasite Immunol. 2005;27(4):115-20.
- Zoller T, Junghanss T, et al. Intravenous artesunate for severe malaria in travelers, Europe. Emerg Infect Dis. 2011;17(5):771-7.

Role of Spleen in Human Malaria

Dr. Papa Alioune Ndour	INSERM - UPMC, Paris, France
Dr. Innocent Safeuki	Center for Rare and Neglected Diseases, University of Notre Dame, Notre Dame, USA
Dr. Seidina Duakité	INSERM - UPMC, Paris, France
Dr. Julien Duez	INSERM - UPMC, Paris, France
Dr. Stéphane Jauréguiberry	INSERM - UPMC, Paris, France
Dr. Pierre Buffet	Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

DOI:	10.1007/SpringerReference_372393
URL:	http://www.springerreference.com/index/chapterdbid/372393
Part of:	Encyclopedia of Malaria
Editors:	Prof. Marcel Hommel and Prof. Peter G. Kremsner
PDF created on:	February, 18, 2015 04:10

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Article#2 → Résultats

Duez J, **Holleran JP**, **Ndour PA**, **Loganathan S**, **Amireault P**, **Français O**, **Nemer W El**, **Le Pioufle B**, **Amado IF**, **Garcia S**, **Chartrel N**, **Le Van Kim C**, **Lavazec C**, **Avery VM**, **Buffet PA**. 2015. Splenic Retention of Plasmodium falciparum Gametocytes To Block the Transmission of Malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **59**:4206–4214.

AAC Journals.ASM.org

Splenic Retention of *Plasmodium falciparum* Gametocytes To Block the Transmission of Malaria

Julien Duez,[a,b,d] John P. Holleran,[b] Papa Alioune Ndour,[a,d] Sasdekumar Loganathan,[b] Pascal Amireault,[c,d,e] Olivier Français,[f] Wassim El Nemer,[e] Bruno Le Pioufle,[f] Inês F. Amado,[g] Sylvie Garcia,[g] Nathalie Chartrel,[a] Caroline Le Van Kim,[e] Catherine Lavazec,[g] Vicky M. Avery,[b] Pierre A. Buffet[a,d]

Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses de Paris (CIMI-Paris), INSERM U1135, UPMC CR7, CNRS ERL 8255, Paris, France[a]; Eskitis Institute for Drug Discovery, Griffith University, Nathan, QLD, Australia[b]; INSERM U1163/CNRS ERL 8254, Institut Imagine, Paris Descartes—Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France[c]; Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France[d]; Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS), Paris, France[e]; Ecole Normale Supérieure de Cachan, CNRS, BIOMIS-SATIE, UMR 8029, Cachan, France[f]; Institut Pasteur de Paris, Paris, France[g]

***Plasmodium falciparum* is transmitted from humans to *Anopheles* mosquito vectors via the sexual erythrocytic forms termed gametocytes. Erythrocyte filtration through microsphere layers (microsphiltration) had shown that circulating gametocytes are deformable. Compounds reducing gametocyte deformability would induce their splenic clearance, thus removing them from the blood circulation and blocking malaria transmission. The hand-made, single-sample prototype for microsphiltration was miniaturized to a 96-well microtiter plate format, and gametocyte retention in the microsphere filters was quantified by high-content imaging. The stiffening activity of 40 pharmacological compounds was assessed in microtiter plates, using a small molecule (calyculin) as a positive control. The stiffening activity of calyculin was assessed in spleen-mimetic microfluidic chips and in macrophage-depleted mice. Marked mechanical retention (80% to 90%) of mature gametocytes was obtained in microplates following exposure to calyculin at concentrations with no effect on parasite viability. Of the 40 compounds tested, including 20 antimalarials, only 5 endoperoxides significantly increased gametocyte retention (1.5- to 2.5-fold; 24 h of exposure at 1 μM). Mature gametocytes exposed to calyculin accumulated in microfluidic chips and were cleared from the circulation of macrophage-depleted mice as rapidly as heat-stiffened erythrocytes, thus confirming results obtained using the microsphiltration assay. An automated miniaturized approach to select compounds for their gametocyte-stiffening effect has been established. Stiffening induces gametocyte clearance both *in vitro* and *in vivo*. Based on physiologically validated tools, this screening cascade can identify novel compounds and uncover new targets to block malaria transmission. Innovative applications in hematology are also envisioned.**

Every 2 to 3 h, human red blood cells (RBC) enter the open and slow microcirculation of the spleen, where they cross 2-μm-wide interendothelial slits before returning to the general circulation (1). In several inherited or acquired diseases, RBC are unable to deform sufficiently to overcome this mechanical challenge (2). Their splenic retention subsequently induces anemia and splenomegaly (3). *Plasmodium falciparum* malaria is the most frequently acquired disease where RBC deformability is affected (4). Intraerythrocytic asexual parasitic stages develop during a 2-day replication cycle, where rings evolve to multinucleated schizonts that rupture the host RBC, thus releasing daughter merozoites which reinvade new RBC (4). Asexual maturation results in extensive RBC remodeling (6) through parasite growth and exported proteins which restructure the RBC and trigger stiffening (5, 49). Rings are modestly deformable, and a proportion of them circulate (7). Mature-asexual stages are rigid and sequester in microvessels where they are protected from splenic mechanical clearance (8). *P. falciparum* transmission from humans to mosquitoes relies on the conversion of a small fraction of asexual parasites to sexual stages, called gametocytes (9). *P. falciparum* gametocytes develop throughout a 2-week period during which immature stages are sequestered, predominantly in the extravascular compartment of the bone marrow (10, 11). Remodeling of the erythrocyte and parasite membrane also occurs during sexual development (12, 13). Stiff, immature gametocytes become deformable mature gametocytes that are released into the peripheral circulation (14, 15). Circulating mature gametocytes must then repeatedly cross splenic interendothelial slits. Their ability to traverse these slits is essential for their persistence in circulation and availability to mosquitoes (1).

One strategy for *P. falciparum* malaria elimination focuses on the discovery of compounds blocking gametocyte transmission from humans to mosquitoes. Several screening assays which identified small molecules that kill gametocytes or affect their development in the mosquito have been reported (1, 16–24). To expand the repertoire of transmission-blocking compounds and uncover new modes of action, we propose a unique screening

Received 15 December 2014 **Returned for modification** 26 January 2015
Accepted 29 April 2015

Accepted manuscript posted online 4 May 2015

Citation Duez J, Holleran JP, Ndour PA, Loganathan S, Amireault P, Français O, El Nemer W, Le Pioufle B, Amado IF, Garcia S, Chartrel N, Le Van Kim C, Lavazec C, Avery VM, Buffet PA. 2015. Splenic retention of *Plasmodium falciparum* gametocytes to block the transmission of malaria. Antimicrob Agents Chemother 59:4206–4214. doi:10.1128/AAC.05030-14.

Address correspondence to Pierre A. Buffet, pabuffet@gmail.com.

J.D. and J.P.H. contributed equally to this article. V.M.A. and P.A.B. also contributed equally to this article.

Supplemental material for this article may be found at http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05030-14.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.05030-14

Downloaded from http://aac.asm.org/ on June 14, 2015 by guest

approach to identify compounds that would stiffen mature gametocytes, thus triggering their splenic mechanical retention (25). Once cleared from the circulation, mature gametocytes would be removed from the transmission cycle.

Most existing methods to study the deformability of *P. falciparum*-infected RBC (7, 26, 27) are not yet compatible with the stringent requirements for high-throughput screening (HTS). A single-sample microsphere filtration (microsphiltration) device to measure the ability of RBC to squeeze between calibrated microspheres, thus mimicking the spleen, has been recently developed (28). The physiological relevance of microsphiltration was demonstrated by obtaining similar retention rates for abnormally deformable RBC in the device and in human spleens perfused *ex vivo* (28). We report here on the development and validation of a microplate version of the microsphiltration device. Microplate filtration is well adapted to screen for compounds that stiffen mature gametocytes. Pharmacological stiffening observed in the microsphiltration assay translated into gametocyte entrapment in microfluidic chips and in their clearance from the circulation of macrophage-depleted mice. Based on these physiologically validated tools, this approach can identify novel compounds and uncover new targets to block malaria transmission.

(Parts of the presently submitted results were presented at the 63rd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2 to 6 November 2014, and at the 32nd Annual Congress of the French Society for Hematology, 1 to 3 April 2015.)

MATERIALS AND METHODS

Preparation of microsphiltering microplates. Calibrated microsphere mixtures (AMTech) (96.5% tin, 3% silver, 0.5% copper; 25 to 45 μm in diameter and 5 to 15 μm in diameter) were resuspended at 2 and 3 g/ml, respectively, in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma) supplemented with 0.5% Albumax II (Life Technologies) and then allowed to settle. A 50-μl solution of 25-to-45-μm-diameter microspheres was transferred to a 96-deep-well filter-bottom plate (Harvard Apparatus) using a Biomek 3000 liquid handler (Beckman Coulter), and then 60 μl of 5-to-15-μm-diameter microspheres was added, resulting in an ~1.15-mm-thick layer.

Parasite culture. NF54-derived *P. falciparum* 16 (Pf16)-luciferase-green fluorescent protein (GFP) transgenic clone 3 (29) was cultured as described previously (16, 30) using RPMI 1640 with L-glutamine and 25 mM HEPES supplemented with 2.5 mg/ml Albumax II (Life Technologies), 5% AB-positive (AB^+) male human serum, 50 μg/ml hypoxanthine, and 2 μg/ml blasticidin (Sigma). Gametocyte growth medium without blasticidin was supplemented with 0.5 M *N*-acetylglucosamine (NAG) and 11 mM glucose (Sigma). Highly synchronous gametocyte cultures were induced from asexual cultures (16) within a 12-h window at the outset of gametocytogenesis, and uniformly differentiated stage V gametocytes were harvested at day 12 or day 13 postinduction for deformability experiments. For selected mouse experiments, mixtures of immature and mature gametocytes were used.

Light microscopy. Thin blood films were fixed in 100% methanol, stained with Giemsa (Sigma), and counted using a 100× oil immersion objective and bright-field illumination. The percentage of organisms at the sexual or asexual stage was counted for 10^4 RBC.

PKH-26 and PKH-67 labeling of normal and heated RBC. RBC were washed with PBS and heated at 50°C for 20 min. Heated and control RBC were labeled using a PKH-26 or PKH-67 Fluorescent Cell Linker kit for general cell membrane labeling (Sigma-Aldrich) as described previously (28). PKH-labeled RBC were resuspended in assay buffer (for asexual-stage organisms) or PBS-Albumax II (1%) and mixed 1:20 with unlabeled RBC.

Flow cytometry. PKH-labeled RBC were quantified with a BD Accuri C6 flow cytometer using 488-nm (PKH-67) and 640-nm (PKH-26) laser excitation. Cells were resuspended in PBS at 10^6/ml, and the presence of parasitemia was determined from acquisition of $>30 \times 10^3$ events. Data were collected and processed using BD Accuri C6 software.

Microsphiltration. Following loading with stage V mature gametocyte samples (200 μl per well at 2% hematocrit and 5% gametocytemia) or control samples, microtiter plates were vacuum aspirated using a manifold system (Beckman Coulter) coupled to an electric high-output vacuum pump (Millipore) via a 10-liter trap. Sample aspiration (peak pressure of 7 in. Hg) was followed by a rinsing step with 1.6 ml of gametocyte culture medium without NAG (vacuum aspiration; peak pressure of 10 in. Hg). The downstream sample of 1.8 ml was retrieved, and RBC populations were quantified.

Compound testing. Forty compounds, consisting of 20 FDA-approved drugs and 20 antimalarial agents, were selected for assay validation. At day 11 postinduction, 200 μl of mature gametocyte culture (2.5% hematocrit and ~3% to 5% parasitemia) was dispensed into polypropylene plates containing compounds at 5 μM or 0.5 μM in 50 μl of gametocyte growth media at a final 0.4% dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration and then incubated with gas-permeable sealed membranes (Corning) for 24 h in a 37°C incubator. As a negative or positive control, gametocytes were exposed to 50 nM calyculin, a phosphatase inhibitor without effect on the deformability of uninfected RBC (31), or to 0.4% DMSO, respectively.

Opera high-content imaging. Following microsphiltration, 4.5 μl (approximately 10^5 RBC) of each filtered sample and 4.5 μl of the corresponding unfiltered control diluted to a final hematocrit of 0.2% were transferred using an Agilent Bravo liquid handler to 384-well CellCarrier imaging plates (PerkinElmer) containing 45.5 μl of CellMask Plasma Membrane Orange stain (Life Technology) diluted 1:13,333 in PBS.

Quantification of gametocytemia was determined using high-content confocal imaging (Opera; PerkinElmer) through acquisition of 17 images per well using a 20× water immersion objective (numerical aperture [NA], 0.7), resulting in at least 10^4 erythrocytes per well. GFP-positive gametocytes were detected using 488-nm excitation with 520/35-nm emission, and CellMask Orange-labeled erythrocytes were detected with 560-nm excitation and 600/40-nm emission.

Data analysis. Images were processed using Opera Harmony software (PerkinElmer) and image segmentation algorithms. Gametocytes were classified and counted based on elongation index, size, and GFP intensity. RBC were detected using CellMask Orange staining intensity, circularity, and size. Gametocytemia (up- and downstream) was defined as the total number of gametocytes detected divided by the total number of erythrocytes, and the corresponding retention rate was calculated as described previously (28). Significance probability for compound-induced gametocyte stiffening was calculated using a nonparametric, U-statistic Mann Whitney test with two-tailed *P* values and a confidence interval of 99%.

Microfluidics. The microfluidic biochips were cast in polydimethylsiloxane (PDMS; Sylgard, France), a silicone elastomer produced as described previously (32). Each biochip comprised 8 parallel filtering units connected to infusion tubing. Biochips were coated with PBS–1% albumin before all experiments. Cultures containing 5% mature gametocytes at 2% hematocrit were exposed to calyculin (50 nM) or control DMSO (0.4%) for 2 h prior labeling with Hoechst or Sybr green (Life Technologies), mixing in a 1:1 ratio, and centrifugation. RBC samples were infused using a push syringe as a 100% RBC concentrate of 20 μl eluted with PBS-Albumax II (1%) at a 200 (± 50) μl/h flow rate and 15,000 (± 5,000)-Pa pressure. Enrichment of mature gametocytes in the slits of each filtering units was quantified from fluorescence microscope images (Leica DMI3000 microscope, using Leica DFC310FX camera-controlled LAS Superposition Image software; Leica Micro-système, Nanterre, France) acquired 15 min postinfusion. Counting was performed by 3 independent unbiased evaluators.

Splenic mechanical retention of gametocytes in mice. All *in vivo* experiments were performed in accordance with the protocols of the Pasteur Institute (Paris) and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory

Downloaded from http://aac.asm.org/ on June 14, 2015 by guest

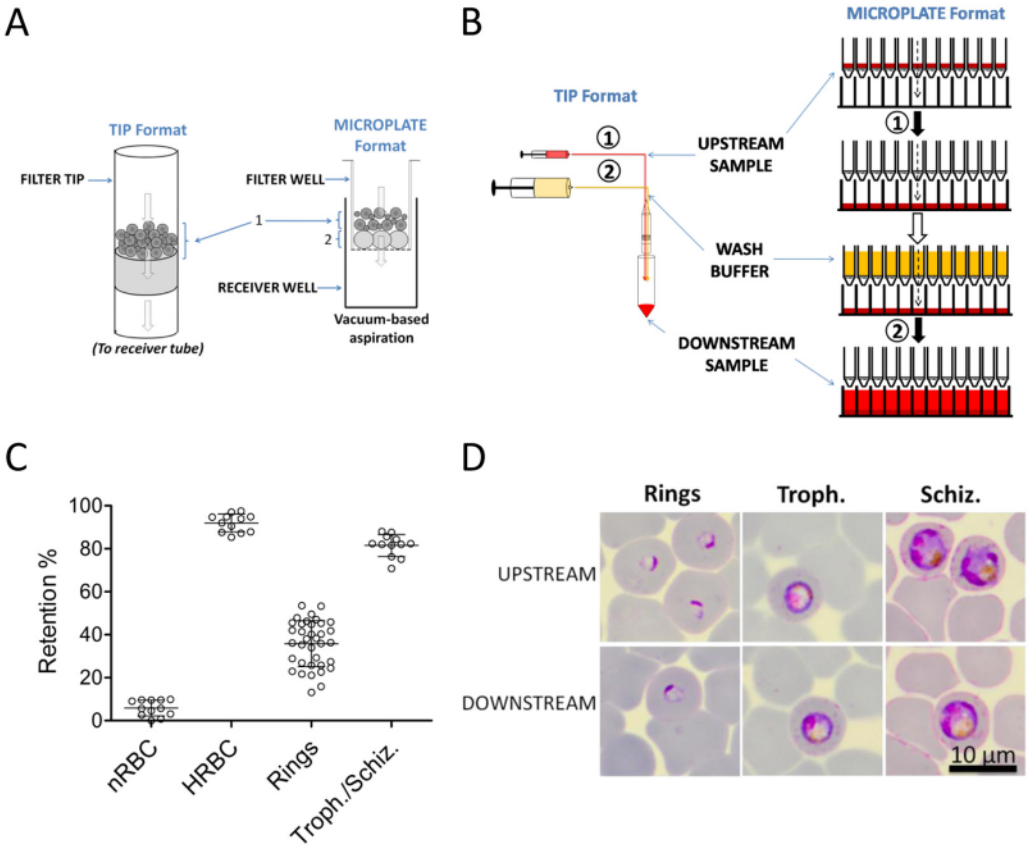


FIG 1 From the hand-made, single-sample prototype to a high-throughput microphiltration assay using microplates. (A) In the prototype, 5-to-25-μm-diameter microspheres were directly deposited by hand above the antiaerosol filter of a tip. In the microplate assay, 25-to-45-μm-diameter microspheres (2) were poured (using an automated dispenser) into 96-well filter mesh plates to support a 1.15-mm-thick layer of 5-to-15-μm-diameter microspheres (1), forming the matrix mimicking the geometry of splenic slits (28). (B) The driving force for microsphiltration in the tip format was applied using syringes connected to hermetic tubing. The RBC sample was gently pushed by hand into the filter (1). An electric pump then flushed the rinsing medium across the filter (2). In the microplate format, microsphiltration was operated by vacuum aspiration in 2 steps: the sample was aspirated into the microsphere layer (step 1) and was then rinsed using microsphiltration medium (step 2). The use of deep-well microplates allowed rinsing to be performed in a single step from the filtering to the receiver plate. (C) The microplate format displayed physiologically relevant retention (mean retention ± standard deviation [SD]) of an array of RBC subpopulations, including normal RBC (nRBC), heat-stiffened RBC (HRBC), or RBC infected with *P. falciparum* asexual stages (Rings; Troph. = trophozoits, Schiz. = schizonts). (D) Microplate-based microsphiltration is an open system preserving the morphology of infected and uninfected RBC (Giemsa-stained smears up- and downstream from filters).

Animals (33). Experiments were performed with C57BL6 adult mice (8 to 12 weeks) injected or not with 100 μl clodronate liposome (ClodLip BV, Netherlands) for macrophage depletion 24 and 48 h prior to the transfusion of human cells. Mice were injected retro-orbitally with 100 μl human RBC suspensions at 20% hematocrit (in culture media) containing 40% of heat-stiffened RBC (HRBC) or immature (3 to 10 days postinduction) or mature (12 to 14 days postinduction) *P. falciparum* gametocytes (NF54 or Pf16). For assessment of calyculin stiffening activity, mature gametocyte cultures were exposed for 2 h to either calyculin (100 nM) or control DMSO (0.4%) before injection into clodronated mice. For control experiments, HRBC (50°C, 20 min) or control unheated normal RBC (nRBC) were differentially labeled with PKH-26 or PKH-67, respectively, prior to injection. Blood samples were then collected from the tail vein at 1, 90, and 180 min postinjection. Circulating concentrations of heated and unheated human RBC were determined by flow cytometry. The concentration of mature and immature gametocytes was determined by microscopic examination of Giemsa-stained blood films.

RESULTS

The 96-well microsphiltration method mimics splenic retention of *P. falciparum*-infected and abnormal RBC. To improve throughput, the tip-based microsphiltration method (28) was adapted to a 96-well microplate format. Deep-well plates designed for vacuum-based filtration were prepared with two layers of microspheres, designed to replicate the filtering properties of the tip-based approach. Optimal dispensing of microspheres into the plates was standardized using an automated liquid dispenser (Fig. 1A and B). A two-step vacuum-based aspiration protocol was validated (Fig. 1B). The microsphere matrix remained wet between filtration steps, and the morphology of filtered RBC was preserved (Fig. 1D).

Mimicry of splenic mechanical sensing was confirmed by quantifying the retention rates of uninfected RBC and *P. falciparum* asexual blood stages. As expected, weak (<10%) retention was observed for normal RBC (Fig. 1C). Heat-stiffened RBC (34) were retained by more than 90%. As previously observed with the tip-based prototype, ring-stage *P. falciparum*-infected RBC showed moderate retention at 35.8% ± 10.7%, while mature asexual stages were retained at 81.5% ± 5.1% (Fig. 1C). The relatively wide distribution of retention rates for rings was related to their

Downloaded from http://aac.asm.org/ on June 14, 2015 by guest

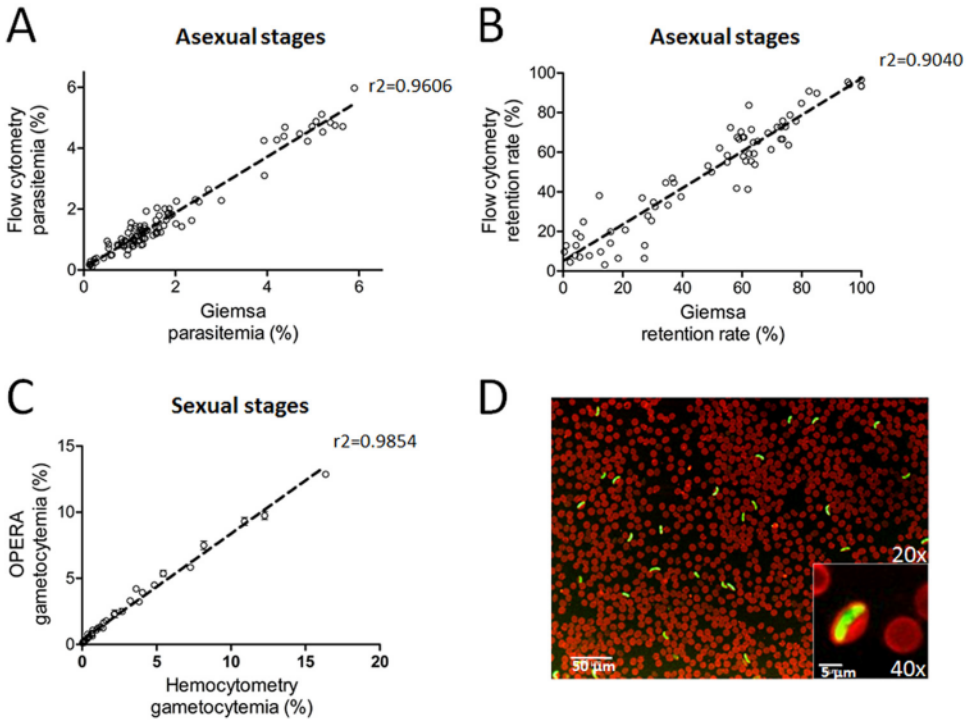


FIG 2 Accurate, automated quantification of asexual and sexual stages up- and downstream from filters. (A and B) A linear correlation was observed between parasitemia (A) and retention rates (B) determined either by flow cytometry or by a reference method (conventional counting on Giemsa-stained smears under the microscope). Parasite populations were filtered at different stages of asexual maturation under different experimental conditions to cover a broad range of retention rates. Pooled results from 6 independent experiments are shown. (C) A linear correlation was observed between gametocyte concentrations determined either by Opera high-content imaging or by a reference method (hemocytometer) ($n = 3$). (D) Example image, taken using an Opera confocal microscope, of GFP-expressing Pf16 stage V gametocytes which were quantified and analyzed automatically.

increasing loss in surface-area-to-volume ratio as the parasite matured (34, 35) and to the distribution of ages across different experiments. These retention rates represent a dynamic range of filtering capability consistent with previously published results (28) using the single-sample prototype or *ex vivo* human spleen perfusion (36). These data illustrate the successful development of microplate-based microsphiltration for rapid and robust determination of spleen-like retention of RBC samples.

Increased throughput and automated quantification of gametocytes. Retention rates of RBC harboring asexual *P. falciparum* stages in the microsphiltration assay were determined using Sybr green and flow cytometry analysis. Retention rates calculated from either Giemsa-stained blood films or flow cytometry showed a strong linear correlation ($r^2 \geq 0.9$; Fig. 2A). Retention rates of gametocytes were determined using high-content imaging based on RBC labeling with a fluorescent membrane stain and gametocyte GFP expression (29). A strong linear correlation ($r^2 = 0.96$) between manual counting using a hemocytometer and imaging-based quantification, across the full range of mature gametocyte concentrations relevant for this assay, was obtained (Fig. 2B).

Proof of concept for pharmacological screening using microsphiltering microplates. Using the microsphiltration assay, untreated or DMSO-exposed, mature gametocytes exhibited less than 50% retention (Fig. 3A). Exposure to 50 nM calyculin for 2 and 24 h resulted in significant increases in retention to 89.85% ± 5.17% and 79.26% ± 3.21% ($P < 0.0001$), respectively. Evaluation of calyculin gametocytocidal activity using a MitoTracker-based viability assay (17) showed <25% inhibition at 100 nM (Fig. 3A). The difference in retention rates between DMSO and calyculin-exposed gametocytes provided a screening window stable across 3 independent biological replicates, with an average Z′ score of 0.67.

Forty compounds, including 20 antimalarial agents and 20 FDA-approved drugs, were tested using the assay. None of the 20 FDA-approved drugs significantly increased gametocyte retention above negative-control values. Of the 20 antimalarial agents tested with a 24-h exposure, only 5 endoperoxide derivatives, namely, artemether, dihydroartemisinin (DHA), artesunate (ART), artemisinin, and artemisone, were found to be active at 1 μM ($P < 0.0001$) (Fig. 3B, C, and D). Assessment of gametocytocidal activity for these compounds revealed killing activity at concentrations lower than those inducing mechanical retention (see Fig. S1 in the supplemental material). The microtiter plate-based microsphiltration platform thus determined the gametocyte-stiffening effect of multiple compounds in parallel.

Physiological relevance of the screening process. To confirm that a compound identified as active in the microsphiltration assay induced the mechanical blockade of compound-exposed gametocytes in the spleen, we analyzed the fate of gametocytes treated with calyculin *in vitro* and *in vivo*.

Mechanical blockade in a spleen-mimetic microfluidic chip. Mature gametocytes from 2 different laboratory strains and a sample directly collected from the blood of a *P. falciparum*-infected patient were exposed to calyculin at 50 nM for 2 h and then infused through microfluidic chips. This method has been shown to recapitulate the mechanical constraints imposed on RBC as they

Downloaded from http://aac.asm.org/ on June 14, 2015 by guest

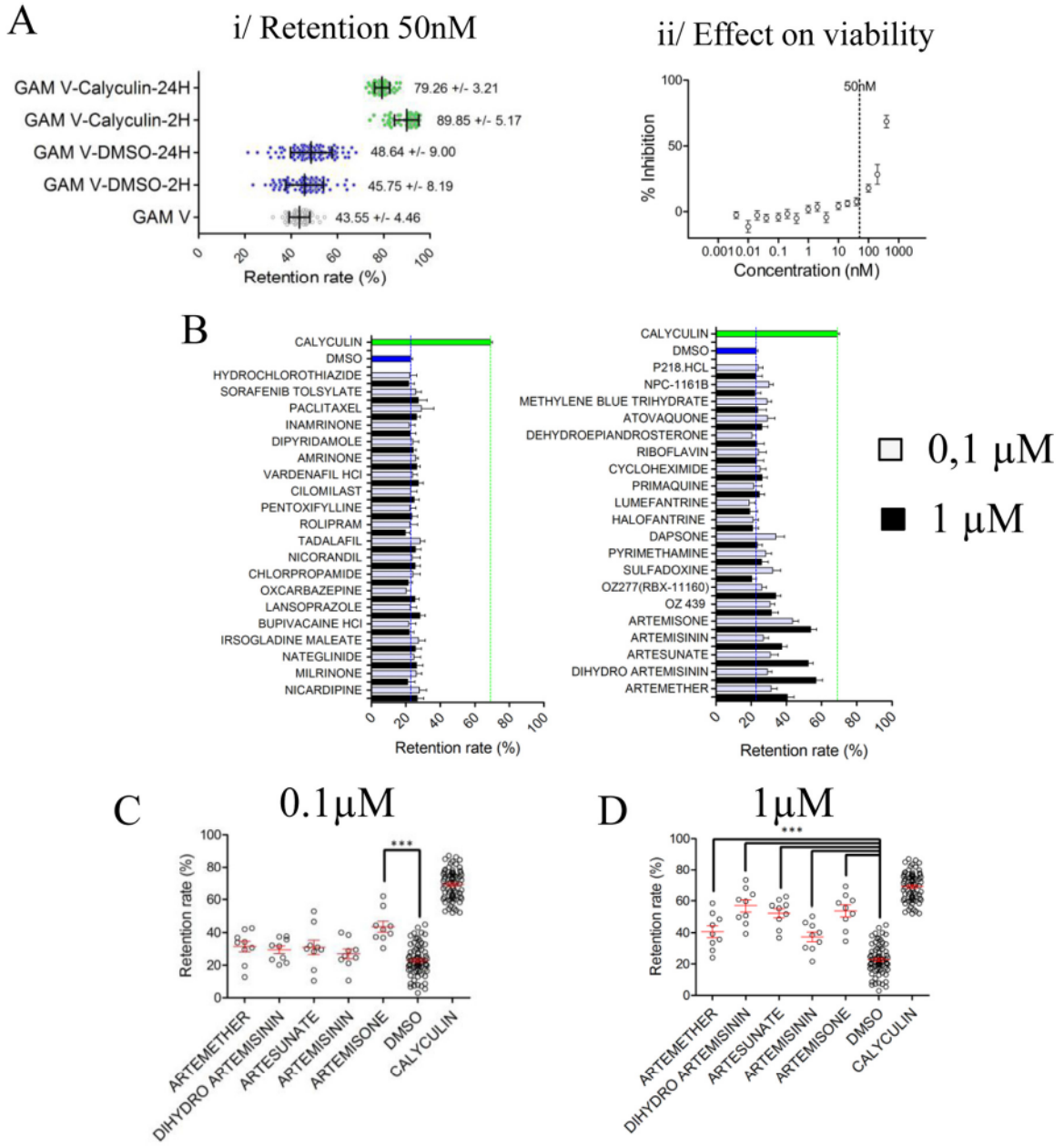


FIG 3 Robust determination of retention rates after exposure of gametocytes to 40 different compounds as a proof of concept for application for screening. (A) (i) Single-well retention rates (mean values ± SD) of mature-stage V gametocytes were determined by microplate-based microsphiltration after a 2-h or 24-h exposure to DMSO at 0.4% or calyculin (50 nM). Compared to unexposed gametocyte stage V controls (GAM V), 0.4% DMSO did not alter gametocyte retention rates (GAM V-DMSO-2H and GAM V-DMSO-24H), whereas calyculin significantly increased their mechanical retention (GAM V-calyculin-2H and GAM V-calyculin-24H). (ii) The same concentration of calyculin (50 nM) did not significantly affect the viability of mature gametocytes at 24 h. (B) Retention rates (mean values ± standard errors of the means [SEM]) of stage V gametocytes measured after a 24-h exposure to 40 pharmacological compounds at 0.1 and 1 µM ($n = 3$). (C and D) Only artemether, dihydroartemisinin (DHA), artesunate (ART), artemisinin, and artemisone (all endoperoxides) significantly decreased the ability of gametocytes to cross microsphere filters at 1 µM.

cross interendothelial slits in the human spleen and has been validated with an array of poorly deformable RBC (32). Exposure to calyculin induced a marked enrichment to 72.40% ± 13.64% in mature gametocytes in the narrowest slits of the chips versus 27.60% ± 13.64% for the DMSO-exposed gametocytes (Fig. 4A) ($P < 0.0001$). Thus, the altered mechanical behavior of pharmacologically stiffened mature gametocytes observed with the microsphiltration assay was confirmed using microfluidic chips as an independent measure of spleen-like retention. This provides a physiologically relevant validation of active compounds identified by microsphiltration.

Clearance of pharmacologically stiffened gametocytes from the blood of macrophage-depleted mice. Gametocytes exposed to either calyculin or 0.4% DMSO were transfused into C56Bl6 mice previously treated with clodronate liposomes to deplete endogenous macrophages and allow normal human RBC to circu-

Downloaded from http://aac.asm.org/ on June 14, 2015 by guest

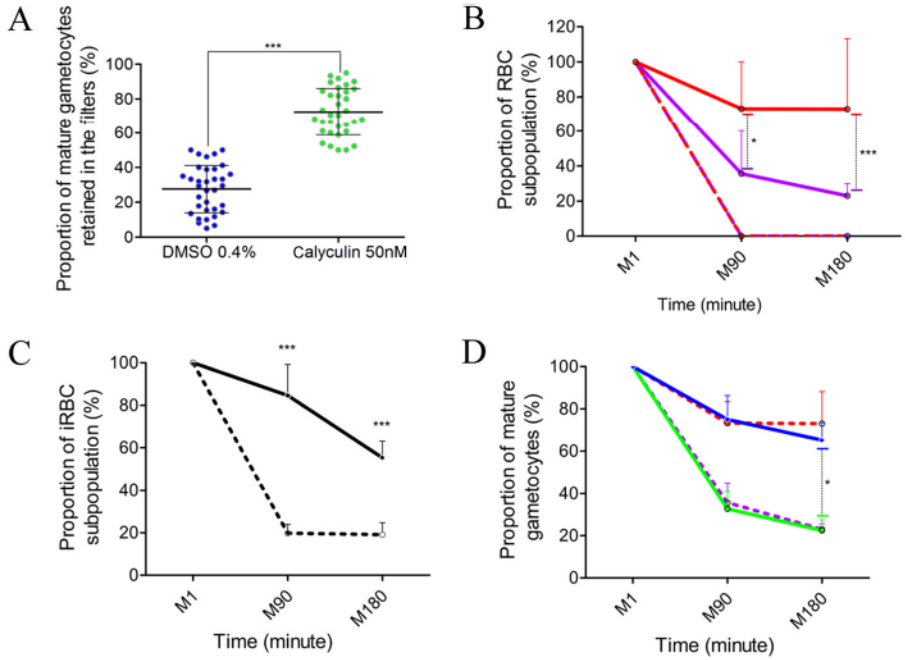


FIG 4 Mechanical clearance of compound-exposed mature gametocytes *in vitro* and *in vivo* to validate screening. (A) Mechanical retention (mean values ± SD) of mature gametocytes in the filtering units of spleen-like biomimetic microchips as quantified by fluorescence microscopy. Calyculin-stiffened gametocytes were significantly enriched compared to controls. (B) C57BL6 mice were treated (solid line) or not (dotted line) with clodronate liposome for macrophage depletion prior to the transfusion of human RBC. Heat-stiffened human RBC (HRBC, purple line) or control unheated RBC (nRBC, red line) were injected retro-orbitally after differential labeling with PKH-26 and PKH-67 for subsequent quantification using flow cytometry. Blood samples were collected at the tail vein 1, 90, and 180 min postinjection (4 independent experiments for a total of 15 mice). (C) Macrophage-depleted C57BL6 mice were transfused with human RBC infected with either immature (dotted line [stage I to IV]) or mature (solid line [stage V]) gametocytes. The concentration of circulating gametocytes was determined on Giemsa-stained smears, showing the persistence in circulation of a majority of RBC infected with mature gametocytes and the clearance of a majority of RBC infected with immature gametocytes (4 independent experiments for a total of 12 mice). (D) Macrophage-depleted C57BL6 mice were transfused with human RBC infected with mature *P. falciparum* gametocytes, exposed just before transfusion either to calyculin at 100 nM or to control DMSO (0.4%) during 2 h (2 independent experiments for a total of 8 mice). A majority of mature gametocytes exposed to calyculin (green line) were cleared, while a majority of mature gametocytes exposed to the solvent (blue line) stayed in circulation ($P = 0.0286$). Red dotted line, nRBC; purple dotted line, HRBC. Results from these mouse experiments are expressed as mean values ± SEM.

late for several hours (Fig. 4B, C, and D). As expected, when untreated mice were transfused with human RBC, complete clearance was observed in less than 90 min. In contrast, 73.19% ± 26.87% and 58.53% ± 12.97% of human RBC ($P = 0.0006$) were still in circulation at 90 and 180 min, respectively, after transfusion into macrophage-depleted mice. In these macrophage-depleted mice, only 35.63% ± 24.42% and 22.98% ± 6.94% of stiff, heat-treated RBC remained in circulation after 90 and 180 min, corresponding to >75% clearance, arguably resulting from a macrophage-independent, mechanical process (Fig. 4B). When gametocyte circulation kinetics were examined, we found that 81.21% of immature compared to 15.35% of mature gametocytes were cleared after 90 min ($P = 0.0005$). This result is consistent with previous studies which demonstrated a marked difference in the stiffness of immature and mature stages using biorheological methods (14, 15) (Fig. 4C). Finally, mature gametocytes exposed to calyculin for 2 h had a clearance rate of 77.52%, whereas exposure to 0.4% DMSO resulted in only 34.83% retention after 180 min ($P = 0.0286$). Interestingly, these clearance rate kinetics were almost identical with those of nRBC (26.97%) and HRBC (77.01%). Hence, a compound active in the microsphiltration assay induces the splenic mechanical retention of gametocytes *in vivo* (Fig. 4D).

DISCUSSION

Using a miniaturized microsphiltration assay designed to mimic the mechanical sensing of RBC by the spleen, we have demonstrated that a small molecule can significantly impair the ability of mature *P. falciparum* gametocytes to cross spleen-like slits, independently from gametocyte killing. This finding was confirmed *in vitro* using biomimetic microfluidic chips and *in vivo* using a macrophage-depleted mouse model. Collectively, these results establish an original screening and postscreening cascade to select compounds that induce the mechanical retention of mature gametocytes in the human spleen, thus eliminating them from the malaria transmission cycle. Once retained in the spleen, the fate of a RBC is macrophage-mediated phagocytosis and destruction. Mechanical retention of RBC is effective in malaria patients (1, 37). Therefore, compounds which induce retention and clearance of mature gametocytes in the spleen represent solid candidates for transmission-blocking agents.

To find transmission-blocking agents through an original, biomechanical approach, we optimized the manual microsphiltration prototype for a miniaturized automated format. This effectively streamlined the processing of 96 samples in a simultaneous fashion with the potential to screen up to 5,000 to 10,000 compounds at a single point over a 1-to-2-month period. We have also

Downloaded from http://aac.asm.org/ on June 14, 2015 by guest

developed specific tools to validate this approach. Ramdani and colleagues recently identified compounds interfering with a signaling pathway that regulates gametocyte-infected RBC deformability. The identification of calyculin (31) has provided a much-needed tool for validation of the screening approach reported here. We have demonstrated that calyculin stiffens gametocytes at concentrations lower than those affecting gametocyte viability (Fig. 3). This stiffening activity was further confirmed using biomimetic microchips with narrow, 2-μm-wide slits (32) in which gametocytes exposed to calyculin accumulated after a few minutes of infusion (Fig. 4A). To validate the effect of hits *in vivo*, we developed a new transfusion approach in mice. The mouse and human spleens retain autologous spherocytic RBC at similar paces (37, 38), and the minimal surface area losses triggering biomechanical retention are also similar in the two species, namely, >18% in human spleens (34) and >20% in mice (38). Macrophage depletion was used to allow human RBC to remain in the peripheral circulation of C57BL6 mice. As expected, those human RBC were rapidly cleared from the circulation of macrophage-intact controls (Fig. 4B), while the majority of them were still in the peripheral blood of macrophage-depleted mice 3 h after xenotransfusion. In this model, a minority of mature gametocytes and a majority of immature gametocytes were cleared, consistent with previous observations *in vitro* (14). Similarly, only a minority of mature gametocytes exposed to DMSO and a majority of those exposed to calyculin were cleared. This strongly suggests that calyculin induces the clearance of mature gametocytes *in vivo* by inducing their mechanical retention in the spleen (39).

In the first set of compounds tested, most were inactive and induced retention rates very similar to those observed with the solvent control (DMSO) (Fig. 3). Five endoperoxides were identified as active compounds; however, in contrast to calyculin, they induced retention only at concentrations higher than those affecting viability (Fig. 3; see also Fig. S1 in the supplemental material). Mechanical retention was thus more likely a consequence of gametocyte killing rather than a new mode of action of endoperoxides with respect to gametocyte carriage. Interestingly, artemether affected the viability of mature gametocytes at lower concentrations than dihydroartemisinin. This is consistent with the greater effect artemether-lumefantrine has on gametocyte carriage and transmission to *Anopheles* mosquitoes compared to DHA-piperaquine (40).

The ideal compound selected by our screening/postscreening cascade would induce a potent, irreversible increase in the retention of mature gametocytes and have a long half-life. Duration of gametocyte carriage is reduced from 7 to 2 weeks in malaria patients treated with artemisinin-based combination therapies (ACTs) (41, 42). A mean duration of activity of 2 weeks would thus cover the gametocyte circulation period in ACT-treated patients. What is the minimal activity that would translate into public health benefit? Modeling indicates that the prediction is complex, due to a possibly nonlinear relationship between gametocytemia and transmission to *Anopheles* mosquitoes (43) and a wide diversity of epidemiological situations. While moderately active compounds (e.g., those resulting in 80% retention) would impact transmission from subjects carrying >250 to 300 gametocytes/μl, only solidly active compounds (>98% retention) would have an impact in subjects with <20 gametocytes/μl. Whatever the antigametocyte approach used, reducing transmission from subjects with intermediate gametocytemia (20 to 200 gametocytes/μl) would require very potent activity. If modeling accurately reflects reality, combining a gametocyte-killing agent from ongoing screening activities (16–24) with a gametocyte-stiffening agent from our biomechanical approach might increase the likelihood for transmission-blocking success.

Following assay optimization, microplate-based microsphiltration proved robust and flexible. The results were reproducible across multiple microplate formats, utilizing various automated dispensers, different microsphere sources, and microsphiltration media. Optimization by analyzing male/female and reversible/irreversible effects is envisioned. We have developed a storage process that preserves the integrity of the microsphere layer and assay performance for 3 months, thereby enabling transport and deferred use at distant laboratories (not shown). Potential applications include HTS to discover compounds modulating the biomechanical properties of RBC under conditions such as diabetes (44), sepsis and inflammatory diseases (45), inherited RBC disorders (46), and transfusion (47). The assay may also provide a quality control test for RBC concentrates, as poorly deformable subpopulations of RBC tend to accumulate upon storage (28, 48).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cédric Pionneau of the P3S post-genomic platform, La Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France, for the technical support he provided for this project.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

P.A.B. is engaged in collaboration with Guilin Pharmaceutical and has provided expertise to Sigma Tau and Sanofi. All other authors report no potential conflicts of interest.

This work was supported by the Bill and Melinda Gates Foundation (OPP1043892), by the "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-10-IAHU-01, ANR-11-LABX-0051, and ANR-11-IDEX-0005-02), and by a grant from "HRA Pharma Laboratoires Paris" to J.D.

REFERENCES

1. **Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, Turner GD, Mercereau-Puijalon O.** 2011. The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology. Blood 117:381–392. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-04-202911.
2. **Mohandas N, Gallagher PG.** 2008. Red cell membrane: past, present, and future. Blood 112:3939–3948. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166.
3. **Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N.** 2008. Hereditary spherocytosis. Lancet 372:1411–1426. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61588-3.
4. **White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM.** 2014. Malaria. Lancet 383:723–735. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0.
5. **Cranston HA, Boylan CW, Carroll GL, Sutera SP, Williamson JR, Gluzman IY, Krogstad DJ.** 1984. Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability. Science 223:400–403. http://dx.doi.org/10.1126/science.6362007.
6. **Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L.** 2009. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. Nat Rev Microbiol 7:341–354. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2110.
7. **Cooke BM, Stuart J, Nash GB.** 2014. The cellular and molecular rheology of malaria. Biorheology 51:99–119.
8. **Miller LH, Good MF, Milon G.** 1994. Malaria pathogenesis. Science 264:1878–1883. http://dx.doi.org/10.1126/science.8009217.
9. **Bousema T, Drakeley C.** 2011. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. Clin Microbiol Rev 24:377–410. http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00051-10.
10. **Farfour E, Charlotte F, Settegrana C, Miyara M, Buffet P.** 2012. The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for Plasmodium falciparum gametocyte maturation? Malar J 11:285. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-285.

Downloaded from http://aac.asm.org/ on June 14, 2015 by guest

11. **Joice R, Nilsson SK, Montgomery J, Dankwa S, Egan E, Morahan B, Seydel KB, Bertuccini L, Alano P, Williamson KC, Duraisingh MT, Taylor TE, Milner DA, Marti M.** 2014. Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. Sci Transl Med **6**:244re5. http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3008882.
12. **Dearnley MK, Yeoman JA, Hanssen E, Kenny S, Turnbull L, Whitchurch CB, Tilley L, Dixon MWA.** 2012. Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of Plasmodium falciparum gametocytes. J Cell Sci **125**:2053–2063. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.099002.
13. **Dixon MWA, Dearnley MK, Hanssen E, Gilberger T, Tilley L.** 2012. Shape-shifting gametocytes: how and why does P. falciparum go banana-shaped? Trends Parasitol **28**:471–478. http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.007.
14. **Tibúrcio M, Niang M, Deplaine G, Perrot S, Bischoff E, Ndour PA, Silvestrini F, Khattab A, Milon G, David PH, Hardeman M, Vernick KD, Sauerwein RW, Preiser PR, Mercereau-Puijalon O, Buffet P, Alano P, Lavazec C.** 2012. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. Blood **119**:e172–e180. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-03-414557.
15. **Aingaran M, Zhang R, Law SK, Peng Z, Undisz A, Meyer E, Diez-Silva M, Burke TA, Spielmann T, Lim CT, Suresh S, Dao M, Marti M.** 2012. Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Cell Microbiol **14**:983–993. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01786.x.
16. **Duffy S, Avery VM.** 2012. Development and optimization of a novel 384-well anti-malarial imaging assay validated for high-throughput screening. Am J Trop Med Hyg **86**:84–92. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0302.
17. **Duffy S, Avery VM.** 2013. Identification of inhibitors of Plasmodium falciparum gametocyte development. Malar J **12**:408. http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-12-408.
18. **Hobbs CV, Tanaka TQ, Muratova O, Van Vliet J, Borkowsky W, Williamson KC, Duffy PE.** 2013. HIV treatments have malaria gametocyte killing and transmission blocking activity. J Infect Dis **208**:139–148. http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit132.
19. **Lucantoni L, Duffy S, Adjalley SH, Fidock DA, Avery VM.** 2013. Identification of MMV malaria box inhibitors of plasmodium falciparum early-stage gametocytes using a luciferase-based high-throughput assay. Antimicrob Agents Chemother **57**:6050–6062. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00870-13.
20. **Peatey CL, Spicer TP, Hodder PS, Trenholme KR, Gardiner DL.** 2011. A high-throughput assay for the identification of drugs against late-stage Plasmodium falciparum gametocytes. Mol Biochem Parasitol **180**:127–131. http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.09.002.
21. **Tanaka TQ, Dehdashti SJ, Nguyen D-T, McKew JC, Zheng W, Williamson KC.** 2013. A quantitative high throughput assay for identifying gametocytocidal compounds. Mol Biochem Parasitol **188**:20–25. http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.02.005.
22. **Lelièvre J, Almela MJ, Lozano S, Miguel C, Franco V, Leroy D, Herreros E.** 2012. Activity of clinically relevant antimalarial drugs on Plasmodium falciparum mature gametocytes in an ATP bioluminescence "transmission blocking" assay. PLoS One **7**:e35019. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035019.
23. **D'Alessandro S, Silvestrini F, Dechering K, Corbett Y, Parapini S, Timmerman M, Galastri L, Basilico N, Sauerwein R, Alano P, Taramelli D.** 2013. A Plasmodium falciparum screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. J Antimicrob Chemother **68**:2048–2058. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt165.
24. **Vu H, Roullier C, Campitelli M, Trenholme KR, Gardiner DL, Andrews KT, Skinner-Adams T, Crowther GJ, Van Voorhis WC, Quinn RJ.** 2013. Plasmodium gametocyte inhibition identified from a natural-product-based fragment library. ACS Chem Biol **8**:2654–2659. http://dx.doi.org/10.1021/cb400582b.
25. **Buffet P, Brousse V, David P, Deplaine G, Lacoste F, Milon G, Mohandas N, Safeukui Noubissi I, Perrot S, Puijalon O.** May 2009. Method for screening compounds for their ability to increase rigidity of red blood cells infected by a protozoan parasite of the genus plasmodium, method for filtering red blood cells, and application thereof. US patent WO 2009144586 A3.
26. **Bow H, Pivkin IV, Diez-Silva M, Goldfless SJ, Dao M, Niles JC, Suresh S, Han J.** 2011. A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria. Lab Chip **11**:1065–1073. http://dx.doi.org/10.1039/c0lc00472c.
27. **Rigat-Brugarolas LG, Elizalde-Torrent A, Bernabeu M, De Niz M, Martin-Jaular L, Fernandez-Becerra C, Homs-Corbera A, Samitier J, del Portillo HA.** 2014. A functional microengineered model of the human splenon-on-a-chip. Lab Chip **14**:1715–1724. http://dx.doi.org/10.1039/c3lc51449h.
28. **Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, Biligui S, Guillotte M, Guitton C, Dokmak S, Aussilhou B, Sauvanet A, Cazals Hatem D, Paye F, Thellier M, Mazier D, Milon G, Mohandas N, Mercereau-Puijalon O, David PH, Buffet PA.** 2011. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. Blood **117**:e88–e95. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-10-312801.
29. **Adjalley SH, Johnston GL, Li T, Eastman RT, Ekland EH, Eappen AG, Richman A, Sim BKL, Lee MCS, Hoffman SL, Fidock DA.** 2011. Quantitative assessment of Plasmodium falciparum sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. Proc Natl Acad Sci U S A **108**:E1214–E1223. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1112037108.
30. **Fivelman QL, McRobert L, Sharp S, Taylor CJ, Saeed M, Swales CA, Sutherland CJ, Baker DA.** 2007. Improved synchronous production of Plasmodium falciparum gametocytes in vitro. Mol Biochem Parasitol **154**:119–123. http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.04.008.
31. **Ramdani G, Naissant B, Thompson E, Breil F, Lorthiois A, Dupuy F, Cummings R, Duffier Y, Corbett Y, Mercereau-Puijalon O, Vernick K, Taramelli D, Baker DA, Langsley G, Lavazec C.** 2015. cAMP-signalling regulates gametocyte-infected erythrocyte deformability required for malaria parasite transmission. PLoS Pathog **11**:e1004815. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004815.
32. **Picot J, Ndour PA, Lefevre SD, El Nemer W, Tawfik H, Galimand J, Da Costa L, Ribeil J-A, de Montalembert M, Brousse V, Le Pioufle B, Buffet P, Le Van Kim C, Français O.** 2015. A biomimetic microfluidic chip to study the circulation and mechanical retention of red blood cells in the spleen. Am J Hematol **90**:339–345. http://dx.doi.org/10.1002/ajh.23941.
33. **Donovan J, Brown P.** 2013. Care and handling of laboratory mice. Curr Protoc Microbiol **31**:A.3N.1–A.3N.18. http://dx.doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ns31.
34. **Safeukui I, Buffet PA, Deplaine G, Perrot S, Brousse V, Ndour A, Nguyen M, Mercereau-Puijalon O, David PH, Milon G, Mohandas N.** 2012. Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen. Blood **120**:424–430. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-01-404103.
35. **Safeukui I, Buffet PA, Perrot S, Sauvanet A, Aussilhou B, Dokmak S, Couvelard A, Hatem DC, Mohandas N, David PH, Mercereau-Puijalon O, Milon G.** 2013. Surface area loss and increased sphericity account for the splenic entrapment of subpopulations of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes. PLoS One **8**:e60150. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060150.
36. **Safeukui I, Correas J-M, Brousse V, Hirt D, Deplaine G, Mulé S, Lesurtel M, Goasguen N, Sauvanet A, Couvelard A, Kerneis S, Khun H, Vigan-Womas I, Ottone C, Molina TJ, Tréluyer J-M, Mercereau-Puijalon O, Milon G, David PH, Buffet PA.** 2008. Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen. Blood **112**:2520–2528. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-03-146779.
37. **Looareesuwan S, Ho M, Wattanagoon Y, White NJ, Warrell DA, Bunnag D, Harinasuta T, Wyler DJ.** 1987. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. N Engl J Med **317**:675–679. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198709103171105.
38. **Waugh RE, Sarelius IH.** 1996. Effects of lost surface area on red blood cells and red blood cell survival in mice. Am J Physiol Cell Physiol **271**(Pt 1):C1847–C1852.
39. **Huang S, Amaladoss A, Liu M, Chen H, Zhang R, Preiser PR, Dao M, Han J.** 2014. In vivo splenic clearance correlates with *in vitro* deformability of red blood cells from Plasmodium yoelii-infected mice. Infect Immun **82**:2532–2541. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01525-13.
40. **Sawa P, Shekalaghe SA, Drakeley CJ, Sutherland CJ, Mweresa CK, Baidjoe AY, Manjurano A, Kavishe RA, Beshir KB, Yussuf RU, Omar SA, Hermsen CC, Okell L, Schallig HDFH, Sauerwein RW, Hallett RL, Bousema T.** 2013. Malaria transmission after artemether-lumefantrine

Downloaded from http://aac.asm.org/ on June 14, 2015 by guest

and dihydroartemisinin-piperaquine: a randomized trial. J Infect Dis **207:** 1637–1645. http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit077.

41. **Chen PQ, Li GQ, Guo XB, He KR, Fu YX, Fu LC, Song YZ.** 1994. The infectivity of gametocytes of Plasmodium falciparum from patients treated with artemisinin. Chin Med J (Engl) **107:**709–711.
42. **Abay SM.** 2013. Blocking malaria transmission to Anopheles mosquitoes using artemisinin derivatives and primaquine: a systematic review and meta-analysis. Parasit Vectors **6:**278. http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-278.
43. **Churcher TS, Bousema T, Walker M, Drakeley C, Schneider P, Ouédraogo AL, Basáñez M-G.** 2013. Predicting mosquito infection from Plasmodium falciparum gametocyte density and estimating the reservoir of infection. Elife **2:**e00626. http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00626.
44. **Keymel S, Heiss C, Kleinbongard P, Kelm M, Lauer T.** 2011. Impaired red blood cell deformability in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus. Horm Metab Res **43:**760–765. http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1286325.
45. **De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent J-L.** 2014. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. Virulence **5:**73–79. http://dx.doi.org/10.4161/viru.26482.
46. **Brousse V, Buffet P, Rees D.** 2014. The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. Br J Haematol **166:**165–176. http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12950.
47. **Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Schaap NPM, de Grip WJ, Bos HJ, Bosman GJCGM.** 2008. Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. Transfusion **48:**1478–1485. http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01734.x.
48. **Frank SM, Abazyan B, Ono M, Hogue CW, Cohen DB, Berkowitz DE, Ness PM, Barodka VM.** 2013. Decreased erythrocyte deformability after transfusion and the effects of erythrocyte storage duration. Anesth Analg **116:**975–981. http://dx.doi.org/10.1213/ANE.0b013e31828843e6.
49. **Sanyal S, Egée S, Bouyer G, Perrot S, Safeukui I, Bischoff E, Buffet P, Deitsch KW, Mercereau-Puijalon O, David PH, Templeton TJ, Lavazec C.** 2012. Plasmodium falciparum STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties. Blood **119:**e1–e8. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-08-370734.

Downloaded from http://aac.asm.org/ on June 14, 2015 by guest

Article#3

Duez J, **Holleran JP**, **Ndour PA**, **Pionneau C**, **Diakité S**, **Roussel C**, **Dussiot M**, **Amireault P**, **Avery VM**, **Buffet PA**. 2015. Mechanical clearance of red blood cells by the human spleen: Potential therapeutic applications of a biomimetic RBC filtration method. Transfusion Clinique et Biologique **22**:151–157.

Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

TRANSFUSION
CLINIQUE ET BIOLOGIQUE

Transfusion Clinique et Biologique 22 (2015) 151–157

State of the art

Mechanical clearance of red blood cells by the human spleen: Potential therapeutic applications of a biomimetic RBC filtratio method

Clairance mécanique des érythrocytes par la rate humaine : applications thérapeutiques potentielles de la filtration érythrocytaire sur tamis microsphérique

J. Duez [a,b,c,d], J.P. Holleran [d], P.A. Ndour [a,b], C. Pionneau [e], S. Diakité [a,b], C. Roussel [b,f,g], M. Dussiot [b,f,g], P. Amireault [b,f,g], V.M. Avery [d], P.A. Buffet [a,*,b]

[a] *CIMI-Paris U1135, équipe 4, hôpital La Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France*
[b] *Laboratoire d'excellence GR-Ex, 24, boulevard du Montparnasse, 75015, Paris, France*
[c] *HRA Pharma Laboratoires, 15, rue de Béranger, 75003 Paris, France*
[d] *Eskitis Institute for Drug Discovery, Griffith University, Brisbane Innovation Park, Don Young Road, Nathan, QLD 4111, Australia*
[e] *CIMI-Paris Plateforme post-génomique de la Pitié Salpêtrière, P3S, hôpital La Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France*
[f] *Inserm U1163/CNRS ERL 8254, Imagine Institute, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, 75015 Paris, France*
[g] *Institut national de la transfusion sanguine (INTS), 75015 Paris, France*

Available online 29 June 2015

Abstract

During their lifespan, circulating RBC are frequently checked for their deformability. This mechanical quality control operates essentially in the human spleen. RBC unable to squeeze though narrow splenic slits are retained and cleared from the blood circulation. Under physiological conditions this prevents microvessels from being clogged by senescent, rigid RBC. Retention of poorly deformable RBC is an important determinant of pathogenesis in malaria and may also impact the clinical benefi of transfusion. Modulating the splenic retention of RBC has already been proposed to support therapeutic approaches in these research fields To this aim, the development of microplates for high throughput filtratio of RBC through microsphere layers (microplate-based microsphiltration) has been undertaken. This review focuses on potential therapeutic applications provided by this technology in malaria chemotherapy and transfusion.
© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Erythrocyte; Deformability; Spleen; Filtration; Microspheres; Malaria; Transfusion; Applications

Résumé

La déformabilité des érythrocytes fait l'objet d'un contrôle qualité régulier imposé par la rate humaine. Tout érythrocyte incapable de se déformer suffisammen pour franchir les étroits espaces inter-endothéliaux spléniques est mécaniquement retenu, puis éliminé de la circulation. En conditions physiologiques, cela prévient l'obstruction des microvaisseaux par des érythrocytes sénescents ou dont la biomécanique est altérée. La rétention des érythrocytes peu déformables est un important déterminant de la pathogenèse du paludisme et vraisemblablement du bénéfic clinique de la transfusion. Une modulation de la rétention mécanique splénique des érythrocytes a préalablement été proposée comme alternative thérapeutique dans ces deux champs de recherche. Dans ce but, le développement de microplaques pour la filtratio érythrocytaire sur tamis microsphériques (microsphiltration) à haut débit a récemment été entrepris. Dans cette revue, sont présentées les applications thérapeutiques potentielles de cette technologie en chimiothérapie du paludisme et en transfusion.
© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Érythrocyte ; Déformabilité ; Rate ; Filtration ; Microsphères ; Paludisme ; Transfusion ; Applications thérapeutiques

* Corresponding author.
E-mail address: pabuffet@gmail.com (P.A. Buffet).

http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2015.05.004
1246-7820/© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Pathophysiological framework: major parameters of RBC deformability

Red blood cells (RBC) are 100 to 1000 times more numerous than white cells in the bloodstream and account for almost half of the blood volume. They display elastic properties and their deformability is a key factor of low blood viscosity and resistance to fl w. Being deformable enables RBC to navigate along capillaries narrower than their own diameter [1,2]. RBC deformability depends on 3 parameters: internal viscosity, membrane and cytoskeleton biomechanics, and cell geometry [3]. Important morphological features of RBC are size, shape and surface-to-volume ratio. Internal viscosity is correlated essentially to intracellular hemoglobin concentration, which depends on the level of RBC hydration. In sickle cell disease, hemoglobin polymerization becomes the dominant parameter of RBC rigidity during vaso-occlusive crises [4]. Visco-elastic properties of the erythrocyte membrane and cytoskeleton depend more on the biomechanical characteristics of the cytoskeleton than on those of the phospholipid bilayer [5]. The spectrin network, which is the major component of the RBC cytoskeleton, is tightly attached to the phospholipid bilayer and transmembrane proteins by anchoring junction complexes [6]. In hereditary spherocytosis (HS) and other inherited RBC diseases, alterations of cytoskeletal proteins and proteins connecting the spectrin network to the membrane result in a progressive decrease in the RBC surface-to-volume ratio [7] that enhances splenic retention of RBC and leads to anemia. In these conditions, splenic retention can occur in absence of any detectable alteration of the RBC surface and thus independently from conventional ligand–receptor interactions between RBC and macrophages.

2. Quality control of RBC integrity by the spleen

RBC within the splenic circulation follow parallel, slow "open" or fast "closed" microcirculatory pathways [1]. In the fast pathway, RBC fl w directly from the peri-follicular spaces to the lumen of sinuses. By contrast, in the slow pathway, RBC circulate in the splenic red pulp upstream from sinuses, without endothelial lining, outside conventional vessels explaining the term "open" microcirculation. To reach the sinus lumen, RBC have to squeeze through narrow apertures between elongated endothelial cells that form the sinus wall [1,8,9]. Crossing these apertures (conventionally named "inter-endothelial slits") is a drastic challenge on RBC deformability [6] and results in the retention of biomechanically altered RBC [1,10,11]. The splenic blood fl w is 1 mL/min/G of tissue (i.e., 100–150 mL/min). The slow "open" pathway receives 10% to 20% of the splenic blood fl w [1,9], and the biomechanical integrity of RBC is thus checked by the spleen approximately every 2 hours. In humans, clearance of the majority of artificiall stiffened RBC (by heating them for 20 minutes) takes a few hours [12]. Other signals for retention and phagocytosis of RBC by the red pulp macrophages of the spleen exist, including conventional ligand–receptor interactions like externalized phosphatidylserine, specifi forms of CD47, or opsonized band 3 clusters [13–15]. Such "conventional" ligand–receptor interactions can take place not only in the spleen but also in other macrophage-rich tissues, like the liver or the bone marrow. In comparison with RBC circulation in the fast pathway, RBC fl w in the slow pathways of the spleen is approximately 20 times slower, likely facilitating interactions with macrophage receptors [1]. Retention of RBC in the spleen, based either on surface or biomechanical alterations, is expected to result in their removal from the circulation. Macrophages occupy indeed 50% of the red pulp, where retention occurs [1]. The ability of the spleen to scrutinize the surface and biomechanical integrity of RBC is expected to play a central role in many inherited and acquired RBC diseases. This is indeed the case in HS [6], thalassemia [16], sickle cell disease [4], as well as in diabetes [17], malaria [9,18–22], and transfusion of stored RBC [23,24]. This review focuses on the potential medical applications of new biomechanical "spleen-mimetic" approaches in malaria and transfusion.

3. Conventional methods to study RBC deformability–phenotypic relevance of microsphiltration

Since the seminal live microscopic observations of Anton van Leeuwenhoek in 1674, several experimental methods to quantify the deformability of RBC have been developed. Micropipette aspiration (that can simultaneously determine RBC surface and RBC volume), filtratio through porous material [25], and more recently ektacytometry [26], optical tweezers [27] and microfluidic chips [28,29]. However, most existing methods to study RBC deformability are not (or not yet) compatible with the stringent requirements for high throughput screening. Micropipette aspiration, optical tweezers and atomic force microscopy are single-cell, quasi-static methods involving localized mechanical cell deformation patterns that reflec only partially the complex process of a RBC crossing a narrow splenic slit [30]. Micropore filtratio and ektacytometry allow dynamic study of RBC but cannot quantify the behaviour of a specifi RBC subpopulation in a mixture. Using biomimetic microfluidi chips, it is possible to partially reproduce the physiologically relevant, dumbbell-shaped deformation of RBC as they cross splenic slits [2,31,32], but these approaches in their current versions have limited sampling throughput.

In 2011, a tip-based, single-sample filtratio device that allows measurement of the capacity of RBC subpopulations to squeeze between calibrated microspheres in a spleen-mimetic way was described and validated [30]. The physiological relevance of "microsphiltration" (i.e., filtratio through microsphere layers) was demonstrated by showing similar retention rates of poorly deformable RBC in the microsphiltration device and in human spleens perfused ex vivo. Recently an automated, miniaturized version of the microsphiltration device was developed which permits the robust evaluation of dozens to hundreds of RBC samples in parallel [31].

4. Principle and method of microsphiltration

Microsphiltration is an experimental method developed to analyze the splenic mechanical clearance of RBC subpopulations. The original device was designed as an inverted 1 mL

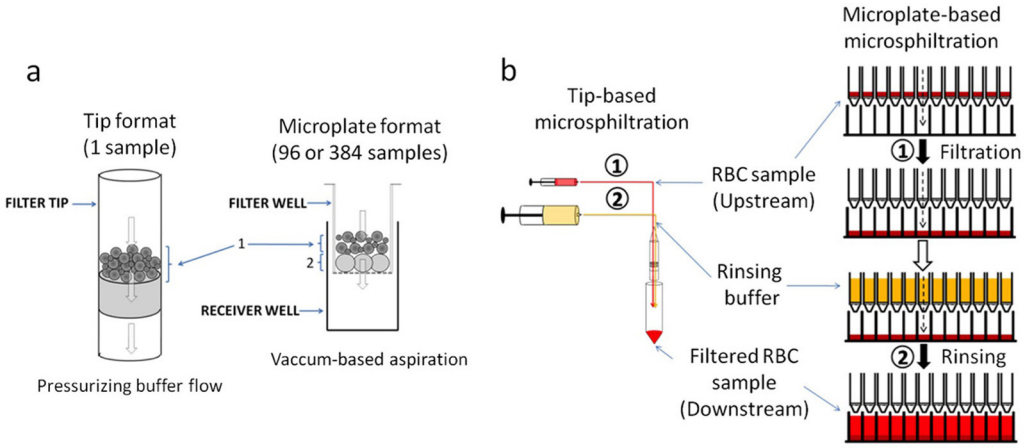


Fig. 1. From tip- to microplate-based microsphiltration. a: with the tip format, 5–25 μm microspheres are manually loaded directly on the top of the anti-aerosol filte of an inverted 1-mL micropipette tip. With the microplate format, 25 to 45 μm-diameter microspheres (2) are automatically dispensed into 96-well filte mesh plates to support a second, upper layer of 5–15 μm microspheres (1) with spleen-like filterin properties [30]; b: tip-based microsphiltration operates through a pressurizing buffer fl w generated by an electric pump coupled to hermetic tubing. RBC are loaded using a 1-mL syringe (1), afterward an electric pump flushe the rinsing buffer across the microsphere matrix (2). Microplate-based microsphiltration operates through vacuum-based aspiration generated by an electric vacuum-pump and is performed in 2 steps; RBC samples (× 96) aspiration across the microsphere matrix (1), and subsequent rinsing using microsphiltration buffer [2]. Adapted from Duez et al., AAC 2015 [31].

filte tip, with the anti-aerosol filte being manually covered with a 5-mm-thick microsphere matrix composed of 5–25 μm-diameter microspheres (Fig. 1). Narrow spaces of define size between microspheres mimic the geometry of splenic inter-endothelial slits [30]. Tubes, syringes and electric pumps were used to perfuse RBC through the microsphere layer in an automated fashion, under controlled fl w rate and pressure. With the tip prototype, leukodepleted RBC samples were resuspended at 2% hematocrit in a buffer supplemented with albumin and then submitted to microsphiltration. RBC subpopulations of interest (for example parasitized RBC, or RBC from HS patients) were diluted in fresh normal RBC. The proportion of the subpopulation of interest was quantifie upstream and downstream from microsphilters, and the result was expressed as a retention rate (%). Retention rates of altered RBC in microsphilters were similar to retention levels in human spleens perfused ex vivo, suggesting that results of microsphilration experiments in vitro accurately predict the level of splenic retention in vivo. With this prototype, 15 minutes are necessary to filte 1 RBC sample. To increase throughput, microsphiltration was adapted to a 96-well microtiter filte plate format. Flow of RBC through microsphere layers is driven by vacuum-based aspiration through microplates loaded with two layers of microspheres using an automated liquid dispenser. A bottom layer of 25 to 45 μm-diameter microspheres provides support to a second, upper 1.15 mm-thick layer of 5–15 μm microspheres forming the filterin matrix mimicking the geometry of splenic slits, as in the prototype (Fig. 1). A two-step vacuum-based aspiration protocol was validated and allows optimal replication of the filterin properties of the tip-based approach. Microsphiltration through microplates has proved to be robust and feasible, as illustrated by the following characteristics:

- different liquid handling dispensers can be used to prepare microsphere filters
- vacuum-based aspiration of RBC samples through microspheres results in retention rates of altered RBC similar to that resulting from a pressurizing fl w generated by a syringe pump using the initial tip-based prototype;
- microsphere mixtures provided by different suppliers can be used to prepare homemade microsphere filter while providing physiologically relevant intersphere apertures;
- the thickness of microsphere layers is experimentally adjusted in each filtratio format so that physiologically relevant retention rates are obtained with control samples (typically heated RBC and parasitized RBC from in vitro cultures);
- in the microplate format, the two-step vacuum-based aspiration sequence is critical to insure complete retrieval of normally deformable RBC downstream from the microsphere filters
- microsphere layers remain wet between the firs (filtratio stricto sensu) and the second aspiration step (rinsing of the microsphere matrix) thus preventing hemolysis that would be induced by exposing RBC to air;
- microplates for microsphiltration can be stored for deferred use and shipped to distant laboratories;
- different technologies can be coupled to microsphiltration in order to quantify retention rates (conventional microscopic observation, fl w cytometry, high content imaging. . .);
- RBC retained within the microsphere matrix are still viable and can be retrieved for further morphological, biochemical or molecular analysis and characterization.

These characteristics highlight the fl xibility, cost-efficien y and accessibility of this new technology. The microplate format enables the simultaneous testing of hundreds to thousands of samples in parallel. By combining a high analytical throughput and a robust physiological validation, microsphiltration is well adapted for pharmacological screening. Preliminary attempts have been performed in the fiel of malaria and transfusion.

5. Microsphiltration-based screening for compounds blocking the transmission of malaria

With more than 200 million clinical episodes annually, *Plasmodium falciparum* malaria is the most frequent acquired disease affecting RBC deformability. The complex life cycle of *Plasmodium* protozoans involves sporozoite inoculation to humans via the bite of *Anopheles* mosquito vectors, initial population amplificatio in hepatocytes, followed by intense multiplication of parasite asexual stages in host RBC. A small proportion of this intra-erythrocytic population engages into sexual development (a 2-week maturation process without multiplication) that ensures transmission to the *Anopheles* mosquito vectors. Multiplying asexual stages differentiate from rings to schizonts in a 48-hour process involving major restructuring of the host RBC membrane and cytoskeleton [33]. Young asexual ring stages are mildly deformable and a significan proportion of them circulate. Mature-asexual stages (trophozoits and schizonts) are stiff and cytoadhere to endothelial cells of the vascular system where they are protected from mechanical sensing and clearance by the spleen. Upon full maturation, schizonts rupture the host RBC membrane to release daughter parasites that can reinvade new RBC. The resulting cyclic waves of parasitized-RBC sequestration and lysis are responsible for the main clinical symptoms of malaria such as febrile episodes and severe attacks.

The carriage of sexual stages that permits malaria transmission is frequently asymptomatic in humans. The current antimalarial portfolio targets predominantly asexual development stages of the parasite that cause symptoms. Amino-8-quinolines (primaquine) are the only currently available pharmaceutical agents displaying high potency at reducing gametocyte carriage in malaria patients. Nevertheless, severe hemolysis in patients with G6PDH deficien y may limit its use in the field (where testing for G6PD deficien y is not easily performed). Artemisimin-based combination therapies (ACT) have a significan but moderate impact on gametocyte carriage. Therefore, the discovery of new pharmacological entities effi ciently targeting gametocytes would greatly facilitate malaria elimination or even eradication. Several screening methods have been proposed recently to uncover potent gametocidal agents [34–40]. As proposed in 2009 in the firs patent describing the method (http://www.google.com/patents/US20110230369), microplate-based microsphiltration offers the opportunity to screen for compounds impairing the circulation properties of gametocytes, thereby blocking malaria transmission. As this approach is based on biomechanical properties rather than survival, novel targets and mechanisms of action may be found.

The development of a sexual stage (gametocyte) lasts 2 weeks during which the parasite undergoes massive cytoskeleton restructurating to finall acquire its typical crescent-like shape. Immature gametocytes and their surrounding host RBC are rigid [41,42] and avoid splenic removal by sequestering in specifi niches such as the extravascular compartment of the bone marrow [43,44]. Mature gametocytes are deformable and circulate. Recent studies using microsphiltration, micropipette aspiration and ektacytometry [41,42] have shown that a drastic switch in gametocyte deformability occurs upon maturation from immature to mature stages and is concomitant with the release of mature stages in the circulation. The ability of mature gametocytes to deform enables them to cross narrow inter-endothelial slits in the spleen, a key property for their persistence in circulation and their availability to *Anopheles* vectors [21]. If mature gametocytes can be stiffened using pharmacological compounds, such an effect is expected to trigger their mechanical clearance into the spleen, thereby removing them from the transmission cycle. A few compounds effective in vitro have been found by a candidate approach [51]. The discovery of such compounds is feasible by establishing a microsphiltration-based screening platform. The non-linear relationship observed between gametocyte numbers in blood patients and infectivity of mosquitoes as measured by membrane feeding assays indicates that a significan impact on malaria transmission would be observed with compounds achieving retention rates $\geq$ 80–95%, depending of epidemiological and clinical parameters. Combined with a classical gametocidal approach, the pharmacological stiffening of mature gametocytes is thus a promising approach that may contribute to malaria control and elimination.

6. Potential contribution of microsphiltration to an optimized transfusion of RBC

RBC concentrates collected and prepared for transfusion are routinely maintained in a storage solution at $4 \pm 2\,^{\circ}C$ for as long as 42 days. Storage solutions were designed to maintain the hemolysis level below 1% in the bag and to obtain a transfusion yield of more than 75% (measured by the % of transfused RBC still in circulation 24 hours after transfusion) [45]. The flippe side of the coin is that up to 25% of the transfused RBC population is cleared from the circulation soon after transfusion. Part of it is even cleared while the transfusion is still ongoing [45]. A small percentage of RBC – in theory approximately 1% (i.e., 3 mL per RBC concentrate) – are expected to be physiologically senescent following any average blood donation. These senescent RBC are programmed for rapid clearance, however up to 25 times more stored RBC are cleared post-transfusion (75 mL per concentrate). The lower transfusion yield with "long-stored" RBC can be attributed to molecular, biochemical and morphological alterations, leading to a progressive – ultimately irreversible – decrease in RBC deformability collectively named storage lesions [46,47]. Transfusion of $\geq$ 3 « old » RBC concentrates is associated with the presence of poorly deformable RBC in circulation over more than 72 hours [24]. This suggests that the spleen is unable to cope with an abrupt infl w of poorly deformable transfused RBC, the biomass of which is greater than the average spleen weight (100–150 g; Fig. 2). Whether transfusion with « old » RBC concentrates is associated with more frequent adverse events or a negative outcome has been a matter of controversy [48]. Recent prospective randomized trials have shown that there is no benefi in transfusing fragile patients with « fresh » blood (i.e., stored for less than 7–10 days) versus older blood (average storage: 22–28 days) [49,50]. The issue of transfusion yield and safety of RBC concentrates stored for

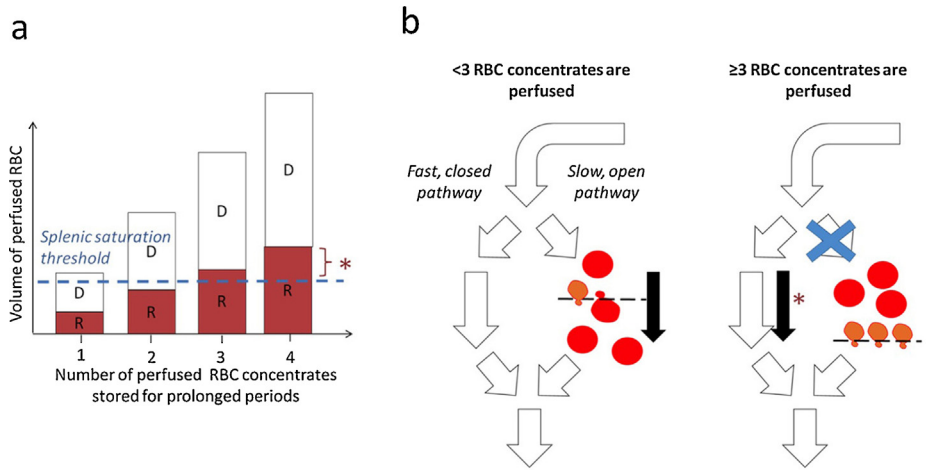


Fig. 2. Model of spleen saturation by poorly deformable RBC from long-stored concentrates. RBC engaged in the splenic circulation follow parallel, slow "open" or fast "closed" microcirculatory pathways (b). In the fast pathway, RBC fl w directly in the lumen of sinuses. In the slow pathway, RBC have to deform to squeeze through narrow inter-endothelial slits from outside to inside red pulp sinuses. Poorly deformable RBC are blocked into the filterin inter-endothelial slits and later phagocytosed by macrophages. The number of filterin slits in a human spleen is limited. A splenic saturation threshold can thus be define as the maximum number of rigid RBC that can be mechanically retained over a given period (a). Upon transfusion, the theorical volume of rigid perfused RBC [R on graph (a) and orange circles on scheme (b)] (25% of 300 mL after 3 weeks of storage = 75 mL) proportionally accumulates with the number of blood, RBC concentrates, as do the volume of deformable RBC [D on graph (a) and red circles on panel (b)]. When a patient is transfused with 1 or 2 RBC concentrates stored for more than 3 weeks, the observed transfusion yield of 75% at 24 hours suggests complete clearance of rigid RBC following entry into the slow pathway (no change in deformability of circulating RBC is detected using ektacytometry). When 3 or more RBC concentrates stored for more than 3 weeks are transfused, the splenic filterin slits of the slow pathway likely saturate with the abrupt infl w of rigid transfused RBC (≈ 225 mL). Total blood fl w (encompassing an excess of rigid perfused RBC) would then exclusively follow the fast, closed pathway for a transient period. Most rigid, perfused RBC are expected to stay in circulation and a drop in the deformability of circulating RBC has been observed in patients transfused in such conditions [24].

30 days or longer has not been addressed by these studies however. Clarifying the mechanisms and relevant clinical impact of storage lesion may help optimize transfusion yields and RBC stock management.

The impact of storage lesion on RBC morphology and biomechanics include: decreased surface area to volume ratio related to membrane loss by microvesiculation, molecular and biochemical changes such as increased pH, ATP and 2,3DPG depletion. These observed storage induced defects are likely to contribute to dysfunctional mechanical properties of the cytoskeleton network. These detrimental changes enhance the discocytes to sphero-echinocytes and spherocytes transformation of a proportion of stored RBC which increases with storage duration. These morphological changes result in a decreased average deformability and are believed to contribute to the rapid mechanical clearance of transfused RBC in the firs 24 hours. Using microsphiltration, we had observed that the proportion of RBC mechanically retained exceeds 25% by the end of the storage period [30]. By separating stored RBC subpopulations able or not to cross the spleen, microsphiltration may help identify relevant morphological, biochemical and molecular processes leading to clearance. This information would be of great interest since it could lead to the identificatio of bio-markers of the storage lesion predicting the transfusion yield. As well, microplate-based microsphiltration may form the backbone of an innovative screening program to identify new molecules to optimize the storage solution composition, with the broad general objective of extending the maximum storage duration.

7. Conclusion–discussion

Methods developed in the last decade for the study of RBC biomechanical properties have led, in combination with molecular and biochemical approaches, to a better understanding of how RBC deform under normal or pathological conditions. By sensing and retaining poorly deformable RBC, the human spleen selects RBC displaying the mechanical ability to fulfil their circulatory functions. Based on the filtratio of RBC through layers of calibrated microspheres, we previously described a tip-based microsphiltration device that replicates the spleen-like retention of poorly deformable RBC. Results from microsphiltration, microfluidic and ektacytometry have shown that striking changes in RBC circulatory behavior result from altered RBC deformability in malaria. Alteration of RBC deformability has also been observed following transfusion.

The recent development of a microplate version of the microsphiltration device is a significan step forward as it allows deformability-based large sampling studies to be performed for the firs time in the fiel of RBC disorders. Hence, microplate-based microsphiltration opens the way to original therapeutic approaches aiming at modulating RBC mechanical fate in vivo.

In malaria, the ability of mature gametocytes to deform and squeeze through narrow splenic slits is crucial for their persistence in circulation and, by extension, for the transmission of *P. falciparum*. Pharmacological screening campaigns have recently been undertaken to exploit this Achille's heel and discover stiffening compounds inducing the mechanical clearance of mature gametocytes into the spleen, thereby removing them

from the circulation and potentially preventing malaria transmission.

In the transfusion field storage lesions contribute to the time-dependent generation of rigid RBC that limit transfusion effica y. When the number of RBC concentrates transfused to a recipient increases, the number of rigid RBC left in circulation increases. In some cases, this may result in splenic saturation. Microplate-based microsphiltration may help identifying biomarkers of the storage lesion predicting the transfusion yield, and support screening campaigns for the discovery of preservative/adjuvant molecules limiting the differentiation of rigid small RBC in blood bags during storage. Microplate-based microsphiltration may also be operated as a routine quality control for blood banking processes or as a clinical follow-up tool for patients undergoing transfusion.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflict of interest concerning this article.

Funding: J. Duez is supported by a grant from "HRA Pharma Laboratoires Paris", J.P. Holleran and A. Ndour by the Bill and Melinda Gates Foundation [OPP1043892] and C. Roussel by the Laboratory of excellence GR-Ex, Paris, France.

References

[1] Groom AC, Schmidt EE, MacDonald IC. Microcirculatory pathways and blood fl w in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. Scanning Microsc 1991;5:159–73 [discussion 173-4].
[2] Picot J, Ndour PA, Lefevre SD, El Nemer W, Tawfi H, Galimand J, et al. A biomimetic microfluidi chip to study the circulation and mechanical retention of red blood cells in the spleen. Am J Hematol 2015;90:339–45.
[3] Stuart J, Nash GB. Red cell deformability and haematological disorders. Blood Rev 1990;4:141–7.
[4] Brousse V, Buffet P, Rees D. The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. Br J Haematol 2014;166:165–76.
[5] Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. Semin Hematol 1993;30:171–92.
[6] Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. Blood 2008;112:3939–48.
[7] Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. Lancet 2008;372:1411–26.
[8] Buffet PA, Milon G, Brousse V, Correas J-M, Dousset B, Couvelard A, et al. Ex vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions. Blood 2006;107:3745–52.
[9] Safeukui I, Correas J-M, Brousse V, Hirt D, Deplaine G, Mulé S, et al. Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen. Blood 2008;112:2520–8.
[10] Koyama S, Aoki S, Deguchi D. Electron microscopic observations of the splenic red pulp with special reference to the pitting function. Mie Med J 1964;14:143–88.
[11] Schnitzer B, Sodeman T, Mead ML, Contacos PG. Pitting function of the spleen in malaria: ultrastructural observations. Science 1972;177:175–7.
[12] Looareesuwan S, Ho M, Wattanagoon Y, White NJ, Warrell DA, Bunnag D, et al. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. N Engl J Med 1987;317:675–9.
[13] Turrini F, Ginsburg H, Bussolino F, Pescarmona GP, Serra MV, Arese P. Phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. Blood 1992;80:801–8.
[14] Lutz HU. Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand) 2004;50:107–16.
[15] Burger P, Hilarius-Stokman P, de Korte D, van den Berg TK, van Bruggen R. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. Blood 2012;119:5512–21.
[16] Dondorp AM, Chotivanich KT, Fucharoen S, Silamut K, Vreeken J, Kager PA, et al. Red cell deformability, splenic function and anaemia in thalassaemia. Br J Haematol 1999;105:505–8.
[17] Keymel S, Heiss C, Kleinbongard P, Kelm M, Lauer T. Impaired red blood cell deformability in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus. Horm Metab Res 2011;43:760–5.
[18] Cranston HA, Boylan CW, Carroll GL, Sutera SP, Williamson JR, Gluzman IY, et al. Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability. Science 1984;223:400–3.
[19] Miller LH, Usami S, Chien S. Alteration in the rheologic properties of Plasmodium knowlesi–infected red cells. A possible mechanism for capillary obstruction. J Clin Invest 1971;50:1451–5.
[20] Dondorp AM, Angus BJ, Hardeman MR, Chotivanich KT, Silamut K, Ruangveerayuth R, et al. Prognostic significanc of reduced red blood cell deformability in severe falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 1997;57:507–11.
[21] Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology. Blood 2011;117:381–92.
[22] Ndour PA, Lopera-Mesa TM, Diakité SAS, Chiang S, Mouri O, Roussel C, et al. Plasmodium falciparum clearance is rapid and pitting independent in immune Malian children treated with artesunate for malaria. J Infect Dis 2015;211:290–7.
[23] Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influenc of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12.
[24] Frank SM, Abazyan B, Ono M, Hogue CW, Cohen DB, Berkowitz DE, et al. Decreased erythrocyte deformability after transfusion and the effects of erythrocyte storage duration. Anesth Analg 2013;116:975–81.
[25] Grigoleit HG, Leonhardt H, Schröer R, Lehrach F. Red blood cell aging as a model to influenc pharmacologically the red cell filterabilit . Res Exp Med (Berl) 1981;179:249–54.
[26] Bessis M, Mohandas N, Feo C. Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices. Blood Cells 1980;6:315–27.
[27] Li J, Dao M, Lim CT, Suresh S. Spectrin-level modeling of the cytoskeleton and optical tweezers stretching of the erythrocyte. Biophys J 2005;88:3707–19.
[28] Shelby JP, White J, Ganesan K, Rathod PK, Chiu DT. A microfluidi model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. PNAS 2003;100:14618–22.
[29] Antia M, Herricks T, Rathod PK. Microfluidi approaches to malaria pathogenesis. Cell Microbiol 2008;10:1968–74.
[30] Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. Blood 2011;117:e88–95.
[31] Duez J, Holleran JP, Ndour PA, Loganathan S, Pascal Amireault, Olivier Français, et al. Splenic retention of Plasmodium falciparum gametocytes to block the transmission of malaria. AAC 2015 [in press].
[32] Rigat-Brugarolas LG, Elizalde-Torrent A, Bernabeu M, Niz MD, Martin-Jaular L, Fernandez-Becerra C, et al. A functional microengineered model of the human splenon-on-a-chip. Lab Chip 2014;14:1715–24.
[33] Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. Nat Rev Microbiol 2009;7:341–54.
[34] Duffy S, Avery VM. Development and optimization of a novel 384-well anti-malarial imaging assay validated for high-throughput screening. Am J Trop Med Hyg 2012;86:84–92.
[35] Duffy S, Avery VM. Identificatio of inhibitors of Plasmodium falciparum gametocyte development. Malar J 2013;12:408.
[36] Lucantoni L, Duffy S, Adjalley SH, Fidock DA, Avery VM. Identifica tion of MMV malaria box inhibitors of plasmodium falciparum early-stage

gametocytes using a luciferase-based high-throughput assay. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:6050–62.
[37] Peatey CL, Spicer TP, Hodder PS, Trenholme KR, Gardiner DL. A high-throughput assay for the identificatio of drugs against late-stage Plasmodium falciparum gametocytes. Mol Biochem Parasitol 2011;180:127–31.
[38] Tanaka TQ, Dehdashti SJ, Nguyen D-T, McKew JC, Zheng W, Williamson KC. A quantitative high throughput assay for identifying gametocytocidal compounds. Mol Biochem Parasitol 2013;188:20–5.
[39] Lelièvre J, Almela MJ, Lozano S, Miguel C, Franco V, Leroy D, et al. Activity of clinically relevant antimalarial drugs on Plasmodium falciparum mature gametocytes in an ATP bioluminescence "transmission blocking" assay. PLoS ONE 2012;7:e35019.
[40] D'Alessandro S, Silvestrini F, Dechering K, Corbett Y, Parapini S, Timmerman M, et al. A Plasmodium falciparum screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. J Antimicrob Chemother 2013;68:2048–58.
[41] Tibúrcio M, Niang M, Deplaine G, Perrot S, Bischoff E, Ndour PA, et al. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. Blood 2012;119:e172–80.
[42] Aingaran M, Zhang R, Law SK, Peng Z, Undisz A, Meyer E, et al. Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Cell Microbiol 2012;14:983–93.
[43] 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.
[44] Aguilar R, Magallon-Tejada A, Achtman AH, Moraleda C, Joice R, Cisteró P, et al. Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. Blood 2014;123:959–66.
[45] Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Schaap NPM, de Grip WJ, Bos HJ, Bosman GJCGM. Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. Transfusion 2008;48:1478–85.
[46] D'Alessandro A, Kriebardis AG, Rinalducci S, Antonelou MH, Hansen KC, Papassideri IS, et al. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. Transfusion 2015;55:205–19.
[47] D'Alessandro A, Nemkov T, Kelher M, West FB, Schwindt RK, Banerjee A, et al. Routine storage of red blood cell (RBC) units in additive solution-3: a comprehensive investigation of the RBC metabolome. Transfusion 2014.
[48] Koch C, Li L, Figueroa P, Mihaljevic T, Svensson L, Blackstone EH. Transfusion and pulmonary morbidity after cardiac surgery. Ann Thorac Surg 2009;88:1410–8.
[49] Lacroix J, Hébert PC, Fergusson DA, Tinmouth A, Cook DJ, Marshall JC, et al. Age of transfused blood in critically ill adults. N Engl J Med 2015;372:1410–8.
[50] Steiner ME, Ness PM, Assmann SF, Triulzi DJ, Sloan SR, Delaney M, et al. Effects of red-cell storage duration on patients undergoing cardiac surgery. N Engl J Med 2015;372:1419–29.
[51] Ramdani G, Naissant B, Thompson E, Breil F, Lorthiois A, Dupuy F, et al. cAMP-Signalling regulates gametocyte-infected erythrocyte deformability required for malaria parasite transmission. PLoS Pathog 2015;11:e1004815.

RESUME

Contexte: La transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum* repose sur le développement intra-érythrocytaire de parasites sexués (les gamétocytes) et leur ingestion par un moustique vecteur. Par filtration au travers d'une matrice de microsphères (microsphiltration), nous avons montré que les gamétocytes matures -*normalement présents dans la circulation des sujets transmetteurs*- sont déformables. Leur capacité à se déformer pour traverser la rate est essentielle à leur présence en circulation. **Objectifs :** Ce projet vise à découvrir des composés rigidifiant les érythrocytes contenant des gamétocytes pour bloquer la transmission du paludisme. En quelques heures, les gamétocytes rigidifiés seront exclus de la circulation sanguine -*donc du cycle de transmission*- par la rate. **Méthodes et résultats:** La microsphiltration a été miniaturisée au format microplaque et couplée à la microscopie à haut débit pour quantifier le nombre de gamétocytes retenus par les filtres. En utilisant la calyculine comme contrôle, l'activité rigidifiante d'antipaludiques de référence a été évaluée par microsphiltration. Les gamétocytes rigidifiés par la calyculine ont également été piégés dans des puces microfluidiques spléno-mimétiques. Leur clairance mécanique splénique a été confirmée dans un modèle murin adapté à la circulation transitoire des globules rouges humains parasités ou non. **Conclusions:** Un criblage par microsphiltration permet de sélectionner des molécules induisant la rétention mécanique splénique des gamétocytes pour bloquer la transmission du paludisme. Un post-criblage *in vitro-in vivo* permet de valider l'activité rigidifiante des actifs découverts par microsphiltration.

Background: Human-to-human transmission of *Plasmodium falciparum* malaria requires the development, within red blood cells (RBC), of sexual parasites termed gametocytes and their ingestion by Anopheles mosquito vector during a blood meal. Using filtration of RBC through microsphere layers (microsphiltration), we had shown that mature gametocytes present in the circulation of infective individuals are deformable. This deformability is a prerequisite for gametocytes circulation as they have (as any other uninfected RBC) to repeatedly cross narrow interendothelial slits in the human spleen. **Objectives :** This project aims at discovering compounds stiffening RBC harboring mature gametocytes, inducing their mechanical retention into the spleen, thereby removing them from the human bloodstream and interrupting malaria transmission. **Methods & Results:** Microsphiltration has been miniaturized to the microplate format, then coupled to high content imaging to quantify gametocyte retention in microsphere filters. Using calyculin as positive control, the gametocyte-stiffening activity of a panel of reference antimalarials was evaluated with the microsphiltration assay. Calyculin-stiffened mature gametocytes were held into spleno-mimetic microfluidic chips and were cleared from the circulation of macrophage depleted mice as rapidly as heat-stiffened control RBC, validating the outcomes of the microsphiltration assay. **Conclusions:** We have developped a microsphiltration assay compatible with screening. The screening/post-screening cascade has the potential to yield potent pharmacological agents blocking malaria transmission based on gametocytes deformability.