Polymorphismes érythrocytaires et protections contre le paludisme a Plasmodium falciparum : exploration de mécanismes innés

Séidina Aboubacar Samba Diakité

▶ **To cite this version:**

Séidina Aboubacar Samba Diakité. Polymorphismes érythrocytaires et protections contre le paludisme a Plasmodium falciparum : exploration de mécanismes innés. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako (Mali), 2015. Français. NNT : 2015PA066671 . tel-01369471

HAL Id: tel-01369471

https://theses.hal.science/tel-01369471

Submitted on 21 Sep 2016

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

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

Complexité du Vivant/Faculté des Sciences et Techniques

Centre d'Immunologie des Maladies Infectieuses-Paris (CIMI-Paris) U 1135 Equipe 4 / Malaria Research and Training Center (MRTC), Unité d'immunogénétique

Titre de la thèse

Polymorphismes érythrocytaires et protections contre le paludisme à *Plasmodium falciparum*: Exploration de mécanismes innés.

Par M. Séidina Aboubacar Samba DIAKITE

Thèse de doctorat de Sciences

Dirigée par M. Pierre BUFFET et M. Mahamadou DIAKITE

Présentée et soutenue publiquement le 28 Septembre 2015

Devant un jury composé de :

Mme MAZIER Dominique Professeur, présidente du jury

M. ELION Jacques, Professeur, Examinateur

M. DIALLO Dapa Ali, Professeur, Examinateur

M. GAMAIN Benoît, Directeur de Recherche, Rapporteur

M. TRAORE Boubacar, Professeur, Rapporteur

Dédicace

A ma famille

Remerciements

Mes remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui de loin ou de près ont contribué à la réalisation de ces travaux de thèse

A mes encadreurs :

Pierre Buffet, Mahamadou Diakité et Rick Fairhurst

Je ne vous remercierai jamais assez pour votre assistance multiforme à la réalisation de ce travail. Tout au long de ces travaux, j'ai été impressionné par vos qualités scientifiques professionnelles. J'ai découvert en vous des êtres sociables de qualité intellectuelle inestimable et d'une rigueur scientifique incommensurable. Avec vous j'ai compris toute la porté de l'expression « sens de la responsabilité ».Vous resterez pour moi une source d'inspiration tant sur le plan moral que intellectuel. ***La course auprès des trois grands éléphants que vous êtes était très agréable.***

Dominique Mazier

Merci pour votre accueil inconditionnel dans le Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie de la Pitié Salpêtrière. A Travers vous je remercie tout le personnel du dit service pour m'avoir offert un environnement de travail jovial sans stress tout au long de ces travaux de thèse.

Ogobara K. Doumbo, Sékou F. Traoré, Dapa Ali Diallo, Seydou Doumbia, Boubacar Traoré et Souleymane Diallo

Je vous prie d'accepter ici l'expression de mes sincères gratitudes et de ma reconnaissance éternelle. A travers vous J'adresse à tous les personnels du MRTC, du SEREFO, de la FMOS, de la FAPH, et du CRLD mes remerciements et toute ma reconnaissance pour leurs aides multiformes dont j'ai bénéficiées de tout un chacun. Que Dieu renforce davantage la cohésion au sein et entre toutes ces structures.

A mes collègues de travail

Alioune NDour,

Merci pour m'avoir appris les techniques de laboratoire surtout la microsphiltration. Tes conseils m'ont été d'une importance capitale dans la réalisation des travaux de cette thèse. Tu m'as surtout impressionné par ta grande capacité d'adaptation aux différentes personnes qui ont séjourné au laboratoire. La longévité de ta complicité avec Pierre prouve à suffisance tes grandes qualités professionnelles et morales. ***Tout était clair au labo. Ceux qui ne l'étaient pas, c'était CLAIRE.***

Valentine Brousse

Merci beaucoup pour ton aide inestimable dans la collecte des échantillons. Ta grande connaissance dans le domaine de la drépanocytose a rehaussé la qualité de ce travail.Surtout un grand merci pour l'idée et l'initialisation de la filtration en condition d'hypoxie sous tente.

Karim Traoré, Saibou Doumbia, Drissa Konaté, Mory Doumbia, Salam Keita, Ibrahim sanogo, Ismaila Coulibaly, Julien Duez, Frederik Gay, Marc Thellier, Eric Kendjo, Oussama Mouri, Sylvestre Biligui, Liliane Ciceron, Camille Roussel, tout le personnel du CIMI-Paris

Merci à toutes et à tous pour vos aides et encouragements.

Jennifer Anderson et Richard Dick Sakai

Merci infiniment Pour leurs aides logistiques.

Remerciement spécial à la Famille Konaté à Sevran France

Lansana, Oumou, Boubacar, Lala, Flatenin, Balla.

Merci pour l'hébergement et votre soutien moral. Que Dieu fasse en sorte que je ne l'oublie jamais.

A mes sponsors et soutiens financiers

-Le programme intra mural du NIAID/NIH des USA

-Le Programme de formation des Formateur des Universités du Mali (PFF)

-Le GR-EX

Liste des Abbréviations :

AMA: Apical Membrane Protein

CD : Cluster of Differenciation

CR1 : Complement Receptor 1

FMPOS: Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

G6PD: Glucose -6-Phosphate Deshydrogénase

GE : Goutte Epaisse

GPI: Glucosyl Phosphotidyl Inositol

GR : Globule rouge

Hb: Hémoglobine

ICAM: Inter cellular adhesion molecule

IRR : Incidence Rate Ratio

LMVR: Laboratory of Malaria and Vector Research

MRTC: Malaria Research and Training Center

MSP : Merosoïte Surface Protein

NIAID : National Institute of Allergy and Infectious Diseases

NIH: National Institute of Health

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PfEMP: *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein

RAP : Rhoptry Associated Protein

RSP : Ring Surface protein

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TIE : Taux d'inoculation Entomologique

TLR: Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor/ Facteur nécrosant les tissus

WHO/OMS : World Health Organisation/ Organisation Mondiale de la Santé

Table des matières

Chapitre I : Introduction 3

I - Généralité sur le paludisme 5

1. Agents pathogènes 5

2. Endémicité et indices paludométriques 9

3- Physiopathologie du paludisme (paludisme simple paludisme grave) 12

4- PfEMP-1 et gènes var 17

5- Les récepteurs (ou contre-ligands) de PfEMP-1 18

6- Protection innée et acquise contre le paludisme. 19

II- Hémoglobinopathies et paludisme : Cas de l'HbAS, de l'HbC et de l'α-thalassémie 24

1- L'Hypothèse d'Haldane : 24

2- Quelques définitions: 25

3- Protection antipaludique conférée par les hémoglobinopathies: Données épidémiologiques (cas de l'HbS, l'Hb C et de l'α-thalassémie) 30

4- Mécanismes identifiées ou suspectées dans la protection conférée par les hémoglobinopathies contre le Paludisme 39

III : Rate et Paludisme 47

1-Anatomie et physiologie de la rate : 47

2- Influence de la rate sur l'issu de l'infection palustre 57

IV : Déformabilité des globules rouges et physiopathologie du paludisme 63

1- Définition et facteurs déterminant la déformabilité des globules rouges 63

2- Les Méthodes conventionnelles d'étude de la déformabilité des GR 64

3- Déformabilité des globules rouges parasités par le *Plasmodium falciparum* 67

Chapitre II : Problématique générale de la thèse, questions posées, axes de travail 68

Chapitre III : RESULTATS OBTENUS 73

1- Organisation pratique et articulation générale des travaux de thèse 73

2- Article I : Cytoadhérence des GR infectés de sujets porteurs d'α-thalassémie 74

2.1- Démarche – Rappel des hypothèses de travail. 74

2.2- Conditions de réalisation de l'étude. 74

2.3- Participation personnelle à ces travaux. 75

2.4- Résultats obtenus. 77

2.5- Autres résultats importants présentés dans cet article 78

3- Article II - Cytoadhérence d'isolats primaires de *Plasmodium falciparum* isolées d'enfants Maliens porteurs d'HbAA, de HbAS ou de HbAC 80

3.1- Démarche– Rappel des hypothèses de travail. 80

3.2- Participation personnelle aux travaux de l'article 80

3.3- Résultats obtenus 83

1- Article III: Exploration de la rétention splénique mécanique des GR contenant des formes jeunes de *Plasmodium falciparum* dans le contexte de l'HbS. 84

4.1- Démarche générale et hypothèses de travail. 84

4.2- Participation personnelle aux travaux de l'article : 84

4.3- Démarche expérimentale et principaux résultats: 84

Chapitre IV : Discussion générale 92

I- Cytoadhérence et protection des sujets α-thalassémiques contre le paludisme grave 92

II- Phénotype de cytoadhérence des isolats primaires de *Plasmodium falciparum* et hémoglobinopathies 95

IV- Proposition de mécanisme générique responsable de la protection des sujets porteurs d'hémoglobinopathie contre les manifestations graves du paludisme 101

V- Quelles implications pour ces études de protections et de leurs mécanismes dans lutte contre le paludisme ? 103

ChapitreV : Conclusion et perspectives 105

Références Bibliographiques 107

Annexes 120

Liste des papiers scientifiques publiés pendant la période de thèse 121

Liste de tableaux 123

Résumé 124

Summary 125

Chapitre I : Introduction

Le paludisme reste de nos jours un véritable problème de santé publique dans le monde, malgré de grandes avancées réalisées dans la lutte contre ce fléau au cours de la décennie écoulée. En effet, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a recensé en 2013, 198 millions de cas de paludisme à travers le monde entraînant 584 000 décès. Le fléau est plus important en Afrique où 90% des décès sont recensés avec 78% constitués d'enfant de moins de 5 ans [1]. Au Mali, en 2012, 2.1millions de cas de paludisme ont été recensés dans les établissements de santé soit 42% des consultation ambulatoire tout âge confondu causant 1833 cas de décès soit 51% du nombre total de décès recensés dans les établissements de santé [2]. Cette situation est d'autant plus alarmante que les parasites responsables du paludisme développent constamment des résistances aux antipaludéens les plus efficaces. D'autre part, les candidats vaccins en cours d'expérimentation bien que ayant les critères d'un bon vaccin classique (bien toléré et immunogène) restent largement insatisfaisant en terme d'efficacité dans la protection contre les épisodes cliniques palustres. Une meilleure compréhension de la biologie du parasite, de la pathogenèse et des mécanismes d'action des immunités anti-palustres permettra d'améliorer les stratégies de lutte contre cette affection. Les travaux de thèse ici présentés s'inscrivent dans ce cadre. Notre étude se fixe comme but d'explorer certains mécanismes innés pouvant expliquer la protection contre le paludisme observée chez des sujets porteurs de certains polymorphismes du globule rouge, notamment l'α-thalassémie, le trait drépanocytaire et l'hémoglobine C. En effet, malgré leurs effets délétères sur les globules rouges (à l'état homozygote), ces variants de l'hémoglobine se sont maintenus à des fréquences très élevées dans les populations humaines vivant dans des zones d'endémie palustre. La propagation de différents haplotypes de l'hémoglobine S de façon parallèle et indépendante dans ces zones serait la conséquence d'une pression sélective exercée par le paludisme au cours de milliers d'années au profit des sujets qui en sont porteurs. L'hémoglobine S dans sa forme hétérozygote protège contre au moins les formes graves du paludisme. Les protections des sujets porteurs de l'α-thalassémie et de l'hémoglobine C contre le paludisme ont elles aussi été rapportées par des études épidémiologiques de terrain.

Les mécanismes biologiques à la base de ces protections sont insuffisamment élucidés. Ceux rapportés n'expliquent pas tous les aspects de ces protections observés dans les études épidémiologiques de terrain. Dans ce travail, nous explorerons les hypothèses du mécanisme de réduction de la cytoadhérence et de la rétention splénique précoce des GR parasités.

I - Généralité sur le paludisme

Le paludisme est une maladie infectieuse du sang causée par des parasites protozoaires appartenant au genre *Plasmodium.* Il est responsable d'un grand nombre de décès chez les jeunes enfants dans le monde. Les parasites du genre P*lasmodium* furent mis en évidence la première fois par le médecin-militaire français Alphonse Laveran en 1880, dans le sang d'un sujet infecté à Constantine en Algérie. Depuis, 5 espèces de *Plasmodium* ont été identifiées comme responsables du paludisme chez l'homme: *P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale et P. knowlesi*. *P. knowlesi* a été décrite récemment chez l'homme en Malaisie en 2004 [3] Globalement, la majorité des infections palustres est causée soit par *P. falciparum* ou par *P. vivax*, et la grande mortalité palustre est associée à l'infection par *P. falciparum* [4]. La situation mondiale du paludisme s'est considérablement améliorée au cours de la dernière décennie. En effet, l'OMS estime qu'entre 2000 et 2010, des réductions de plus de 50 % des cas de paludisme signalés ont été enregistrées dans 43 des 99 pays touchés par la maladie, alors que 8 autres pays ont affiché des tendances à la baisse de 25 à 50 %. Pareillement, l'incidence estimée du paludisme a été réduit de 17 % depuis 2000 et le taux de mortalité spécifiquement dû au paludisme a diminué de 26 % [5]. Cependant, le paludisme reste toujours un problème majeur de santé publique dans le monde. En effet le paludisme menace encore globalement 3.4 milliard de personnes. L'OMS estimait à 207 millions le nombre d'épisodes palustres enregistré en 2012 entrainant 627000 décès. Près 80% de cas et 90% des décès étaient recensés en Afrique et 77% des décès concernait les enfants de moins de 5 ans.[4]

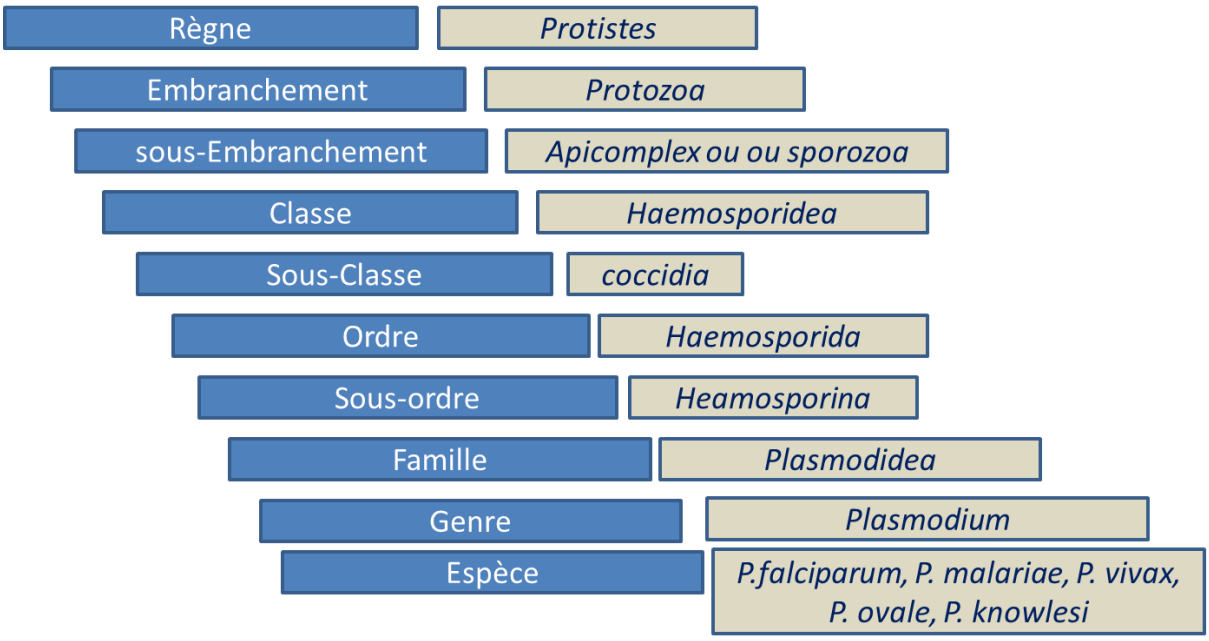
1. Agents pathogènes

1.1. Classification (Taxonomie)

Les plasmodies appartiennent au Règne des Protistes, au Phylum (ou embranchement) des *Protozoa*, au sous-phylum des *Apicomplexa* (sporozoa), à la Classe des *Haemosporidea*, à la Sous-classe des *Coccidia*, à l'Ordre des *Haemosporida*, au Sous-ordre des *Haemosporina*, à la Famille des *Plasmodidae* et au Genre *Plasmodium*. Le

genre *Plasmodium* comprend 172 espèces qui infectent les oiseaux, les reptiles et les mammifères.

Les autres genres du même groupe comprennent *Hepatocystis*, *Haemoproteus* et *Leucocytozoon*, dont aucun n'est infectieux pour l'homme. Le genre *Plasmodium* est subdivisé en 10 sous-genres. Les parasites des humains et des primates font tous partie soit du sous-genre *Plasmodium (Plasmodium*) soit du sous-genre *P. (Laverania)*, alors que toutes les autres espèces infectant les mammifères font partie du sous-genre hétérogène *P. (Vinckeia)*. Les différents sous-genres se distinguent les uns des autres par des caractères morphologiques et des particularités du cycle biologique.



1.2. Cycle vital du *Plasmodium*

Le cycle de transmission du paludisme fait intervenir trois acteurs : le parasite, le vecteur et l'être humain, tous trois en relation dynamique avec les facteurs environnementaux et les conditions socio-économiques. Ces différents facteurs conditionnent l'épidémiologie du paludisme dans une région donnée. Le parasite du paludisme a un cycle hétéroxène à deux hôtes puisqu'il comporte obligatoirement un passage alterné par un vertébré (hôte intermédiaire qui est l'homme) et un moustique (hôte définitif).

1.2.1. Cycle *Plasmodium* chez l'Anophèle vecteur :

Le 20 août 1897, Ronald Ross (1857-1932), médecin chirurgien du service de santé britannique en Inde démontrait la transmission du *Plasmodium* par le moustique chez les mammifères [6]. Il obtint ainsi le Prix Nobel de médecine en 1902 pour cette découverte et proposait que cette date du 20 août devienne à l'avenir la journée mondiale du moustique. Giovanni Battista Grassi et collaborateurs ont par la suite confirmé cette découverte chez l'homme par la découverte des moustiques du genre *Anopheles* comme vecteur pour *P. vivax* et *P. falciparum* [7]. Lorsque l'anophèle pique une personne infectée, le parasite pénètre dans le moustique avec le sang et subit des transformations complexes pendant une période de 14 à 21 jours avant d'être prêt à réinfecter un autre hôte humain.

Par la piqûre, le moustique absorbe des globules rouges dont certains portent le *Plasmodium* sous la forme de gamétocytes. Les formes asexuées des parasites ainsi que les hématies sont digérées alors que les gamétocytes mâles et femelles subsistent et poursuivent le cycle sexué du *Plasmodium*. Les gamétocytes sont haploïdes, comme tous les autres stades chez l'homme. Ils sont présents dans le sang périphérique à la fois sous forme de gamétocyte mâle et femelle. Les gamètes mâles et femelles s'unissent dans l'estomac du moustique pour donner un zygote, ookinète (ou œuf mobile) qui traverse la paroi de l'estomac et s'installe à la périphérie de cet organe en devenant un oocyte. L'oocyte se divise et donne naissance à plusieurs milliers de sporozoïtes [8]. Ceux-ci gagnent les glandes salivaires du moustique. On estime que les glandes salivaires d'un moustique peuvent contenir jusqu'à 6 000 sporozoïtes et que le nombre de sporozoïtes inoculés au cours d'un repas sanguin est le plus souvent compris entre 20 et 30, pouvant quelques fois approcher le millier [9, 10]. Les vecteurs en causes sont des moustiques du genre *Anopheles* dont les femelles sont hématophages et responsables de la transmission. Les anophèles appartiennent au Phylum (ou embranchement) des *Arthropoda*, à la classe des *Insecta*, à la sous-classe des *Neoptera* ; à l'ordre des Diptera, au sous-ordre des Nematocera, à la famille des

Culicidae, à la sous-famille des *Anophelinae* qui compte 3 genres : *Chagasia*, *Bironella* et le genre *Anopheles.*

1.2.2- Survie et multiplication du *Plasmodium* chez l'homme, retransmission

Lorsqu'un moustique infecté pique un homme, il injecte le parasite avec sa salive sous la forme de sporozoïtes, éléments infectants, vermiformes de 4 à 5 µm de long, qui sont entraînés dans la circulation générale. Chez l'homme, la piqûre de 5 moustiques infectés suffit pour assurer un taux d'infection de 100% chez des volontaires [11]. Il est maintenant bien établit que les sporozoïtes du *Plasmodium*, une fois chez l'homme, atteignent le foie et migrent à travers les cellules de Küpffer et plusieurs hépatocytes avant de finalement infecter un hépatocyte [12]. Ils pénètrent dans les cellules hépatiques grâce à leur complexe apical. Dans le foie, les sporozoïtes se divisent de très nombreuses fois (schizogonie). Cette phase, cliniquement muette, peut durer entre 7 jours et quelques semaines, suivant les espèces plasmodiales.

Cette multiplication aboutit à un éclatement des hépatocytes et à la mise en circulation de plusieurs milliers de mérozoïtes capables d'envahir par endocytose les globules rouges. Dans ces derniers, chaque mérozoïte se divise pour donner naissance à 8 à 34 nouveaux parasites (mérozoïtes), capables à leur tour d'envahir d'autres globules rouges.

Ce cycle dure de 48 à 72 heures selon les espèces. Après un certain nombre de cycles, spontanément (programmation génétique ?) ou sous l'effet d'une pression médicamenteuse, quelques parasites se différencient en gamétocytes mâles et femelles dont le potentiel sexué est bloqué jusqu'à leur absorption par l'anophèle.

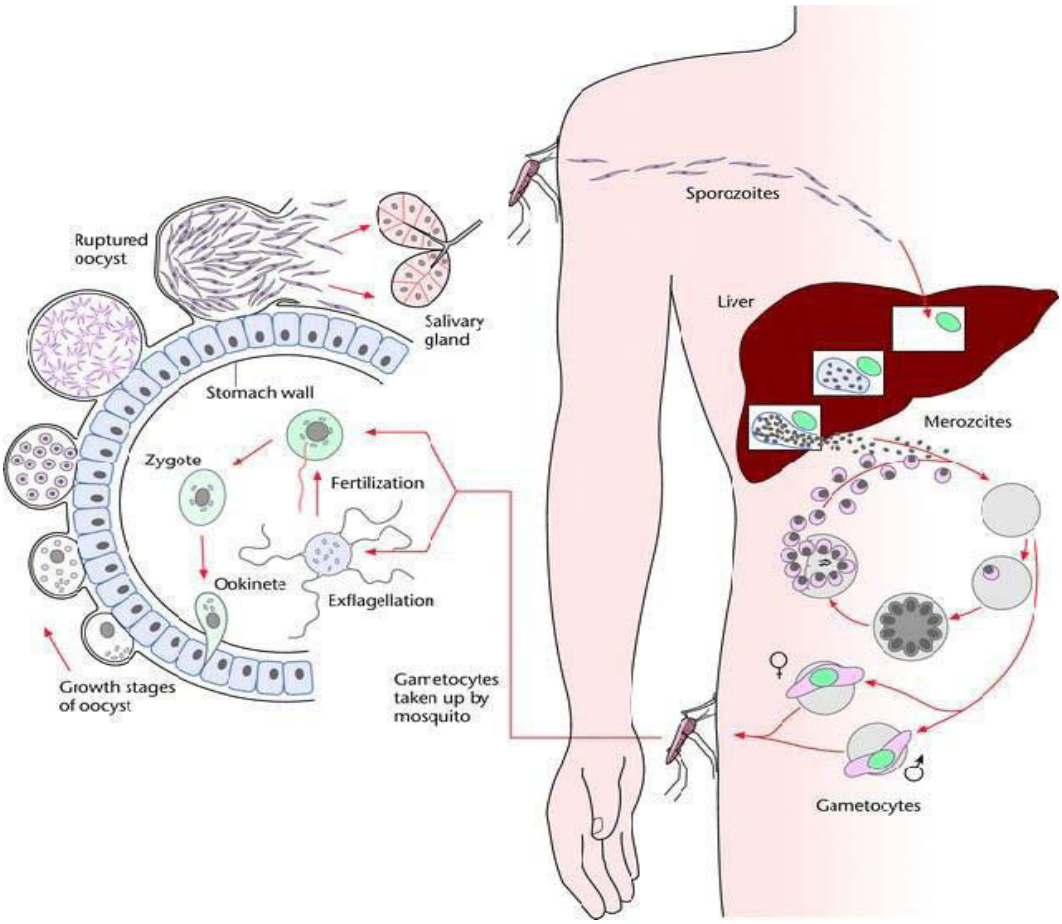


Figure 1: Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* chez le moustique et chez l'homme

Source : *Pr M. DIAKITE, Laboratoire Immuno-Génomique & Parasitologie, MRTC/FMPOS BP 1805, Bamako, Mali*

2. Endémicité et indices paludométriques

La situation palustre dans une communauté peut être décrite en termes d'***endémicité,*** qui donne des indications sur l'importance de la transmission, sur la circulation du parasite dans la communauté et sur "l'*intensité*" de la maladie. Elle permet aussi de délimiter le problème palustre dans l'espace

L'indice de stabilité, déterminé par MacDonald [13], caractérise l'enracinement du paludisme et permet de distinguer :

- **les zones de paludisme stable**, où la forte transmission entraîne une prémunition. Celle-ci n'empêche pas les habitants d'être parasités mais limite les

manifestations pathologiques aux classes d'âge les plus jeunes alors que les adultes sont peu touchés

- **les zones de paludisme instable**, où le caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition; la maladie sévit alors sous forme d'épidémie touchant toutes les classes d'âges.

Entre ces deux extrêmes existe toute une palette de situations intermédiaires, modulée par différents facteurs comprenant le type de transmission, le type de vecteur, l'espèce plasmodiale en cause et le niveau d'immunité dans la population ainsi que les caractéristiques environnementales.

Tableau 1: Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme [14]

Niveau d'endémicité	**Transmission**	**Indice plasmodique Chez les enfants de 2-9 ans (%)**	**Commentaires**
Paludisme hypoendémique	Faible: sub-périodique ou sporadique	Généralement ≤ 10	Les moustiques sont instables, généralement difficiles à détecter; des épidémies sérieuses peuvent survenir
Paludisme mésoendémique	Saisonnière, périodique suivant une bonne saison pluvieuse	11-50 en fonction du temps de surveillance	les moustiques fluctuent, détectables en fonction des saisons, une fenêtre saisonnière peut survenir; les habitants acquièrent une certaine immunité
Paludisme hyperendémique	Intense (saisonnière) chaque année	51-75	Fluctuation saisonnière des cas de paludisme; fréquentes séquelles sévères chez les jeunes enfants; une certaine immunité chez les adultes
Paludisme holoendémique	La transmission peut survenir à travers l'année avec des pics de transmission	> 75	On peut détecter les moustiques toute l'année avec des pics; des taux élevés d'anémie chez les très jeunes enfants et la prémunition chez les adultes

D’autres indices paludométriques permettent de définir l’endémicité du paludisme. Il s’agit de :

- **L’indice splénique** (% d'enfants entre 2 et 9 ans présentant une splénomégalie) permet également le classement en zones «hypoendémique» (indice splénique de 0 à 19 %), «méso-endémique» (indice splénique de 20 à 49 %), «hyper-endémique» (indice splénique de 50 à 75 %) et «holoendémique» (indice splénique supérieur à 75 %).
- Le **taux d’inoculation entomologique (TIE ou *EIR en anglais*)** lequel est le nombre de piqûres infectantes des moustiques que reçoit une personne par unité de temps (Macdonald, 1957). C’est une mesure plus directe de l’intensité de la transmission (Beier et al., 1999). Le TIE permet également le classement en zones d'hypoendémie (TIE < 0,25 ; **endémicité faible**), en zones de méso-endémie (TIE : 0,25-10 ; **endémicité modérée**), en zones d'hyper-endémie (TIE : 11-140 ; **endémicité élevée**) et en zones d'holoendémie (TIE >140 ; **endémicité élevée**). Dans les situations où le TIE est en dessous de 10, la prévalence du paludisme est presque directement proportionnelle au TIE et la transmission tend à être instable et est considérée d’intensité faible à modérée. A un TIE annuel au dessus de 10, les personnes reçoivent de multiples piqûres infectantes et l’intensité de la transmission du paludisme est considérée comme élevée et tend à être stable [15].

3- Physiopathologie du paludisme (paludisme simple paludisme grave)

De toutes les espèces de plasmodium qui parasitent l’homme, *P. falciparum* est de loin le plus pathogène et induit la part majeure de la mortalité et la morbidité par paludisme dans le monde. Les personnes vivant dans des zones d’endémie palustre sont constamment exposées aux infections palustres. Cependant dans la majorité des cas, ces infections restent asymptomatiques. Seule une minorité des cas évolue vers le paludisme symptomatique et très peu d’entre eux deviennent graves [16]. Trois éléments déterminent la pathogénicité du plasmodium : le parasite lui-même, l’hôte et l’environnement. Des interactions spécifiques interviennent entre le parasite et l’hôte

et aboutissent à diverses manifestations cliniques du paludisme. Parmi ces interactions, nous pouvons citer : l'invasion des GR, la fixation de GR non parasités par des GR parasités formation de rosettes ou « Rosetting »), l'adhésion des GR parasités aux cellules endothéliales dans les petits vaisseaux (Cytoadhérence), la production de toxines par les parasites comme le pigment issu de la digestion de l'hémoglobine (hémozoïne résultant de la polymérisation de l'hème) [17], l'acide urique [18] l'ensemble aboutissant à la libération dans l'organisme de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα. [19-26]

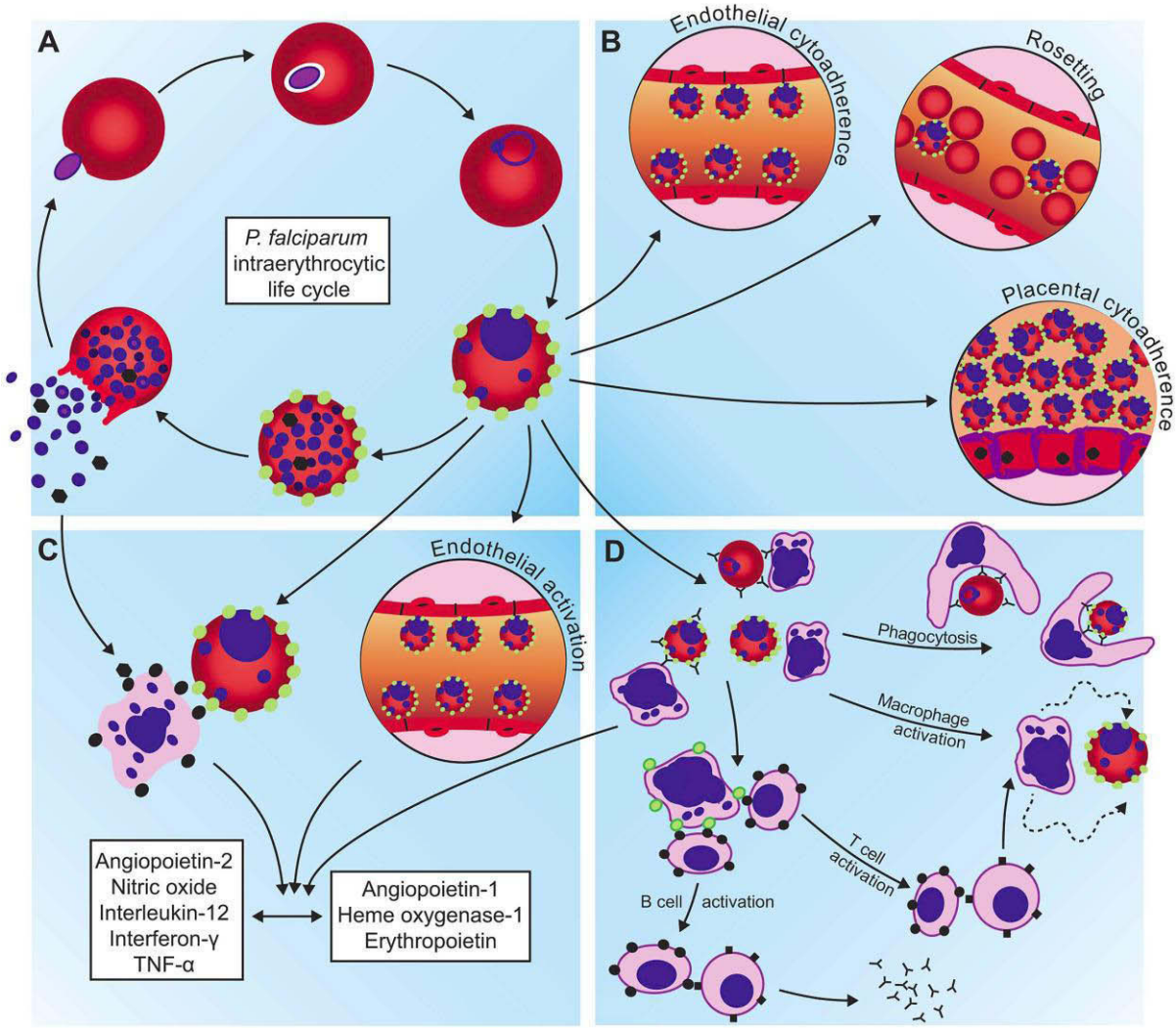


Figure 2: pathogénèse du paludisme à *P. falciparum*

source :[27]

3.1- L'invasion des globules rouges

L'invasion des GR par le plasmodium contribue indirectement à la physiopathologie du paludisme car elle est indispensable à l'expansion de la population parasitaire au stade sanguin [28]. Il s'agit d'un processus hautement spécifique, ordonné et séquentiel ne dépassant pas 30 secondes. Le mérozoïte s'attache à une hématie susceptible puis s'oriente de manière à apposer son complexe apical sur la membrane de l'hématie. Une invagination se forme, à l'intérieur de laquelle s'introduit le mérozoïte. Cette invagination finit par former une vacuole parasitophore autour du mérozoïte. Les molécules de surface du GR auxquelles se fixe le mérozoïte ont fait l'objet de nombreuses recherches. Les sialoglycoproteines ou glycophorines (GPs) spécialement la GPA et La GPB ont été les premiers récepteurs identifiés [29] mais on peut aussi cite le GP-C, l'antigène du groupe sanguin A. Du côté du parasite, les ligands parasitaires impliqués sont l'EBA 175 (Erythrocyte Binding Antigen), le MSP-1 le MSP-2-4/5 (Mérozoïte Surface Proteins), l'AMA-1 (Apical Membrane Antigen), les RAP1, 2, 3 (Rhoptry associated protein).

Pour un individu donné, et pour une souche parasitaire donnée, la gravité du paludisme dépend intimement de la charge parasitaire. Cette dernière est liée en partie à la capacité du parasite à infecter les GR et à se multiplier à l'intérieur de ce dernier [30]. Des parasite isolés de patients présentant un paludisme grave ont montré un taux initial de multiplication *in vitro* 3 fois supérieur à ceux de parasites isolés de patients avec paludisme simple [30]

3.2- Le Rosetting :

Le rosetting consiste en la fixation des GR non parasités autour d'un GR parasité mature. Il fait intervenir des protéines parasitaires exprimées à la surface des GR parasités telles que le PfEMP-1 et leurs récepteurs présents sur le GR comme le CD36, CR1, et certaines lectines [31-33]. D'autre composant plasmatique pourraient être impliqués dans le rosetting comme des IgM non immunes, le fibrinogène et d'autres composants non identifiés [34, 35]. Le rosetting est associé à la gravité du paludisme dans plusieurs études mais pas dans toutes. Tous les isolats de *P. falciparum* issus de

patients avec paludisme grave se sont montrés capables de rosetting alors que beaucoup d'isolats issus de patients avec paludisme simple en était incapables [36]. Le mécanisme par lequel le rosetting produit la maladie n'est pas complètement élucidé. La formation de rosettes n'a pas été observée de façon convaincante *in vivo*. Des expériences rigoureuse menées avec des souches de parasites produisant le rosetting et celle ne le produisant pas dans les conditions statiques et même de flux n'ont pas pu prouver une augmentation du taux d'invasion des GR par les parasites induisant le rosetting [37]. Le rosetting a été aussi observé *in vitro* avec des *P. vivax*, [38, 39] dont l'infection est peu virulente chez l'homme. Ces observations suggèrent que le rosetting ne peut à soi seul causer du neuropaludisme et de la défaillance multiviscérale. Le rosetting apparaitrait donc comme une expression phénotypique d'autres propriétés du parasite comme la Cytoadhérence qui est, elle, solidement corrélée à la gravité du paludisme[23].

3.3- La Cytoadhérence

La Cytoadhérence est un processus dans lequel des GR parasités par des formes matures de *P. falciparum* se fixent de façon spécifique aux cellules endothéliales des petits vaisseaux (artérioles, capillaires, et veinules post-capillaires). C'est ce qui explique en partie l'absence de formes matures de *P. falciparum* dans le sang périphérique. La Cytoadhérence est l'interaction cellulaire la plus étudiées dans la pathogénèse du paludisme. Ainsi de multiples molécules présentes sur les GR parasités et les cellules endothéliales impliquées dans ce phénomène ont été identifiées. Ainsi PfEMP-1 (une protéine parasitaire de 200-350 KDa) apparait comme le plus important ligand parasitaire impliqué dans ce phénomène [19, 40, 41]. Sa partie N-terminale comporte plusieurs domaines (DBL, CIDR) opérant l'interaction avec des récepteurs endothéliaux de l'hôte. On peut citer entre autre: l'ICAM-1, le VCAM-1, L'E-selectin, la Thrombospondine, le PECAM (Platelet –Endothelial Cell Adeshion Molecule), L'antigène du Groupe sanguin A, les IgM non immunes, le CD36 [42-44] Des études ont montré que ICAM-1 et la E-selectin sont exprimés en plus grande quantité dans le micro-vaisseaux des sujets présentant un paludisme grave comparés à

ceux des sujets présentant un accès simple [45]. En immobilisant les globules rouges parasités dans les petits vaisseaux, la Cytoadhérence interrompt leur circulation systémique. Ils ne sont donc pas soumis à la clairance splénique s'exerçant normalement sur les globules rouges altérés. La cytoadhérence expose aussi au moins une partie d'entre eux à un environnement pauvre en oxygène, propice à leur croissance, facilitant ainsi l'invasion de nouveaux GR. En induisant ainsi l'adhérence de sa cellule hôte (le GR) ainsi aux cellules endothéliales des petits vaisseaux, le parasite déclenche une souffrance tissulaire. Cette ischémie locale est le mécanisme central du neuropaludisme et de plusieurs composants de la défaillance multiviscérale du paludisme grave [46]. Les globules rouges parasités cytoadhérant peuvent obstruer les petits vaisseaux et déclenchent le recrutement des plaquettes et des monocytes, l'ensemble activant les cellules endothéliales et la production de cytokines.

3.4- L'induction de cytokines inflammatoires

Certaines molécules d'origine parasitaire ont été décrites comme ayant une activité toxinique. Parmi elles, l'hémozoïne [47, 48], La Glycosylphosphotidylinositol (GPI) incorporées aux molécules parasitaires [48-50] et l'acide urique parasitaire [18]. La réponse inflammatoire systémique au cours de l'accès palustre contribue à l'expression de récepteurs endothéliaux inductibles comme ICAM1, ce qui amplifie la Cytoadhérence et la séquestration cérébrale des globules rouges parasités.

3.5- Anémie palustre

La pathogénèse de l'anémie palustre à *P. falciparum* est multifactorielle. Cependant l'infection à *P. falciparum* contribue directement de façon importante à cette manifestation grave. La perte des GR constitue un mécanisme important de l'anémie dans les infections aigue à *P. falciparum* chez les sujets naïfs [51]. Les troubles d'érythropoïèse souvent observés au cours des infections aigue à *P. flaciparum* jouent un rôle mineur dans l'anémie palustre [52]. Il a été rapporté que même un arrêt complet d'érythropoïèse n'entraîne que 1% de perte des GR totaux de l'organisme par

jour [53]. Cependant, l'inhibition de l'érythropoïèse semble jouer un rôle prépondérant dans l'anémie en cas de portage prolongé à faible parasitémie [54]. L'hypersplénisme et l'hémolyse induite par les anticorps sont considérés comme les principaux mécanismes de l'anémie chez les patients infectés par *P. falciparum* dans le contexte particulier de la splénomégalie palustre hyper-immune [54, 55].

4- PfEMP-1 et gènes var

Au cours de son développement intra-érythrocytaire, *P. falciparum* exprime des protéines très antigéniques qui sont transportées et exposées à la surface des GR infectés. Ces protéines parasitaires appelées *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane proteins (PfEMP) sont exprimées à la surface des GR infectés au niveau des protubérances induites par l'infection par *P. falciparum* appelées « Knobs ». PfEMP-1 désigne une famille de protéines parasitaires de 200 à 350 kDa. Les membres de la famille PfEMP-1 sont codés par une famille d'une soixantaine de gènes appelés les gènes var et chaque gène *var* code pour un variant de PfEMP-1 d'antigénicité spécifique [19]. Un seul gène var est exprimé à la fois par le parasite au cours d'un cycle intra érythrocytaire donné [56, 57]. Les anticorps induits par PfEMP-1 étant spécifiques de variant, cela augmente la probabilité que le parasite échappe à une reconnaissance par les anticorps induits par les PfEMP-1 exprimées au cours des infections ou cycles précédents. En plus, les gènes var sont constamment objet de remaniements par recombinaison ou réarrangements donnant naissance à un vaste répertoire de gènes dans la nature. PfEMP-1 joue également un rôle de ligand parasitaire permettant au GR parasités par *P. falciparum* d'adhérer aux cellules humaines comme les GR, les cellules endothéliales, les monocytes, les plaquettes à travers des récepteurs (voir chapitres précédents). En effet malgré une grande diversité antigénique, la fonction adhésive générique de PfEMP-1 est conservée. En somme, le PfEMP-1 joue un rôle très important pour la survie du parasite durant sa vie intra érythrocytaire en permettant non seulement une évasion de l'immunité adaptative anti-PfEMP-1 variant –spécifique, mais aussi de la clairance innée splénique des GR parasités tout en maintenant les parasites dans un environnement propice à leur

développement. Les protéines de PfEMP-1 possèdent un large segment N-terminal extra cellulaire et plusieurs domaines DBL (Duffy binding-like domains) séparés par des régions inter-domaines riches en cystéine (CIDR pour Cystein-rich Inter domain Region) [19, 58]. Les domaines DBL et CIDR peuvent appartenir à un petit nombre de classe de séquence et leur arrangement se fait de façon modulaire. Ainsi les domaine DBL ont été groupés en 7 classes (DBL α, α1, β, γ, δ, ε et x), et les CIDR ont été groupés en 4 classes (CIDR α, α1, β et γ). En fonction de leur structure, de leur position chromosomique et de leur orientation, les gènes v*ar* ont à leur tour été classés en groupe (A, B et C) et en 2 groupes intermédiaires (A/B, B/C) [58-61].Certains variants de PfEMP-1 sont associés à la formation accrue de rosettes *in vitro* et/ou au paludisme grave [62-64]

5- Les récepteurs (ou contre-ligands) de PfEMP-1

5.1- Antigène Cluster of Différentiation 36 (CD36)

Plusieurs isolats de *P. falciparum* adhérent à l'endothélium via l'antigène CD36. C'est un récepteur commun à un ensemble de molécules incluant la thrombospondine et les acides gras à chaîne longue. Il est exprimé par les plaquettes et les cellules dendritiques aussi bien que l'endothélium. Des polymorphismes du gène de CD36 semblent influencer la susceptibilité des sujets au paludisme [21, 65], [66-68].

5.2- Molécule d'Adhésion Intercellulaire-1 (ICAM-1)

ICAM-1 est un membre de la superfamille des immunoglobulines qui comprend les anticorps et les récepteurs des cellules T. ICAM-1 est une protéine transmembranaire qui possède une extrémité amino-terminale extracellulaire et un domaine transmembranaire unique. La structure de ICAM-1 est caractérisée par une forte glycosylation. Il s'agit d'une molécule d'adhésion intercellulaire présente en faible concentration dans les membranes des leucocytes et des cellules endothéliales. Lors de la stimulation par des cytokines, sa concentration augmente considérablement (récepteur inductible). Lorsqu'il est activé, les leucocytes se lient aux cellules endothéliales via ICAM-1 / LFA-1, puis transmigrent dans les tissus [69]. Quelques isolats de *P. falciparum* adhérent fortement à l'endothélium via l'ICAM-1 [70, 71]. Un

polymorphisme au niveau du domaine N-terminal présente des fréquences élevées dans les populations africaines, et réduit l'activité adhésive de l'ICAM-1. Une étude au Gabon a démontré que l'allèle de faible adhérence était associé à une réduction de la susceptibilité au paludisme grave [72].

5.3- Le Platelet-Endothelial Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31)

Un autre récepteur d'adhésion pour *P. falciparum* est le CD31, encore appelé PECAM-1 [73]. Le PCAM-1 est une protéine retrouvée à la surface des plaquettes, des monocytes, des polynucléaires neutrophiles et de certaines cellules T. C'est une protéine transmembranaire de 150 KDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Elle joue un rôle important dans la migration leucocytaire, l'angiogénèse et l'activation des intégrines. Une étude en Thaïlande a rapporté qu'un haplotype de PECAM-1 est plus fréquent chez les sujets présentant le neuropaludisme suggérant le rôle du PECAM-1 dans cette maladie [74].

5.4- Le récepteur-1 du complément (CR-1)

La séquestration des parasites n'est pas seulement due à l'adhérence à l'endothélium. Quelques souches de *P. falciparum* expriment un phénotype connu sous le nom de rosetting, ou les hématies parasitées adhérent à d'autres hématies non-parasitées.

Le récepteur du complément de type 1 (CR1) a été identifié comme étant le principale récepteur de PfEMP-1 parasité impliqué dans le rosetting des hématies non-infectées aux hématies infectées par *P. falciparum*, et la formation des rosettes a été associée au paludisme sévère [63]. Aussi certains polymorphismes du CR-1 influenceraient la gravité du paludisme chez l'homme [63, 75, 76].

6- Protection innée et acquise contre le paludisme.

Les études épidémiologiques ont montré que le sujet vivant en zone d'endémie était susceptible d'acquérir une certaine protection contre le paludisme. Cette immunité protectrice, appelée prémunition se caractérise par:

- Une apparition progressive après infections répétées,
- Une installation d'autant plus précoce que la transmission est forte et stable,
- Une action incomplète n''empêchant pas toute nouvelle infection et ne permettant pas l'élimination complète des parasites par le sujet,
- Une action instable qui diminue si le sujet n'est plus exposé au parasite pendant de longues périodes

La multiplication de *P. falciparum* peut entraîner la mort de l'hôte mais , si le sujet survit, il développe des mécanismes protecteurs qui peuvent, à la longue, inhiber la croissance du parasite et supprimer ainsi le stimulus antigénique de l'immunité de protection : on parle alors de tolérance. Aussi, le parasite dispose de certains moyens lui permettant de contourner les mécanismes de défense de l'hôte. Enfin, l'immunité anti palustre jouerait un rôle dans la physiopathologie du paludisme. En effet, certains troubles de la régulation de la réponse immune favoriseraient l'apparition de phénomènes immunopathologiques ou immunodépresseurs, qui peuvent aussi bien entraîner des manifestations graves de la maladie et limiter la croissance du parasite. Ainsi s'établit un équilibre précaire entre la survie de l'hôte et celle du parasite.
I1 existe deux sortes de mécanismes protecteurs :
- Les mécanismes naturels qui inhibent ou ralentissent le développement du parasite chez un hôte naïf (c'est-à-dire n'ayant jamais été exposé au parasite). Bien qu'ils ne soient pas de nature immunologique, on parle cependant d'immunité naturelle.
- Les mécanismes immunologiques spécifiques d'espèce et acquis consécutivement à une primo-infection par le parasite. On parle alors d'immunité acquise.

6.1- La protection naturelle anti-palustre

L'immunité innée mieux décrite sous le terme de protection naturelle anti-palustre est assurée essentiellement par des facteurs génétiques constitutionnels qui constituent des barrières naturelles soit au développement de certaines espèces plasmodiales chez des hôtes particuliers, soit à la mise en œuvre des mécanismes pathogènes (parfois même les deux). Parmi ces facteurs on peut citer:

6.1.1- Le type hémoglobinique

Certains types hémoglobiniques sont connus pour leur rôle dans la protection contre les formes graves du paludisme. Parmi ces types hémoglobiniques, l'hémoglobine S dans sa forme hétérozygote encore appelée trait drépanocytaire est le mieux caractérisée. En effet de nombreuses études épidémiologiques ont rapporté une association entre le portage du trait drépanocytaire et la protection contre diverses formes du paludisme [77-82]. Cependant les mécanismes exacts de cette protection restent encore incomplètement élucidés. D'autres types hémoglobiniques ont été trouvés significativement associés à un risque réduit de développement des formes graves du paludisme chez l'homme. On peut citer : l'hémoglobine C [83], [84], et l'alpha thalassémie [80, 85-89]. La protection conférée par ces types hémoglobiniques contre le paludisme sera traitée plus en détail dans le chapitre suivant. L'hémoglobine F (hémoglobine fœtale), la principale hémoglobine présente chez le nouveau-né, inhiberait aussi la croissance de *P. falciparum* [90], ce qui expliquerait en partie, la rareté des accès palustres chez le nourrisson.

6.1.2- Des déficits enzymatiques.

Le déficit enzymatique le plus nettement associé à la protection des sujets contre le paludisme est le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase [91, 92]. Le déficit en pyruvate kinase aurait lui aussi un rôle protecteur contre le paludisme grave [93].

6.1.3- Les polymorphismes des récepteurs membranaires du globule rouge

Des molécules présentes à la surface des globules rouges jouent un rôle important dans l'invasion de ces derniers par les plasmodies. Ces molécules jouent un rôle de récepteur pour des ligands de mérozoïtes et certaines sont spécifiques d'espèce plasmodiale. Ainsi, des GR humains dépourvus du groupe Duffy (Duffy négatifs) sont réfractaires à l'infection par *P. vivax* [94] et *P. knowlesi* [94]. De même, des GR humains déficients en une glycoprotéine de membrane (la glycophorine A) sont résistants à l'infection par *P. falciparum* [92]. Cette glycoprotéine pourrait être un des récepteurs membranaires impliqué dans l'invasion par *P. falciparum.* Certains

polymorphismes du récepteur pour le complément-1 (CR-1) seraient aussi associés à la protection contre le paludisme grave [63, 75, 76].

6.2- Immunité acquise (adaptative)

6.2.1- Immunité adaptative cellulaire anti-palustre

Les études chez l'homme et les souris indiquent que les cellules T CD4+ et CD8+ sont importantes pour la protection contre le paludisme [95, 96]. Les observations cliniques suggèrent que la durée de l'immunité protectrice dépend de la persistance de l'exposition à l'antigène. La fonction des cellules régulatrices T dans l'infection palustre n'a pas été totalement explorée, bien que les études chez les souris et chez l'homme indiquent que les cellules T régulatrices sont activées pendant la réponse à l'infection palustre et régule négativement la fonction effectrice des cellules T [97]. La déplétion des cellules T régulatrices chez la souris *in-vivo* augmente l'immunité contre le paludisme. L'examen des échantillons sanguins humains a indiqué qu'il existe une augmentation importante de la production de facteur transformant de croissance béta (TGF-β) et une expansion des populations de cellules T régulatrices pendant le stade asexué de l'infection à *P. falciparum*. Ces changements sont corrélés avec des densités élevées de parasite. L'origine et les caractéristiques des cellules T régulatrices générées lors de la réponse à l'infection palustre ne sont pas bien connues. En général, les cellules T régulatrices sont hétérogènes et dérivées de différentes populations de cellules T. Au contraire des cellules T régulatrices dérivées du thymus qui expriment le facteur de transcription Foxp3+, les cellules T CD4+ naïves qui sont converties en cellules Foxp3+ en présence du TGF-β peuvent être spécifiques d'antigène et semblent être générées en réponse à l'infection chronique ou à l'exposition à un antigène à des concentrations sous-immunogéniques. L'inoculation avec des sporozoïtes provenant de moustiques infectés par le *Plasmodium* pourrait déclencher la génération de cellules T régulatrices converties bien que cette idée ne soit pas encore explorée.

L'infection palustre induit à la fois une réponse des cellules B T-indépendantes et T-dépendantes. Les études cliniques dans les années 1960 et dans les années 1990 ont montré que les anticorps peuvent conférer une protection contre le paludisme : les enfants recevant un transfert passif d'anticorps sériques provenant d'adultes vivant en zone d'endémie palustre étaient capables de contrôler la parasitémie et la fièvre mais étaient incapables d'éliminer l'infection [98, 99].

6.2.2- Immunité adaptative humorale anti-palustre

La plupart des réponses humorales sont T-dépendantes nécessitant ainsi une interaction entre les cellules B et les cellules T CD4+. Beaucoup d'études ont recherché les rôles spécifiques des différentes sous-classes de d'IgG dans l'acquisition de l'immunité anti-palustre. Des différences substantielles dans la distribution des sous-classes d'IgG ont été rapportées entre les individus ayant une prémunition et ceux n'ayant pas de prémunition contre le paludisme. Les IgG1 et IgG 3 ayant une propriété cytophile sont apparues prédominantes chez les individus protégés suggérant ainsi leurs rôles importants dans la prémunition contre le paludisme clinique [100-104]. Il a été par la suite montré que les taux d'IgG3 spécifiques au parasite étaient positivement corrélés à une prémunition contre les cas de paludisme contrairement au taux d'IgG totales spécifiques du parasite [105]. L'efficacité des IgG cytophile (IgG1 et IgG3) dans la protection contre le paludisme s'expliquerait par leur habilité à se fixer sur des cellules phagocytaires portant leurs récepteurs comme les monocytes. LesIgG1 et IgG2 opéreraient ainsi une inhibition cellulaire de la croissance des parasites en opsonisant les GR parasités.[100, 106, 107]. Les rôles des IgM et IgE ont été rapporté dans la protection et ou la pathogenèse du paludisme. Ainsi le rôle des IgE dans l'immunité et la pathogenèse du paludisme reste encore mal élucidé à cause des donné contradictoires. Certaines études ont trouvé une association entre des taux élevés d'IgE et des manifestations graves de la maladie [108] alors que d'autres ont rapporté leurs rôles dans la protection contre le paludisme [109, 110].

II- Hémoglobinopathies et paludisme : Cas de l'HbAS, de l'HbC et de l'α-thalassémie

1- L'Hypothèse d'Haldane :

Haldane est l'un des trois fondateurs de la génétique populationnelle. Il est surtout connu pour avoir le premier suggéré que les maladies pourraient constituer un facteur d'évolution du génome humain. En 1949, Haldane avait proposé le concept de polymorphisme équilibré pour expliquer pourquoi les thalassémies (Hémoglobinopathies) atteignent des fréquences élevées, approchant la fixation dans certaines populations [111]. Il avait argumenté que les hétérozygotes pouvaient être protégés contre certaines maladies importantes, et le paludisme était un candidat sérieux, comme l'atteste la distribution globale des thalassémies qui couvrent une large partie de l'Afrique, de l'Asie, et les régions méditerranéennes où le paludisme était prévalent [112]. D'autres éléments renforcent cette hypothèse. Par exemple, le peuple Tharu a à la fois une fréquence élevée de l'alpha-thalassémies, approximativement 80%, et une incidence de paludisme plus faible que celle observée chez d'autres groupes ethniques habitant les mêmes régions du Népal [113]. L'argument le plus fort provient d'une étude sur la génétique des populations en Malaisie, qui a démontré que la prévalence de l'alpha+-thalassémie varie à la fois en fonction de l'altitude et de la latitude, étroitement corrélée avec le niveau d'endémicité palustre. Des analyses haplotypiques suggèrent l'existence d'un effet fondateur[1]. Plus de 60 ans après l'hypothèse de Haldane, des preuves épidémiologiques de la protection que confèrent certaines hémoglobinopathies contre le paludisme ont été rapportées par plusieurs études de terrain. Nous discuterons des cas de l'hémoglobine S, de l'hémoglobine C et de l'α-thalassémie

[1] L'Effet fondateur en génétique de population est la diffusion d'une mutation génétique (ou d'un trait génétique) au sein d'une population à partir de l'apparition de celle-ci chez un individu de la dite population. Il repose surtout sur l'endogamie favorisée soit par un isolement géographique d'une population (chez les populations humaines et animales), soit par des considérations ethniques, religieuses, historiques, sociales, ou politiques (Chez les populations humaines).

2- Quelques définitions:

2.1- Hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies correspondent aux anomalies qui touchent la partie protéique de l'hémoglobine (Hb). Affections héréditaires, ce sont les maladies monogéniques les plus répandues dans le monde. On estime que les sujets porteurs d'hémoglobinopathies (asymptomatiques, mineures ou majeures) représentent jusqu'à 5 % de la population mondiale et que chaque année dans le monde près de 300.000 enfant naissent porteurs d'une forme grave d'hémoglobinopathie [114]. Les sujets hétérozygotes sont généralement a- ou peu symptomatiques, mais les sujets homozygotes ou hétérozygotes composites sont exposés à des complications sévères, voire mortelles.

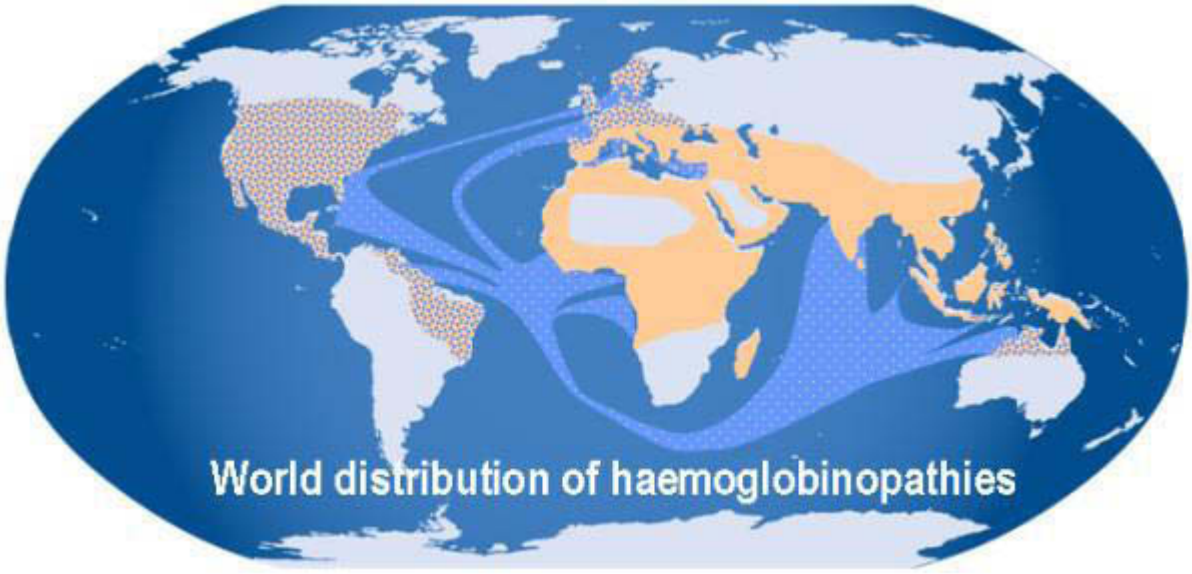


Figure 3: Distribution géographique mondiale des hémoglobinopathies

Source : and Higgs *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, **5**:13 [115]

2.2- L'hémoglobine :

Chaque molécule d'hémoglobine est un tétramère formé par l'association de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes α (ou globines α) composée chacune de 141 acides aminés et deux chaînes β (ou globines β) de 146 acides aminés. Chacune des chaînes adopte une conformation spatiale lui conférant une forme globuleuse et ménageant une « poche » superficielle dans laquelle se trouve

logée une molécule d'hème. L'hème est une protoporphyrine ayant en son centre un atome de fer sous forme réduite (Fe++) qui permet de fixer l'oxygène.

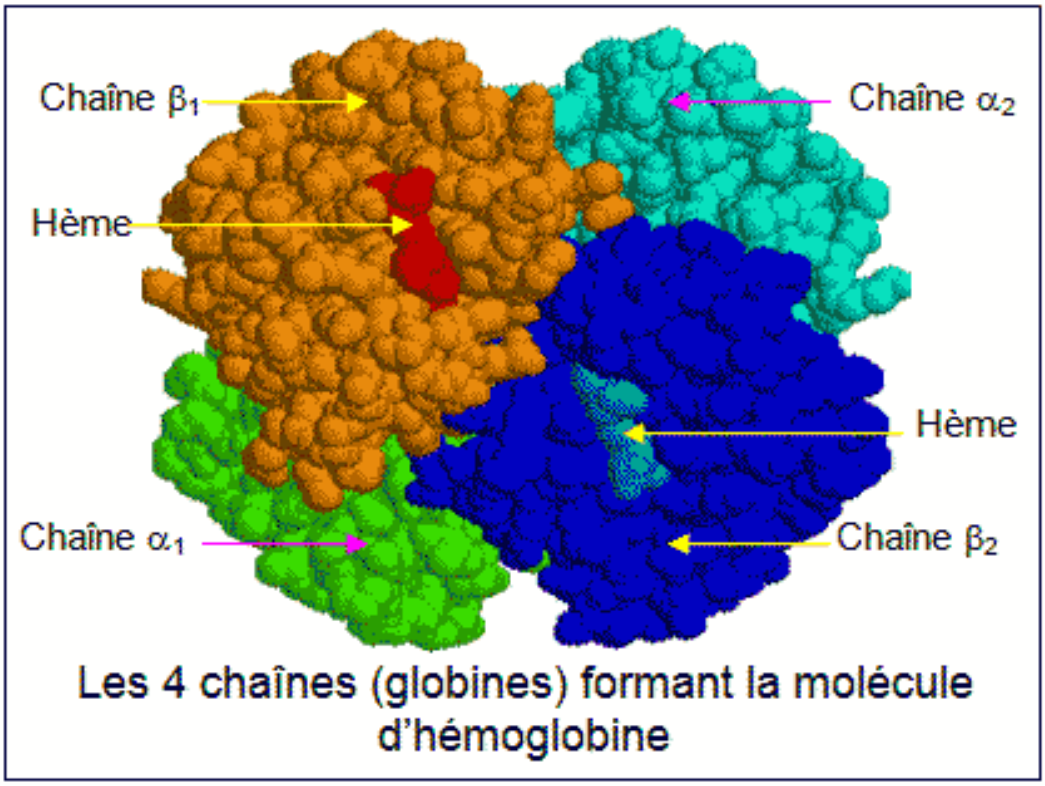


Figure 4: Structure 3D de l'hémoglobine

Les chaînes de type α correspondent à des chaînes polypeptidiques de 141 résidus dont la synthèse est sous le contrôle de gènes situés sur le chromosome 16. Les chaînes de type β (auxquelles se rattachent les chaînes γ, δ et ε) comportent 146 résidus et dépendent de gènes situés sur le chromosome 11. L'organisation des familles des gènes α et β-globine est présentée schématiquement dans la figure ci-dessous. Le contrôle de leur expression s'exerce à plusieurs niveaux :

• spécificité tissulaire stricte (lignée érythrocytaire) ;

• expression, au cours du développement, dans l'ordre de leur position topographique. On observe des commutations successives « switch » qui modifient la composition de l'Hb ;

• expression coordonnée précisément qui aboutit à une synthèse équivalente des gènes de la famille α et de la famille β, tout déséquilibre se traduisant par un syndrome thalassémique.

2.3- L'hémoglobine S ou Sickle hemoglobin:

Herrick fut le premier à décrire des GR en forme de faucille chez un patient de l'Ouest de l'Inde d'origine américaine [116]. Il a été par la suite démontré que cette déformation des GR était causée par la présence dans ces derniers d'une hémoglobine particulière différant de l'Hb normale adulte HbA par ses propriétés électrophorétiques. L'origine moléculaire de la drépanocytaire venait d'être décrite [117]. Cette Hb particulière fut appelée HbS ou «Sickle Hemoglobin». L'hémoglobine S est une variante de l'hémoglobine qui résulte d'une mutation ponctuelle au niveau du codon six sur le gène de la β-globine (β 6 GAG→GTG). Cette mutation a pour conséquence la substitution de l'acide glutamique (Glu) par la valine (Val) de la séquence d'acide aminé (aa) de la β-globine (β 6 Glu→Val) [118]. L'Hb S possède un caractère hydrophobe induisant sa polymérisation en situation d'hypoxie et ou de déshydratation. Le gène de la β-globine est situé sur le bras court du chromosome 11. La transmission de l'allèle HbS se fait donc suivant le mode autosomique (mode de transmission des allèles située sur les chromosomes non sexuels). Il s'agit d'un allèle co-dominant dont la présence à l'état hétérozygote suffit à la synthèse de l'HbS. Cependant le portage hétérozygote de l'allèle HbS n'induit de manifestation pathologique que dans des situations contraignant d'hypoxie ou de déshydratation (altitude très élevée et activité physique intense). Les sujets porteurs de l'allèle muté S à l'état homozygote souffrent d'une maladie appelée «drépanocytose». L'état hétérozygote caractérisé par le portage d'un allèle muté S et d'un allèle naïf A est encore appelé **trait drépanocytaire (HbAS).** Le trait drépanocytaire n'est pas associé à la drépanocytose sauf dans des conditions extrême d'hypoxie (plus de six mille mètres d'altitude). L'allèle muté HbS semble émerger de façon complètement indépendante dans diverses régions du globe. En effet, plusieurs haplotypes ont été décrits, chacun prenant le non de la localité où elle a été décrite pour la première fois. Il s'agit des haplotypes Sénégal, Benin, Bantu ou Central African Republic (CAR) et Arabo-Indian (ou Asian) [119-122]. Cette émergence de façon indépendante en plusieurs points conforte l'hypothèse que la mutation confère un avantage sélectif aux sujets qui la portent.

2.4- L'hémoglobine C:

En 1951, Itano a décrit une nouvelle variante d'Hb similaire à l'HbS mais cette fois ci différente de L'HbA par substitution de l'Acide Glutamique par la lysine en position 6 de la séquence d'aa de la β-globine ((β 6 GAG→AAG <=> β 6 Glu→Lys) [123]. La mutation est donc au même site que celle de l'hémoglobine S). Ranney a décrit l'HbC comme étant un allèle de l'HbS qui se caractérise par une diminution de la solubilité, une augmentation de l'agrégation moléculaire intra érythrocytaire et une cristallisation de l'Hb, le tout aboutissant à une déshydratation global des GR et la formation de « Cellules cibles » par les GR [123]. Ces différentes propriétés de l'HbC réduisent considérablement la déformabilité des GR qui en sont porteurs et donc leur rétention au niveau de la rate. L'HbC est surtout fréquentes chez les habitants autochtones de la zone voltaïque de l'Afrique de l'Ouest englobant le Ghana, le Burkina Faso, le nord de la Côte d'Ivoire et le sud du Mali. Sa fréquence peut atteindre jusqu'à 50% dans certaines populations vivant dans cette zone. Elle est aussi retrouvée à une moindre fréquence chez certaines populations isolées géographiquement et culturellement en Afrique du Nord [124, 125]

2.5- α-Thalassémie (α-Thal):

Les Thalassémies ou syndromes thalassémiques sont des affections génétiques caractérisées par une production réduite d'un ou des deux chaines (α et β) de globine de l'Hb. On parle d'α- thalassémie lorsque le ratio α-globine/β-globine est inférieur à 0.8 [126]. Il s'agit donc d'un défaut de synthèse de l'α-globine.

Sur le plan moléculaire, un individu normal dispose de deux paires de gènes d'α-globine, tous situés sur le chromosome 16 (deux gènes par chromosome). Ce génotype s'écrit αα/αα. Les quatre gènes sont capables d'être exprimés de façon indépendante. L'α-thalassémie résulte le plus souvent de la délétion d'un ou de plusieurs des 4 gènes α chez un individu. Deux principales délétions ont été décrites : la délétion $\alpha^{3.7}$ (rightward deletion) et la délétion $\alpha^{4.2}$ (leftward deletion) [127-129]. Occasionnellement, des mutations ponctuelles survenant dans des régions critiques des gènes de l'α-globine peuvent empêcher leurs expressions. On parle alors de α-

thalassémie non délétionnelles. Quand une mutation ou délétion abolit l'expression d'un seul gène α, (-α/αα), on parle de α-thalassémie hétérozygote asymptomatique. L'abolition de l'expression de deux gènes α situé sur le même chromosome (--/αα) est appelée α^0-thalassémie hétérozygote. Celle de deux gènes α situés sur deux chromosomes différents (-α/-α) est appélé α^+-Talassémie homozygote. L'α^0-thalassémie hétérozygote et l'α^+-talassémie homozygote sont des thalassémies mineures. Elles sont responsables d'anémie modérée microcytaire (Microcytose). Lorsque 3 gènes α chez ne sont pas exprimé chez un individu (--/-α) on parle d'hémoglobinose H responsable de microcytose marquée. La délétion des 4 gènes α chez un individu (--/--) donne l'hémoglobine Bart's (Hb Bart's) responsable du syndrome d'hydrops foetalis incompatible avec la vie. Les thalassémies non délétionnelles les plus connues sont : $\alpha^{IVSI(-5\ nt)}\alpha$ (en zone Méditerranéenne), α_2^{AATAAG}, et α_2^{AATGAA} (Zone méditerranéenne et au moyen orient) [130, 131].

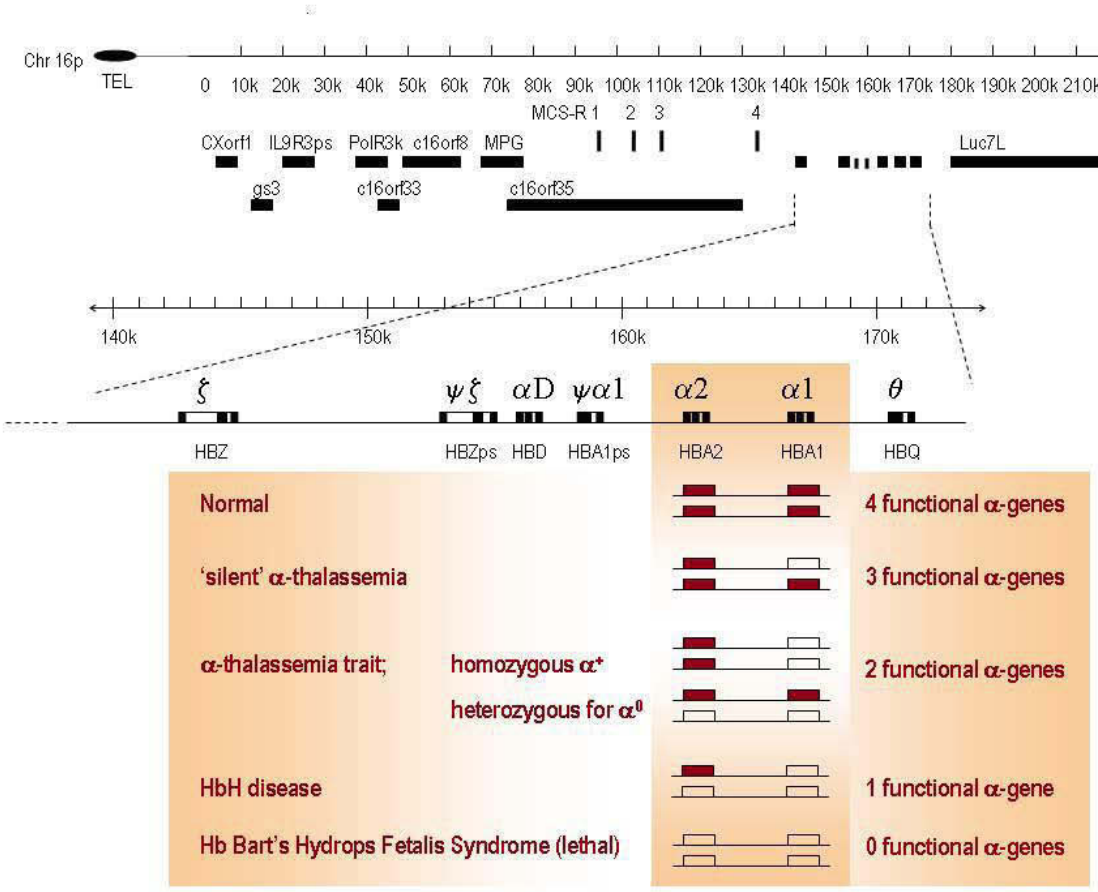


Figure 5: Structure de la famille des gènes de l'α-globine

S**ource** : Harteveld and Higgs *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, **5**:13[115]

Comme beaucoup d'autres affections génétiques de l'Hb, l'α-thalassémie est surtout fréquente dans les régions subtropicales du globe. Dans certaine zone, sa fréquence (la présence d'au moins une délétion de gène α) peut atteindre jusqu'à 80-90% [112, 113, 132-134].

2.6- la β-thalassémie (β-thal)

La β-thalassémie se caractérise par un déficit (β^+-thalassémie) de synthèse ou une absence totale de synthèse (β^0-thalassémie) de la chaine β de l'hémoglobine. Elle est généralement causée par des mutations génétiques au niveau du gène de la B-globine situé sur le chromosome 11. Plusieurs mutations responsables de β-thalassémie ont été décrites [135]. La β-thalassémie est surtout fréquente en Asie et dans la zone méditerranéenne [136]. La β-thalassémie étant plus rarement impliquée dans les phénomènes de protection naturelle contre le paludisme, elle ne sera pas abordée dans mon travail de thèse.

3- Protection antipaludique conférée par les hémoglobinopathies: Données épidémiologiques (cas de l'HbS, l'Hb C et de l'α-thalassémie)

3.1- L'HbS et paludisme

Le portage à l'état hétérozygote de HbS (HbAS) est le mieux décrit de tous les traits génétiques associés à la protection contre le paludisme, archétype de polymorphisme équilibré. L'étroite superposition de sa distribution géographique avec celle du paludisme rapporté par de nombreux auteurs [112, 137-139], fut le premier argument en faveur de cette hypothèse. Cependant la première preuve irréfutable de la protection des sujet porteurs de trait drépanocytaire contre le paludisme sont venu des travaux d'Allisson [78, 140],. Il a rapporté l'existence d'un risque réduit de d'infection palustre chez les sujets porteur d'HbS dans les conditions d'exposition naturelles. Allisson a aussi démontré que ces sujets HbAS résistaient mieux au développement d'une infection palustre même après l'administration intraveineuse de grande quantité

de GR infecté par *P. falciparum* [140]. Depuis, de nombreuses études ont été menées dont les résultats ont permis de confirmer l'hypothèse d'Haldane concernant l'HbS, en particulier la superposition de la répartition géographique des fréquences élevées de l'allèle HbS et de celle des prévalences élevés de paludisme passée et présente. Récemment, une étude a quantifié de façon statistique cette relation géographique entre l'HbS et le paludisme en Afrique mais pas en Amérique et en Inde [141]. Cela s'expliquerait par le fait que l'HbS n'est pas présente chez les populations autochtones d'Amérique et y a été introduite récemment avec la traite des noirs. En Asie, elle est confinée dans un petit nombre de tribus de l'Inde. Aussi de nombreuses études (Cas-Contrôles, de Cohorte ou d'association à base familiale) conduites dans diverses populations ont rapporté l'effet de protection de l'HbS contre le paludisme sur le plan clinique.

De façon générale, l'HbAS est associée à près de 50% de réduction de risque de faire une épisode de paludisme non compliqué, cette réduction pouvant atteindre jusqu'à 80% concernant le paludisme grave ou compliqué [77, 142-144]. Aidoo et collaborateurs ont rapporté une réduction d'environ 55% de la mortalité (toutes causes confondues) chez ces sujets HbAS de 6 à 16 mois dans l'Ouest du Kenya [82]. Tenant compte de la place du paludisme dans la mortalité des enfants dans cette région du monde, on peut imaginer aisément l'effet protecteur de l'HbAS contre la mortalité palustre. D'autres études ont rapporté l'incidence du paludisme grave chez les sujet HbAS. Cette incidence était réduite de 71% dans la première étude [143] alors que la réduction atteignait 83% dans la seconde [143]. Ackerman et collaborateurs sur la base d'analyse cas-contrôle avait trouvé une incidence de 0.011% chez les sujet HbAS contre 0.087% dans le groupe contrôle [145]. L'effet de protection de l'HbAS contre le paludisme grave concerne la presque totalité des formes graves du paludisme allant du neuropaludisme à l'anémie grave [80]. Concernant les épisodes palustres non compliqués, de multiples études prospectives ont décrit une réduction du risque liée à l'HbAS [143, 146-149]. En plus de la réduction du risque de paludisme, Crompton et al ont rapporté un retard de plus de 30 jours dans l'avènement du premier épisode de paludisme chez les sujets HbAS, au cours d'une saison de transmission, comparé à un

groupe contrôle de sujets HbAA vivant dans les mêmes conditions d'exposition au paludisme. [150]. Cette observation a été récemment confirmée [151]

En revanche, les études du portage asymptomatique de *P. falciparum* chez les sujets HbAS comparé au sujets HbAA ont donné des résultats contradictoires. Quelques études ont rapporté des prévalences plus faibles du portage asymptomatiques chez les sujets HbAS [140] [152, 153]. Billo MA et collaborateurs en plus de rapporter une faible incidence de l'infection asymptomatique palustre chez les sujets HbAS avaient aussi trouvé que ces sujets éliminaient plus rapidement leurs parasites en absence de tout traitement avant même l'apparition des symptômes [154]. Beaucoup d'autres études ont par ailleurs trouvé des prévalences de portage asymptomatique similaires entre les sujets HbAS et HbAA [146, 155-162]. D'autres études ont rapporté que la prévalence du portage asymptomatique du parasite apparaissait plus élevées chez les sujets HbAS [163, 164].Ces observations viennent d'être confirmées encore par une importante étude prospective chez les enfants de moins de 5 ans au Mali [151]. Ntoumi et collaborateurs ont rapporté une prévalence élevée d'infections multiples à *P. falciparum* chez les sujets HbAS [165]. Dans ces études de prévalence de paludisme asymptomatique, les parasitémies chez les sujets HbAS étaient soit plus faibles soit similaires à celles observées chez les sujets HbAA. Dans une importante étude prospective au Mali, il a été rapporté une réduction de 150 parasites/µl de la parasitémie chez les sujets HbAS malades comparés au sujets HbAA malades. Cette même étude rapportait une réduction de 34% de l'incidence du paludisme chez les sujets HbAS par rapport au sujet HbAA [79].

En résumé, la protection conférée par l'HbAS contre le paludisme varie en fonction des divers aspects de l'infection palustre. Elle est très forte contre les formes graves du paludisme comme le neuropaludisme et l'anémie grave, modérée contre les accès simples de paludisme et presque nulle contre les infections asymptomatiques. On note aussi un allongement de l'incubation du paludisme chez les sujets HbAS.

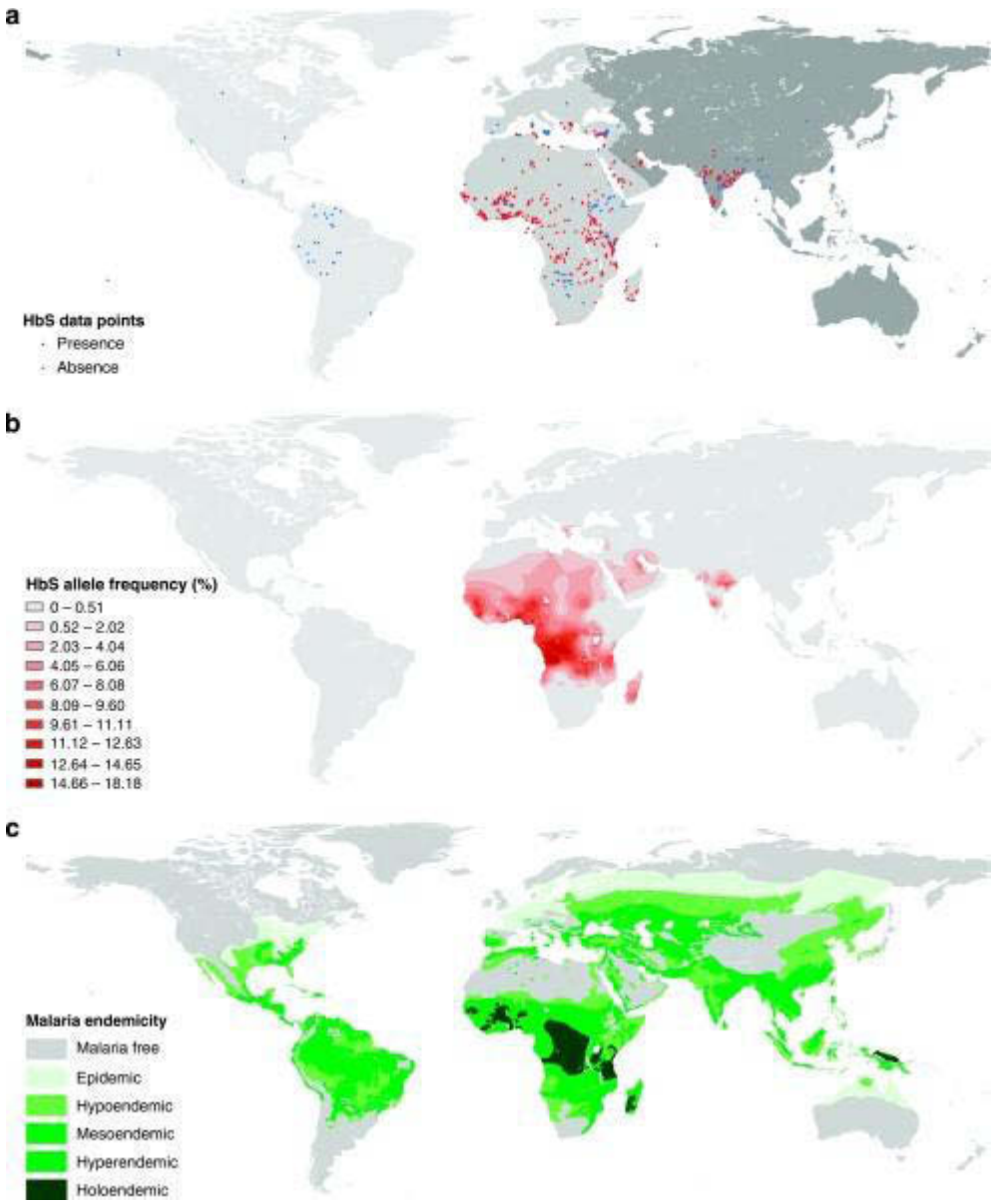


Figure 6: Distribution globale de l'allèle S et du paludisme.

Source : Piel et al Nat. Commun 2010 [141]

3.2- L'HbC et paludisme

La protection conférée par l'HbC contre le paludisme est relativement moins explorée que celle due à l'HbAS. Cela s'explique certainement par le fait que la distribution de l'HbC est beaucoup plus restreinte sur le plan géographique. Les premières investigations dans ce sens ont débuté depuis les années 50. Cependant, il faut attendre jusqu'à la fin des années 90 pour que les premières éléments scientifiques et épidémiologiques robustes soient rapportés. En effets les toutes premières études épidémio-cliniques portant sur la relation entre l'HbC et le paludisme n'avaient pas trouvé de liaison entre cette hémoglobinopathie et la protection contre le paludisme

[155, 163, 166]. L'association entre l'HbC et la protection contre le paludisme fut décrite pour la premières fois en 2000 chez les dogons du Mali, une population caractérisée par une forte prévalence l'HbC et une faible prévalence de l'HbS. En effet, Agarwal et ses collaborateurs ont rapporté que dans cette population, les sujets porteurs d'HbAC présentaient 29% de moins de risque de souffrir d'un neuropaludisme que les sujets HbAA. Cette étude n'a décelé aucun cas de neuropaludisme chez les 7 sujets HbCC inclus [83]. Un an plus tard, Modiano confirmait cette ces résultats dans une étude réalisée au Burkina Faso où il rapportait que l'HbAC et HbCC étaient respectivement associées à 29% et 93% de réduction de risque de paludisme [84].Cette protection a aussi été décrite par Rihet en 2004 au Burkina Faso [167]. Cependant, May et ses collaborateurs avaient trouvé que la protection conférée par l'HbC contre le paludisme concernait seulement le neuropaludisme et non les autres aspects du paludisme comme le paludisme simple ou même l'anémie sévère palustre [80]. Dans une récente étude prospective menée chez les enfants de 0 à 6 ans au Mali, l'HbC réduisait de 183 jours le temps médian que passaient les enfants sans paludisme comparé à l'HbAA [151].

En résumé, la protection conférée par l'HbC contre le est admise concernant le paludisme grave notamment le neuropaludisme. A la différence de l'HbS, cette protection revêt un caractère dose dépendant c'est-à-dire que l'état homozygote de l'HbC (HbCC) confère une protection beaucoup plus marquée que l'état hétérozygote HbAC. Cela s'explique par le faite que l'homozygotie HbCC est beaucoup moins symptomatique que l'homozygotie HbSS.

3.3- α-Thalassémie et paludisme:

La protection des sujets porteurs d'α-thalassémie hétérozygote et homozygote contre les formes graves du paludisme a été étudiée par plusieurs investigateurs. Si certains n'ont pas trouvé d'association significative entre la forme hétérozygote de l'α-thalassémie et une protection contre le neuropaludisme [80], presque toutes ont rapporté la protection des sujets α-thalassémiques hétérozygotes et homozygotes contre l'anémie palustre grave [80, 85, 88]. D'autres auteurs ont toutefois trouvé une

réduction de l'incidence du paludisme grave chez ces sujets [86, 87]. Cependant les résultats des études relatives à la protection des sujets α-thalassémiques contre le paludisme simple ou asymptomatique sont moins concluants [86, 150, 168]. Une méta-analyse des données de ces trois études n'a révélé aucune protection contre le paludisme simple associée ni à α-thalassémie hétérozygote ni à α-thalassémie homozygote. [77].

La presque totalité des études n'ont pu observer une association entre l'α-thalassémie et une réduction de la prévalence du paludisme asymptomatique [87, 169, 170] ou même la parasitémie [171]. Cependant en utilisant la PCR pour apprécier le portage parasitaire, Lin a rapporté que *P. falciparum* circule moins fréquemment chez les sujets α-thalassémiques que chez les sujets contrôles [172]

3.4- Hémoglobinopathie et paludisme chez les femmes enceintes.

Très peu d'auteurs se sont intéressés à la relation entre les hémoglobinopathies et la protection contre le paludisme chez les femmes enceintes. Les résultats de ces études ne sont pas concluants. La plupart de ces études n'ont pas trouvé de protection associée aux hémoglobinopathies chez les femmes enceintes. Ainsi aucune différence n'a été observée en terme de prévalence de la parasitémie chez les entre sujets HbAA et HbAS multi-gestes au Nigeria [173]. Bouyou-Akotet et collaborateurs ont fait le même constat chez les femmes primo-gestes et seconde-gestes au Gabon [174]. Dans deux études au Ghana, une relation n'a pu être établie entre l'HbS, l'HbC ou l'α-thalassémie et la prévalence du paludisme chez les femmes enceintes [175]. La prévalence du paludisme était même plus élevée chez les femmes enceintes HbAS que les femmes enceinte HbAA en Uganda [176]. Une autre étude menée en Papouasie Nouvelle Guinée n'a retrouvé aucun lien entre l'α-thalassémie et les parasitémies placentaire ou maternelles. [177].

Toutefois ces études sont souvent confrontées à un problème de taille d'effectif donc de puissance analytique.

Tableau 2: Tableau récapitulatif des études épidémiologiques sur les hémoglobinopathies et le paludisme

Aspect épidemio-clinique du paludisme	Hémoglobinopathies	Protection	références
parasitémie asymptomatique	HbAS	oui	-Allison AC et al , 1954 -Colbourne et al, 1956, -Fleming et al, 1979 -Billo et al, 2012 -Lopera-Mesa et al , 2015
		non	-Willcox et al, 1981 -Edington et al, 1957 -Rigelhann, B et al, 1976, -Allen SJ et al, 1992 -Travassos MA et al, 2014 -Ntoumi F et al, 1997
	HbC	oui	-Lin E et al, 2010
	α-thalassémie	oui	-Williams TN et al, 2005 -Wuamba S et al, 2006
		non	-Mockenhaup FP et al, 1999 -Allen SJ et al, 1993
Délaie d'apparition	HbAS	oui	-Crompton P et al, 2008 -Travassos MA et al,

de l'épisode rallongé			2014
	HbC	oui	-Travassos MA et al, 2014
Charge parasitaire	HbAS	oui	-Lopera-Mesa T et al 2015, -Crompton P et al 2008
	HbC	oui	-Rihet P et al 2004
	α-thalassémie	oui	-Lin E et al 2010
		non	-Veenemans J et al 2008
Incidence paludisme symptomatique	HbAS	oui	-Taylor SM et al -Williams TN et al 2005 -Jallow M et al 2009 -Ackerman H et al 2005 -Willcox MC et al 1981 -Kreuels B et al ,
	HbC	oui	-Modiano D et al, 2001 -Rihet P et al, 2004
		non	-Edington GM et al 1957 -Ringelhann B et al, -Guinet F et al, 1997
	α-thalassémie	non	-Williams TN et al, 2005 -Crompton P et al 2008 - Williams TN et al 1996

Neuropaludisme	HbAS	oui	-May J et al, 2004
	HbC	oui	-AgarwalA et al 2000 -Modiano D et al, 2001 -May J et al, 2004
Anémie palustre sévère	HbAS	oui	-May J et al, 2007,
	HbC	non	May J et al, 2007
	α-thalassémie	oui	May J et al, 2007
Paludisme chez la femme enceinte	HbAS	non	-Fleming AF et al 1984 -Bouyou-Akotet MK et al 2003 -Mockenhaupt FP et al 2000
	HbC	non	-Bouyou-Akotet MK et al 2003
	α-thalassémie	non	-Bouyou-Akotet MK et al 2003 -O'Donnell A et al, 2006

4- Mécanismes identifiées ou suspectées dans la protection conférée par les hémoglobinopathies contre le Paludisme

4.1- Mécanismes communs :

Peu d'études ont exploré de façon simultanée les mêmes mécanismes pour la protection conférée par les trois hémoglobinopathies. Cela s'explique en partie par les caractéristiques cliniques particulières de la protection conférée par chacune des hémoglobinopathies, en partie par les contraintes logistiques de l'obtention simultanée d'échantillons de sujets porteurs des différents polymorphismes. Les hypothèses explorées pour les trois hémoglobinopathies sont (i) l'inhibition de la croissance du parasite dans les GR et, (ii) la phagocytose précoce et accrue des GR infectés par le *Plasmodium falciparum*. Ces hypothèses reposent en grande partie sur la faible stabilité de ces variants hémoglobiniques qui entrainerait une sénescence précoce des GR [178]. En effet ces variants hémoglobiniques seraient plus susceptibles au stress oxydatif. Le produit de la dégradation de l'Hb ainsi formé, appelé hémichromes, se déposerait à la face interne de la membrane des GR altérant les protéines membranaires. Ces altérations induiraient une opsonisation des GR et donc leur élimination par le système des phagocytes mononuclés [179-182]. Cette élimination précoce s'oppose à un développement parasitaire complet à l'intérieur des GR. La phagocytose précoce des GR infectés par *P. falciparum* a été décrite *in vitro* avec des GR de sujet α-thalassémiques [183, 184], HbC [183]et HbAS . Le rôle de l'immunité humorale acquise spécifique a été décrit dans la protection des sujets HbAS [183], HbC [183] et α-thalassémiques. Cependant plusieurs études ultérieures n'ont pas confirmé ces observations [164, 170, 185-188]

4.2- Mécanismes étudiés dans le contexte de la protection conférée par l'α-Thalassémie

4.2.1- Inhibition de la croissance des parasites :

L'inhibition de la multiplication de *P. falciparum* en culture a été rapportée par plusieurs auteurs. Cette inhibition varie en fonction du dégré d'affection

thalassémique et concerne soit l'invasion des GR par les mérozoïtes, soit le développement intra érythrocytaire du parasite. Ainsi plusieurs auteurs on rapporté une réduction de la multiplication de *P. falciprum* avec les GR HbH (--/-α)[30, 189-191]. Moins d'études ont retrouvé cette inhibition avec les les GR α^{+}-thalassémiques (-α/-α) et α–thalassémiques hétérozygote (-α/αα) [192]. Une réduction de l'invasion des GR α^{0}-thalassémiques a aussi été rapporté [193]. Récemment Glushakova et collaborateurs ont rapporté une reduction de la multiplication intra érythrocytaire de *P. falciparum* dans des GR a-thalassémiques [194]. Dans cette étude la multiplication intra érythrocytaire était fortement corrélée la concentration moyenne corpusculaire en hémoglobine et au volume globulaire moyen des GR. La multiplication intra érythrocytaire était appréciée à travers le nombre médian de mérozoïte libéré par schizonte.

4.2.2- La microcytose (réduction de la taille des GR observée chez les sujets α-thalassémiques)

La microcytose a été associée à la protection des sujets a- thalassémiques homozygotes (-α/-α) contre l'anémie palustre grave [195, 196]. Il s'agit d'une hypothèse spéculative basée sur l'observation d'un plus grand nombre de GR chez les sujets α-thalassémiques mais de plus petite taille donc contenant une quantité faible d'hémoglobine par rapport au GR de taille normale. Selon ce modèle, pour une perte équivalente en nombre de GR du au paludisme, les sujets Homozygotes a-thalassémiques perdraient moins de hémoglobine que les sujets « normaux ». Ainsi, une perte de plus de $1.1x10^{12}$ GR par litre de sang rendrait les sujets normaux plus anémiques que la même perte chez des sujets α-thalassémiques homozygotes. Formulé autrement à parasitémie égale (proportion de GR parasités) la perte de globules rouges et d'hémoglobine est moindre. A parasitémie égale, la réduction du nombre de GR nécessaire pour induire une anémie sévère (Hb < 50g/litre) doit être 10% plus importante chez les sujets α-thalassémique homozygotes que chez des sujets normaux. Ces spéculations qui reposent sur l'observation des paramètres hématologiques mesurés chez d'enfant soufrant de paludisme aigu en Papouasie de la Nouvelle

Guinée, suppose que l'anémie palustre est uniquement due à la destruction des GR parasités, ce qui n'est pas exact. On ne peut toutefois pas disqualifier cette hypothèse car la part d'anémie due à la perte des GR non parasités pourrait être elle aussi indirectement liée à la parasitémie.

4.3- Mécanismes étudiés dans le contexte de la protection conférée par l'HbC

Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer la protection des sujets porteurs d'HbC contre le paludisme grave.

4.3.1- Inhibition de la prolifération de *P. falciparum*

Plusieurs études ont rapporté une réduction de la prolifération de la parasitémie en culture *in vitro* dans les GR HbC. En effet une réduction de la multiplication de *P. falciparum* en culture *in vitro* a été décrite par plusieurs auteurs avec les GR HbCC [197]. Cette réduction est principalement due à une altération de la rupture de schizonte alors que ni la croissance intra érythrocytaire ni l'invasion des GR par les mérozoïtes ne sont affectées. Les GR contenant l'hémoglobine C sont connus pour leur résistance à la lyse osmotique

4.3.2- Inhibition de la séquestration des GR parasités

Fairhurst et collaborateurs ont décrit en 2005 une réduction de la Cytoadhérence, du rosetting et de la micro-agglutination des GR parasités contenant l'HbC [198]. Parallèlement ils ont démontré que l'expression des molécules parasitaires responsables de ces phénomènes est altérée avec les GR HbC. Cette altération serait due soit à une perturbation du transport de PfEMP-1 vers la surface du GR [199], soit à un blocage de leur extériorisation par les dépôts d'hémichromes [200].

4.4- Mécanismes étudiés dans le contexte de la protection conférée par l'HbAS

Au cours du dernier demi-siècle, plusieurs mécanismes probables ont été suggérés pour expliquer la protection conférée par le portage de l'Hb S (à l'état hétérozygote) ou trait drépanocytaire contre le paludisme. La plupart de ces hypothèses sont basés sur les propriétés intrinsèques de l'HbS et n'expliquent pas de façon exhaustive les aspects expérimentaux, cliniques et épidémiologiques de cette protection. La

protection des sujets HbAS semble donc résulter d'une synergie d'action de divers mécanismes indépendants imputables à l'interaction entre le parasite et le GR d'une part, et à l'interaction du GR parasité avec son environnement d'autre part. Les différents mécanismes décrits à ce jour sont développés ci-dessous.

4.4.1- Incapacité des parasites à se multiplier dans les GR HbAS

4.4.1.1- La falciformation des GR infectés circulants :

Luzzatto et collaborateurs en 1970 avaient observé en incubant du sang de sujets HbAS infectés par *P. falciparum* avec du metabisulfite de sodium que les GR infectés falciformaient beaucoup plus rapidement que les GR non infectés [201]. Par la suite Roth en 1978 a démontré que cette falciformation accélérée était accentuée dans les GR contenant les formes jeunes (anneaux) de *P. falciparum*. Bien que contenant des polymères d'HbS, les GR parasités par des formes matures (trophozoïtes et schizontes) ne falciformaient pas, probablement du fait de la grande taille du parasite ou de la faible concentration en Hb (le parasite ayant digéré à ce stade une grande partie de l'Hb contenue dans le GR) [202]. La polymérisation précoce de l'Hb dans les GR parasités serait due à la consommation accrue de l'oxygène du fait du métabolisme intracellulaire du parasite. La falciformation pourrait aussi s'expliquer par la baisse du PH intra érythrocytaire causée par la présence du parasite. Ces auteurs ont par la suite formulé l'hypothèse d'une clairance précoce des GR HbAS parasité falciformés du sang circulant par les macrophages, ralentissant la croissance de la charge parasitaire chez les sujets HbAS.

4.4.1.2- L'inhibition de la croissance des parasites dans les GR HbAS :

Le développement de la technique de culture continue *in vitro* de *P. falciparum* par Trager W. et collaborateurs en 1976 [203] a permis l'étude de l'impact de l'HbS sur la croissance *in vitro* de *P. falciparum*. Ainsi, Friedman en 1978 et Pasvol en 1980 ont rapporté que la multiplication de *P. falciparum* était réduite dans les GR HBAS ainsi que la maturation des formes jeunes du parasite en trophozoïtes matures et en schizontes dans les conditions hypoxiques [204, 205]. Ces observations seraient dues à

la formation de polymères d'HbS dans les GR HBAS et à l'arrêt du métabolisme des parasites [204, 206, 207]. Aussi la polymérisation de l'HbS entraînerait une déshydratation qui inhiberait la croissance du parasite [208]. En plus l'infection des GR par *P. falciparum* génère des agents oxydants qui causent des dommages oxydatifs à la membrane des GR [209]. La membrane des GR contenant l'HbS déjà fragilisée par le dépôt d'hémichromes [210] et de fer [211] issu de la polymérisation de l'HbS est donc très sensible aux agents oxydants produits par l'invasion des GR par *P. falciparum*. Les mécanismes d'inhibition de croissance de *P. falciparum* par l'HbS reposent sur des propriétés différentes de cette hémoglobine : la polymérisation en hypoxie et la susceptibilité au stress oxydatif. L'inhibition de la croissance de *P. Faciparu*m dans le GR HbAS par le stress oxydatif semble reste une hypothèse spéculative, aucune étude n'ayant à ce jour rapporté une réduction de la croissance de *P. falciparum* dans les conditions normoxique. Plus récemment, LaMonte et collaborateurs ont mis en évidence le rôle significatif joué par les micro-ARN dans l'inhibition de la croissance de *P. falciparum* dans les GR contenant l'HbS [212]. Les micro-ARN (ou miARN) sont de acides ribonucléiques (ARN) de courte taille formés d'un simple brin présents seulement dans des cellules eucaryotes. Ils possèdent en moyenne 22 nucléotides soit beaucoup moins que les autres ARN. Ce sont des régulateurs post-transcriptionnels capables d'éteindre l'expression d'un gène [213, 214]. Leur appariement à une séquence complémentaire de l'ARN messager du gène cible conduit à la répression traductionnelle ou à la dégradation de cet ARNm. Le génome humain comprendrait environ 1 000 gènes à l'origine de la transcription de miARN. LaMonte a rapporté qu'après l'infection des GR par *P. falciparum,* plusieurs miARN (présents dans le GR) s'accumulent et sont transférés dans le cytosol du parasite. Parmi ces miARN, deux (miR-451 et le miR-223) sont significativement plus abondants dans les GR HbSS et un peu moins dans les GR HbAS. Il a constaté une réduction d'environ 80% de la croissance de *P. falciparum* dans les GR HbSS et 60% dans les GR HbAS comparé au GR HbAA (souche 3D7, 3% oxygène) [212]. Cette réduction de croissance était significativement supprimée par des oligonucléotides anti-sens miR-451 et miR-223. La condition de culture hypoxique (3% Oxygène)

aurait pu constituer un effet confondant dans cette étude. Cependant, une réduction de la croissance d'environ 50% des parasites a été observée dans des GR HbAA enrichi en miR-451 et le miR-223. Ce la constitue la preuve que les miARN sont effectivement responsable de l'inhibition de croissance observé avec les GR HbS

4.4.2- Induction de la tolérance à *P. falciparum*

L'hème produit par l'oxydation de l'hémoglobine consécutive à l'infection palustre pourrait contribuer à la pathogenèse du neuropaludisme [215, 216] (L'hème Oxygénase ainsi que le monoxyde de carbone issu de son action en se fixant sur l'hémoglobine empêche l'oxydation de ce dernier et donc la libération de l'hème libre. Ferreira et collaborateurs en 2011 ont rapporté que les souris transgéniques produisant l'HbS humain toléraient des parasitémies létales de *P. berghei* et que la délétion du gène de l'hème-oxygénase-1 (Hmox1) ou un traitement aux inhibiteurs de l'hème oxygénase abolissait cette tolerance [217]. En réaction à la dégradation continue de l'HbS instable, les GR contenant HbS seraient très riche en Hème-oxygénase induisant ainsi une grande tolérance à l'infection palustre. La transposition de ces résultats, obtenus dans des conditions expérimentales *in vivo*, à la pathogenèse de l'infection humaine à *P. falciparum,* n'est pas validée. Ces hypothèses de mécanisme sont aussi fragilisées par les résultats d'études cliniques de terrain qui démontrent que l'HbAS attenue plus la virulence de *P. falciparum* qu'elle n'empêche son développement

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des études sur les mécanismes de la protection conféré par les Hémoglobinopathies contre le paludisme

Mécanismes	Hémoglobinopathies	Spécificité	Références
Phagocytose précoce et accrue	HbAS	-	-Ayi K et al, 2004
	HbC	-	- Tokumasu F et al, 2005 -Ayi K et al, 2004,
	α-thalassémie	-	-Ayi K et al, 2004 -Luzzi GA et al, 1991 -OlsonJA et al, 1986 -Ifediba, TC et al, 1991
Réponses immunitaires humorale acquise	HbAS	-	-Bayoumi RA et al, 1987 -Verra F et al, 2007 , -Cornille-Brogger R et al, 1979 -Abou-Zeid YA et al 1992 -Verra F et al, 2007
	HbC	-	-Verra F et al, 2007
Inhibition de la croissance intra érythrocytaire	HbAS	Falciformation de GR parasité	-Luzzatto L et al 1970 - Roth EF et al, 1978
		Inhibition de la maturation à faible concentration d'oxygène	-Friedman MJ et al 1978 -Pasvol G et al 1980 -Friedman MJ et al, (J Protozool), 1979 -Friedman MJ et al (Exp Parasitol),1979 -Ginsburg H et al 1986 -Griffiths MJ et al 2001 -Friedman MJ et al, (Am J Trop Med, hyg), 1979
		Inhibition de la croissance de *P.f* par les micro-ARN	LaMonte G et al, 2012
	HbC	Resistance à la rupture des schizontes	-Pasvol G et al, 1982 -NagelRL et al, 1990 -Faithurst RM et al, 2003

			-Friedman MJ et al, 1979
	α-thalassémie		-Brockelman CR et al, 1987 -Luzzi GA et al, 1991 -Pattanapanyasat K et al, 1999
Inhibition de la virulence du parasite	HbAS	Inhibition de la Cytoadhérence	-Cholera R et al, 2008
		Inhibition de la libération de l'hème libre	-Ferreira A et al, 2011
	HbC	Inhibition de la Cytoadhérence	-Fairhurst RM et al, 2005
	α-thalassémie	Inhibition de la Cytoadhérence	-Krause M et al, 2012
Microcytose	α-thalassémie		-Fowkes FJ et al 2008 -Mockenhaupt FP et al, 1999

III : Rate et Paludisme

La splénomégalie est l'un des signes caractéristiques du paludisme dans les zones endémiques. La splénectomie augmente le risque d'évolution de la maladie vers le paludisme grave. Ces observations suggèrent un rôle important de la rate dans la physiopathologie du paludisme. L'idée selon laquelle la rate élimine par filtration les GR parasités repose sa fonction majeure de contrôle de qualité des GR circulants. Le mécanisme de la rétention des GR parasités par *P. falciparum* au niveau de la rate semble cependant plus compliqué qu'on le pense souvent. En théorie, le modèle conventionnel de survie de *P. falciparum* chez *Homo sapiens* suppose que des GR parasités échappent à la rétention splénique. Les formes matures esquivent de façon efficace le contrôle splénique en adhérant aux cellules endothéliales micro vaisseaux. Les formes jeunes du parasite quant à elles, de petites taille et n'exprimant aucun antigène à la surface des GR parasités pouvant induire des mécanismes effecteur de la réponse immunitaire adaptative sont supposés être capables de traverser la rate de façon efficace. Ceci expliquerait leur présence dans le sang périphérique. Cependant, des techniques d'étude de la déformabilité des GR et de leur capacité à franchir les fentes inter-endothéliales spléniques ont éclairé certains mécanismes originaux, de la rétention splénique des GR parasités [218-221]. Ces mécanismes contribueraient au rôle de la rate dans la protection contre le paludisme et la dans la physiopathologie du paludisme aigu ou chronique.

1-Anatomie et physiologie de la rate :

De couleur rouge à rouge pourpre, la rate humaine pèse environ 100 à 200g et mesure environ 12cm x 8cm x 4cm. Elle est située dans l'hypochondre gauche en rapport avec l'estomac le diaphragme et l'angle colique gauche. La rate est le plus grand organe lymphoïde dédié à l'élimination des GR défectueux, des microorganismes et d'autre particules. Cette fonction est rendue possible grâce à une micro-anatomie spécifique : des composants hautement spécialisés de la matrice extracellulaire, des récepteurs particuliers de ces cellules endothéliales vasculaires et l'extraordinaire organisation de son système vasculaire et microcirculatoire.

1.1- Organisation micro-anatomique de la rate :

La rate est constituée d'un parenchyme aussi appelé pulpe entourée d'une capsule qui se ramifie dans la pulpe délimitant des travées. La pulpe est composée de stroma et de vaisseaux supportant une grande population de cellules sanguines. La rate est vascularisée par l'artère splénique (une ramification du tronc cœliaque qui lui-même nait de l'aorte) et se draine dans la veine splénique qui se jette dans le tronc porte. Ces deux vaisseaux pénètrent dans la rate par sa face creuse encore appelée le hile. Ils se ramifient ensuite à l'intérieur des travées à travers les différentes couches parenchymateuses : la pulpe blanche au centre, la zone marginale et la pulpe rouge située sous la capsule. Il existe une répartition particulière des cellules sanguines dans le parenchyme splénique correspondant adaptée à la fonction immunitaire de la rate. Les lymphocytes et cellules associées sont concentrés au niveau de la pulpe blanche alors que les macrophages, les monocytes, les plaquettes et dans une moindre mesure les GR sont retrouvés au niveau de la zone marginale et de la pulpe rouge. La pulpe rouge est riche en macrophages et en GR, ces derniers étant amenés par les artérioles pulpaires. Ils traversent ensuite un réseau trabéculaire (cordons) puis se faufilent entre les cellules endothéliales pour atteindre la lumière des sinus puis les veinules spléniques.

1.1.1-La capsule et le réseau trabéculaire

La rate humaine est couverte par une capsule composée de tissu dense et connectif avec peu de muscle lisse [222-224]. Cette composition explique la faible contractilité de la capsule et du réseau trabéculaire de la rate humaine. La capsule mesure entre 0.3 et 1 millimètre d'épaisseur. La capsule contient aussi des fibres de collagène et des fibres élastiques. Elle est en continuité sur sa face interne le réseau trabéculaire dans le parenchyme splénique ;

1.1.2-Le parenchyme splénique :

Le parenchyme splénique est composé de pulpe blanche, de la zone marginale et de la pulpe rouge.

1.1.2.1- Pulpe blanche :

La pulpe blanche est constituée d'un réseau de couches concentriques de fibroblaste spécialisés et est peuplée de lymphocytes, de cellules présentatrices d'antigène et de macrophages [225]. Le réseau réticulaire est très dense et contient une accumulation de lymphocytes T autour des artères. La matrice protéique produite par ces fibroblastes est constituée entre autres de collagène de type III, de laminine, de fibronectine, de vitronectine et de tenascine [226, 227]. Ces molécules constitue des récepteurs pour des marqueurs lymphoïde formant un microenvironnement spécifique pour l'interaction avec les lymphocytes T [228]. Les lymphocytes T s'accumulent dans la pulpe blanche pour former des manchons de lymphocytes T autour de l'artère centrale appelée PALS (periarterial lymphatic sheath). Les lymphocytes B quant à eux sont concentrés en nodules lymphoïdes situés plus en périphérie, généralement aux points de ramification de l'artère centrale. On y trouve aussi des macrophages arrangés de façon moins dense autour de la portion distale des vaisseaux.

1.1.2.2- La zone marginale

La zone marginale est la zone tampon entre la pupe blanche et la pulpe rouge. Elle est la zone de terminaison de la majorité des artérioles spléniques. Dans cette partie de la rate, circulent les lymphocytes et certaines cellules accessoires (macrophage cellules présentatrices d'antigène) dont certaines sont dirigées vers la pulpe blanche. La majorité des érythrocytes et des plaquettes sont dirigés vers la pulpe rouge [229].

1.1.2.3- La pulpe rouge

La pulpe rouge représente le ¾ du volume de la rate. Elle comprend 4 structures vasculaires en séquence : des fins vaisseaux artériels non anastomosés (penicilli), des cordons spléniques (cordons de Billroth), des sinus veineux et des veines ; l'ensemble étant supporté par des fibroblastes et leur matrice protéique extracellulaire [227]. La rate humaine est de type sinusal. Les sinus représentent environ 1/3 du volume de la pulpe rouge [230]. Il s'agit de longs canaux anastomosés conduisant aux veines de la pulpe. Ces sinus ont un seul endothélium dans lequel les cellules sont arrangées de façon longitudinale le long de l'axe du sinus. Le cytoplasme des cellules endothéliales sinusales possèdent deux jeux de filaments cytoplasmiques appelés fibres de stress

dont la contraction permet l'ouverture de fentes inter-endothéliales au travers desquelles les érythrocytes doivent se faufiler pour atteindre la lumière des sinus veineux [231].

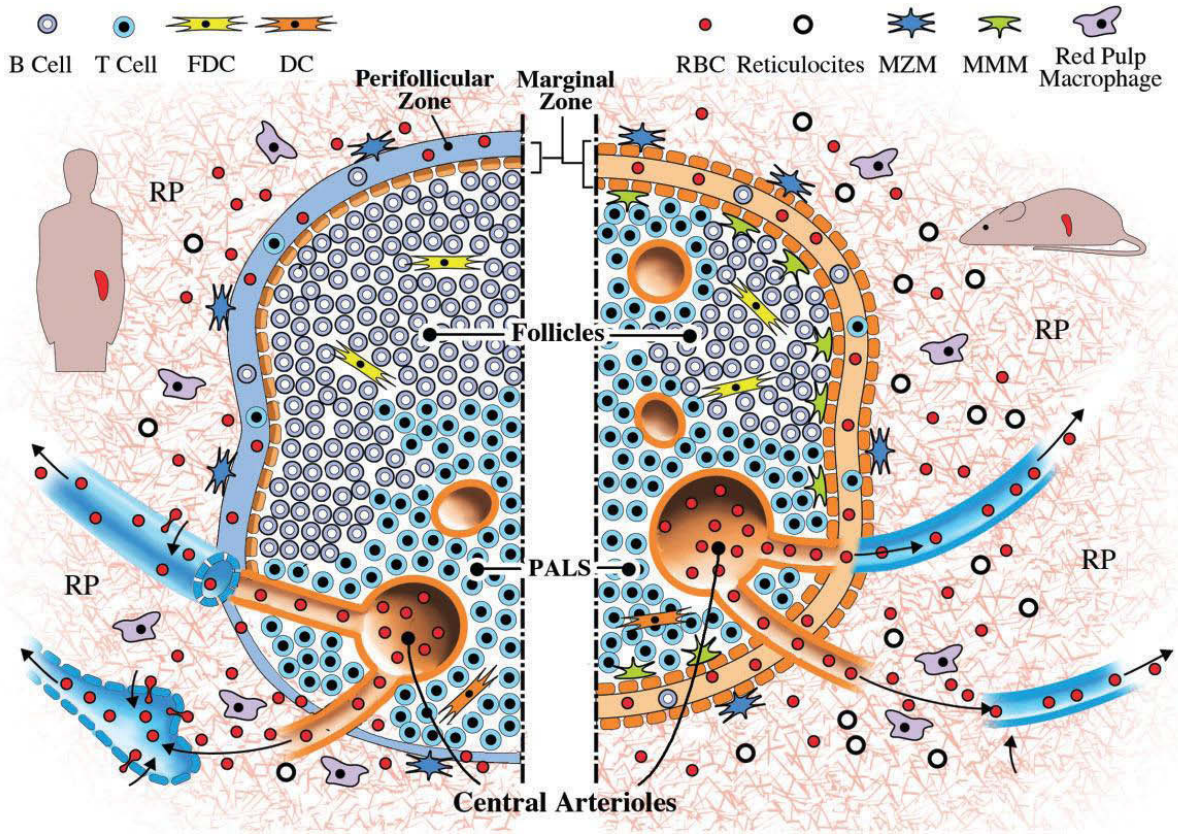


Figure 7 : Schéma des structures comparées des rates chez l'homme et chez la souris.

Three main differences exist between mouse and human spleens. (i) The marginal zone in human spleen lacks a clearly delimited marginal sinus and it is surrounded by an additional perifollicular zone, where some blood vessels terminate in capillaries that bypass the filtration cords as fast 'closed' microcirculation. (ii) The human spleen is sinusoidal whereas the mouse spleen is non-sinusoidal. The former consists of a honeycombed reticular meshwork of venous sinuses, in which endothelial cells align longitudinally in a barrel-like shape sustained by a fenestrated basement membrane and adventitial reticular cells. This forces blood to squeeze through the interendothelial slits before entering the lumen of venous sinuses. Differently, in non-sinusoidal spleens, blood flows through open-ended pulp venules provided of flat endothelium, a conventional basement membrane and adventitial reticular cells, thus offering little impedance to entrance of red blood cells. (iii) There is intense erythropoiesis elicited in the mouse spleen yet unreported in the human spleen. FDC, follicular dendritic cell; MMM, marginal metallophilic macrophages; MZM, marginal zone macrophages.

Source : Del Portillo AH et al., Cellular microbiology 2011[221]

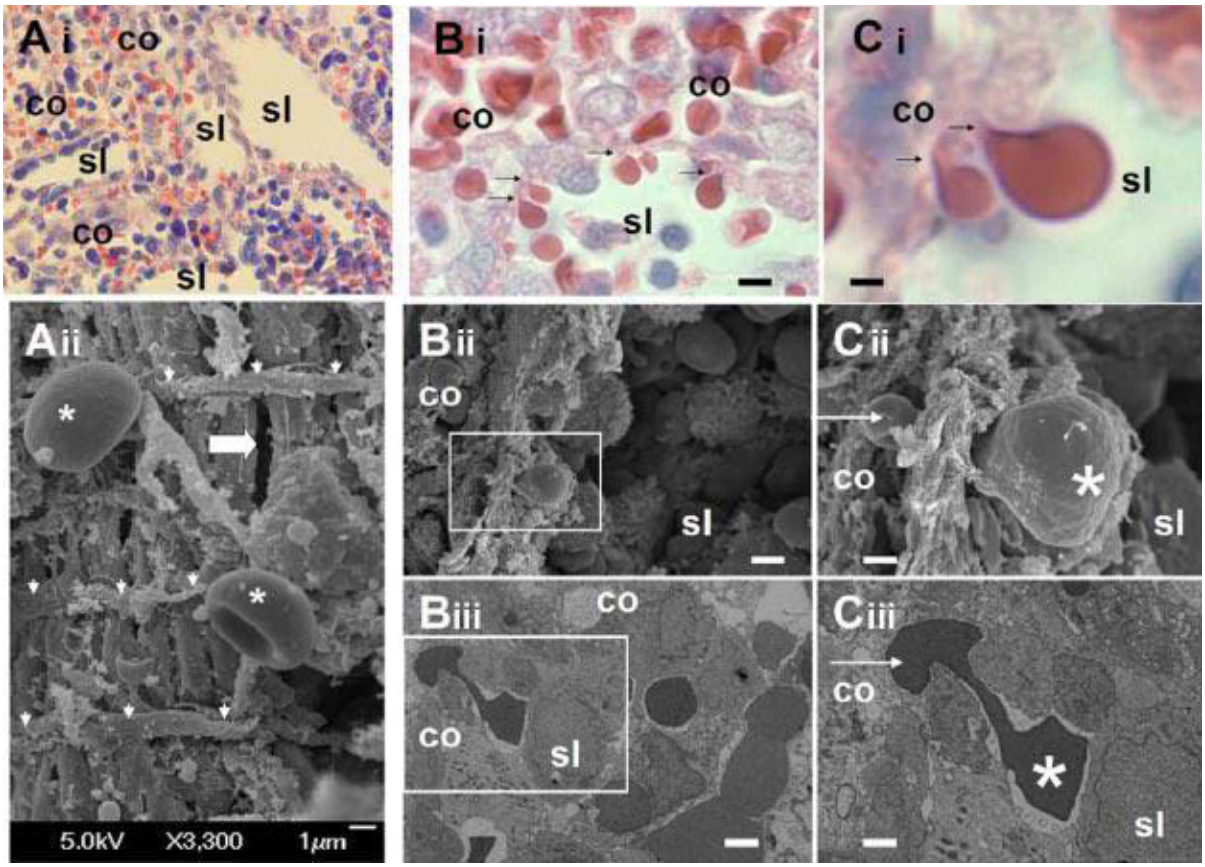


Figure 8 : Structure fine des fentes inter endothéliales au niveau de la paroi des sinus veineux de la pulpe rouge de la rate humaine.

(Ai) Reticular meshwork in the human spleen red pulp made of cords (co) and sinus lumens (sl) on a Giemsa-stained histologic section (original magnification x200). (Aii) Typical scanning electron micrograph of the abluminal side of a sinus wall in the red pulp, with periodic helical basal fibers (white arrowheads), normal RBC (stars), and a narrow interendothelial slit (horizontal thick arrow). (B) Squeezing of RBCs crossing an interendothelial slit, from the cord (co) to the sinus lumen (sl) on a Giemsa-stained histologic section (original magnification x1000): (i black arrows), scanning (ii, white square), or transmission (iii, white square) electron micrograph of a human spleen. (C) Same pictures at original magnification x4000. On electron micrographs (ii-iii), one part of the RBC (star) has emerged in the sinus lumen, although the other is still in the process of leaving the cord (white arrow). This illustrates that the interendothelial slits are not long enough (typically < 3.5 μm) to accommodate the whole elongated RBCs as they squeeze through. Bi-iii: bar represents 4 μm; Ci-iii: bar represents 1 μm.

Source: Deplaine et al, Blood 2011[219]

1.2-Rôle immunologique de la rate :

1.2.1- Spécificité de la réponse immunitaire innée et adaptative dans la rate :

La rate le plus gros organe lymphoïdes de l'organisme humain et joue un rôle très important dans la lutte contre les infections par les bactéries encapsulées comme *Streptoccoccus pnemonia, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis* et les salmonelles non typhiques.

L'architecture complexe des différentes parties de la rate lui permet d'assurer à la fois la filtration du sang et l'initiation de la réponse immunitaire aux antigènes retenus *in situ*. Ces deux fonctions interfèrent mutuellement l'une avec l'autre. La phagocytose, le transport, la préparation et la présentation des antigènes par les cellules phagocytaires et les cellules stromales sont très importantes pour l'induction de la réponse immunitaire T (cellulaire) et B (humorale). En retour, la fonction de clairance de la rate est sous l'influence de cytokines et d'anticorps cytophiliques spécifiques produits par les lymphocytes T et B au cours de la réponse immunitaire adaptative.

La pulpe rouge et la zone marginale de la rate constituent les sièges privilégiés de clairance la de substances particulaires par les cellules phagocytaires [232-234]. Il s'agit d'une phagocytose non spécifique d'antigène concernant tous les microorganismes sanguins contre lesquels l'organisme hôte n'est pas immunisé. Un cas particulier de la clairance splénique innée des particules du sang est l'élimination physiologique des érythrocytes défectueux dont la durée de vie de 120 jours, les GR humains sont éliminés à un taux de $2x10^{11}$ /jour, principalement par les macrophages de la pulpe rouge de la rate et secondairement ceux du foie [235] et d'autres organes.[236, 237]

Bien que les macrophages de la rate et du foie soient capables d'éliminer les antigènes particulaires de façon non spécifique, cette élimination est moins efficace pour les antigènes solubles. Cependant, l'élimination des antigènes particulaires et celle des antigènes solubles sont plus efficacement assurées chez les sujets immunisés. En effet la fixation des anticorps circulant sur les antigènes aboutit à la formation des complexes immuns dont la taille dépend du ratio anticorps/antigène. Ce phénomène

encore appelé opsonisation augmente la phagocytose des antigènes par les cellules phagocytaire en favorisant leur attachement au complexe immun à travers l'interaction entre la portion Fc des immunoglobulines et leur récepteur sur les cellules phagocytaires. L'opsonisation des antigènes solubles augmente considérablement leur phagocytose par les cellules phagocytaire au niveau de la rate

En résumé, de part sa connexion directe sur la circulation sanguine et son architecture micro-anatomique, la rate joue un rôle très important dans l'élimination des pathogènes circulants. A cause de sa richesse en cellules immunitaires, (lymphocyte B, lymphocyte T, macrophages, plaquettes) elle participe activement à l'élimination non spécifique des antigènes (surtout particulaires) et réunit les conditions favorables à la mise en place des réponses immunitaires spécifiques.

1.2.2- Rôle de Contrôle de qualité de la surface et de la déformabilité des globules rouges.

Les GR qui arrivent dans la rate à travers l'artère splénique peuvent s'engager l'une dans l'une des deux microcirculations parallèle : la circulation rapide ou fermée ou la circulation lente ou ouverte [238]. Dans la microcirculation rapide, les GR passent directement de la zone circulatoire périfolliculaire à la lumière des veinules. Il s'agit là d'une circulation quasi conventionnelle où les GR ne subissent pas de contrainte mécanique particulière. Dans la circulation lente ouverte, les GR en provenance des cordons de la pulpe rouge doivent se faufiler à travers de très étroits espaces séparant les cellules endothéliales de la paroi des veinules (fentes inter-endothéliales) pour atteindre la lumière des veinules. La traversée des fentes inter-endothéliale de la rate constitue la contrainte de déformabilité la plus rigoureuse pour les GR dans le l'organisme [239] pouvant aboutir à la rétention des GR moins déformables ou à l'expulsion des corps intra érythrocytaires (pitting) [238, 240].

A la différence des capillaires conventionnels bien structurés en forme de canal, les lits microcirculatoires labyrinthiques de la pulpe rouge de la rate sont dépourvus

d’endothélium. Cette microcirculation ouverte qui représente entre 10 et 20% du sang total passant à travers la rate expose le GR à un contrôle précis de leur déformabilité [238, 241]. Ainsi chaque GR circulant est susceptible d’être soumis à ce contrôle de qualité toutes les 2 à 3 heures. Chez les sujet sains ; la demi-vie des GR chauffés dans la circulation sanguine est de 1 heure [242]. D’autres facteurs sont impliqués dans la rétention des GR dans la circulation lente de la rate comme des interactions classiques ligand-récepteur telle que l’opsonisation de la protéine band 3 (contre laquelle des anticorps ont été identifiée) et la détection par les macrophages de la phosphatidylserine exposée à la membrane externe du GR [243, 244]. La vélocité des GR est approximativement 20 plus faible dans circulation lente de la rate que dans les capillaires ce qui favoriserait l’établissement des fortes interactions entre des ligands des GR et leurs récepteurs des macrophages et permettrait même la formation de liaisons faibles [238]. La rétention des GR dans la rate présage leur destruction subséquente et leur recyclage. Les macrophages représente environ la moitié du volume de sang présent dans la pulpe rouge et cette particularité de ce environnement joue très probablement un rôle dans la modification poste rétention des GR se traduisant par une phagocytose [238].

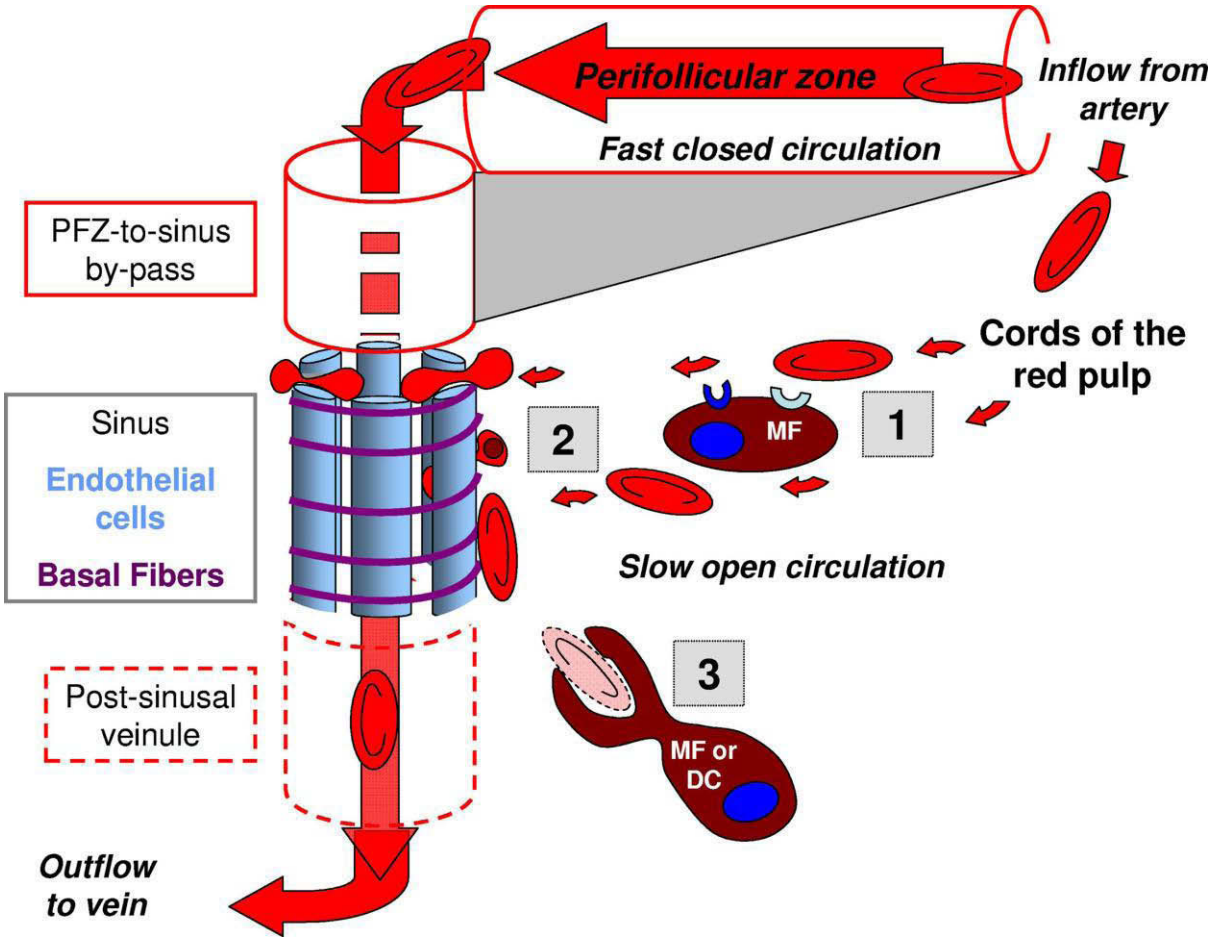


Figure 9 : Le splenon: L'unité fonctionnelle de la filtration splénique des GR

Blood flow is from top right to bottom left and may follow 2 parallel paths. The fast and closed circulation flows from splenic artery to central arterioles and their branches, then through the perifollicular zone (PFZ), PFZ-to-sinus by-passes, sinus lumens, postsinusal veinules that join into the splenic vein, and accounts for 80%-90% of the splenic blood flow. The slow open circulation has at least 2 specificities: (i) a microcirculatory structure devoid of endothelial cells where cord macrophages, and reticular cells survey the slowly migrating blood cells and (ii) narrow and short interendothelial slits in the sinus wall that RBC must cross to get back to the general circulation. The splenon displays analogies and differences with the nephron (see text). Schematically, the filtering function of the spleen can be divided in 3 successive steps. The "prefiltration step" (1) corresponds to the close contacts between RBCs and macrophages in the cords. RBC retention during this step is putatively triggered by ligand-receptor interactions, including direct recognition of RBC surface alterations and opsonization. The "filtration" step (2) corresponds to the crossing of interendothelial slits. RBC retention here is triggered by mechanical alterations. Undeformable bodies can also be extracted from RBCs in a process called pitting. The "postfiltration" step (3) corresponds to the modifications and processing of retained RBCs. Both the prefiltration and postfiltration steps potentially result in the phagocytosis of abnormal, decorated, or opsonized RBCs. Phagocytosis of parasitized RBCs is an initial step of antigen presentation to immune cells, thereby connecting filtration to the antigen-specific response.

Source : Buffet et al, blood 2011 [245]

2- Influence de la rate sur l'issu de l'infection palustre

2.1- Paludisme et splénectomie :

L'issue de l'infection à *Plasmodium falciparum* chez les patients splénectomisés a été récemment examinée à partir des données de la littérature [245, 246]. Elle est fortement influencée par le statut du patient vis-à-vis de l'exposition préalable à *P. falciparum*. Chez les sujets naïfs non immuns vis-à-vis du paludisme (essentiellement des voyageurs), les cas de paludisme sévère ou létal sont approximativement 10 fois plus fréquents que chez les sujets splénectomisés comparé aux sujets dont la rate est intacte. Les parasitémies sont aussi plus élevées et la circulation des formes matures circulant dans le sang périphériques plus fréquemment observée chez les sujets splénectomisés. La situation semble bien différente avec les sujets splénectomisée immuns (vivant dans les zones endémiques) chez qui la gravité et la mortalité du paludisme à *P. falciparum* semblent, au pire, modérément plus élevées que chez les sujets non splénectomisés. La circulation de formes matures du parasite reste plus fréquente [246]. De façon synthétique, ces observations suggèrent que la rate est indispensable à un contrôle la charge parasitaire de *P. falciparum* chez les sujets non immuns (même si ce contrôle reste partiel), alors que l'influence splénique semble moins nette chez les sujets préalablement protégés contre le paludisme par l'immunité acquise.

2.2- Splénomégalie : Aspect fonctionnel et pathologique de la rate dans les infections à *P. falciparum*

La prévalence de la splénomégalie dans les zones d'endémie palustre dépasse très souvent 50% chez les jeunes enfants. Cette fréquence est un indicateur de l'intensité de la transmission du paludisme [247]. Cependant la splénomégalie est rarement observée au cours du paludisme aigu chez les sujets non immuns [51, 248]. Chez les adultes présentant un paludisme sévère, Imbert et Urban ont noté que le poids de la rate augmentait de 2 à 3 fois en 4-8 jours d'infection [249, 250]. La rate des sujets décédés de paludisme sévère apparait plus noire que la normale à l'autopsie, reflétant ainsi la présence de pigment malarique aussi bien dans GR intacts contenant des formes matures de *P. falciparum* que dans les macrophages [251, 252]. Pendant la phase aigue du paludisme létal, il a été observé une accumulation préférentielle des

GR infectés et non infectés dans de la rate. Aussi des GR contenant des formes matures adhérentes de *P. falciparum* ont été observés dans les sinus spléniques [251]. Des GR contenant des parasites, mais aussi des parasites extra-érythrocytaires ont aussi été observés engagés dans les fentes inter-endothéliales des parois des sinus de la pulpe rouge [220, 250, 251]. Pongpongratn a rapporté une érythrophagocytose accrue dans la rate chez ces sujets [252]. La splénomégalie au cours du paludisme résulte d'une expansion simultanée de la pulpe rouge et de la pulpe blanche [250]. La pulpe rouge est congestionnée par des GR [253] et le nombre de macrophages est augmenté [250]. La structure de la rate est désorganisée avec la disparation de la zone marginale et une diminution relative du nombre de lymphocyte B. La signification fonctionnelle de cette observation n'est pas élucidée [250]. Des études expérimentales menées chez des patients infectés par *P. falciparum* ont montré que la clairance des GR normaux et celle des GR présentant des altérations mécaniques et ou de surface est accéléré aussi bien avant le traitement chez les patients avec splénomégalie qu'après l'initiation d'un traitement antipaludique chez la plupart de patients (splenectomisés ou non) [242, 254, 255] . Cette activation splénique non spécifique consécutive au paludisme persiste plusieurs semaines après l'accès, ce qui peut contribuer au risque accru d'anémie chez les patients ayant des infections recrudescentes [51, 256]. L'hyposplénisme n'a pas été décrit de façon évidente chez les patients adultes atteints de paludisme [254], cependant il pourrait exister chez les patients jeunes [257] ou chez les patients présentant des infections très graves [258]. Pour étudier le mécanisme de clairance des GR parasités avant le traitement, Buffet et collaborateurs ont développé une technique de perfusion *ex vivo* de la rate humaine isolées par une suspension de culture de GR parasités [220, 241]. Cette technique réplique certains aspects des étapes précoces de l'infection palustre chez les sujets naïfs. Comme attendu, ils ont observé une rétention rapide et complète des formes matures - adhérentes et peu déformables - de *P. falciparum* (trophozoïtes matures et schizontes). Cependant, ils ont aussi observé une rétention rapide d'une proportion des GR contenant les formes asexuées jeunes de *P. falciparum* (anneaux). Cette rétention était indépendante des anticorps [241]. Ce processus a été par la suite répliqué par Deplaine qui a montré une

réduction modérée mais significative de la capacité des anneaux à traverser des espaces très étroits *in vitro*.[219]

2.3-La rate et les diverses formes cliniques de l'infection à *Plasmodium falciparum*

2.3.1- Rate et anémie palustre

L'administration intermittente ou continue d'agents antipaludiques chez les enfants africains protège partiellement contre la survenue de l'anémie sévère. [259, 260]. Malgré la fréquence élevée de dysfonctionnement de l'érythropoïèse au cours du paludisme [52], celui-ci ne constitue pas la cause majeure de l'anémie aigue et subaigüe liées au paludisme. En effet même une abrogation complète de l'érythropoïèse ne saurait induire une réduction de plus de 1% par jour de la biomasse totale de GR [53]. Cependant, dans le contexte différent de patients souffrant d'infections récurrentes ou prolongées, les troubles de l'érythropoïèse pourraient en revanche jouer un rôle prépondérant dans la survenue de l'anémie [54]. Lorsque l'anémie palustre a une évolution aigue ou sub-aigue [51, 248, 261], le mécanisme physiopathologique pré dominant est donc la perte accrue de GR particulièrement au niveau splénique.[51, 262]. La rupture des GR infectés au cours de la libération de mérozoïtes contribue moins à l'avènement de l'anémie que la perte de GR non infectés [51, 258].

2.3.2- Rôle de la rate dans l'évolution de l'infection palustre vers les formes cliniques graves

L'anémie sévère et les troubles de conscience sont les deux manifestations cliniques majeures du paludisme grave chez les enfants africains. [263, 264]. Comparé au neuropaludisme, l'anémie palustre sévère survient plutôt dans la vie - chez les nourrissons et les jeunes enfants présentant de splénomégalie. La taille de la rate à l'admission est inversement corrélée au taux d'hémoglobine. Chez les enfants non immuns ou faiblement immuns, le neuropaludisme et l'anémie palustre sévère résultent donc de deux mécanismes distincts, impliquant la rate plus ou moins

directement. Bien que les enfants souffrant d'anémie sévère aient une plus longue évolution de la fièvre que ceux souffrant de neuropaludisme, ils ont une parasitémie généralement similaire ou plus faible [54]. Une corrélation négative entre parasitémie et perte de GR au moment du diagnostic du paludisme a aussi été observée chez les sujets adultes non immuns (Price 2001). L''évolution du paludisme vers l'anémie pourrait donc impliquer la présence d'un mécanisme splénique absent dans le neuropaludisme. Ce mécanisme pourrait être la rétention innée mécanique des anneaux dans la rate [245]. Etant donné que cette rétention des anneaux correspond à la clairance des parasites circulants elle a comme effet attendu de réduire la croissance de la parasitémie et donc de ralentir la progression de l'infection. La corrélation entre en la splénomégalie et la baisse de l'hématocrite ou du taux d'hémoglobine et l'évolution lente de l'infection palustre chez les patients présentant l'anémie pourrait s'expliquer par cette connexion entre la rétention innée des formes anneaux de *P. falciparum* et l'anémie, à laquelle s'ajouterait la rétention d'une part des GR non parasités dont la déformabilité est altérée [258]. La mesure du volume splénique par échographie montre que la rate des enfants impaludés soufrant d'anémie sévère (mortalité =1.9%) étaient plus grande que celle des enfants souffrant de neuropaludisme (mortalité = 29%). Le poids de la rate était significativement et de façon marqué plus élevé chez les survivants que chez les sujets morts de paludisme [265]. La rétention splénique des anneaux pourrait donc expliquer plusieurs aspects épidémiologiques, cliniques et expérimentaux du paludisme à *P. falciparum*. Cependant, cette rétention, n'a pu être directement confirmée chez les sujets infectés et ne saurait expliquer tous les aspects cliniques du paludisme. En effet, certains sujets tolèrent de forte parasitémie avec peu de symptômes et sans manifestations graves de la maladie.

2.3.3- Influence de l'âge sur la gravité de l'infection palustre : quel rôle pour la rate ?

Dans les zones à forte transmission de *P. falciparum*, l'infection palustre est grave quasi exclusivement chez les jeunes enfants probablement parce que les sujets âgés ont déjà développé une immunité acquise [266, 267]. Cependant, les enfants naïfs non immuns (vivant dans des zones non impaludées) présentent moins de risque de développer le paludisme grave que les adultes naïfs. Les sujets jeunes auraient donc un mécanisme inné d'élimination du parasite ou d'atténuation de sa pathogénicité plus efficace que les sujets adultes [268]. Considérant qu'un même et seul mécanisme dépendant de l'âge favorise l'évolution de l'infection palustre vers le neuropaludisme au détriment de l'anémie palustre sévère [54], le risque de neuropaludisme pourrait donc augmenter alors que celui de l'anémie sévère palustre pourrait diminuer avec l'âge de l'enfant [264]. Ainsi la capacité des sujets à développer très tôt dans la vie une réponse immunitaire spécifique aux antigènes de plasmodium pendant la période où le mécanisme inné de protection est le plus efficace serait le moyen par lequel la population humaine ne souffre que d'une mortalité assez réduite par paludisme en zones endémiques [247]. (A l'inverse, les épidémies touchant des populations adultes ayant perdu leur immunité ont été associées à des taux de mortalité assez élevés). De façon intéressante, il y a de ce point de vue une similarité frappante entre la Babesiose et le paludisme. Dans les zone à forte transmission de Babesia , les animaux sont très tôt infectés au cours de leur vie et acquièrent rapidement une immunité, ce qui protège totalement les animaux adultes contre les manifestations de l'infection [269]. Dans les zones à faible transmission de Babesia, la babesiose grave est fréquente chez les animaux car certains animaux acquièrent leur première infection après que le mécanisme inné de protection (des sujets jeunes) soit altéré. N'ayant pas eu la chance de développer la réponse immunitaire acquise avant, la maladie pourrait évoluer défavorablement. Comme *Plasmodium falciparum, Babesia bovis* et *Babesia divergens* infectent les GR et la biomasse de parasite augmente plus rapidement chez les sujets splénectomisés [269]. Les mécanismes innés de protection des jeunes sujets pourraient donc être similaires dans le paludisme et la babesiose. Ce potentiel

mécanisme commun pourrait être basé sur la rétention splénique et ou la destruction des GR parasités circulants.

En résumé La rate joue un rôle déterminant pour l'issue de l'infection palustre chez l'homme. Elle intervient à trois niveaux : le contrôle de la charge parasitaire à travers la rétention des GR parasités, l'initiation de la réponse immunitaire spécifique et l'installation de l'anémie palustre en favorisant la rétention des GR non parasités. Ces trois phénomènes sont intimement liés aux modifications des propriétés rhéologiques des GR induites par la l'infection palustre. La rate apparait ainsi comme un rempart à l'évolution du paludisme vers les formes fulminantes dues à une augmentation très rapide de la charge parasitaire. Les situations innées ou induites pouvant modifier la déformabilité des GR pourraient donc influencer cette fonction protectrice de la rate contre les formes les plus létales du paludisme.

La perception des altérations biomécaniques des GR par la rate joue un rôle physiopathologique important au cours du paludisme à *P. falciparum*. La rate pourrait conférer une protection innée par ce biais. Il est donc logique de spéculer que ce mécanisme puisse jouer un rôle dans la protection des sujets HbAS contre le paludisme

IV : Déformabilité des globules rouges et physiopathologie du paludisme

1- Définition et facteurs déterminant la déformabilité des globules rouges

La déformabilité des GR se définit par leur habilité à changer de forme en réponse à l'application d'une force extérieure, par exemple des contraintes de cisaillement. Les GR normaux sont des cellules discoïdes biconcaves de 7.5 à 8.5 µm de diamètre dont le volume diminue légèrement avec l'âge de la cellule. Ils passent une partie importante de leur vie circulatoire (120 jours en moyenne), à l'intérieur des capillaires d'un diamètre inferieur au leur (3 à 7µm). La circulation ouverte de la pulpe rouge splénique, impose une contrainte plus importante : le passage à travers des fentes inter- endothéliales de 0.2 à 2µm de diamètre.

Trois (3) facteurs sont déterminants dans la déformabilité des GR :

1.1- La viscosité cytoplasmique [270]

Une augmentation de la viscosité interne des GR contribue à la diminution de leur déformabilité. Elle intervient généralement à la suite d'une déshydrations provoquée soit par une élévation de température soit par une forte osmolarité du milieu extérieur. Ce paramètre intervient dans l'amélioration de la déformabilité des GR en milieu hypotonique [271]. Les GR HbCC ayant une concentration moyenne corpusculaire en hémoglobine élevée sont moins déformables [271].

1.2- Les propriétés rhéologiques de la membrane cellulaire [272]

L'élasticité de la membrane des GR est le premier garant de leur déformabilité. Elle est due à sa structure particulière composée d'un double feuillet phospholipidique soutenu par un squelette protéique (principalement les spectrines et des protofilaments d'actine, connectés au feuillet bilipidique par l'ankyrine, et la Protéine band 3) [239]. L'élasticité de la membrane relève beaucoup plus du squelette protéique que du double feuillet phospholipidique [273]. Les variations de la déformabilité liées à la membrane des GR est surtout perceptible à faible contrainte de cisaillement [271]. Ce paramètre explique la perte de déformabilité des GR dans le contexte de certaines affections génétiques de GR comme les thalassémies [274]

1.3- Les propriétés géométriques en particuliers le ratio surface volume

A surface, viscosité interne et rigidité membranaire constantes, la déformabilité d'un GR dépend de son volume. Plus le ratio surface/volume est grand plus le GR est déformable. Cela explique la baisse de la déformabilité des GR en milieu hypotonique [271]. Ce paramètre est impliqué dans l'altération de la déformabilité des GR dans la Pyropoikilocytose héréditaire. [271]

2- Les Méthodes conventionnelles d'étude de la déformabilité des GR

Plusieurs méthodes expérimentales de quantification de la déformabilité des GR ont été développées.

2.1- La méthode d'aspiration à la micropipette:

La technique d'aspiration à la micropipette a été beaucoup utilisée pour étudier les propriétés mécaniques des membranes des GR [275-277]. Cette technique utilise une micropipette de 1 à 3 μm de diamètre pour appliquer une pression négative sur la membrane d'un GR. Cette pression négative aspire la membrane du GR dans la micropipette. La pression nécessaire à l'aspiration dépend de la flexibilité de la membrane du GR. La technique d'aspiration à la micropipette permet aussi d'apprécier la viscosité interne de GR en mesurant le temps nécessaire au GR pour reprendre complètement sa forme initiale après relâchement de la pression négative.

2.2- L'ektacytométrie :

Elle détermine l'élongabilité du GR soumis à des forces de cisaillement [278].L'ectacytometrie utilise une technique de diffraction de laser pour mesurer la déformabilité. Elle permet une mesure rapide de la déformabilité des GR à partir d'une petite quantité de sang (25 μl). En soumettant les GR à des force de cisaillement croissant dans des milieux de différentes osmolarités, elle permet de déterminer la contribution des différentes paramètres impliqués dans la déformabilité des GR. [279]. Cette technique permet d'analyser la forme, le volume et le diamètre des GR. Elle peut être utilisée aussi bien dans le domaine de la recherche (étude de l'influence des médicaments sur la déformabilité des GR) que dans le domaine des analyses médicales. Cette technique a été utilisée pour étudier la déformabilité des GR dans

des contexte de polymorphisme héréditaire comme la pyropoikilocytose, la sphérocytose, l'HbCC [279]

2.3- La méthode de la pince optique (Optical tweezers) [280].

C'est une technique qui teste l'élasticité de la membrane des GR.

2.4- Les puces micro fluidiques : [281, 282]

Elle mesure la capacité des GR à se faufiler à travers des espaces de taille décroissant sous la force d'entrainement d'un liquide en flux. Les puces micro fluidiques miment la structure des micro-capillaires de la circulation sanguine.

2.5- Le test de filtration :

Le test de filtration mesure la déformabilité des GR en utilisant une membrane de filtre avec de mailles de 0. A 5 µm de diamètre .Les GR du sang sont filtrés à travers les mailles de la membrane en appliquant une pression négative qui les aspire. La déformabilité GR est estimé à travers le temps de la filtration d'un volume de sang donné ou encore le volume de sang filtré en un temps donné. Cette technique a été utilisée pour étudier la déformabilité des GR dans plusieurs contextes comme les diabètes[283], la septicémie [284] ou la drépanocytose[285]

2.6- La microsphiltration [219]

Elle mesure la capacité des GR à se déformer pour traverser un filtre de microsphères métalliques (96.50% étain, 3.00% argent, et 0.50% cuivre; Industrie des poudres Sphériques) mimant la filtration splénique. La taille des microsphères et leurs proportions (50% microsphères de 5-15µ + 50% microsphères de 15-25µ de diamètre) sont choisies de sorte à créer des espaces étroites comparables aux fentes inter endothéliales des veinules de la pulpe rouge de la rate. Cette technique de filtration retient les populations de GR rigide de façon comparable à la rate humaine isolée perfusée en *ex vivo*.

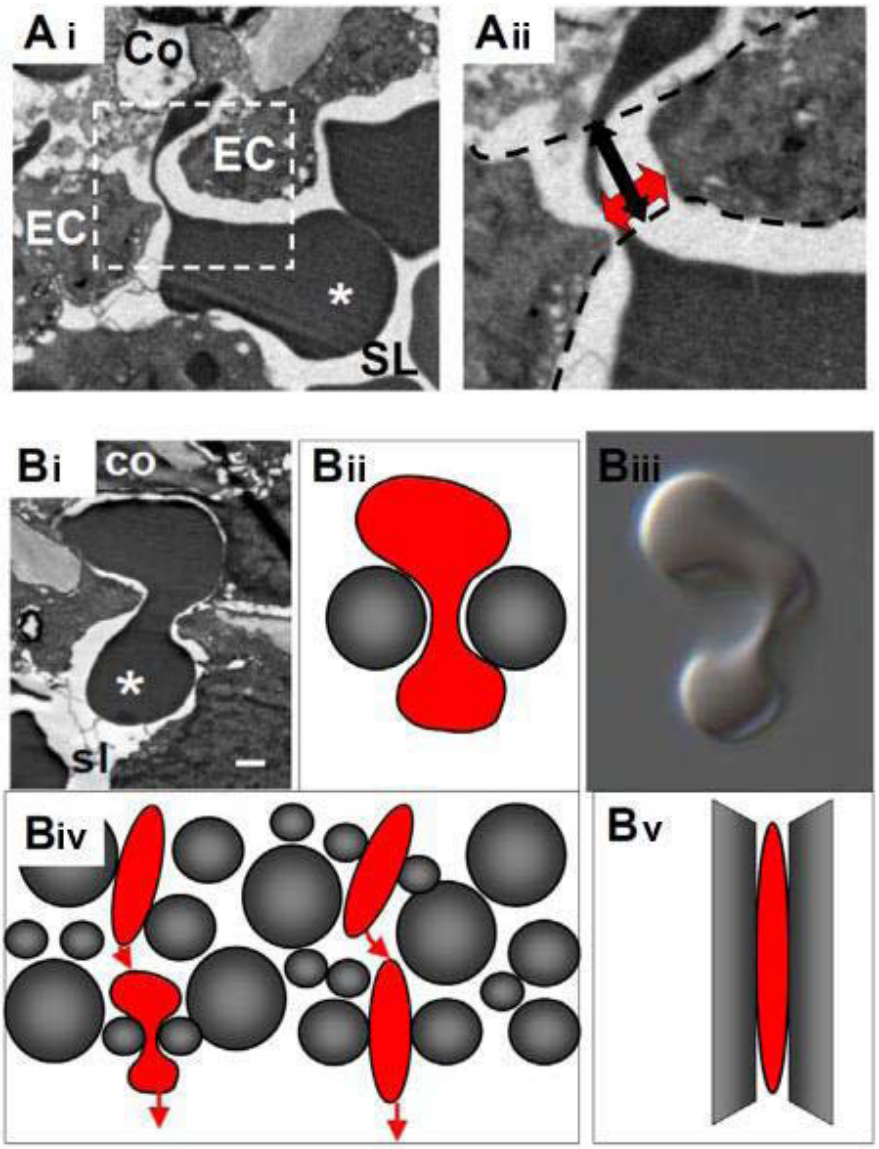


Figure 10 : Dimensions et géométrie des fentes inter endothéliales et déformations correspondantes des globules rouges

(Ai) Transmission electron micrograph (original magnification _2000) of RBCs squeezing through an interendothelial slit (ie, between 2 adjacent endothelial cells [EC], from the cord [Co] to the sinus lumen [SL], white star showing the anterior pole of the RBCs). (Aii) Width (red double-headed arrow) and length (black double-headed arrow) of the interendothelial slit at high original magnification (_5000) as measured on 11 pictures. (B) Dumbbell-shaped RBCs as observed on a transmission electron micrograph (Bi, white star showing the anterior pole of the RBCs), or as expected to occur as a RBCs squeeze between microbeads (Bii), or as observed under the contrast-phase microscope after formaldehyde fixation of RBCs engaged within the microbead layer (Biii). (Biv) Schematic flow routes and shape deformation of RBCs squeezing through a narrow and short interbead space interspersed in wider spaces (left route), or only through wide spaces (right route). (Bv) Schematic longitudinal elongation of RBCs flowing though a narrow and long channel in a polycarbonate sieve.

3- Déformabilité des globules rouges parasités par le *Plasmodium falciparum*

Les GR contenant les forme jeunes de *P. falciparum* sont moins déformables que les GR non parasités. Cette perte de déformabilité, déjà présente au stade anneau, augmente à mesure que le parasite se développe en trophozoïte puis en schizonte, comme observé par exemple en rhéoscopie [218],en microsphiltration [219] ou par micropipettes [286]. L'infection des GR par *P. falciparum* agit au niveau des 3 facteurs déterminant la déformabilité des GR : le ratio surface volume [287, 288], la flexibilité membranaire [289, 290] et la viscosité interne des GR. [286]. La réduction de la déformabilité des GR parasités a été rapportée par différents auteurs utilisant différentes techniques d'appréciation de la déformabilité des GR [241, 281, 282, 288, 291].

En résumé, la déformabilité des GR est fortement affectée par l'infection palustre. La perte de déformabilité des GR est perceptible dès les stades précoces de développement de *P. falciparum* dans le GR et augmente avec l'âge de ce dernier. Elle est en grande partie responsable de la rétention des GR parasités au niveau de la rate. La perte de déformabilité des GR induite par *P. falciparum* au stade précoce de leur développement pourrait ainsi être plus marquée avec les GR initialement plus rigides comme les GR HbAS. Cette altération accrue de la déformabilité des GR HbAS infecté par *P. falciparum* jouerait ainsi un rôle prépondérant dans la protection des sujets HbAS contre le paludisme.

Chapitre II : Problématique générale de la thèse, questions posées, axes de travail

I- Cadre conceptuel général

Comme exposé en introduction, le paludisme contribue au maintien des hémoglobinopathies dans la population humaine (hypothèse d'Haldane). La pathogénicité des hémoglobinopathies dans leur forme homozygote prédisposerait *a priori* ces mutations génétiques à un confinement voire à une expulsion totale du génome humain. En effet, en absence de traitement approprié les sujets porteurs de ces mutations à l'état homozygote ou composite n'atteignent généralement pas la puberté (exception faite du cas de l'HbC qui est une affection plus bénigne) sont donc incapables d'assurer la descendance, ce qui constitue un désavantage très important pour le maintien la transmission de ces traits génétiques. Pourtant ces mutations ont émergé et se sont propagées de façon indépendante dans plusieurs régions. Leur répartition est quasi superposable aux régions de distribution passées ou présentes du paludisme, une des maladies les plus meurtrières de l'histoire de l'espèce humaine depuis sa sédentarisation, il y a plus de 10.000 ans. Ce constat fut à l'origine de l'hypothèse d'Haldane en 1949 selon laquelle, ces variants génétiques confèrent une protection contre le paludisme. Plusieurs études épidémiologiques ont rapporté des indications tangibles de cette protection concernant l'HbAS, l'HbC et l'alpha-thalassémie. La masse de données générées dans le domaine est considérable tant sur le plan épidémiologique, que mécanistique ou médical.

Toutefois la compréhension des mécanismes de protection conférée contre le paludisme par les principales hémoglobinopathies (HbAS, l'HbC et l'alpha-thalassémie) comporte encore de nombreuses zones d'ombre. Dans cette interaction entre hémoglobinopathies et paludisme, il y a un contraste fort entre la simplicité et la solidité apparente du concept général de polymorphisme équilibré et la complexité de son exploration mécanistique. Il y a consensus sur le concept mais controverse sur le ou les mécanismes.

II- Mécanismes de la protection conférée contre le paludisme par les hémoglobinopathies : un chapitre riche mais complexe aux frontières de la paludologie et de l'hématologie

Les méta-analyses et revues générales [27, 77] récentes montrent que quel que soit le mécanisme protecteur évoqué, les explorations n'apportent jamais de réponse tout-à-fait consensuelle. A titre d'exemples, la croissance parasitaire *in vitro* dans des GR HBAS, CC ou thalassémiques est généralement mais pas toujours diminuée (à l'exception de la croissance en GR HBAS en hypoxie), la réponse adaptative est parfois augmentée mais ce n'est pas constant. Par ailleurs, la plupart des mécanismes proposés sont basés sur des observations *in vitro* ou sur modèle animal. L'extrapolation de ces résultats à la physiopathologie humaine n'est pas toujours validée. Enfin, la multiplicité des mécanismes proposés et l'absence de hiérarchisation quant à leurs impacts relatifs rend l'analyse de ce champ de recherche complexe et fait émerger plusieurs questions générales :

La protection relève-t-elle d'un mécanisme protecteur générique, commun à toutes les hémoglobinopathies ou d'un (ou de) mécanisme(s) spécifique(s) propre(s) à chaque hémoglobinopathie ?

Une réduction la cytoadhérence des globules rouges parasités peut-elle être ce mécanisme protecteur commun ?

Le parasite est-il capable de s'adapter à l'environnement particulier du globule rouge d'hémoglobinopathie pour maintenir un niveau de cytoadhérence compatible avec une multiplication efficace ?

Un blocage inné des globules rouges parasités dans la rate peut-il intervenir dans une ou plusieurs hémoglobinopathies en particulier l'HbAS ?

Ces questions constituent l'axe central de mon travail de thèse.

III- Les grands axes de mon travail de thèse

1- **Article I : Exploration de l'inhibition de la cytoadhérence en tant que mécanisme potentiel de protection commun à toutes les hémoglobinopathies.**

L'inhibition de la cytoadhérence *in vitro* des GR parasités de sujets HbAS et HbC avait été décrite et serait due à une perturbation de la morphologie et de la topographie des molécules de PfEMP-1 exprimées à la surface de ces GR [198, 292]. Cette altération phénotypique est en partie liée aux modifications induites par le dépôt d'hémichromes issus de l'oxydation de l'hémoglobine instable contenue dans ces GR. Ce phénomène étant décrit dans le contexte de deux hémoglobinopathies, l'hypothèse d'une inhibition de la cytoadhérence comme mécanisme de protection antipaludique des sujets porteurs d'alpha-thalassémie était donc formulée et prenait en compte les observations cliniques et épidémiologiques de terrain. En effet de multiples études épidémiologiques n'ont pas trouvé d'association entre l'alpha-thalassémie et une réduction de la prévalence ou de la densité de *P. falciparum* (mesuré par la parasitémie). Ces observations ne concordent pas avec les hypothèses de réduction de croissance des parasites dans ces GR, de l'élimination accrues des GR α-thalassémiques infectés soit par phagocytose soit du fait d'une réponse spécifique humorale anti plasmodium accrue chez ces sujets. En revanche, une réduction de la cytoadhérence expliquerait bien la tolérance des sujets alpha-thalassémiques au paludisme grave même sur fond de parasitémie élevée

Nous avons donc exploré cette hypothèse au cours de ces travaux de thèse en utilisant des souches de parasite de terrain isolées des patients maliens et des cellules endothéliales microvasculaires humaines.

2- Article 2 : Adaptation parasitaire à l'environnement cellulaire particulier des GR HbAS et HbC : le déficit de cytoadhérence peut-il être compensé par une adaptation/sélection de variants parasitaires ?

L'Hb AS et l'Hb C protègent les sujets qui en sont porteurs par une réduction de la cytoadhérence, elle-même due à une expression altérée des molécules de PfEMP-1 à la surface des GR parasités. Cependant, sur le terrain, certains sujets HbAS et HbC

souffrent d'accès palustres symptomatiques parfois graves Les variants de PfEMP-1 exprimés par les parasites au moment de ces attaques devraient donc avoir un phénotype de cytoadhérence assez prononcé pour compenser l'inhibition induite par le développement altéré du parasite dans les GR HbAS/HbC. Nous avons exploré l'hypothèse d'une plus forte adhérence de parasites de Patients HbAS/HbC comparée à l'adhérence de parasites de patients HbAA, tous les parasites ayant été cultivés dans des GR HbAA.

3- Article 3 : La rate jouerait-elle un rôle dans la protection des sujets porteurs de trait drépanocytaire contre le paludisme ?

La gravité du paludisme est corrélée à la charge parasitaire [293]. Une parasitémie d'environ 0.01% est généralement nécessaire à l'induction du paludisme symptomatique [54]. Plusieurs études ont rapporté des faibles parasitémies et une persistance de parasitémie asymptomatiques chez les sujets HbAS. De plus, en zone de transmission saisonnière, les sujets HbAS souffrent de leur premier accès en moyenne un mis plus tard que les sujets HbAA [150, 151]. Cette observation suggère une ascension plus lente de la parasitémie chez les sujets HbAS que chez les sujets HbAA. Il pourrait s'agir d'une croissance plus lente, comme observé *in vitro* à faible concentrations d'oxygène, d'une clairance plus efficace de la des GR parasités chez les sujets HbAS, ou d'une combinaison de ces deux phénomènes. . Les travaux de l'équipe d'accueil ont montré que la rétention mécanique innée des GR HbAA parasités par des formes jeunes pouvait contribuer au contrôle de la charge parasitaire [219, 241]. Une rétention splénique précoce et accrue des GR infectés (contenant les formes jeunes de *Plasmodium falciparum)* contribuerait à un contrôle de la parasitémie chez les sujets HbAS. Cette rétention pourrait être essentiellement mécanique à cause de faible déformabilité initiale de ces GR accentuée par la présence du parasite [294-296]

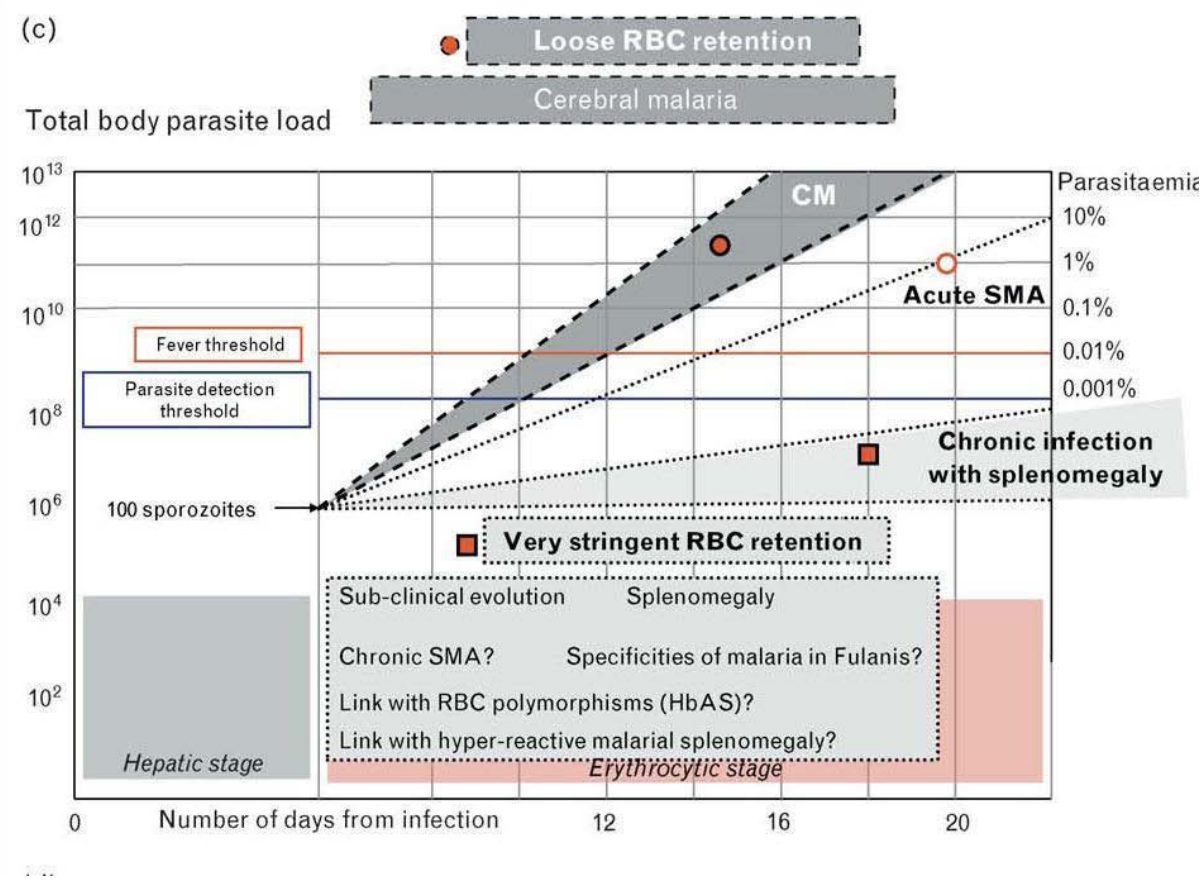


Figure 11 : *Illustration spéculative du rôle possible de la rétention splénique des GR parasités circulants, dans l'évolution du paludisme vers les différentes formes cliniques*

Source : Buffet et al, Curr Opinion in Hematology 2009 [54]

En utilisant des outils d'étude de la rétention mécanique splénique récemment développés, nous avons exploré l'hypothèse d'une rétention mécanique splénique accrue des GR infectés par les formes jeunes (anneaux) de *P. falciparum* chez les patients HbAS.

Chapitre III : RESULTATS OBTENUS

1- Organisation pratique et articulation générale des travaux de thèse

Ce travail a exploré certains des mécanismes cellulaires pouvant expliquer la protection des sujets porteurs de polymorphismes de GR (HbAS, HbC et α-thalassémie) contre le paludisme grave. La thèse étant en cotutelle entre l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC) et l'Université des sciences de Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), les travaux se sont déroulés à la fois à Paris et à Bamako avec des séjours annuels de 6 mois alternés. Les séjours étaient organisés de manière à pouvoir couvrir la période de haute transmission du paludisme au Mali qui s'étend de juillet à Décembre. Cette organisation du travail nous a permis d'explorer cette thématique avec des souches de *Plasmodium falciparum* adaptées à la culture long terme et mais aussi avec des souches parasitaires obtenues directement auprès des patients maliens souffrant de paludisme. Deux grandes facettes des interactions innées entre *Plasmodium falciparum* et *Homo sapiens* ont été explorées : la cytoadhérence des globules rouges parasités aux cellules endothéliales d'une part (Articles 1 et 2), la rétention mécanique des globules rouges parasités dans la rate d'autre part, la filtration de globules rouges *in vitro* étant ici complétée par des expériences de perfusion de rates humaines *ex vivo* (Article 3 soumis).

2- Article I : Cytoadhérence des GR infectés de sujets porteurs d'α-thalassémie

(Krause MA, **Diakite SA**, Lopera-Mesa TM, Amaratunga C, Arie T, Traore K, Doumbia S, Konate D, Keefer JR, Diakite M, Fairhurst RM. *PLoS One. 2012;7(5):e37214. doi: 10.1371)*

2.1- Démarche – Rappel des hypothèses de travail.

La cytoadhérence diminuée des GR parasités de sujets HbC et HbAS a été montrée en 2005 et 2008 [198, 292] et s'expliquerait en partie par une sénescence précoce de ces GR, elle-même liée à la susceptibilité de ces hémoglobines mutantes au stress oxydatif. Comme observé dans le contexte de l'HbC ces molécules d'hémoglobine altérées se déposeraient à la face interne de la membrane cytoplasmique du GR perturbant ainsi l'expression normale de PfEMP-1 opératrice du phénomène de cytoadhérence. Le stress oxydatif est un phénomène commun aux hémoglobinopathies, α-thalassémie comprise. La réduction de cytoadhérence pourrait constituer un mécanisme de protection contre le paludisme grave commun aux différents polymorphismes de l'hémoglobine.

Les mécanismes communs de protection préalablement proposés reposeraient ou bien sur une réduction de croissance des parasites dans les GR porteurs d'hémoglobine anormale, ou bien sur une phagocytose accrue des GR infectés ou encore sur une réponse spécifique humorale anti plasmodium accrue dans ce contexte d'hémoglobinopathie. Il n'y a toutefois pas d'association entre l'α-thalassémie et une réduction de la prévalence ou de la densité de la parasitémie à *Plasmodium falciparum* en zone endémique ce qui n'est pas concordant avec l'intervention exclusive des mécanismes communs évoqués ci-dessus. En revanche, une réduction de cytoadhérence expliquerait bien la protection partielle des sujets α-thalassémiques contre le paludisme grave même sur fond de parasitémie élevée.

2.2- Conditions de réalisation de l'étude.

Ce travail s'inscrivait dans le cadre d'une étude portant sur l'immunité innée et acquise des enfants maliens contre le paludisme. L'étude a été conçue et mise en œuvre dans le cadre d'une collaboration avec une équipe du Dr Rick Fairhurst du

Laboratoire de Recherche sur le Paludisme et les Vecteur du NIH/NIAID des Etats Unis d'Amérique. Cette étude s'est déroulée dans trois villages voisins (Kenioroba, Fourda et Bozokin) situés à environ 75Km au sud-ouest de Bamako, capitale du Mali. Le paludisme y est saisonnier et la période de haute transmission s'étend de juin à décembre avec des pics observés en juillet et octobre. C'était une étude prospective qui a couvert les périodes de transmission de 2008 à 2013 et a inclus plus de 1500 enfants âgés de 6 mois à 17 ans après consentement éclairé écrit des parents ou tuteurs. Tous les enfants inclus dans l'étude ont été dépistés pour les différentes hémoglobinopathies (HbS, HbC, α-thalassémie) et pour le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Cette étude constitue la base de nombreuses explorations ultérieures et nous a donné accès aux GR de sujet α-thalassémiques ainsi qu'à des isolats primaires de *P. falciparum*.

2.3- Participation personnelle à ces travaux.

Ma participation à cet article a concerné les activités réalisées au Mali avec des isolats primaires de *P. falciparum*. Outre le dépistage de l'α-thalassémie (détection de la délétion 3.7 par PCR), j'ai réalisé (i) la culture sur un cycle des isolats de *P. falciparum* dans des GR de sujets α-thalassémiques (ou des GR de sujets contrôle HbAA), (ii) la culture des cellules endothéliales, (iii) le test de cytoadhérence des GR parasités aux cellules endothéliales, et (iv) la préparation des GR infectés pour la microscopie à force atomique. J'ai contribué à l'exploitation des résultats générés qui forment la base des figures et paragraphes correspondants des résultats.

Les éléments clé et les spécificités de cette démarche expérimentale étaient les suivants

Le laboratoire d'immunogénétique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'université de Bamako a servi de cadre de réalisation à mes expériences. Des GR parasités de patients maliens ont été incubés en culture jusqu'au stade de trophozoïte. Les GR contenant les trophozoïtes ont par la suite été purifiés par la méthode de séparation magnétique (environ 95% de parasitémie). Des GR de sujets «normaux/contrôles» (αα/αα) et de sujets α-thalassémiques hétérozygotes

(-α/αα) ou homozygotes (-α/-α) ont été incubés dans des flacons de culture séparés avec ces trophozoïtes purifiés. Après la rupture des schizontes et invasion des GR par les mérozoïtes, les parasites étaient entretenus en culture (37ºC, 5% CO_2) de nouveau jusqu'au stade trophozoïte. Les GR étaient resuspendus à 2% d'hématocrite et le milieu de culture était changé 2 fois par jour pour permettre une croissance optimale et synchrone des isolats primaires de *P. falciparum.* La parasitémie dans chacune des cultures (de GR contrôles, et GR thalassémiques) était déterminée par cytométrie en flux après marquage au bromure d'éthidium. Les parasitémies et les hématocrites des suspensions étaient ajustés respectivement à 5% et 1%. Pour chaque suspension de culture, 150µl de chaque suspension ont été incubés en duplicata (avec agitation horizontale à température ambiante) avec des cellules endothéliales préalablement cultivées à plus de 50% de confluence sur des lames « LabTek CC-2 coated 8-well chamber slides » (Nalge Nunc International, Rochester, NY). Chaque échantillon de suspension de GR α-thalassémiques a été testé avec son contrôle de GR normaux sur la même lame. Après avoir enlevé le surnageant, les murs des puits étaient décollés de la lame sur laquelle avaient été t cultivées les cellules endothéliales. La lame était alors rincée puis fixée au glutaraldéhyde avant d'être colorée au Giemsa. La lame était alors examinée au microscope et les cellules endothéliales ainsi que les GR parasités ayant adhéré étaient comptés. Le score de cytoadhérence était déterminé comme étant le nombre moyen de GR parasités ayant adhéré à une cellule endothéliale. Le facteur de comparaison était le statut thalassémique des GR, et la souche de parasite. La même lame test était utilisée pour les GR thalassémiques et les GR contrôles (αα/αα).

Le score relatif de cytoadhérence des GR thalassémiques était déterminé en le rapportant au score de cytoadhérence des GR contrôles de la même lame, considéré comme égal à 100%

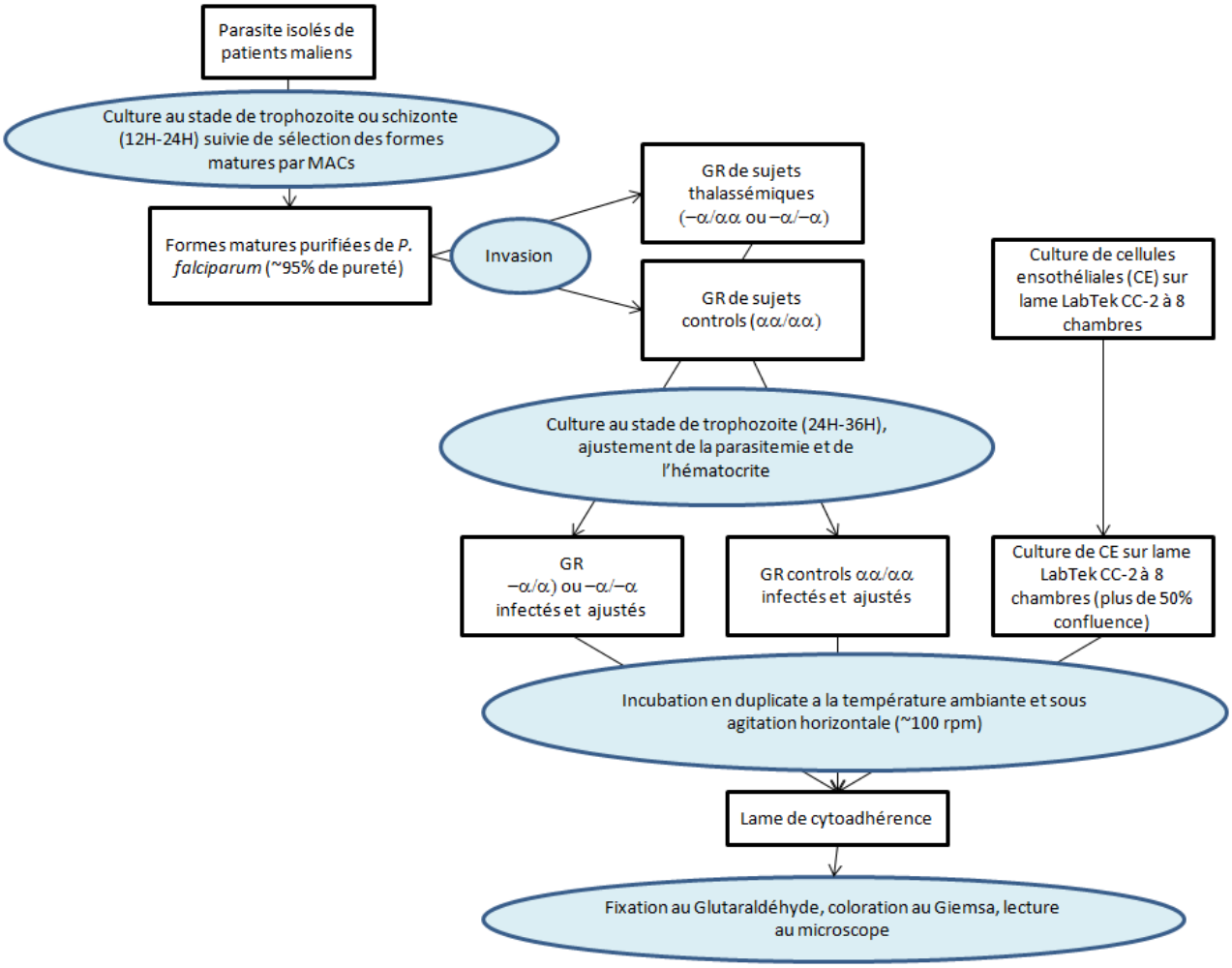


Figure 12: Plan de la démarche expérimentale de l'article 1

J'ai réalisé 12 expériences de comparaison de la cytoadhérence de GR infectés de sujets « normaux » (αα/αα) vs GR de sujets α-thalassémiques hétérozygotes (-α/αα), et 5 expériences de comparaison de la cytoadhérence de GR infectés de sujets « normaux » (αα/αα) vs GR de sujets α-thalassémiques homozygotes (-α/-α).

2.4- Résultats obtenus.

J'ai constaté que l'adhésion des GR de sujets thalassémiques hétérozygotes (-α/αα) et homozygotes (-α/-α) infectés par des formes matures de *P. falciparum* aux cellules endothéliales humaines était réduite respectivement de 22% et 43 % par rapport au GR infectés de sujet normaux (αα/αα). Ces résultats ont été obtenus avec des isolats primaires obtenus chez des patients maliens. Des résultats supplémentaires (4 expériences de comparaison) ont été obtenus par l'équipe avec des souches de

laboratoire et des GR de sujets thalassémiques HH (--/-α) ont montré une réduction de 89% de l'adhésion de ces GR parasités aux cellules endothéliales comparés aux GR de sujet «normaux».

2.5- Autres résultats importants présentés dans cet article

D'autres explorations ont été menées par l'équipe avec des monocytes et des souches de *P. falciparum* adaptées à la culture et ont montré des réductions relatives du score d'adhésion des GR parasites aux monocytes de 13%, 33% et 63% respectivement pour les GR de sujets hétérozygotes (-α/αα), homozygotes (-α/-α) et HH (--/-α).

La quantification de PfEMP-1 à la surface des GR parasités a consisté en la mesure de l'intensité moyenne de la fluorescence à la surface des GR parasités par cytométrie en flux après marquage de ceux-ci par un anticorps spécifique de PfEMP-1 conjugué à l'Alexa 488. Nous avons constaté une réduction relative de l'intensité moyenne de fluorescence de 18% et de 43% respectivement avec GR de sujets thalassémiques hétérozygotes (-α/αα), et HH (-- /-α)

Les images de microscopie à force atomique de GR naturellement infectés (patients maliens thalassémiques hétérozygotes et homozygotes) maturés *ex vivo* jusqu'au stade trophozoïte ont permis d'observer non seulement des populations de GR présentant de fines protubérances de surface (« knobs ») régulièrement distribuées (caractéristique attendue de GR normaux infectés par les formes matures de *P. falciparum*), mais aussi des populations de GR présentant de grosses protubérances irrégulièrement dispersées à la surface des GR, semblable à ceux décrits à la surface des GR infectés contenant l'HbC ou l'HbS [198, 292].

En résumé, cet article rapporte la réduction significative de l'adhésion des GR thalassémiques infectés aux cellules endothéliales et aux monocytes. Cette réduction est corrélée au degré de l'atteinte thalassémique. Ce travail a également montré une altération quantitative et qualitative de l'expression des molécules de PfEMP-1 à la surface des GR infectés de sujet α-thalassémiques. La protection contre le paludisme grave conférée par l'α-thalassémie s'explique donc

en partie par la réduction de la cytoadhérence suite à une altération d'expression des molécules de PfEMP-1 à la surface des GR infectés.

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

α-Thalassemia Impairs the Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes

Michael A. Krause[1], Seidina A. S. Diakite[2], Tatiana M. Lopera-Mesa[1], Chanaki Amaratunga[1], Takayuki Arie[3], Karim Traore[2], Saibou Doumbia[2], Drissa Konate[2], Jeffrey R. Keefer[4], Mahamadou Diakite[2], Rick M. Fairhurst[1]*

1 Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America, **2** Malaria Research and Training Center, Faculty of Medicine, Pharmacy, and Odontostomatology, University of Bamako, Bamako, Mali, **3** Department of Physics and Electronics, School of Engineering, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan, **4** Division of Pediatric Hematology, Department of Pediatrics, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland, United States of America

Abstract

Background: α-thalassemia results from decreased production of α-globin chains that make up part of hemoglobin tetramers (Hb; $\alpha_2\beta_2$) and affects up to 50% of individuals in some regions of sub-Saharan Africa. Heterozygous ($-\alpha/\alpha\alpha$) and homozygous ($-\alpha/-\alpha$) genotypes are associated with reduced risk of severe *Plasmodium falciparum* malaria, but the mechanism of this protection remains obscure. We hypothesized that α-thalassemia impairs the adherence of parasitized red blood cells (RBCs) to microvascular endothelial cells (MVECs) and monocytes – two interactions that are centrally involved in the pathogenesis of severe disease.

Methods and Findings: We obtained *P. falciparum* isolates directly from Malian children with malaria and used them to infect $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (normal), $-\alpha/\alpha\alpha$ and $-\alpha/-\alpha$ RBCs. We also used laboratory-adapted *P. falciparum* clones to infect $-/-\alpha$ RBCs obtained from patients with HbH disease. Following a single cycle of parasite invasion and maturation to the trophozoite stage, we tested the ability of parasitized RBCs to bind MVECs and monocytes. Compared to parasitized $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ RBCs, we found that parasitized $-\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha/-\alpha$ and $-/-\alpha$ RBCs showed, respectively, 22%, 43% and 63% reductions in binding to MVECs and 13%, 33% and 63% reductions in binding to monocytes. α-thalassemia was associated with abnormal display of *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), the parasite's main cytoadherence ligand and virulence factor, on the surface of parasitized RBCs.

Conclusions: Parasitized α-thalassemic RBCs show PfEMP1 display abnormalities that are reminiscent of those on the surface of parasitized sickle HbS and HbC RBCs. Our data suggest a model of malaria protection in which α-thalassemia ameliorates the pro-inflammatory effects of cytoadherence. Our findings also raise the possibility that other unstable hemoglobins such as HbE and unpaired α-globin chains (in the case of β-thalassemia) protect against life-threatening malaria by a similar mechanism.

Citation: Krause MA, Diakite SAS, Lopera-Mesa TM, Amaratunga C, Arie T, et al. (2012) α-Thalassemia Impairs the Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. PLoS ONE 7(5): e37214. doi:10.1371/journal.pone.0037214

Editor: Tobias Spielmann, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Germany

Received November 21, 2011; **Accepted** April 16, 2012; **Published** May 18, 2012

This is an open-access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the Creative Commons CC0 public domain dedication.

Funding: This research was supported by the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rfairhurst@niaid.nih.gov

Introduction

α-thalassemia is an inherited disorder of hemoglobin (Hb) synthesis, in which reduced production of α-globin chains leads to decreased amounts of normal $\alpha_2\beta_2$ tetramers and increased amounts of unpaired β-globin chains. In sub-Saharan Africa, α-thalassemia states are produced by a 3.7-kb deletion that leaves one functional copy of duplicated α-globin genes. Heterozygotes ($-\alpha/\alpha\alpha$) have an essentially normal phenotype while homozygotes ($-\alpha/-\alpha$) have mild microcytic anemia. HbH disease is a chronic hemolytic disorder that may produce severe anemia requiring periodic blood transfusions. While the prevalence of α-thalassemia can exceed 50% in some malaria-endemic areas of sub-Saharan Africa, HbH disease ($-/-\alpha$) is extremely rare because the mutant *cis* allele ($-/$) is very uncommon.

One study associated α-thalassemia with reduced risk of severe *Plasmodium falciparum* malaria in Papua New Guinea [1], but only recently have epidemiological studies confirmed this finding in sub-Saharan Africa. Case-control and cohort studies have shown that heterozygous and homozygous α-thalassemia variously protect against severe malaria syndromes, including cerebral malaria (CM; coma with or without convulsions), severe malarial anemia (SMA; Hb level ≤50 g/l), and deep acidotic breathing [2,3,4,5]. While these observations provide strong evidence that α-thalassemia prevents the progression from uncomplicated to severe malaria, the mechanism of this protection has not been established.

In considering candidate mechanisms of protection by α-thalassemia, we reasoned that they should be consistent with a well-established epidemiological observation reported from numerous African settings. Specifically, α-thalassemia is not associated with reduced parasite prevalence [5,6,7] or densities *in vivo* as determined by examining blood smears from children with asymptomatic parasitemia [2,8], uncomplicated malaria [2,3,4,5,6,7,9,10,11,12], or severe malaria [2,13]. As noted by other investigators [3,5,14], these observations indicate that α-thalassemia does not protect against severe malaria by mechanisms that impair the ability of parasites to invade or develop within RBCs [15,16], or promote the removal of parasitized RBCs from the bloodstream by increased neoantigen expression [15,17] or increased antibody binding [18]. Indeed, we have observed extremely high parasite burdens (up to 200,000/μl) in some $-\alpha/\alpha\alpha$ and $-\alpha/-\alpha$ children with malaria (unpublished data).

A central question thus emerges from these considerations: how can marginal decreases in α-globin synthesis enable children to develop high parasite densities and symptoms of uncomplicated malaria and yet not develop severe complications of the disease? To explore this question, we hypothesized that α-thalassemia impairs the adherence of parasitized RBCs to microvascular endothelial cells (MVECs) and monocytes. These cell-cell interactions are mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), a family of clonally-expressed, antigenically-variant proteins [23,24,25]. *P. falciparum* parasites export PfEMP1 proteins and concentrate them in knob-like protrusions on the surface of their host RBCs. This host cell modification enables a large mass of parasitized RBCs to sequester in venous microvessels [26] and avoid clearance from the bloodstream by the spleen. However, the adherence of parasitized RBCs to MVECs and monocytes also contributes to the development of life-threatening malaria by causing systemic microvascular inflammation [27,28,29,30].

Using naturally-circulating *P. falciparum* isolates and freshly-drawn RBCs from our study site in rural Mali, where approximately 40% of children are α-thalassemic, we show that α-thalassemia impairs the cytoadherence of parasitized RBCs and is associated with abnormal PfEMP1 display.

Methods

Red Blood Cells

All blood samples were obtained from healthy Malian children who were confirmed to be aparasitemic by examination of thick blood smears. Blood samples from two patients with HbH disease were obtained in the United States. Written, informed consent was obtained from all blood donors or their parents. Blood collection was approved by the Institutional Review Boards of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, the University of Bamako, and the Johns Hopkins School of Medicine. Whole blood samples were drawn into Vacutainers® (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) containing acid-citrate-dextrose (ACD) anticoagulant. After removing buffy coat leukocytes, RBCs were washed three times with RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stored at 50% hematocrit at 4°C prior to use (within 4–36 h of blood draw). In some flow cytometry experiments, whole blood samples were stored in ACD Vacutainers® on ice during a 36-hour transport from Mali to the United States and then used within 4–24 h of arrival. Hemoglobin types were determined by HPLC (D-10 Instrument, Bio-Rad, Hercules, CA). The presence of the *G6PD**A− allele was determined as described [19]. The presence of the 3.7-kb deletional determinant of α-thalassemia was determined as described [20]. In all experiments, normal and α-thalassemic RBCs were obtained simultaneously and processed in parallel. Normal and α-thalassemic RBC donors from Mali had normal HbA and did not carry the *G6PD**A− allele.

Parasite Culture

P. falciparum clones (3D7, FCR-3, A4tres and FVO) were cultured in O+ RBCs at 5% hematocrit in complete medium (CM; RPMI-1640 supplemented with 25 mg/ml HEPES, 2 mg/mL sodium bicarbonate, 50 μg/ml gentamicin, and 0.5% Albumax II (Gibco-BRL, Grand Island, NY) in 0.2 μm-vented, 75-cm^2 flasks (Corning Inc., Corning, NY). Knobby parasite lines were maintained by periodic gelatin flotation [21]. Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and media was changed every 8–12 h. Naturally-circulating *P. falciparum* isolates (ring stage) were obtained directly from Malian children with malaria and cultured for 12–24 hours to the trophozoite stage, as above. Trophozoite-infected RBCs containing paramagnetic hemozoin were enriched to >95% purity by magnetic separation (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), inoculated into normal and α-thalassemic RBC samples, and cultured at 1–2% hematocrit as above. In all experiments, parasitized RBCs were assayed after one cycle of invasion and development to the trophozoite stage (~36 h).

Endothelial Cell Adherence Assay

Endothelial cell adherence assays were conducted in Mali, except those using HbH RBCs obtained in the United States. Human adult dermal microvascular endothelial cells (MVECs; Lonza, Walkersville, MD) were maintained in the manufacturer's EGM2-MV medium and grown on LabTek CC-2 coated 8-well chamber slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY) to ~50% confluency at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2. Trophozoite-infected RBCs were adjusted to 5–20% parasitemia and 1% hematocrit by the addition of noninfected RBCs in binding media (BM; RPMI-1640, 0.5% BSA, pH 6.7). Adherent MVECs were washed with BM and then incubated with 150 μl of the parasitized RBC suspension for 1 h at 37°C with constant horizontal agitation (100 rpm). After parasite suspensions were removed from each well, slides were washed by dipping twice in BM at 37°C, fixed in 2% glutaraldehyde at ambient temperature for 2 h, and stained in 1 or 2.5% Giemsa for 30–60 min. In each experiment, the number of parasitized RBCs bound to ~700 MVECs was counted from duplicate wells. For each slide, the number of parasitized α-thalassemic RBCs per MVEC was normalized to counts from parasitized normal RBCs.

Monocyte Adherence Assay

Monocyte adherence assays were conducted in Mali, except those using HbH RBCs obtained in the United States. CD14+ monocytes (Lonza) were plated onto CC2 Lab-Tek chamber slides (Nalge Nunc International) at 4×10^5 cells per well and cultured for 48 h in RPMI 1640 containing 25 mM HEPES, 50 μg/ml gentamicin, and 10% fetal bovine serum at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2. Normal and α-thalassemic RBCs infected with *P. falciparum* trophozoites (3D7, A4tres, FCR-3, naturally-circulating isolates) were purified by magnetic separation, adjusted to 3–15% parasitemia and 1% hematocrit as previously described. Adherent monocytes were washed with binding media and incubated with 150 μl of the parasitized RBC suspension for 1 h at 37°C with gentle horizontal rotation. The parasite suspension was removed from each well and the slides were gently washed by dipping four times in binding media. Slides were dried and stained using Hema 3 (Fischer Scientific). Adherence was measured by counting the number of infected RBCs bound to a minimum of 700 monocytes from duplicate

wells. For each slide, the number of parasitized α-thalassemic RBCs per monocyte was normalized to the counts from parasitized normal RBCs.

Flow Cytometry

Flow cytometry was conducted in the United States using α-thalassemic RBCs obtained in Mali and HbH RBCs obtained in the United States. Rat or rabbit polyclonal antisera raised against PfEMP-1 variants expressed by the *P. falciparum* clones FVO and A4tres were kindly provided by Morris Makobongo and Dror Baruch (NIAID). Rabbit polyclonal antisera specific for a recombinant PfEMP1 variant subdomain (VAR2CSA, DBL3X) was kindly provided by Kavita Singh (NIAID). Samples of trophozoite-infected RBCs (1.5×10^6 cells; 1% parasitemia) were stained with various dilutions of antiserum in FACS staining buffer (FSB; PBS, 2% FBS, 0.1% sodium azide) for 45 min at ambient temperature and washed twice with FSB. Samples were then incubated with Alexa 488-conjugated anti-rat or anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) and ethidium bromide (2 μg/ml) at ambient temperature for 30 min and washed twice with FSB. A FACSort instrument (Becton-Dickinson, San Jose, CA) and FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR) were used to acquire and analyze 250,000 to 500,000 events from each sample.

Atomic Force Microscopy

Parasitized α-thalassemic RBCs were obtained directly from Malian children with malaria, cultured to the trophozoite stage, and prepared for atomic force microscopy (AFM) imaging as described [22]. We also inoculated HbH RBCs with *P. falciparum* clone FCR-3 and cultured them through one cycle of invasion and development to the trophozoite stage (~36 h). A Bioscope AFM (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA) on a wide-field Axiovert 200 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) was optimized to image the surface topography of RBCs and to identify the parasite stage within an individual AFM-imaged RBC. The X and Y piezoelectric scanners of the Bioscope AFM were disconnected. A custom built closed-loop XY scanner stage (nPoint, Inc., Madison, WI) was used to minimize scanning artifacts and thermal drift of the scanner for improved image accuracy. AFM was performed in tapping mode in air using Nanosensors pointprobe tips (Nanosensors, Switzerland) with a cantilever resonant frequency of 327–397 kHz. Topographic and error signal (amplitude) images were collected simultaneously. Parasites were stained with YOYO-1 fluorescent nucleic acid staining reagent (Molecular Probes, Inc.). Bright field and fluorescent images were collected with a chilled CCD video camera (Model C5985, Hamamatsu Photonic Systems, Bridgewater, NJ). Image-Pro Plus version 5.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) was used to merge these images to allow the approximate identification of the parasite stage.

Statistical Analysis

In assays of cytoadherence and PfEMP1 expression, results from parasitized α-thalassemic RBCs were normalized to results from parasitized normal RBCs tested in parallel. 2-tailed *P* values were calculated by one-sample *t* test of the mean using GraphPad software version 5.01 (Graphpad Software, La Jolla, CA).

Results

Because cytoadherence is centrally involved in the pathogenesis of severe malaria, we tested *P. falciparum*-infected normal and α-thalassemic RBCs for their adherence to MVECs. In these and other cytoadherence comparisons, we used naturally-circulating *P. falciparum* isolates obtained directly from Malian children with malaria, and freshly-drawn nonparasitized RBCs from healthy Malian children. In experiments using $-/-\alpha$ RBCs, we used laboratory-adapted *P. falciparum* clones, and freshly-drawn RBCs from two patients with HbH disease. Relative to parasitized $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ RBCs, parasitized $-\alpha/\alpha\alpha$ and $-\alpha/-\alpha$ RBCs showed 22% and 43% reductions in adherence to MVECs, respectively (mean ± SEM; 78%±6.6%, $P=0.007$, $N=12$ for $-\alpha/\alpha\alpha$; 57%±13.0%, $P=0.03$, $N=5$ for $-\alpha/-\alpha$) (**Fig. 1a**). Although the $-/-\alpha$ phenotype is not present in sub-Saharan Africa, we chose to use $-/-\alpha$ RBCs to test the effects of further reductions in α-globin expression on cytoadherence. Parasitized $-/-\alpha$ RBCs showed an 89% reduction in adherence to MVECs (11%±1.8%, $P<0.0001$, $N=4$) (**Fig. 1a**).

P. falciparum infection is associated with elevated levels of TNF and other monocyte-derived cytokines that cause fever and other symptoms of malaria. Excessive levels of these cytokines correlate with the development of severe malaria syndromes [31]; for example, TNF causes dyserythropoiesis that contributes to the development of severe malarial anemia. The interaction between PfEMP1 on parasitized RBCs and CD36 on monocytes leads to monocyte activation and cytokine production *in vitro* [32,33]. To measure the effects of α-thalassemia on this interaction, we tested the adherence of parasitized RBCs to monocytes. Relative to parasitized $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ RBCs, parasitized $-\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha/-\alpha$ and $-/-\alpha$ RBCs showed 13%, 33% and 63% reductions in adherence to monocytes, respectively (mean ± SEM; 87%±4.0%, $P=0.003$, $N=21$ for $-\alpha/\alpha\alpha$; 67%±9.6%, $P=0.07$, $N=3$ for $-\alpha/-\alpha$; 37%±5.8%, $P=0.002$, $N=4$ for $-/-\alpha$) (**Fig. 1b**).

Reduced expression of PfEMP1 on the surface of parasitized RBCs containing the malaria-protective HbC or HbS variants is associated with reductions in cytoadherence. Using specific antisera in a flow cytometric assay, we found that parasitized $-\alpha/\alpha\alpha$ and $-/-\alpha$ BCs showed 18% and 43% reductions in surface PfEMP1 levels, respectively, relative to parasitized $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ RBCs (mean ± SEM; 82%±3.0%, $P=0.0002$, $N=10$ for $-\alpha/\alpha\alpha$; 57%±4.7%, $P=0.0003$, $N=6$ for $-/-\alpha$) (**Fig. 1c**). We were unable to quantify PfEMP1 levels on the surface of parasitized $-\alpha/-\alpha$ RBCs. This is because the homozygous α-thalassemic children in our cohort had confounding polymorphisms such as HbC, HbS and G6PD deficiency, were parasitized at the time of screening, or refused to donate a blood sample.

On the surface of parasitized RBCs, PfEMP1 proteins are concentrated on knob-like protrusions that make contact with host cells [32,34,35]. Alterations in knob assembly can therefore affect the amount and distribution of PfEMP1 [34,36]. To determine whether reduced surface levels of PfEMP1 are associated with aberrant knob assembly on parasitized α-thalassemic RBCs, we examined the surface of these cells. Atomic force micrographs of naturally-parasitized $-\alpha/\alpha\alpha$ and $-\alpha/-\alpha$ RBCs (cultured *ex vivo* from ring forms to mature trophozoites) showed populations expressing fine, regularly distributed knobs (**Fig. 2a,b**) characteristic of parasitized normal RBCs as well as cell populations expressing large, widely separated knobs (**Fig. 2d,e**) reminiscent of parasitized HbC and HbS RBCs [22,37]. Knobs on the surface of trophozoite-infected $-/-\alpha$ RBCs were found to be variously abnormal in size and distribution (**Fig. 2c**) and in some cases essentially absent (**Fig. 2f**).

Discussion

α-thalassemia protects against different clinical forms of severe malaria, especially SMA but also CM and deep acidotic breathing

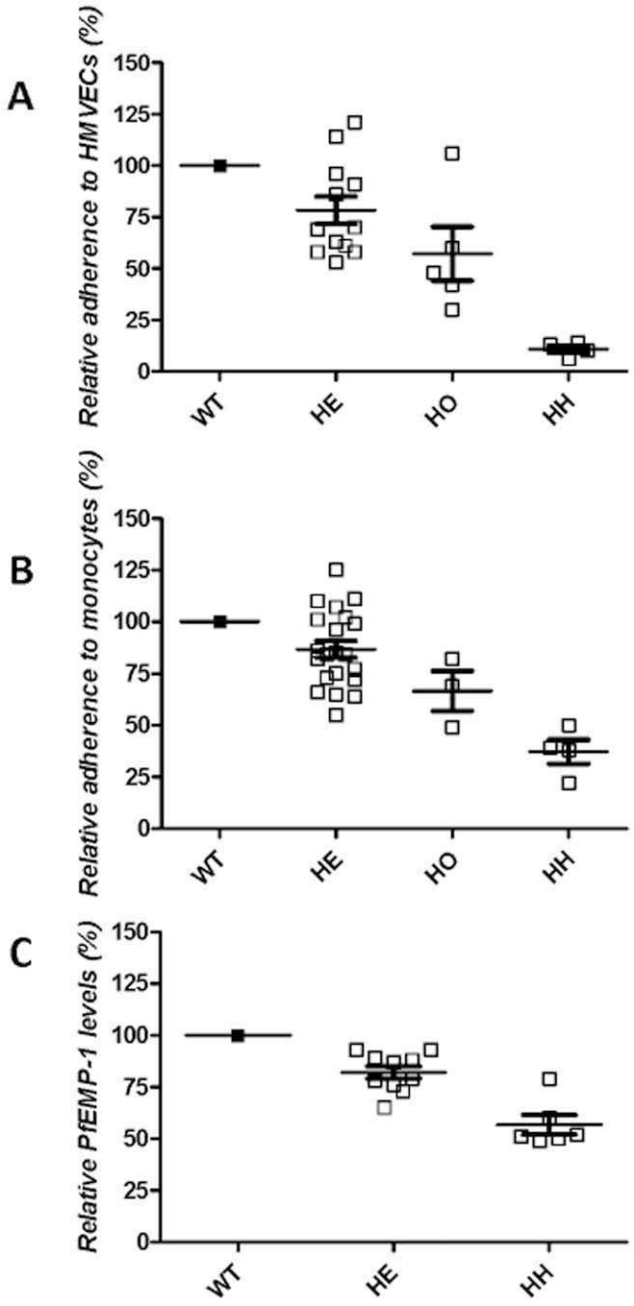


Figure 1. Relative cytoadherence and surface PfEMP1 levels of parasitized RBCs. a, Adherence of parasitized RBCs to MVECs. The numbers of parasitized $-\alpha/\alpha\alpha$ (HE), $-\alpha/-\alpha$ (HO) and $-/-\alpha$ (HH) RBCs adhering to MVECs were normalized to those of parasitized $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ RBCs tested in parallel. The mean (± SEM) number of parasitized $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ RBCs per 100 MVECs was 260±40, $N=19$. Results were obtained from 19 naturally-circulating parasite isolates and 2 laboratory-adapted parasite clones (A4tres and FCR-3), multiple blood donors (5 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, 2 $-\alpha/\alpha\alpha$, 2 $-\alpha/-\alpha$ and 2 $-/-\alpha$), and 4 MVEC donors (not all combinations tested). This resulted in $-\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha/-\alpha$ and $-/-\alpha$ samples being compared to $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ samples 12, 5 and 4 times. **b,** Adherence of parasitized RBCs to monocytes. The numbers of parasitized $-\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha/-\alpha$ and $-/-\alpha$ RBCs adhering to monocytes were normalized to those of $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ RBCs tested in parallel. The mean (± SEM) number of parasitized $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ RBCs per 100 monocytes was 136±10, $N=12$. Results were obtained from 3 naturally-circulating parasite isolates and 3 laboratory-adapted parasite clones (3D7, A4tres and FCR-3), multiple blood donors (5 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, 3 $-\alpha/\alpha\alpha$, 2 $-\alpha/-\alpha$ and 2 $-/-\alpha$) and 4 monocyte donors (not all combinations tested). This resulted in $-\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha/-\alpha$ and $-/-\alpha$ samples being compared to $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ samples 20, 3 and 4 times. The $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ and $-\alpha/\alpha\alpha$ RBCs were different from those used in endothelial cell adherence assays. **c,** PfEMP1 expression levels (median fluorescence intensities, MFI) on the surface of parasitized RBCs. The mean (± SEM) MFI of parasitized $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ RBCs was 556±153, $N=6$. Results were obtained from 2 laboratory-adapted parasite clones (A4tres, FVO and $FCR3^{CSA}$), multiple blood donors (4 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, 6 $-\alpha/\alpha\alpha$ and 2 $-/-\alpha$), and various concentrations of 2 antisera (not all combinations tested). This resulted in $-\alpha/\alpha\alpha$, and $-/-\alpha$ samples being compared to $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ samples 10 and 6 times. The $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ and $-\alpha/\alpha\alpha$ RBCs were different from those used in endothelial cell and monocyte adherence assays.
doi:10.1371/journal.pone.0037214.g001

– syndromes associated with fatal outcome. The mechanism by which α-thalassemia protects against these severe malaria syndromes has remained obscure, although it does not seem to affect parasite density *in vivo*. Microcytosis has recently been implicated as a mechanism of protection against SMA by homozygous, but not heterozygous, α-thalassemia in Papua New Guinea [14]. According to this model, increased RBC counts protect homozygotes against SMA by reducing the amount of Hb loss at any given parasite density. While microcytosis might prevent SMA, as defined as Hb concentration ≤50 g/l [14], the role of α-thalassemia homozygosity in protection against death from SMA is less clear. This is because SMA can be associated with very low fatality rates (~1%) [38] unless it is complicated by other signs of severe malaria, including coma and deep acidotic breathing [4,38].

To explore how heterozygous and homozygous forms of α-thalassemia protect against CM and complicated SMA, we hypothesized that these traits weaken the adherence of parasitized RBCs to host cells within microvessels – a pro-inflammatory process that is essential in the pathogenesis of severe disease syndromes. We found that progressive reductions in α-globin production produce commensurate reductions in the adherence of parasitized RBCs to MVECs and monocytes. Decreased levels and abnormal distribution of PfEMP1 on the surface of parasitized α-thalassemic RBCs correlate with these findings. Based on these data, we propose the following model to explain how α-thalassemia protects against severe malaria syndromes without affecting parasite densities *in vivo*.

P. falciparum merozoites readily invade α-thalassemic RBCs and develop into viable trophozoites expressing PfEMP1. The amount and distribution of PfEMP1 is sufficiently normal to mediate effective sequestration of trophozoite-infected RBCs. This normal cycle of invasion, development, and sequestration enables parasites to avoid clearance from the bloodstream by the spleen and to multiply to densities that are equivalent to those observed in non-thalassemic children with malaria. The avidity of parasitized RBCs for MVECs and monocytes is sufficiently weakened by α-thalassemia, however, so that these host cell populations are not maximally activated. The resulting levels of inflammation produce symptoms of uncomplicated malaria, but are not high enough to cause severe disease and death. This model of protection is consistent with recent data showing that the degree of endothelial cell activation correlates with avidity of cytoadherence [39,40]. It is also consistent with the finding that parasitized α-thalassemic RBCs show impaired adherence to human umbilical vein endothelial cells and rosetting [41,42] (the binding of a parasitized RBC to several other noninfected RBCs), a different cytoadherence interaction also implicated in the development of severe disease.

Our model suggests that α-thalassemia heterozygous and homozygous states confer protection against CM and complicated SMA by impairing PfEMP1-mediated activation of host cells. By impairing endothelial cell activation, for example, α-thalassemia

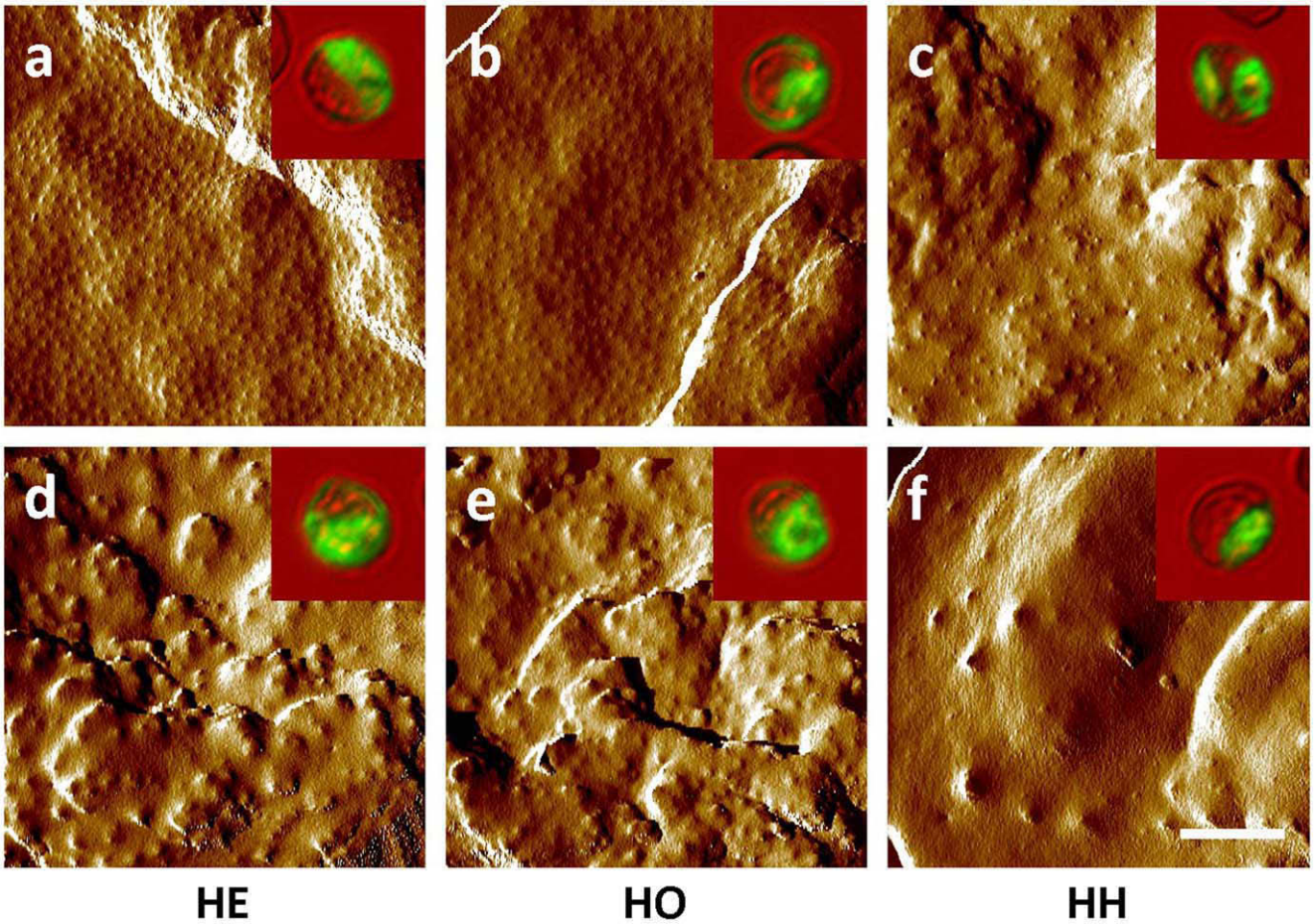


Figure 2. Distribution and morphology of knobs on the surface of parasitized RBCs. Atomic force micrographs (AFMs) of parasitized −α/αα (HE) (**a,d**) and −α/−α (HO) (**b,e**) RBCs obtained from naturally-parasitized Malian children with malaria and −/−α (HH) (**c,f**) RBCs infected with a laboratory-adapted *P. falciparum* clone showing normal (**a,b**) or abnormal (**c–f**) knob distributions and morphologies. AFM images are representative of 32, 10 and 18 images of parasites in −α/αα, −/−αα and −/−α RBCs. Inlays show YOYO-1-stained parasites that correspond to those imaged by AFM. Comparison AFMs of parasitized HbA, HbC and HbS RBCs have been reported previously [22,37].
doi:10.1371/journal.pone.0037214.g002

could dampen the degree of endothelial dysfunction that contributes to CM. By impairing monocyte activation, α-thalassemia could produce lower levels of cytokines and other inflammatory mediators that suppress erythropoiesis [43]. Some evidence for this possibility was recently provided by Veenemans *et al.* who showed that in Tanzanian and Kenyan children, α-thalassemia limits the decline in Hb levels associated with episodes of symptomless parasitemia – particularly those accompanied by inflammation [8]. The lower mean corpuscular Hb concentrations associated with α-thalassemia may contribute to this protective mechanism by decreasing the amount of free Hb released upon the rupture of each schizont-infected RBC. This mechanism would have the effect of lessening the severity of free Hb-induced endothelial cell dysfunction, as proposed by May *et al.* [4].

Our model also provides a plausible explanation for how heterozygous α-thalassemia confers less protection against severe disease than do HbS and HbC. Indeed, large numbers of α-thalassemic children *do develop severe disease* despite their abnormal RBC phenotype. Multiple studies have reported significant numbers of α-thalassemic children who develop life-threatening manifestations of disease [(e.g., 31% (94/301) of Ghanaian children in [2]; 60% (391/655) of Kenyan children in [3]; and 51% (70/137) of Kenyan children in [13])]. Relatively mild reductions in surface levels of particular PfEMP1 variants may not suffice to significantly impair the avidity of parasitized RBCs for host cells, resulting in relatively significant proportions of children with severe disease carrying the heterozygous α-thalassemia phenotype. A major limitation of our study is that it used −α/−α RBCs from relatively few donors. While data from −α/−α (and HbH) RBC samples were useful to explore the effect of α-thalassemia dose on PfEMP1 display, additional laboratory and epidemiological studies are needed to determine the relative contribution of impaired cytoadherence to the malaria-protective effects of homozygous α-thalassemia.

Parasitized α-thalassemic RBCs show PfEMP1 display abnormalities that are reminiscent of those on the surface of parasitized HbS and HbC RBCs. Shared characteristics between HbS, HbC, and α-thalassemic RBCs suggest possible mechanisms by which these diverse hemoglobinopathies impair the ability of *P. falciparum* parasites to remodel their host RBC membrane. HbS, HbC, and unpaired β-globin chains (in the case of α-thalassemia) undergo accelerated degradation to hemichromes [44,45]. These hemichromes bind the inner leaflet of the RBC membrane where they promote the heme iron-mediated oxidation of membrane proteins and lipids [46,47] – a process that consumes antioxidants as well. Since parasites induce hemichrome formation as they mature from

ring to trophozoite stages [48], the amount of hemichromes produced by parasites in HbS, HbC, and α-thalassemic RBCs would be greater than in normal RBCs [49]. Excessive hemichrome-induced damage to the parasitized RBC membrane could interfere with the trafficking and knob incorporation of PfEMP1.

Finally, our data suggest that α-thalassemia protects against severe *P. falciparum* malaria by the same mechanism as HbS and HbC: ameliorating the pro-inflammatory effects of cytoadherence. This model also raises the possibility that other unstable hemoglobins such as HbE and unpaired α globin chains (in the case of β-thalassemia) protect against severe malaria by a similar mechanism. While appropriate case-control and cohort studies have not yet been conducted to determine whether HbE or β-thalassemia confer protection against fatal malaria syndromes, neither hemoglobinopathy has been associated with reduced parasite prevalence or densities *in vivo* [50,51,52]. We speculate that diverse hemoglobinopathies have been naturally selected worldwide for the common phenotype of abnormal PfEMP1 display. If true, these findings would suggest that PfEMP1-mediated phenomena are centrally responsible for malaria-related deaths and that therapeutics and vaccines that interfere with cytoadherence may reduce malaria mortality.

Acknowledgments

This research was supported by the Intramural Research Program of the NIAID, NIH. The authors wish to acknowledge Jennifer M. Anderson, Steve Beaudry, Mory Doumbia, Seydou Doumbia, Robert W. Gwadz, Carole A. Long, Sam Moretz, Dick Sakai, Cheick Traore, and Thomas E. Wellems for their efforts in support of this work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAK TML CA TA JRK MD RMF. Performed the experiments: MAK SASD TML CA TA KT RMF. Analyzed the data: MAK TML CA TA. Contributed reagents/materials/analysis tools: SD DK JRK. Wrote the paper: MAK TML CA TA RMF.

References

1. Allen SJ, O'Donnell A, Alexander ND, Alpers MP, Peto TE, et al. (1997) alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 14736–14741.
2. Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Gellert S, Otchwemah RN, Dietz E, et al. (2004) Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria. Blood 104: 2003–2006.
3. Williams TN, Wambua S, Uyoga S, Macharia A, Mwacharo JK, et al. (2005) Both heterozygous and homozygous alpha+ thalassemias protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya. Blood 106: 368–371.
4. May J, Evans JA, Timmann C, Ehmen C, Busch W, et al. (2007) Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. JAMA 297: 2220–2226.
5. Wambua S, Mwangi TW, Kortok M, Uyoga SM, Macharia AW, et al. (2006) The effect of alpha+-thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya. PLoS Med 3: e158.
6. Allen SJ, Rowe P, Allsopp CE, Riley EM, Jakobsen PH, et al. (1993) A prospective study of the influence of alpha thalassaemia on morbidity from malaria and immune responses to defined Plasmodium falciparum antigens in Gambian children. Trans R Soc Trop Med Hyg 87: 282–285.
7. Enevold A, Lusingu JP, Mmbando B, Alifrangis M, Lemnge MM, et al. (2008) Reduced risk of uncomplicated malaria episodes in children with alpha+-thalassemia in northeastern Tanzania. Am J Trop Med Hyg 78: 714–720.
8. Veenemans J, Andang'o PE, Mbugi EV, Kraaijenhagen RJ, Mwaniki DL, et al. (2008) Alpha+ -thalassemia protects against anemia associated with asymptomatic malaria: evidence from community-based surveys in Tanzania and Kenya. J Infect Dis 198: 401–408.
9. Mockenhaupt FP, Falusi AG, May J, Ademowo OG, Olumese PE, et al. (1999) The contribution of alpha+-thalassaemia to anaemia in a Nigerian population exposed to intense malaria transmission. Trop Med Int Health 4: 302–307.
10. Mockenhaupt FP, Bienzle U, May J, Falusi AG, Ademowo OG, et al. (1999) Plasmodium falciparum infection: influence on hemoglobin levels in alpha-thalassemia and microcytosis. J Infect Dis 180: 925–928.
11. Mockenhaupt FP, May J, Bergqvist Y, Meyer CG, Falusi AG, et al. (2001) Evidence for a reduced effect of chloroquine against Plasmodium falciparum in alpha-thalassaemic children. Trop Med Int Health 6: 102–107.
12. Imrie H, Fowkes FJ, Michon P, Tavul L, Hume JC, et al. (2006) Haptoglobin levels are associated with haptoglobin genotype and alpha+ -Thalassemia in a malaria-endemic area. Am J Trop Med Hyg 74: 965–971.
13. Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, Peto TE, Weatherall DJ, et al. (2005) Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+-thalassemia and the sickle cell trait. Nat Genet 37: 1253–1257.
14. Fowkes FJ, Allen SJ, Allen A, Alpers MP, Weatherall DJ, et al. (2008) Increased microerythrocyte count in homozygous alpha(+)-thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia. PLoS Med 5: e56.
15. Yuthavong Y, Butthep P, Bunyaratvej A, Fucharoen S, Khusmith S (1988) Impaired parasite growth and increased susceptibility to phagocytosis of Plasmodium falciparum infected alpha-thalassemia or hemoglobin Constant Spring red blood cells. Am J Clin Pathol 89: 521–525.
16. Pattanapanyasat K, Yongvanitchit K, Tongtawe P, Tachavanich K, Wanachiwanawin W, et al. (1999) Impairment of Plasmodium falciparum growth in thalassemic red blood cells: further evidence by using biotin labeling and flow cytometry. Blood 93: 3116–3119.
17. Williams TN, Weatherall DJ, Newbold CI (2002) The membrane characteristics of Plasmodium falciparum-infected and -uninfected heterozygous alpha(0)thalassaemic erythrocytes. Br J Haematol 118: 663–670.
18. Luzzi GA, Merry AH, Newbold CI, Marsh K, Pasvol G, et al. (1991) Surface antigen expression on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is modified in alpha- and beta-thalassemia. J Exp Med 173: 785–791.
19. Guindo A, Fairhurst RM, Doumbo OK, Wellems TE, Diallo DA (2007) X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. PLoS Med 4: e66.
20. Crompton PD, Traore B, Kayentao K, Doumbo S, Ongoiba A, et al. (2008) Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria. J Infect Dis 198: 1265–1275.
21. Pasvol G, Wilson RJ, Smalley ME, Brown J (1978) Separation of viable schizont-infected red cells of Plasmodium falciparum from human blood. Ann Trop Med Parasitol 72: 87–88.
22. Arie T, Fairhurst RM, Brittain NJ, Wellems TE, Dvorak JA (2005) Hemoglobin C modulates the surface topography of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Struct Biol 150: 163–169.
23. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, et al. (1995) Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. Cell 82: 77–87.
24. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, et al. (1995) Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. Cell 82: 101–110.
25. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, et al. (1995) The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Cell 82: 89–100.
26. Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner GD, Louwrier K, et al. (1999) A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. Am J Pathol 155: 395–410.
27. Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, et al. (1994) An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. Am J Pathol 145: 1057–1069.
28. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK (2002) The pathogenic basis of malaria. Nature 415: 673–679.
29. Rowe A, Obeiro J, Newbold CI, Marsh K (1995) Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya. Infect Immun 63: 2323–2326.
30. Carlson J, Helmby H, Hill AV, Brewster D, Greenwood BM, et al. (1990) Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. Lancet 336: 1457–1460.
31. Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, et al. (1989) Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. N Engl J Med 320: 1586–1591.
32. Ockenhouse CF, Magowan C, Chulay JD (1989) Activation of monocytes and platelets by monoclonal antibodies or malaria-infected erythrocytes binding to the CD36 surface receptor in vitro. J Clin Invest 84: 468–475.
33. McGilvray ID, Serghides L, Kapus A, Rotstein OD, Kain KC (2000) Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. Blood 96: 3231–3240.
34. Crabb BS, Cooke BM, Reeder JC, Waller RF, Caruana SR, et al. (1997) Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. Cell 89: 287–296.
35. MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA (1985) Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. Am J Pathol 119: 385–401.

36. Horrocks P, Pinches RA, Chakravorty SJ, Papakrivos J, Christodoulou Z, et al. (2005) PfEMP1 expression is reduced on the surface of knobless Plasmodium falciparum infected erythrocytes. J Cell Sci 118: 2507–2518.
37. Cholera R, Brittain NJ, Gillrie MR, Lopera-Mesa TM, Diakite SA, et al. (2008) Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 991–996.
38. Marsh K, Forster D, Waruiru C, Mwangi I, Winstanley M, et al. (1995) Indicators of life-threatening malaria in African children. N Engl J Med 332: 1399–1404.
39. Jenkins N, Wu Y, Chakravorty S, Kai O, Marsh K, et al. (2007) Plasmodium falciparum intercellular adhesion molecule-1-based cytoadherence-related signaling in human endothelial cells. J Infect Dis 196: 321–327.
40. Chakravorty SJ, Hughes KR, Craig AG (2008) Host response to cytoadherence in Plasmodium falciparum. Biochem Soc Trans 36: 221–228.
41. Carlson J, Nash GB, Gabutti V, al-Yaman F, Wahlgren M (1994) Natural protection against severe Plasmodium falciparum malaria due to impaired rosette formation. Blood 84: 3909–3914.
42. Udomsangpetch R, Sueblinvong T, Pattanapanyasat K, Dharmkrong-at A, Kittikalayawong A, et al. (1993) Alteration in cytoadherence and rosetting of Plasmodium falciparum-infected thalassemic red blood cells. Blood 82: 3752–3759.
43. Ekvall H (2003) Malaria and anemia. Curr Opin Hematol 10: 108–114.
44. Campwala HQ, Desforges JF (1982) Membrane-bound hemichrome in density-separated cohorts of normal (AA) and sickled (SS) cells. J Lab Clin Med 99: 25–28.
45. MacDonald VW, Charache S (1982) Drug-induced oxidation and precipitation of hemoglobins A, S and C. Biochim Biophys Acta 701: 39–44.
46. Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH (1982) Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. J Clin Invest 70: 1253–1259.
47. Hebbel RP (1985) Auto-oxidation and a membrane-associated 'Fenton reagent': a possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes. Clin Haematol 14: 129–140.
48. Giribaldi G, Ulliers D, Mannu F, Arese P, Turrini F (2001) Growth of Plasmodium falciparum induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes. Br J Haematol 113: 492–499.
49. Ayi K, Turrini F, Piga A, Arese P (2004) Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. Blood 104: 3364–3371.
50. Brown AE, Webster HK, Fucharoen S, Bunyaratvej A (1990) Haemoglobin-E trait and the clinical course of malaria in Thai soldiers. Eur J Haematol 45: 120–121.
51. Kitayaporn D, Nelson KE, Charoenlarp P, Pholpothi T (1992) Haemoglobin-E in the presence of oxidative substances from fava bean may be protective against Plasmodium falciparum malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 86: 240–244.
52. Oo M, Tin S, Marlar T, O'Sullivan WJ (1995) Genetic red cell disorders and severity of falciparum malaria in Myanmar. Bull World Health Organ 73: 659–665.

3- Article II - Cytoadhérence d'isolats primaires de *Plasmodium falciparum* isolées d'enfants Maliens porteurs d'HbAA, de HbAS ou de HbAC.

(Beaudry JT, Krause MA, **Diakite SA,** Fay MP, Joshi G, Diakite M, White NJ, Fairhurst RM. *PLoS One. 2014 Mar 19;9(3):e92185. doi: 10.1371)*

3.1- Démarche– Rappel des hypothèses de travail.

Les protections conférées par le portage de l'HbAS, l'HbC sont en partie dues à la réduction de la cytoadhérence des GR infectés contenant ces hémoglobines mutées. Cette réduction de la cytoadhérence découlerait d'une anomalie morphologique et de distribution des PfEMP-1 exprimés par les parasites. La cytoadhérence des GR parasités leur confère un avantage sélectif en leur permettant d'échapper au filtre splénique et donc de maintenir un taux de croissance élevé à chaque cycle. En zone endémique, l'infection à *Plasmodium falciparum* devient symptomatique (accès clinique) lorsque la densité parasitaire circulante dépasse un certain seuil. Les parasites responsables d'accès clinique chez les sujets HbAS ou HbC pourraient donc exprimer des variants de PfEMP-1 dont la capacité à induire la cytoadhérence est suffisamment forte pour surmonter la réduction induite par les polymorphismes du GR. On attend donc une avidité d'adhésion aux cellules endothéliales et monocytes élevée et/ou une expression accrue des molécules de PfEMP-1. Ce travail avait pour objectif de comparer le profil de cytoadhérence des isolats de *P. falciparum* isolés des patients maliens porteurs de HbAA, souffrant de paludisme à celui des isolats obtenus de patients HbAS ou HbAC. Ce travail s'est déroulé dans le cadre du même protocole d'étude de recherche que celui décrit pour l'article précèdent. Ces travaux se sont déroulés pour l'essentiel dans le laboratoire d'immunogénétique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako.

3.2- Participation personnelle aux travaux de l'article

Ma participation à cet article a concerné toute les parties expérimentales du travail. Il s'agit de la culture des parasites et des cellules endothéliales et de la réalisation du test de cytoadhérence. J'ai obtenu et cultivé les isolats primaires de *P. falciparum* à partir des échantillons de sang de patients HbAA, HbAS et HbAC avec maturation jusqu'au stade de trophozoïte J'ai ensuite opéré la sélection des parasites matures par séparation

magnétique. J'ai cultivé des isolats primaires dans les GR de sujets «Normaux» (ne présentant pas de polymorphisme de GR) et aussi réalisé les tests de cytoadhérence. Les étapes de la démarche expérimentale étaient les suivants :

Des échantillons de sang infectés de patients HbAA (contrôles), HbAS ou HbAC en cours d'accès palustre étaient prélevés le même jour. Les GR étaient lavés et mis en culture (37ºC, 5% CO2) jusqu'à obtention simultanée des trophozoïtes ou schizontes. Les parasites (trophozoïtes ou schizontes) étaient ensuite sélectionnés par la méthode de séparation magnétique (MACs). Ces parasites ainsi isolés (~95% de parasitémie) étaient mis en incubation avec des GR de sujets ne portant aucun polymorphisme de GR (ni HbS, ni HbC, ni α-thalassémie, ni déficit en G6PD). Après invasion des GR et maturation des parasites jusqu'au stade trophozoïte, la parasitémie et l'hématocrite étaient ajustés respectivement à 5% et 1% dans les différentes cultures qui étaient utilisées pour le test de cytoadhérence comme décrit dans l'article précèdent. Le ratio du score de cytoadhérence des parasitée isolés des patients HbAS/HbAC sur le score de cytoadhérence des parasites isolés des contrôles HbAA était calculé.

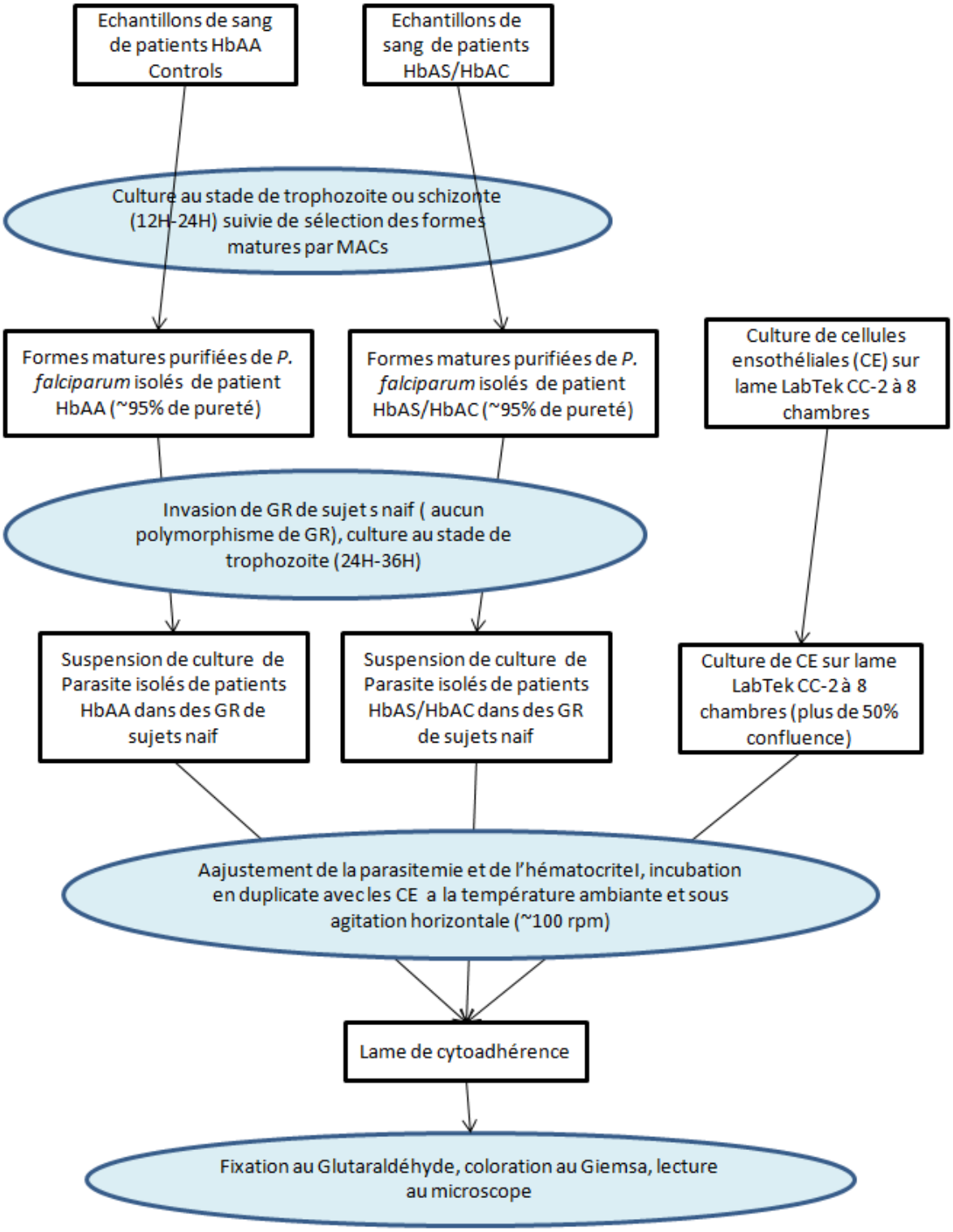


Figure 13: Plan de la démarche expérimentale de l'article 2

3.3- Résultats obtenus

Au total 62 souches de parasite isolées de 31 patients HbAA, 15 patients HbAS et 16 Patients HbAC ont été utilisées. Dix (10) d'entre elles ont été utilisées en analyse multiple où un même échantillon HbAS ou HbAC est comparé à plusieurs échantillons HbAA testés sur la même lame. Chaque comparaison permet de générer une valeur de ratio Nous n'avons pas observé de différences significatives en terme de score de cytoadhérence entre les parasites isolés des patients HbAS et HbAC et ceux isolés des patients HbAA. La moyenne du ratio de score de cytoadhérence était de 1.46 et 1.19 respectivement pour les parasite de patient HbAS et HbAC (p égal respectivement 0.07 et 0.43). L'âge étant associé à la protection contre le paludisme grave et compliqué, nous avons aussi exploré si la même hypothèse en comparant les isolats de primaire de *P. falciparum* issus des patients de moins de 5 à ceux issus des patients de plus de 5 ans. Nous avons trouvé un ratio moyen du score de cytoadhérence des parasite de sujets âgés sur le score de cytoadhéerence des parasite de sujet jeune de 1.21 (P= 0.31)

Parallèlement à ces travaux expérimentaux, une extraction de l'ARNm était réalisée sur les échantillons de GR infectées isolés des patients en vue de la détermination ultérieure des caractéristiques moléculaires des variants de PfEMP-1 exprimés par les différentes souches de parasites. A terme, nous espérons pouvoir identifier des variants spécifiques de PfEMP-1 sélectionnée *in vivo* par les conditions de multiplication rigoureuses chez les patients HbAS, HbAC et les sujets âgés.

En résumé nous avons observé un profil de cytoadhérence plus marqué des isolats primaires de *P. falciparum* isolés des patients HbAS. Cependant la différence avec les isolats de parasite isolés d'autre patient n'est pas significative. Une analyse génomique de ces souches nous permettra de déterminer si l'HbAS sélectionne des souches particulières de *P. falciparum* plus virulentes exprimant une molécule spécifique de PfEMP-1 (de forte avidité).

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Ex-Vivo Cytoadherence Phenotypes of *Plasmodium falciparum* Strains from Malian Children with Hemoglobins A, S, and C

Jeanette T. Beaudry[1,2], Michael A. Krause[1], Seidina A. S. Diakite[3], Michael P. Fay[4], Gyan Joshi[4], Mahamadou Diakite[3], Nicholas J. White[5], Rick M. Fairhurst[1]*

1 Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America, **2** Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, **3** Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology, Malaria Research and Training Center, University of Bamako, Bamako, Mali, **4** Biostatistics Research Branch, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America, **5** Mahidol-Oxford Tropical Diseases Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Sickle hemoglobin (Hb) S and HbC may protect against malaria by reducing the expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) on the surface of parasitized red blood cells (RBCs), thereby weakening their cytoadherence to microvascular endothelial cells (MVECs) and impairing their activation of MVECs to produce pathological responses. Therefore, we hypothesized that parasites causing malaria in HbAS or HbAC heterozygotes have overcome this protective mechanism by expressing PfEMP1 variants which mediate relatively strong binding to MVECs. To test this hypothesis, we performed 31 cytoadherence comparisons between parasites from HbAA and HbAS (or HbAC) Malian children with malaria. Ring-stage parasites from HbAA and HbAS (or HbAC) children were cultivated to trophozoites, purified, and then inoculated in parallel into the same wildtype uninfected RBCs. After one cycle of invasion and maturation to the trophozoite stage expressing PfEMP1, parasite strains were compared for binding to MVECs. In this assay, there were no significant differences in the binding of parasites from HbAS and HbAC children to MVECs compared to those from HbAA children (HbAS, fold-change = 1.46, 95% CI 0.97–2.19, p = 0.07; HbAC, fold-change = 1.19, 95% CI 0.77–1.84, p = 0.43). These data suggest that *in-vitro* reductions in cytoadherence by HbS and HbC may not be selecting for expression of high-avidity PfEMP1 variants *in vivo*. Future studies that identify PfEMP1 domains or amino-acid motifs which are selectively expressed in parasites from HbAS children may provide further insights into the mechanism of malaria protection by the sickle-cell trait.

Citation: Beaudry JT, Krause MA, Diakite SAS, Fay MP, Joshi G, et al. (2014) *Ex-Vivo* Cytoadherence Phenotypes of *Plasmodium falciparum* Strains from Malian Children with Hemoglobins A, S, and C. PLoS ONE 9(3): e92185. doi:10.1371/journal.pone.0092185

Editor: Lars Hviid, University of Copenhagen and Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark

Received May 13, 2013; **Accepted** February 20, 2014; **Published** March 19, 2014

This is an open-access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the Creative Commons CC0 public domain dedication.

Funding: This study was supported by the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rfairhurst@niaid.nih.gov

Introduction

For millennia, the significant morbidity and mortality of *Plasmodium falciparum* malaria has selected for red blood cell (RBC) polymorphisms, including sickle hemoglobin (Hb) S, HbC, α-thalassemia, and G6PD deficiency [1–10]. These malaria protective polymorphisms have reached high frequencies in tropical areas despite the spectrum of deleterious consequences associated with their homozygous (or hemizygous) states. HbS (β_6 glu->val) is a balanced polymorphism in which HbAS heterozygotes are protected against both uncomplicated and severe malaria [1]. In contrast, HbC (β_6 glu->lys) generally affords protection against severe, but not uncomplicated, malaria [1]. Several mechanisms have been proposed to explain this malaria protection, including reduced parasite multiplication rates through reduced invasion, impaired growth, or increased clearance; enhanced innate immunity through inhibition of $CD8^+$ T cells and upregulation of heme-oxygenase 1; accelerated acquisition of immunity; and altered host pathogenic mechanisms (reviewed in [11,12]). One proposed mechanism, which would protect through alterations in host pathogenesis, involves the abnormal display of *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), the parasite's variant surface antigen and cytoadherence ligand, on 'knobs' on the surface of parasitized HbAS and HbAC RBCs [13,14].

Abnormal PfEMP1 display is characterized by (i) reduced PfEMP1 levels, (ii) reduced knob densities, (iii) heterogeneous distributions of PfEMP1 and knobs, and (iv) aberrant – wider and more protuberant – knob morphologies [15]. These perturbations are associated with up to 50% reductions in the cytoadherence of parasitized HbAS and HbAC RBCs [13,14]. Cytoadherence, the binding of parasitized RBCs to human microvascular endothelial cells (MVECs), enables mature parasites to sequester in the microvessels of most organs and avoid removal from the bloodstream by the spleen [16]. While enabling parasites to multiply to high densities, cytoadherence also contributes to malaria pathogenesis by activating MVECs, leading to release of inflammatory cytokines, upregulation of adhesion receptors,

co-sequestration of blood elements (e.g., RBCs, monocytes, and platelets), obstruction of microvessels, and loss of microvascular integrity [17]. Therefore, reductions in PfEMP1-mediated cytoadherence may protect HbAS and HbAC children against malaria by limiting parasite burden and reducing the downstream effects of endothelial cell activation.

The expression of PfEMP1 on parasitized RBCs also leaves parasites vulnerable to detection by the immune system. To avoid this, individual parasites undergo antigenic variation by switching from one clonally-expressed PfEMP1 variant to another [18]. This is accomplished by allelic exclusion of all but one of the parasite's ~60 *var* genes, which encode PfEMP1 [19]. While repeated and chronic infections with different parasite strains results in the piecemeal acquisition of PfEMP1 variant-specific antibodies [20], the lack of significant strain-transcending immunity and the vast diversity of *var* genes [21,22] present major obstacles to the development of a PfEMP1-based vaccine. *Var* genes share a two-exon structure, which encodes for a semi-conserved intracellular domain (exon 2) and an extracellular domain (exon 1) comprised of Duffy binding-like domains (DBL*s*) and cysteine-rich inter-domain regions (CIDRs) [19].

Differential affinity of individual DBLs and CIDRs for specific host endothelial receptors (e.g., EPCR in the brain and CD36 in other organs) enables the organ-specific sequestration of parasitized RBCs and influences the clinical presentation and severity of malaria [23,24]. Recent evidence suggests that particularly virulent subsets of PfEMP1 variants are involved in the pathogenesis of severe malaria syndromes (i.e., respiratory distress, severe anemia, and cerebral malaria) [23,25–27]. Expression of such PfEMP1 variants may provide a selective advantage to parasites by conferring increased cytoadherence or high parasite multiplication rates. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired from 1–2 episodes while immunity to uncomplicated malaria develops over years of repeated and persistent infections [28]. Consistent with these findings, parasites from patients with severe malaria are more frequently recognized by antibodies from immune adults than those from younger patients with uncomplicated malaria [20].

One challenge in defining the mechanisms underlying malaria protection in HbS and HbC children is the difficulty of conducting human *in-vivo* studies to validate *in-vitro* findings. In considering ways to investigate these potential mechanisms, we hypothesized that parasites causing clinical malaria in HbAS and HbAC children must have somehow overcome the malaria protective effects of abnormal PfEMP1 display. One potential mechanism is that parasite populations in HbAS and HbAC children are selected to express particular PfEMP1 variants, which mediate stronger binding to MVECs *in vivo* than those expressed in HbAA children. This process could enable parasites to circumvent the protective effects of abnormal PfEMP1 display and cause malaria symptoms in HbAS and HbAC children. To explore this possibility, we tested whether parasites from HbAS and HbAC children with malaria show increased binding to MVECs *in vitro* than those from HbAA children in Mali.

Methods

Study site, participants, and case definitions

P. falciparum-infected RBCs and uninfected RBCs were obtained from an ongoing cohort study conducted in three villages (Kenieroba, Fourda, and Bozokin) located 75 km southwest of Bamako, Mali. From these villages, 1514 children aged 0.5–17 years were enrolled over three transmission seasons (2008, 2009, and 2010). All children were typed for Hb polymorphisms (D-10 instrument, BioRad, Hercules, CA), ABO blood group (agglutination assay), α-thalassemia (nested PCR), and presence of the G6PD deficiency allele, *G6PD**A- (G202A) (nested PCR), as described [29]. Uncomplicated malaria was defined as axillary temperature $>37.5^{\circ}$C and parasite density $<100{,}000/\mu$l counted from thick blood smears. Severe malaria was defined according to WHO criteria [30]. Blood collection and consent process were approved by the Institutional Review Board of the NIAID and the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Pharmacy, and Odontostomatology at the University of Bamako. Informed consent was obtained from adults or the parent/guardian of children. Written informed consent was obtained from those adults who could read the informed consent form in French. Oral informed consent was obtained in the local language from those adults who could not read French. In this case, oral consent was documented by the adult's thumbprint and the study physician's signature, and the consent process witnessed by a third-party, French-literate individual from the community. This study is registered at Clinicaltrials.gov (NCT00669084).

Parasite culture

Venous blood samples from children with malaria were collected in sodium heparin Vacutainers (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ), and the RBCs washed three times in RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY). Uninfected 'wild-type' donor RBCs [i.e., HbAA, normal αα/αα genotype, and no *G6PD**(A-) allele] from healthy volunteers were similarly collected, washed, resuspended at 50% hematocrit, and stored at 4°C for up to 3 days before use. Ring-stage parasites from HbAA, HbAS, and HbAC children with malaria (**Table 1**) were cultured at 1 or 2% hematocrit in complete medium [RPMI 1640 supplemented with 2 mg/ml sodium bicarbonate, 50 μg/ml gentamicin, and 0.5% Albumax II (Life Technologies)]. Parasites were cultured for ~24 h to trophozoites in 0.2-μm-vented flasks (Corning Inc., Corning, NY) in a humidified 5% CO_2 environment at 37°C. Trophozoite-infected RBCs were then magnetically purified (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) and inoculated into wildtype RBCs at 2.5% hematocrit. After invasion of uninfected RBCs was confirmed by the appearance of new ring-stage parasites, the hematocrit was decreased to 0.8%. Once parasites matured to trophozoites, they were assayed for cytoadherence to MVECs in parallel with one or more other parasite isolates that were simultaneously cultivated, purified, and inoculated into the same wildtype RBCs.

Cytoadherence assay

Human dermal MVECs (HMVECs-d, Lonza, Walkersville, MD) were grown in the manufacturer's EGM-2MV media for up to 5 passages and seeded into 8-well LabTak CC2-coated chamber slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY) to achieve ~30% confluency. Trophozoite-infected RBCs were magnetically purified and adjusted to 3–5% parasitemia (with equal parasitemias for samples compared on the same slide) and 0.5% hematocrit using uninfected RBCs in binding medium (BM; RPMI 1640, 0.5% BSA). Parasitized RBC suspensions were added to MVEC-coated chamber slides (200 μl/well) and incubated on an orbital shaker (100 rpm) for 1 h at room temperature. Whenever possible, each parasite isolate was tested for binding in duplicate wells on the same slide. After the parasitized RBC suspensions were removed from each well, the gasket was detached from the slide. The slide was then washed by dipping horizontally in BM four times, fixed in 2% glutaraldehyde overnight at room temperature, and stained in 10% Giemsa for 30 min. The number of parasitized RBCs bound to ~350 MVECs in each well was

Table 1. Characteristics of Malian HbAA, HbAS, and HbAC children from which parasite isolates were obtained.

***All* samples used in comparisons**										
		α-thalassemia			***G6PD*A- (G202A)**					
	n	**WT**	**HET**	**ND**	**ABS**	**HET**	**HEM**	**Age**	**Pf den**	**% sev**
HbAA	31	87.1	9.7	3.2	87.1	3.2	9.7	6.2	25200	0
HbAS	16	68.8	25.0	6.3	87.5	12.5	0	4.9	22125	12.5
HbAC	15	60.0	40.0	0	80.0	20.0	0	5.9	32025	13.3
***Unique* samples used in comparisons**										
		α-thalassemia			***G6PD*A- (G202A)**					
	n	**WT**	**HET**	**ND**	**ABS**	**HET**	**HEM**	**Age**	**Pf den**	**% sev**
HbAA	25	84.0	12.0	4.0	84.0	4.0	12.0	6.0	19200	0
HbAS	15	66.7	26.7	6.7	86.7	13.3	0	5.2	22050	13.3
HbAC	12	58.3	41.7	0	83.3	16.7	0	5.9	26288	8.3

The number of samples (n), proportion of samples with α-thalassemia (wildtype, WT; heterozygous, HET; not determined, ND) and *G6PD*A- (G202A) (absent, ABS; heterozygous, HET; hemizygous, HEM) genotypes, mean age (years), median parasite density (/μl), and proportion of severe malaria cases are shown for *all* HbAA, HbAS, and HbAC samples used in comparisons, and *unique* HbAA, HbAS, and HbAC samples used in comparisons. *All* samples (n = 62) include 10 parasite strains that were used in multiple comparisons, while *unique* samples include 52 parasite strains that were used in single comparisons. Three *unique* samples (2 HbAS and 1 HbAC) were classified as severe since they met one or more of these criteria: cessation of eating/drinking, repetitive vomiting, or prostration.

doi:10.1371/journal.pone.0092185.t001

counted, and data expressed as number of parasitized RBCs per MVEC. Duplicate comparisons were made whenever sufficient numbers of parasites were available. Seventy-six percent (25/33) of comparisons were performed in duplicate, 50% of which had a ratio of replicate 1:2 between 0.80 and 1.3 (range 0.5–2.5).

Statistical analysis

An overdispersed Poisson regression was used to model the effect of Hb type (HbAS and HbAC) and age (≤5 and >5 years) on the binding of parasitized RBCs to MVECs, controlling for any 'slide' and 'location within slide' effects in our data set and for any multiple comparisons done with an individual parasite isolate. Analyses were done in Proc GLMMIX in SAS Version 9.2.

Results

In children with malaria, we hypothesized that HbAS and HbAC select for parasites with stronger binding to MVECs than HbAA. To test this hypothesis, ring-stage parasites obtained directly from HbAA, HbAS and HbAC children (**Table 1**) were cultured *ex vivo* to the trophozoite stage, magnetically purified, and inoculated into the same wildtype donor RBCs (**Figure 1**). Once parasites invaded and matured to trophozoites expressing PfEMP1, we compared the cytoadherence of parasites from HbAS or HbAC children to parasites from HbAA children, tested in parallel. Parasites from HbAS children showed increased binding to MVECs compared to those from HbAA children, but this increase was not significant (fold-change = 1.46, 95% CI 0.97–2.19, n = 16, p = 0.07) (**Figure 2, Table 2**). Parasites from HbAC children clearly showed no difference in binding (fold-change = 1.19, 95% CI 0.77–1.84, n = 15, p = 0.43) (**Figure 2, Table 2**). Since age, a surrogate of immunity in areas of high malaria transmission, influences the expressed PfEMP1 repertoire, we included it as a categorical covariate. Parasites from younger children (≤5 years) showed no difference in binding compared to those from older children (>5 years) (fold-change = 1.21, 95% CI 0.83–1.77, n = 31, p = 0.31) (**Figure 2**).

Discussion

We hypothesized that *P. falciparum* parasites in HbAS and HbAC children with malaria overcome abnormal PfEMP1 display by expressing PfEMP1 variants which bind relatively strongly to MVECs. In our study, HbAS, HbAC, and young age were not significantly associated with increased binding to MVECs. However, these data require confirmation as they were obtained

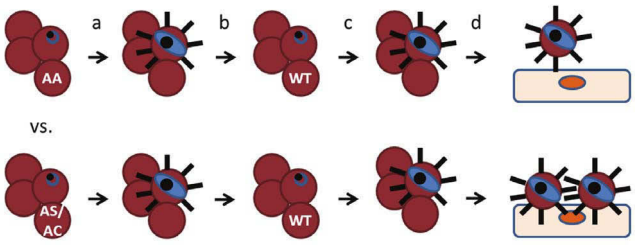


Figure 1. Schematic representation of the cytoadherence assay. Ring-stage parasites from HbAA and HbAS (or HbAC) children were cultured to trophozoites (a), and then purified by magnetic column and inoculated into wildtype donor RBCs (b). After invasion and maturation to trophozoites expressing PfEMP1 (c), parasites from HbAS or HbAC children were compared for binding to MVECs in parallel with those from HbAA children (d).
doi:10.1371/journal.pone.0092185.g001

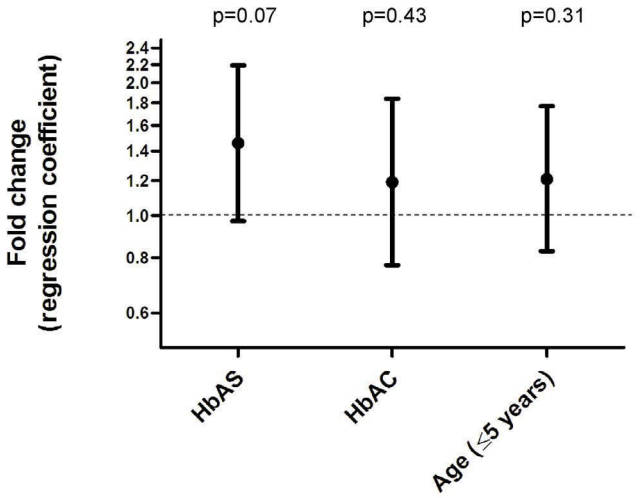


Figure 2. Relationship between cytoadherence, Hb type, and host age. A Poisson regression model was constructed to examine the effect of Hb type and host age on the cytoadherence of parasitized RBCs to MVECs. Fold-changes and 95% CIs of the relative binding compared to parasites from HbAA (for HbAS and HbAC) children and parasites from >5-year-old (for ≤5-year-old) children are indicated.
doi:10.1371/journal.pone.0092185.g002

from a limited number of comparisons between parasites from HbAS, HbAC, and HbAA children. Working in a cohort of ~1350 children (15.3% HbS, 7.3% HbC) in an area of intense seasonal transmission for 3 years, we were able to make only 16 comparisons between HbAS and HbAA samples, and only 15 comparisons between HbAC and HbAA samples. The number of comparisons was limited by several factors. First, high numbers of parasites were required to conduct the *ex-vivo* cytoadherence assay before parasites switched PfEMP1 variants (i.e., the parasite isolates could not be adapted and expanded in culture). Second, the assay required that parasites from HbAS (or HbAC) children mature synchronously in culture with those from HbAA children, which did not always occur. Third, HbAS conferred significant protection against malaria in our cohort (unpublished data) and so fewer parasite isolates were available from HbAS children. Additional factors limited data analysis. For example, more comparisons would have enabled us to include age as a continuous variable, providing finer resolution of age effects on cytoadherence. Also, 42% of comparisons between HbAS (or HbAC) and HbAA samples may have been confounded by co-inherited RBC polymorphisms (e.g., α-thalassemia and G6PD deficiency) (**Table 1**), which could also affect cytoadherence [31]. Finally, comparisons of relative cytoadherence may have been influenced by different batches of MVECs, which can vary in their ability to bind parasitized RBCs.

It remains unclear whether our results reflect the limitations described above or to an actual lack of difference in binding phenotypes for parasites from HbAA and HbAS children – especially since parasites from HbAS children trended towards increased binding to MVECs, but failed to reach significance. However, the lack of statistical significance in both sets of comparisons suggests that any cytoadherence-dependent mechanism is likely working in concert with other factors (e.g., PfEMP1-specific IgG) to prevent the development of uncomplicated and severe malaria syndromes. Additional studies that are powered to address some of these limitations are therefore warranted since the results from such studies would have two significant implications. First, they would provide insight into whether abnormal PfEMP1

Table 2. Relative cytoadherence of parasitized HbAA, HbAS, and HbAC RBCs to MVECs.

Slide #	Year	ID	pRBC	MVEC	pRBC/MVEC	Ratio
HbAS:HbAA comparisons						
1	2008	AS1	1462	1216	1.20	1.41
		AA1	1054	1236	0.85	
2	2008	AS2	758	627	1.21	1.76
		AA2	427	620	0.69	
3	2009	**AS3**	12279	709	17.32	1.68
		AA3	7353	712	10.33	
4	2009	**AS3**	7714	704	10.96	6.73
		AA4	1147	704	1.63	
5	2009	AS4	1687	707	2.39	0.63
		AA5	2672	705	3.79	
6	2009	AS5	1180	729	1.62	1.26
		AA6	930	725	1.28	
6	2009	AS6	3773	703	5.37	4.18
		AA6	930	725	1.28	
6	2009	AS7	2589	703	3.68	2.87
		AA7	930	725	1.28	
7	2009	AS8	4392	708	6.20	1.18
		AA7	3864	733	5.27	
8	2009	AS9	696	727	0.96	0.33
		AA8	2125	740	2.87	
9	2009	AS10	3003	711	4.22	3.78
		AA9	795	711	1.12	
10	2010	AS11	4870	730	6.67	1.46
		AA10	3661	799	4.58	
11	2010	AS12	3818	871	4.38	0.98
		AA11	3712	830	4.47	
12	2010	AS13	1759	712	2.247	0.58
		AA12	2880	747	3.86	
13	2010	AS13	3180	727	4.37	0.66
		AA12	4768	728	6.55	
14	2010	AS14	6033	727	8.30	2.43
		AA13	2412	706	3.42	
15	2010	AS15	2929	714	4.10	1.64
		AA14	1917	767	2.50	
HbAC:HbAA comparisons						
16	2008	AC1	1581	600	2.64	2.20
		AA15	360	300	1.20	
17	2008	AC2	712	608	1.17	1.75
		AA16	402	600	0.67	
18	2008	AC3	307	300	1.02	1.72
		AA17	179	300	0.60	
19	2008	AC4	844	300	2.81	2.36
		AA18	715	600	1.19	
20	2008	AC5	244	302	0.81	1.58
		AA19	153	300	0.51	
20	2008	AC6	922	625	1.48	2.89
		AA19	153	300	0.51	
20	2008	AC7	738	604	1.22	2.40

Table 2. Cont.

HbAC:HbAA comparisons						
		AA19	153	300	0.51	
21	2008	AC8	1089	600	1.82	1.04
		AA20	1048	600	1.75	
22	2009	**AC9**	4452	735	6.06	0.82
		AA3	5255	713	7.37	
4	2009	AC9	2042	354	5.77	3.54
		AA4	1147	704	1.63	
23	2009	**AC10**	9197	706	13.03	5.00
		AA21	1825	701	2.60	
23	2009	AC10	9197	706	13.03	3.37
		AA22	2329	704	3.31	
24	2009	**AC10**	12512	707	17.70	3.05
		AA22	4255	732	5.81	
25	2009	AC11	1603	720	2.23	0.46
		AA23	3560	715	4.84	
26	2009	**AC12**	2139	700	3.06	0.60
		AA24	1789	350	5.11	
27	2010	**AC12**	1970	747	2.64	0.35
		AA25	5328	707	7.54	

Over three transmission seasons (2008, 2009, and 2010), a total of 31 cytoadherence comparisons were performed between parasites from HbAA and HbAS (or HbAC) children by inoculating them into wild-type donor RBCs and assaying their binding to MVECs in parallel. The ratio of parasitized RBCs (pRBC) bound per MVEC (pRBC/MVEC) was calculated for each sample tested. The pRBC/MVEC ratio from the HbAS- or HbAC-derived parasite in each comparison was then normalized to that of the HbAA-derived parasite from the same comparison to give a measure of the relative cytoadherence. Two comparisons (AS13 *vs.* AA12 and AC10 *vs.* AA22) were performed over multiple slides, as shown. Also, several samples (indicated in bold) were used in multiple comparisons.

doi:10.1371/journal.pone.0092185.t002

display is working *in vivo* to modulate the expressed *var* gene repertoire of parasite populations. Second, if a subset of high-avidity PfEMP1 variants are, indeed, being selected in HbAS children, they might offer an opportunity to identify "virulent" PfEMP1 variants and thus aid the discovery of putative "pathogenicity motifs" (e.g., particular PfEMP1 domains, or conserved amino-acid residues within domains) that confer high-avidity binding phenotypes. While such motifs may only cause uncomplicated malaria in older children with HbAS, for example, they may be responsible for causing severe malaria in younger HbAA children who lack both immune- and hemoglobinopathy-mediated resistance to this disease. Such an approach would complement efforts to characterize PfEMP1 variants expressed in children with severe malaria. Since parasites from these children show increased binding to CD36 and ICAM-1, the PfEMP1 variants causing uncomplicated malaria in HbAS children might share features with those causing severe malaria in other children.

The results of our study suggest that our particular binding assay detected no clear differences between the cytoadherence of parasites from HbAA, HbAS, and HbAC children to MVECs. Although further studies that are adequately powered to account for age, severity of malaria episode, and co-inherited RBC polymorphisms are needed, our initial findings provide useful insights into the relationship between Hb types and PfEMP1 variants *in vivo*. Testing the binding of parasites from HbAS, HbAC, and HbAA children with malaria to individual receptors (e.g., CD36, ICAM-1, gC1qR, EPCR) as well as to MVECs derived from brain or lung may help to further clarify the binding phenotypes of these parasites. Furthermore, identification of "virulent" PfEMP1 domains associated with increased binding to MVECs may inform the rational design of PfEMP1-based vaccines against severe malaria.

Acknowledgments

The authors wish to thank Saibou Doumbia, Robert Gwadz, Sue Kyes, Tatiana Lopera-Mesa, Neida Mita-Mendoza, Chris Newbold, Dick Sakai, and Karim Traore for their efforts in support of this work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JTB MAK RMF. Performed the experiments: JTB MAK SASD. Analyzed the data: JTB MPF GJ RMF. Wrote the paper: JTB RMF. Helped supervise laboratory and clinical work: MD NJW.

References

1. Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM (2012) Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 12: 457–468.
2. May J, Evans JA, Timmann C, Ehmen C, Busch W, et al. (2007) Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. JAMA 297: 2220–2226.
3. Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, et al. (1991) Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. Nature 352: 595–600.
4. Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, et al. (2002) Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. Lancet 359: 1311–1312.

5. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simpore J, Verra F, et al. (2001) Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. Nature 414: 305–308.
6. Agarwal A, Guindo A, Cissoko Y, Taylor JG, Coulibaly D, et al. (2000) Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. Blood 96: 2358–2363.
7. Allen SJ, O'Donnell A, Alexander ND, Alpers MP, Peto TE, et al. (1997) alpha+−Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 14736–14741.
8. Williams TN, Wambua S, Uyoga S, Macharia A, Mwacharo JK, et al. (2005) Both heterozygous and homozygous alpha+ thalassemias protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya. Blood 106: 368–371.
9. Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, et al. (1995) Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. Nature 376: 246–249.
10. Guindo A, Fairhurst RM, Doumbo OK, Wellems TE, Diallo DA (2007) X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. PLoS Med 4: e66.
11. Taylor SM, Cerami C, Fairhurst RM (2013) Hemoglobinopathies: Slicing the Gordian Knot of Plasmodium falciparum Malaria Pathogenesis. PLoS Pathog 9: e1003327.
12. Bunn HF (2013) The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria. Blood 121: 20–25.
13. Cholera R, Brittain NJ, Gillrie MR, Lopera-Mesa TM, Diakite SA, et al. (2008) Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 991–996.
14. Fairhurst RM, Baruch DI, Brittain NJ, Ostera GR, Wallach JS, et al. (2005) Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria. Nature 435: 1117–1121.
15. Fairhurst RM, Bess CD, Krause MA (2012) Abnormal PfEMP1/knob display on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing hemoglobin variants: fresh insights into malaria pathogenesis and protection. Microbes Infect 14: 851–862.
16. David PH, Hommel M, Miller LH, Udeinya IJ, Oligino LD (1983) Parasite sequestration in Plasmodium falciparum malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 80: 5075–5079.
17. Francischetti IM, Seydel KB, Monteiro RQ (2008) Blood coagulation, inflammation, and malaria. Microcirculation 15: 81–107.
18. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, et al. (1995) Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. Cell 82: 101–110.
19. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, et al. (1995) The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Cell 82: 89–100.
20. Bull PC, Kortok M, Kai O, Ndungu F, Ross A, et al. (2000) Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: agglutination by diverse Kenyan plasma is associated with severe disease and young host age. J Infect Dis 182: 252–259.
21. Barry AE, Leliwa-Sytek A, Tavul L, Imrie H, Migot-Nabias F, et al. (2007) Population genomics of the immune evasion (var) genes of Plasmodium falciparum. PLoS Pathog 3: e34.
22. Kraemer SM, Kyes SA, Aggarwal G, Springer AL, Nelson SO, et al. (2007) Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in Plasmodium falciparum: comparisons of geographically diverse isolates. BMC Genomics 8: 45.
23. Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JE, et al. (2013) Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. Nature 498: 502–505.
24. Ochola LB, Siddondo BR, Ocholla H, Nkya S, Kimani EN, et al. Specific receptor usage in Plasmodium falciparum cytoadherence is associated with disease outcome. PLoS One 6: e14741.
25. Bull PC, Berriman M, Kyes S, Quail MA, Hall N, et al. (2005) Plasmodium falciparum variant surface antigen expression patterns during malaria. PLoS Pathog 1: e26.
26. Warimwe GM, Keane TM, Fegan G, Musyoki JN, Newton CR, et al. (2009) Plasmodium falciparum var gene expression is modified by host immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 21801–21806.
27. Kirchgatter K, Portillo Hdel A (2002) Association of severe noncerebral Plasmodium falciparum malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 alpha sequences lacking cysteine residues. Mol Med 8: 16–23.
28. 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.
29. Crompton PD, Traore B, Kayentao K, Doumbo S, Ongoiba A, et al. (2008) Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria. J Infect Dis 198: 1265–1275.
30. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster (2000) Severe falciparum malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 94 Suppl 1: S1–90.
31. Krause MA, Diakite SA, Lopera-Mesa TM, Amaratunga C, Arie T, et al. (2012) alpha-Thalassemia impairs the cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. PLoS One 7: e37214.

1- Article III: Exploration de la rétention splénique mécanique des GR contenant des formes jeunes de *Plasmodium falciparum* dans le contexte de l'HbS.

(Seidina A. S. Diakité, Papa Alioune Ndour, Valentine Brousse, Frederick Gay, Camille Roussel, Sylvestre Biligui, Virginie Prendki, Tatiana M. Lopera-Mesa, Karim Traore, Drissa Konaté, Saibou Doumbia, Jérôme Cros, Safi Dokmak, Rick M. Fairhurst, Mahamadou Diakité, and Pierre A. Buffet. *Article soumis : JID N° 58098*)

4.1- Démarche générale et hypothèses de travail.

Comme détaillé la section « Question de recherche et hypothèses de travail » une rétention splénique précoce et accrue des GR infectés de sujets HbAS expliquerait bien les observations épidémio-cliniques et expérimentales sur la protection dont bénéficient les sujets porteurs du trait drépanocytaire contre le paludisme. En utilisant des outils du laboratoire d'accueil j'ai exploré la déformabilité et la rétention splénique des GR de sujets HbAA et HbAS.

4.2- Participation personnelle aux travaux de l'article :

Ma participation à cet article a concerné toutes les étapes du travail, de la conception à l'analyse des données en passant par la réalisation des expérimentations. J'ai aussi mis au point la filtration des globules rouges dans des conditions hypoxiques « physiologiques ».

4.3- Démarche expérimentale et principaux résultats:

4.3.1- La « Microsphiltration » ou filtration sur filtres à microsphères et études de la déformabilité.

Méthodes

La filtration a été réalisée sur des filtres de type conique comme décrit par Deplaine [219]. Il s'agit de filtres constitués d'une couche de 5 mm d'épaisseur constituée d'un

mélange de microsphères métalliques (50% ont 5µm à 15µm de diamètre + 50% 15µm à 25µm de diamètre)

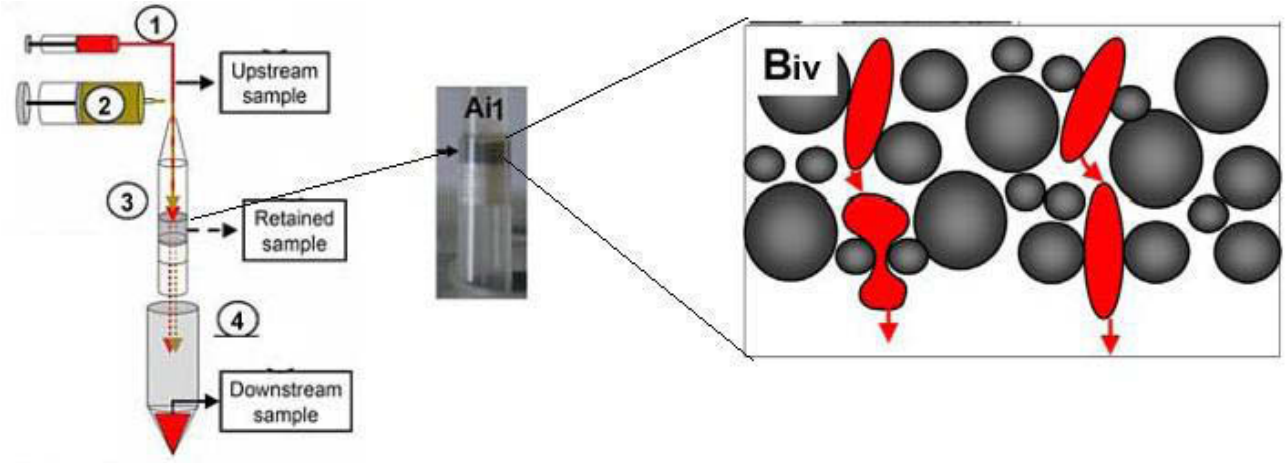


Figure 14 : Schéma de la microsphiltration

1= injection de 0.6ml de suspension de GR (2% hématocrite dans du PBS albumax 1%) dans le microsphiltre
2= Adaptation de la seringue contenant du PBS albumax 1% branchée à une pousse seringue électrique (1ml par minute)
3= rinçage des billes avec du PBS albumax (6 ml)
4= Récupération du filtrat

Des GR de sujets HbAS et HbAA étaient obtenus de donneurs sains dans le cadre d'un dépistage de routine des parents de patients drépanocytaires (à l'Hôpital Necker à Paris). Au Mali, les échantillons de GR étaient obtenus des donneurs dans le cadre de l'étude qui a servi de cadre à la réalisation des travaux des deux précédents articles. Une partie des échantillons HbAS/HbSS et HbAA contrôles servait à la mesure de la déformabilité par la détermination des indice d'élongation (IE) des GR par ecktacytométrie (ou Lorca). Les GR étaient ensuite incubés avec des formes matures de *Plasmodium falciparum* (schizontes) préalablement concentrés par sélection magnétique. Après invasion des GR, l'échantillon de culture contenant les formes jeune de *P. falciparum* (anneaux) était resuspendu à 2% hématocrite et 600 microlitres de la suspension étaient introduits dans le microsphiltre qui était ensuite rincé avec 6 ml de PBS à un débit de 1 ml par minute. La pression maximale était fixé 1000Pa. Un aliquote de la suspension (Amont) et du filtrat (Aval) étaient incubé avec

du syto61 pour marquer l'ADN des parasites. Les parasitémies dans les échantillons en amont et en aval du filtre étaient quantifiées par cytométrie en flux (Accuri). Le taux de rétention (RR%) d'une population particulière de GR (GR parasités ou GR marqués au PKH67 ou PKH26) était déterminé en utilisant la formule suivante :

$$RR\%(GR) = \frac{(\text{GR\%amont} - \text{GR\%aval})100}{\text{GR\%amont}}$$

Pour la validation des filtrations, des GR frais (déformables) et des GR rendus rigides par chauffage (50°C x 20 minutes) préalablement marqués respectivement au PKH67 et au PKH26 étaient ajoutés à la suspension de GR à une proportion d'environ 3% chacun. La filtration était validée si la rétention de GR chauffés était supérieure à 90% et celle des GR frais inférieure à 10%.

L'hypoxie a été créée en utilisant des mélanges de gaz pauvre en oxygène (1% O2 + 3% CO2 pour l'hypoxie modérée et 0.5% O2+ 5% CO2 pour l'hypoxie poussée) dans une enceinte en plastique hermétiquement fermée. Le plan de travail suivant a été suivi.

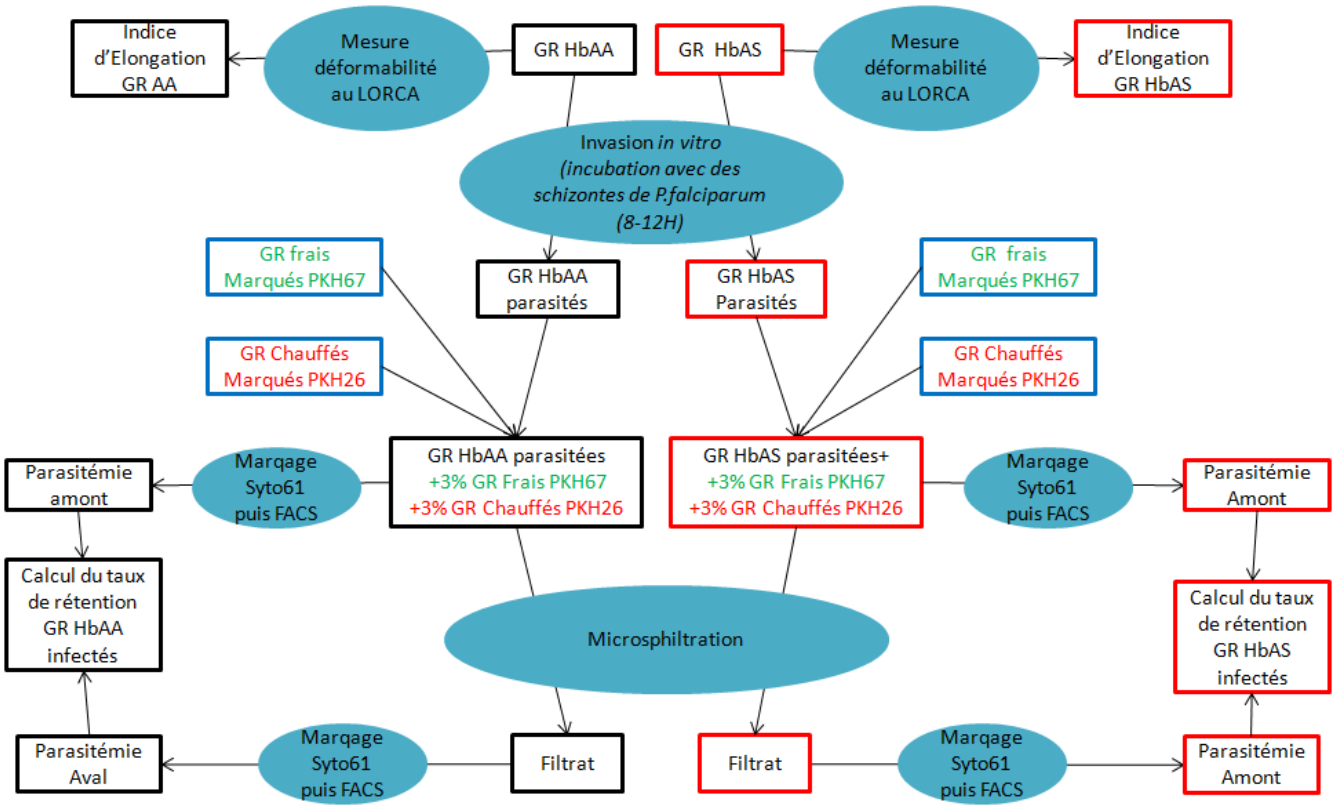


Figure 15: Plan de la démarche expérimentale de l'article 3

Résultats :

Globules rouges non infectés : Les GR non infectés de sujets HbAS étaient ent légèrement mais significativement moins déformables que ceux des sujets contrôles HbAA. La moyenne des indices d'élongation (±SEM) était de 0.616 ±0.006, 0.594 ±0.006 et 0.453 ±0.054 respectivement pour les GR HbAA, les GR HbAS et les GR HbSS (p HbAA vs HbAS = 0.01 et p HbAA vs HbSS = 0.008). Pour mieux appréhender cette différence de déformabilité sur le plan physiologique, nous avons normalisé les valeurs des Index d'Elongation des GR HbAS par rapport à la moyenne des Index d'élongation des GR contrôles HbAA. Cette même opération a été effectuée avec les indices d'élongation de GR de sujets splénectomisés par rapport à des GR de sujets n'ayant pas de signe d'hyposplénisme (absence de corps d'Howell-Jolly sur frottis mince). La différence de déformabilité observée entre les GR HbAA et les GR HbAS était du même ordre de grandeur que celle observée entre les GR de sujets contrôles et les GR de sujets splénectomisés. La microsphiltration de mélange de GR HbAA marqués au PKH 67 et de GR HbAS marqués au PKH 26 tous dilués dans des GR frais non marqués de sujets sains a rapporté une rétention de près de 17.7% des GR HbAS comparés aux GR HbAA.

Nous avions préalablement vérifié que les marquages avec le PKH67 ou PKH26 n'avaient pas d'impact sur la rétention des GR. La rétention des GR frais marqués au PKH 67 ou PKH26 au sein d'une suspension de GR du même échantillon de sang prélevé (GR HbAA ou HbAS) était toujours restée entre -5% et 5%.

Globules rouges parasités : La microsphiltration des GR HbAA et HbAS infectés par des formes jeunes de *P. falciparum* en normoxie, hypoxie modérée et hypoxie profonde n'a pas montré une plus grande rétention des GR HbAS infectés comparés aux GR HbAA infectés. La rétention des GR HbAA parasités était même parfois plus importante que celle des GR parasités HbAS et HbSS. Les deux suspensions de cultures ont été filtrées en parallèle et les taux de rétention de GR parasités comparés.

Comme indiqué dans le plan de la démarche expérimentale, il s'agit là d'une comparaison indirecte de la rétention des GR HbAS parasités à celle des GR HbAA parasités. La rétention des GR HbAA parasités est calculée par rapport à une population de GR HbAA non parasités et celle des GR HbAS parasités est calculée par rapport à une population de GR HbAS non parasités.

Afin de se rapprocher le plus possible des conditions naturelles d'infection palustre, nous avons effectué des expériences de microsphiltration *ex vivo* avec des GR HbAA et de GR HbAS infectés obtenus chez des patients maliens prélevés au cours d'un accès palustre. Les échantillons cliniques étaient gardés au frais (entre 4 et 8ºC), transportés au laboratoire et filtrés dans les 8 heures suivant le prélèvement. Nous avons trouvé au cours de ces expériences un taux moyen de rétention des GR parasités relativement plus faible que ceux obtenus avec des GR parasités artificiellement *in vitro* avec des isolats de *P. falciparum* (FUP) adaptés à la culture. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les GR HbAA et Les GR HbAS naturellement infectés en termes de rétention. Les taux de rétention des GR infectés artificiellement *in vitro* par les mêmes isolats primaires de *P. falciparum* obtenus des patients maliens étaient comparables aux valeurs obtenues avec la souche de laboratoire (souche FUP).

Rétention des GR parasités en conditions de falciformation : L'hypothèse d'une rétention plus forte des GR HbAS parasités est en partie basée sur une éventuelle falciformation précoce de ces GR lorsqu'ils sont parasités par les formes jeunes de *P. falciparum*. Nous avons donc mis au point une condition d'hypoxie profonde permettant d'effectuer la microsphiltration sur des populations érythrocytaires engagées dans le processus de falciformation. Afin d'éviter toute falciformation « non physiologique » la condition d'hypoxie profonde a été créée en modifiant exclusivement la composition atmosphérique du milieu de filtration tout en restant proche des conditions physiologiques concernant les paramètres gazeux du sang (PO_2 =~70 mmHg et PCO_2 = 45-55mm Hg, pH= 7.06-6.63). En déterminant la proportion de GR falciformés (parasités ou non) et celles de GR discoïdes (parasités et non parasités), nous avons constaté que, dans ces conditions, la présence du parasite dans

les GR ne favorisait pas la falciformation des GR (GR HbAS et HbSS) ni au début (15 minute d'hypoxie) ni à la fin de l'exposition (45 minutes d'hypoxie).

4.3.2- Perfusion *ex vivo* de la rate humaine isolée.

Nous avons complété l'approche par des expériences de perfusion *ex vivo* de rate humaine. Des GR HbAA et HbAS parasités *in vitro* par la souche de laboratoire FUP et les suspensions de culture (GR parasités jeune 4-8H et GR non parasités) étaient marquées au PKH 67 pour les GR HbAA et au PKH 26 pour les GR HbAS. Les deux suspensions de culture marquées étaient par la suite diluées dans des GR frais non marquées et l'ensemble utilisé pour perfuser la rate humaine en circuit fermé pendant 60 minutes comme préalablement décrit [220]. Des aliquotes du perfusat étaient prélevés à intervalles réguliers, puis immédiatement incubés avec le Syto61pour le marquage de l'ADN parasitaire. La proportion des différentes populations de GR était déterminée par cytométrie en flux (Accuri). Nous avons déterminé les proportions des GR HbAA non infectés, et des GR HbAS non infectés au sein du mélange dans les différents aliquotes ainsi que les proportions de GR HbAA et de GR HbAS parasités respectivement au sein des populations de GR HbAA et de GR HbAS. Le taux de rétention des différentes populations de GR était déterminé dans chaque aliquote par rapport à sa proportion initiale dans l'aliquote (au temps t = 0). Le taux de rétention au temps t = 60 minute était considéré comme le taux de rétention dans la rate.

La figure suivante schématise la procédure de la perfusion *ex vivo* des rates.

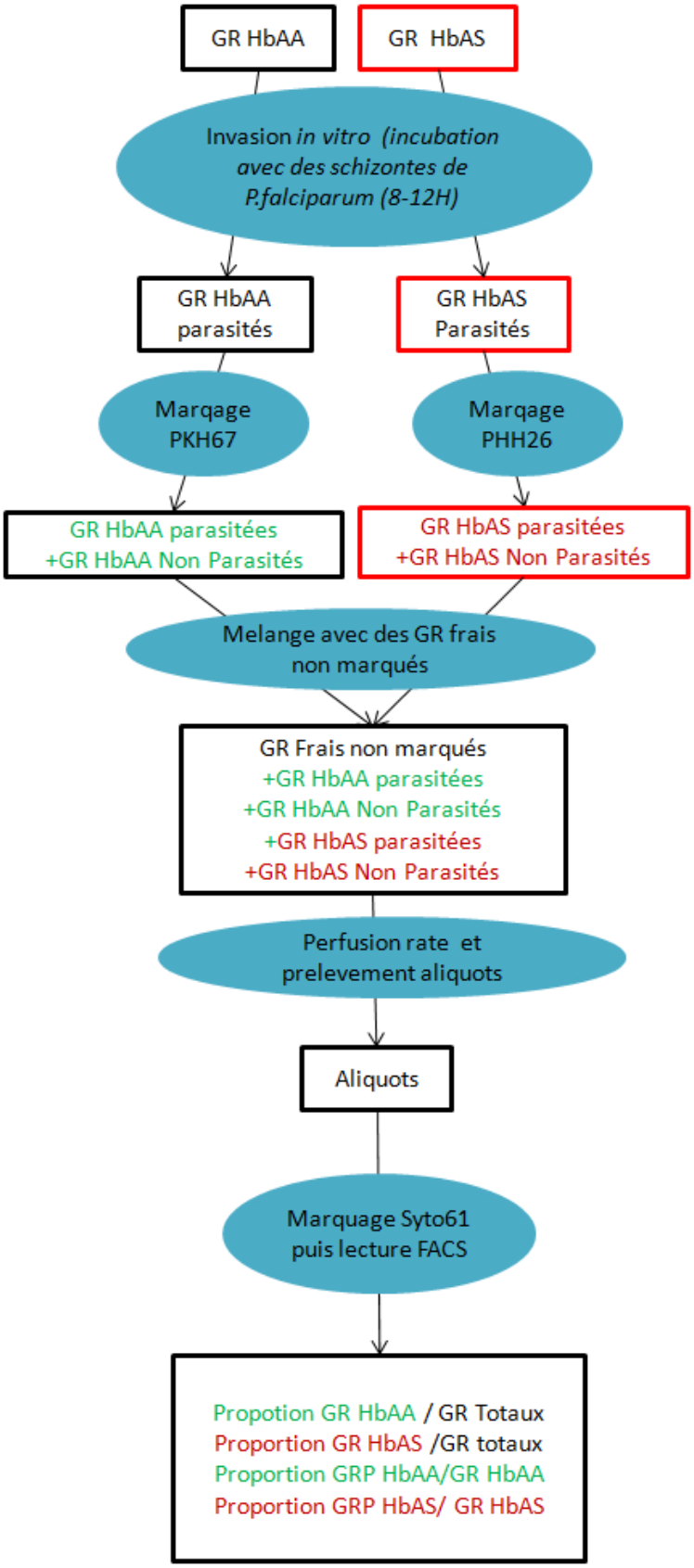


Figure 16: Plan de la démarche expérimentale pour la perfusion *ex vivo* des rates

Deux rates ont été perfusées dans ces conditions et la cinétique des taux de rétention des différentes populations a été déterminée. Les GR HbAS ont été plus retenus que les GR HbAA. La rétention des GR HbAS est restée supérieure à celle des GR HbAA durant toute la perfusion. Cependant les GR HbAS parasités n'ont pas plus retenus que les GR HbAA parasités, lorsque chacune de ces populations a été comparée à la population de GR non parasités correspondante. Ces résultats confirment ceux obtenus par microsphiltration.

En résumé, ces résultats confirment que les GR HbAS (non parasités) sont moins déformables que les GR HbAA (non parasités). Nous avons aussi observé une plus forte rétention des GR HbAS comparés au GR HbAA en microsphiltration *in vitro* (17.7%). Afin d'étudier l'impact de la filtration splénique dans les conditions naturelles, la rétention de chacune des populations de GR parasités a été déterminée par rapport à la population de GR non parasités correspondante (GR parasités HbAS dans des GR non parasités HbAS, GR parasités HbAA dans des GR non parasités HbAA). Dans ces conditions, la rétention des GR parasités HbAS par les formes jeunes de *P. falciparum* n'étaient pas plus marquée que celle des GR parasités HbAA. Les GR parasités HbAA présentaient même parfois des taux de rétention significativement plus élevés que les GR HbAS parasités. Ces résultats ont été confirmés (i) avec des isolats primaires de *P. falciparum* isolés de patients maliens en normoxie, en hypoxie modérée et (ii) avec une souche de laboratoire en hypoxie profonde associée à la falciformation d'une proportion significative des GR HbSS et HbAS. Contrairement à des observations anciennes nous n'avons pas observé une falciformation plus forte des GR parasités comparés au GR non parasités ni dans les GR HbAS ni dans les GR HbSS.

Au total, nous n'avons pas observé une plus grande rétention des GR HbAS parasitées par les formes jeunes de *P. falciparum* ni en microsphiltration *in vitro*, ni dans la rate humaine perfusée *ex vivo*. L'évolution lente de la parasitémie chez les sujets HbAS ne s'expliquerait donc pas par une rétention précoce des GR infectés par des formes jeunes.

The Journal of Infectious Diseases

Sickle-cell Trait Does Not Enhance the Mechanical Retention of Plasmodium falciparum Ring-infected Red Blood Cells in the Human Spleen

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	58098
Full Title:	Sickle-cell Trait Does Not Enhance the Mechanical Retention of Plasmodium falciparum Ring-infected Red Blood Cells in the Human Spleen
Short Title:	Low splenic retention of P. falciparum ring-infected HbAS RBCs
Article Type:	Major Article
Section/Category:	Parasites
Keywords:	malaria; sickle-cell trait; red blood cell; spleen; retention.
Corresponding Author:	Seidina A. S. Diakite, Pharm.D. Malaria Research and Training Center Bamako, Mali MALI
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Malaria Research and Training Center
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Seidina A. S. Diakite, Pharm.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Seidina A. S. Diakite, Pharm.D.
	Papa Alioune Ndour, PhD
	Valentine Brousse, M.D., PhD
	Frederick Gay, M.D., PhD
	Camille Roussel, M.D.
	Sylvestre Biligui
	Virginie Prendki, M.D.
	Tatiana Mesa Lopera, PhD
	Karim Traoré, Pharm.D.
	Drissa Konaté, M.D.
	Saibou Doumbia, M.D.
	Jérôme Cros, M.D., PhD
	Safi Dokmak, M.D., PhD
	Rick M. Fairhurst, M.D., PhD
	Mahamadou Diakité, Pharm.D., DPhil
	Pierre A. Buffet, M.D., PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	MALI
Abstract:	Background. Sickle-cell trait (HbAS) reduces Plasmodium falciparum malaria risk and suppresses parasitemias. Enhanced splenic retention of Plasmodium falciparum-infected HbAS red blood cells (RBCs) may partly mediate these protective effects. Methods and Results. We investigated RBC deformability and retention using

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	ektacytometry, microsphiltration, and ex-vivo spleen perfusion. Compared to uninfected HbAA RBCs, uninfected HbAS RBCs were less deformable, and more retained in microsphilters and spleens. When samples or cultures of P. falciparum rings in HbAA or HbAS RBCs were analyzed, ring-infected HbAA RBCs were retained at greater or similar levels in microsphilters in experiments using a laboratory-adapted parasite strain exposed to normoxia (retention rate 62.5 versus 43.8%, P<0.01) or hypoxia (59.0 versus 37.9%, P=0.04), or blood samples from Malian children tested ex vivo (32.1 versus 28.7%, P=0.52) or after reinvasion in vitro (55.9 versus 43.7%, P=0.30). In hypoxia, sickling of uninfected and ring-infected HbAS RBCs (8.6 versus 5.7%, P=0.51), and retention of ring-infected HbAA and HbAS RBCs in microsphilters (72.5 versus 68.8%, P=0.38) and spleens (41.2 versus 30.4%, P=0.11) did not differ. Conclusions. HbAS is not associated with higher retention of ring-infected RBCs in microsphilters or spleens, suggesting that HbAS does not confer malaria protection by enhancing splenic removal of ring-infected RBCs.
Suggested Reviewers:	Del Portillo Hernando hernando.delportillo@isglobal.org
	Nicholas John White
	Narla Mohandas mnarla@NYBloodcenter.org
	David Modiano david.modiano@uniroma1.it
	Tom Williams tom.williams@umcna.org

Manuscript
Click here to download Manuscript: Diakite_NdourSickle-cell_Trait_Does_Not_Enhance_the_Mechanical_Retention_of_Plasmodium_fa

Sickle-cell Trait Does Not Enhance the Mechanical Retention of *Plasmodium falciparum* Ring-infected Red Blood Cells in the Human Spleen

Short title: Low splenic retention of *P. falciparum* ring-infected HbAS RBCs

Seidina A. S. Diakité[1,2,3,a], Papa Alioune Ndour[1,3,a], Valentine Brousse[4], Frederick Gay[1], Camille Roussel[1], Sylvestre Biligui[1], Virginie Prendki[1], Tatiana M. Lopera-Mesa[5], Karim Traore[2], Drissa Konaté[2], Saibou Doumbia[2], Jérôme Cros[6], Safi Dokmak[6], Rick M. Fairhurst[5,b], Mahamadou Diakité[2,b], and Pierre A. Buffet[1,3]

[1]Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses de Paris, CIMI-PARIS, INSERM U1135, UPMC CR7, CNRS ERL 8255, Paris F-75005, France. [2]Malaria Research and Training Center, Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology, University of Bamako, Bamako BP 1805, Mali. [3]Laboratoire d'Excellence de Globules Rouges (GR-Ex), Paris 75115, France. [4]Centre de Référence de la Drépanocytose, Hôpital Universitaire Necker Enfants Malades, Paris, France. [5]Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, MD 20892, United States. [6]Department of Chirurgie Digestive et Viscérale, Hôpital Beaujon, AP-HP, Clichy, 92110, France.

[a]S.A.S.D. and P.A.N. contributed equally to this work.

[b]R.M.F. and M.D. contributed equally to this work.

Correspondence: Pierre A. Buffet, MD, PhD

CIMI-PARIS INSERM U1135 UPMC CR7, CNRS ERL 8255; 47 Boulevard de l'hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France; Phone: +33 (0)1 42 16 01 10; Fax: +33 (0)1 42 16 01 65

Email: pabuffet@gmail.com

Abstract: 200 words, Text: 3367 words

ABSTRACT

***Background*.** Sickle-cell trait (HbAS) reduces *Plasmodium falciparum* malaria risk and suppresses parasitemias. Enhanced splenic retention of *Plasmodium falciparum*-infected HbAS red blood cells (RBCs) may partly mediate these protective effects.

***Methods and Results*.** We investigated RBC deformability and retention using ektacytometry, microsphiltration, and ex-vivo spleen perfusion. Compared to uninfected HbAA RBCs, uninfected HbAS RBCs were less deformable, and more retained in microsphilters and spleens. When samples or cultures of *P. falciparum* rings in HbAA or HbAS RBCs were analyzed, ring-infected HbAA RBCs were retained at greater or similar levels in microsphilters in experiments using a laboratory-adapted parasite strain exposed to normoxia (retention rate 62.5 versus 43.8%, $P<0.01$) or hypoxia (59.0 versus 37.9%, $P=0.04$), or blood samples from Malian children tested ex vivo (32.1 versus 28.7%, $P=0.52$) or after reinvasion in vitro (55.9 versus 43.7%, $P=0.30$). In hypoxia, sickling of uninfected and ring-infected HbAS RBCs (8.6 versus 5.7%, $P=0.51$), and retention of ring-infected HbAA and HbAS RBCs in microsphilters (72.5 versus 68.8%, $P=0.38$) and spleens (41.2 versus 30.4%, $P=0.11$) did not differ.

***Conclusions*.** HbAS is not associated with higher retention of ring-infected RBCs in microsphilters or spleens, suggesting that HbAS does not confer malaria protection by enhancing splenic removal of ring-infected RBCs.

***Keywords*.** malaria; sickle-cell trait; red blood cell; spleen; retention.

Introduction

Despite its deleterious consequences, hemoglobin S (HbS, β_6 Glu→Val) has reached high prevalence in malaria-endemic areas [1, 2] due to its natural selection by *Plasmodium falciparum* malaria. HbS exists as a balanced polymorphism in sub-Saharan Africa, where it protects children with sickle-cell trait (HbAS heterozygotes) from *P. falciparum* malaria morbidity and mortality but kills those with sickle-cell disease (HbSS homozygotes). While HbAS children are protected from severe malaria, uncomplicated malaria, and high parasitemia [3-7] as compared to HbAA children, the mechanisms that mediate these protections remain under active investigation. Although several candidate mechanisms have been proposed [8-10], their epidemiological, clinical, and experimental correlates have not been adequately explained. For example, transgenic mice expressing a human HbAS phenotype lose their protection against lethal *P. berghei* malaria when splenectomized [11], and Malian HbAS children experience their first malaria episode about 1 month later in the transmission season as compared to HbAA children, despite these 2 groups of children having comparable parasitemias at the time of their first malaria episode [12].

To explore the basis for generally lower parasitemias and delayed malaria episodes in HbAS children, we hypothesized that their spleen-dependent removal of ring-infected red blood cells (RBCs) is more efficient than in HbAA children. Such an effect would achieve lower parasitemias that are tolerated without symptoms, and delay progression to higher parasitemias that produce symptoms [13, 14]. A slower rise in parasitemia in HbAS children may conceivably result from an enhanced adaptive immune response to *P. falciparum* antigens or from a more effective innate clearance of circulating ring-infected RBCs in the spleen. While several studies have reported no differences between HbAS and HbAA children in the intensity of adaptive immune responses to parasite antigens [15-17], others

have reported some differences [18]. In exploring a protective role for the spleen, we recognized that HbAS RBCs are less deformable than HbAA RBCs, evidenced in part by their greater retention in leukocyte-depletion filters [19]. Also, *P. falciparum* ring-infected HbAS RBCs sickle faster than uninfected HbAS RBCs when treated with reducing agents or exposed to very low O_2 concentrations [20, 21]. Given these findings, investigators have long speculated that the spleen's preferential destruction of sickled, ring-infected HbAS RBCs may protect HbAS children from clinical malaria and high parasitemias.

To investigate this possibility, we hypothesized that ring-infected HbAS RBCs undergo enhanced retention in the splenic circulation [13, 14] and are subsequently phagocytosed in the spleen red pulp [22]. Taking advantage of recent progress in studying RBC deformability and splenic retention in vitro and ex vivo [23], we tested this hypothesis using validated tools such as ektacytometry, microsphiltration, and human spleen perfusion under conditions that induce or do not induce the sickling of uninfected and ring-infected HbAS RBCs.

METHODS

Blood Collection

HbAA and HbAS RBCs were collected in Mali and France. In Mali, blood donors were children who participated in a cohort study of genetic and acquired protection against *P. falciparum* malaria [4], and were found to be healthy and aparasitemic at the time of blood collection. This study is registered at Clinicaltrials.gov (NCT00669084) and was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the NIAID, NIH, and the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Pharmacy, and Odontostomatology, University of Bamako. The parents of all children gave written informed consent.

In France, HbAS and HbSS RBCs were collected at the Necker Hospital from HbAS parents or HbSS children who were identified through routine hemoglobinopathy screening and prenatal counselling programs; in all cases, parents provided written informed consent for the use of leftover blood samples. HbAA RBCs were collected from healthy donors in parallel. These sample collections were approved by the Institutional Review Board of Paris VI University. The Ile de France VI IRB has approved this approach as a non-research process (Article L1121-1, French Code for Public Health).

All venous blood samples were collected in ACD Vacutainers® (Becton-Dickinson, Rungis, France) and washed 3 times with RPMI-1640 (Life Technologies, Saint-Aubin, France) to remove the buffy coat and plasma. RBCs were stored at 4°C and used within 24 hours.

RBC Deformability Measurements

The RBC elongation index (EI) was measured over a range of shear stresses (0.3–30 Pa) by ektacytometry using a Lorrca® Laser Optical Rotational Red Cell Analyzer (RR Mechatronics, De Corantijn, Netherlands). EI was defined as the ratio of the difference between the 2 axes of the ellipsoid diffraction pattern and the sum of these 2 axes. Mean EI values were calculated from duplicate measurements. To better appreciate the difference between the EIs of HbAA and HbAS RBCs in the present study, and that between the EIs of non-splenectomized and splenectomized RBCs in a previous study [24], the mean EI values of control HbAA and control non-splenectomized RBCs were set at 100. The mean EI values for HbAS and splenectomized RBCs were normalized to their respective controls using the following formulae:

HbAS Normalized EI = (HbAS EI x 100)/HbAA Mean EI

Splenectomized Normalized EI = (Splenectomized EI x 100)/Non-splenectomized Mean EI

***Plasmodium falciparum* Strains and Culture**

Trophozoite stages of the *P. falciparum* laboratory line FUP and trophozoite stages of African clinical isolates (prepared by collecting ring stages from French patients with malaria and culturing them ex vivo) were purified using MACS columns (Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA), inoculated into fresh HbAS and HbAA RBCs in parallel, and then studied at the ring stage. Ring stages of Malian clinical isolates were collected from pre-identified Malian HbAA and HbAS children who presented with malaria, and then studied ex vivo. Mature trophozoites of Malian clinical isolates (prepared by collecting ring stages from Malian children with malaria and culturing them ex vivo) were also purified using MACS columns, inoculated into fresh HbAS and HbAA RBCs in parallel, and then studied at the ring stage. These HbAA and HbAS RBCs were obtained from healthy aparasitemic Malian children who lacked α-thalassemia and G6PD A– deficiency [4].

In France, parasites were cultured at 2% hematocrit in RPMI-1640 media containing 25 mM HEPES, 25 mM $NaHCO_3$, 0.3 g/L glutamine, 10 mg/L gentamicin (Life Technologies), and 10% human AB+ serum, and incubated at 37°C in an atmosphere of 21% O_2, 5% CO_2, and 74% N_2. In Mali, parasites were cultured similarly, except that 0.5% AlbuMAX® II (Life Technologies) was used to supplement the media instead of human AB+ serum.

Microsphiltration in Normoxic and Moderately Hypoxic Conditions

Filters were prepared and used as previously described [23]. 600 µL of RBC suspension [2% hematocrit in PBS/1% AlbuMAX® II were filtered through the microsphere layers at 1 mL per

minute for 2 minutes, and then washed by 6 mL of PBS/1% AlbuMAX® II at 1 mL per minute for 6 minutes. In some experiments, hypoxic conditions were created by gassing the RBC suspension and filtration solution with a gas mixture of 1% O_2, 5% CO_2, and 94% N_2 for 15 minutes and microsphiltration was performed in a hermetic plastic tent (Captair Pyramid®; Erlab, Val de Reuil, France) that was inflated, deflated, and re-inflated with the same gas mixture prior to each experiment (**Supplementary Figure 1**). Maintenance of 1% O_2 and 5% CO_2 levels in the RBC suspension was confirmed every 15-30 minutes using an i-STAT® System and CG4+ cartridge (Abbott Point of Care, Inc., Princeton, NJ). The mean parasitemias (percent of infected RBCs in the RBC suspension) in the upstream (U) and downstream (D) samples were determined for duplicate samples. The RBC retention rate (RR) for each sample was calculated using the following formula: RR = [(U-D)/U] x 100.

Cell Counting

Uninfected and ring-infected RBCs were labelled with SYTO® 61 red fluorescent nucleic acid stain (Life Technologies) to detect parasite DNA and PKH26 (red) or PKH67 (green) lipophilic fluorescent cell linker probes to stain HbAS and HbAA RBC membranes, respectively, according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France). Cell counting was performed using an Accuri C6 flow cytometer (Becton-Dickinson) (**Supplementary Figure 2**).

Sickling in Stringent Hypoxic Conditions Followed by Filtration

To investigate the influence of hypoxia-induced sickling on the retention of ring-infected RBCs, we suspended them at 2% hematocrit and exposed them to a gas mixture containing a lower O_2 concentration (0.5% O_2, 5% CO_2, and 94.5% N_2) supplemented with 2 L of CO_2

within a hermetic plastic tent. At 0, 5, 15, 30, and 45 minutes after exposure to the gas mixture, 500-µL samples were fixed in 500 µL of 1% glutaraldehyde for up to 15 minutes, pelleted, and used to prepare a thin smear on a glass slide. The slide was then labelled with 1:1500 Hoechst 33342 stain (H3570; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) in PBS/1% Albumax II for 30 minutes, washed 4 times with IX PBS, and covered with VECTASHIELD® antifade mounting media for fluorescence (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and a cover slip. Using a fluorescent microscope, RBCs were observed under red fluorescence and parasite DNA under UV fluorescence. Images were acquired on a Leica DMI3000 microscope, using a Leica DFC310FX camera controlled by LAS Superposition Images software (Leica Microsystems, Nanterre, France). Uninfected RBCs and ring-infected RBCs were separately categorized into 3 groups: discoid RBCs, sickled RBCs, or indeterminate RBCs that were neither discoid nor sickled. To validate cell counts by microscopy, discoid RBCs, sickled RBCs, discoid ring-infected RBCs, and sickled ring-infected RBCs were also quantified using imaging flow cytometry as previously described [25]. Briefly, glutaraldehyde-fixed RBCs were passed through an ImageStream Mark II Imaging Flow Cytometer (EMD Millipore, Billerica, MA) and 50,000 events acquired using Inspire V4.0 software. Post-acquisition data analysis was performed using IDEAS V6.2 software. An algorithm that correctly differentiates discoid and sickled RBCs was created. Sickling rates were calculated by dividing the number of sickled RBCs by all RBCs (i.e., discoid + sickled + indeterminate RBCs).

Human Spleen Retrieval and Ex-vivo Spleen Perfusion

Spleens were retrieved from patients undergoing left splenopancreatectomy for pancreatic diseases and processed as previously described [26]. Briefly, medical and surgical care was

not modified, and written informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the Ile-de-France II IRB. The main splenic artery was cannulated, and the spleen flushed with RPMI-1640 containing 0.3% Albumax II and 1 μg/L gentamicin (Life Technologies), transferred to the laboratory, and connected to the perfusion device. Mixtures of uninfected RBCs and ring-infected RBCs labelled with PKH26 (HbAA RBCs) or PKH67 (HbAS RBCs) were mixed with fresh RBCs (French Blood Establishment, Rungis, France) to achieve a 15-25% hematocrit, and then perfused into circulation. During perfusion, key physiologic markers (TO_2, TCO_2, glucose, and lactate) were maintained at physiological levels. Spleen effluents were sampled at various time points during perfusion. Parasitemia was determined by flow cytometry and the relative retention rates calculated as described above. The retention rate at the end of the perfusion (at 60 minutes) was considered the retention rate in the spleen.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad, Inc., San Diego, CA). The Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, or t test with Welch's correction were used, as appropriate. All *P* values are two-tailed and deemed significant when <0.05.

RESULTS

Deformability and Retention of Uninfected HbAA and HbAS RBCs

The mean ±SEM elongation index (EI) values of uninfected HbAS (0.594 ±0.006, *P*=0.01) and HbSS RBCs (0.453 ±0.054, *P*=0.04) were significantly lower than the mean EI of HbAA RBCs (0.616 ±0.006; **Figure 1A**). The mean difference in EI values of uninfected HbAA and HbAS RBCs (3.5% lower in HbAS RBCs, *P*=0.008) was similar to that of uninfected HbAA RBCs from

non-splenectomized and splenectomized subjects (3.2% lower in splenectomized subject RBCs, *P*<0.0001 [16]; **Figure 1B**). The mean ±SEM retention rate of uninfected HbAS RBCs (10.7% ±3.50) in microsphilters in vitro were retained at a higher rate than uninfected HbAA RBCs (-6.99% ±5.08, *P*=0.05; **Figure 1C**), which corresponds to a mean relative retention rate of 17.7% for HbAS RBCs as compared to HbAA RBCs. When co-perfused through 2 isolated human spleens for 60 minutes ex vivo, the retention rates of uninfected HbAS RBCs were higher than those of uninfected HbAA RBCs (39.4% versus 19.6% in spleen 1, and 52.0% versus 21.5% in spleen 2, **Figure 1D**), which corresponds to a mean relative retention rate of 25.1% for HbAS RBCs as compared to HbAA RBCs. Taken together, these data indicate that uninfected HbAS RBCs are less deformable and less filterable than HbAA RBCs.

Retention of *P. falciparum* Ring-infected HbAA and HbAS RBCs

To mimic the situation occurring in human subjects, experiments were performed with HbAA rings mixed in HbAA RBCs or HbAS rings mixed in HbAS RBCs. In experiments using the *P. falciparum* line FUP, the mean retention rate (±SEM) of ring-infected HbAA RBCs in microsphilters was higher than that of ring-infected HbAS RBCs in both normoxic (54.5% ±4.7 versus 44.5% ±3.3, *P*=0.06; **Figure 2A**) and moderately hypoxic conditions (59.0% ±6.7 versus 38.0% ±7.8, *P*=0.04; **Figure 2B**). The mean retention rate of ring-infected HbSS RBCs in microsphilters (33.3% ±9.1, *P*=0.09) was even lower in normoxic conditions (**Figure 2A**). In experiments using ring-infected RBCs collected directly from Malian children with malaria, the mean retention rates of HbAA and HbAS samples were not different (32.1% ±2.0 versus 28.7% ±4.7, *P*=0.52; **Figure 2C**). After invasion of *P. falciparum* clinical isolates into fresh HbAA and HbAS RBCs and cultivation to ring stages in vitro, the mean retention rates of HbAA and HbAS samples were also not different (55.9% ±6.0 versus 43.7% ±10.0, *P*=0.30;

Figure 2D). When co-perfused through 2 isolated human spleens for 60 minutes ex vivo, the retention rates of ring-infected HbAA and HbAS RBCs were not different (37.2% versus 45.2% in spleen 1, and 27.7% versus 33.1% in spleen 2). These data indicate that ring-infected HbAS RBCs are no less filterable than ring-infected HbAS RBCs in microsphilters in vitro (even in moderately hypoxic conditions) or in human spleens ex vivo.

Effect of Hypoxia-induced Sickling on Retention of Uninfected HbAA and HbAS RBCs

Previous reports had observed the enhanced sickling of ring-infected HbAS RBCs as compared to uninfected HbAS RBCs upon exposure to 8% sodium metabisulfite, dithionite, or stringent hypoxic conditions (100% N_2) [20, 21], and speculated that this property would enhance the destruction of sickled ring-infected RBCs in the spleen. To investigate whether sickling influences the splenic retention of ring-infected RBCs, we first established that exposure to a stringent hypoxia (0.5% O_2, 5% CO_2, and 94.5% N_2 for 45 minutes) induced sickling in uninfected HbAS and HbSS RBCs (**Figure 3A**). In experiments using uninfected and ring-infected RBCs (see later), we calculated sickling rates by enumerating the numbers of discoid, sickled, and indeterminate RBCs (**Figure 3B**) and then calculating the proportion of all RBCs that were sickled. When we exposed ring-infected HbAS and HbSS RBCs to stringent hypoxia for 15 minutes (initiated sickling) and 45 minutes (established sickling), we observed no significant enhancement of sickling in ring-infected HbAS or HbSS RBCs as compared to their uninfected counterparts. In fact, sickling rates at 45 minutes were slightly lower in ring-infected versus uninfected RBCs: mean ±SEM, 5.7% ±6.0 versus 8.6% ±5.7 in HbAS, and 32.7% ±12.0 versus 41.7% ±8.6 in HbSS samples (**Figure 3C**). Sickling rates derived from microscopy or imaging flow cytometry were significantly correlated (Pearson r=0.81, *P*=0.001; **Figure 3D**).

Effect of Hypoxia-induced Sickling on Retention of Uninfected HbAA and HbAS RBCs

To investigate the effects of hypoxia-induced sickling on the splenic retention of ring-infected RBCs, we exposed *P. falciparum* (FUP line) ring-infected HbAA and HbAS RBCs to stringent hypoxia for various times and then passed them through human spleens and microsphilters. The relative retention rates of ring-infected HbAS RBCs were lower as compared to those of ring-infected HbAA RBCs over 60 minutes of co-perfusion in 2 isolated spleens ex vivo (**Figure 4A**). On the other hand, we found that the retention rates of ring-infected HbAA and HbAS RBCs in microsphilters were similar, but significantly higher than those of ring-infected HbSS RBCs, after 15 minutes of hypoxia: mean ±SEM, 74.8% ±1.1 for HbAA, 64.6% ±8.8 for HbAS, and 29.2% ±10.3 for HbSS (**Figure 4B**). We found similar results after 45 minutes of hypoxia: 72.5% ±1.5 for HbAA, 68.8% ±4.9 for HbAS, and 46.6% ±7.1 for HbSS (**Figure 4C**).

DISCUSSION

Here we show that ring-infected HbAS RBCs displayed retention rates similar to or lower than those of ring-infected HbAA RBCs in vitro (microsphiltration) and ex vivo (perfused human spleens). To mimic the situation occurring in human subjects, experiments were performed with HbAA rings mixed in HbAA RBC or HbAS rings mixed in HbAS RBC. This finding was unexpected given that uninfected HbAS RBCs are less deformable than uninfected HbAA RBCs [13, 14], which we confirmed here by ektacytometry, comparably deformable to RBCs from splenectomized subjects [24], and more retained than uninfected HbAA RBCs in human spleens. It was thus conceivable that, after being invaded by *P. falciparum* and subjected to the effects of initial parasite development, ring-infected HbAS

RBCs would become even less deformable than their uninfected counterparts and thereby more retained in microsphilters and human spleens. Despite this logical assumption, we observed that ring-infected HbAS RBCs were not more retained than ring-infected HbAA RBCs in microsphilters. This observation, which we initially made using the *P. falciparum* FUP strain in normoxic conditions, was reproduced in microsphilters using the FUP strain in moderately hypoxic conditions (1% O_2, 3% CO_2, and 96% N_2) and multiple parasite isolates from Malian children in normoxic conditions either before or after in-vitro cultivation. Together these data suggest that sickle-cell trait does not protect against *P. falciparum* malaria or suppress parasitemias by enhancing the mechanical retention of ring-infected RBCs in the spleen. Beyond the context of malaria, our observation that uninfected HbAS RBCs are more efficiently retained in microsphilters and spleens as compared to uninfected HbAA RBCs may have important implications for transfusion medicine. The potential risk of suboptimal transfusion yield and safety has been illustrated by splenic rupture in young subjects with normal spleens who received blood transfusions from HbAS or splenectomized donors [27].

The aforementioned experiments assumed that the microsphilter retention of ring-infected RBCs results from parasite-induced alterations in the shape or membrane rigidity of ring-infected RBCs [28, 29]. However, increased rigidity of ring-infected HbAS RBCs may also result from parasite-induced sickling, which increases their cytoplasmic viscosity. Previous studies of HbAS RBCs ex vivo [20] and in vitro [21] reported enhanced sickling of ring-infected RBCs as compared to uninfected RBCs, and thus speculated that HbAS (but not HbAA) children benefitted from enhanced destruction of ring-infected RBCs in their spleens. To test this possibility, we investigated the mechanical retention of ring-infected HbAS (and HbSS) RBCs in experimental conditions that induced sickling. When we exposed ring-

infected HbAS and HbSS RBCs to sickling-inducing, physiologically-relevant gas mixtures, we observed no differences in the sickling rates of uninfected and ring-infected RBCs. Even under conditions that induced high sickling rates, the retention rates of ring-infected HbAS and HbAA RBCs were similar. These results, which we obtained at O_2 and CO_2 concentrations observed in the venous effluent of human spleens perfused ex-vivo (Buffet et al. Blood 2006) and without reducing agents, differ strikingly from previous observations [20, 21] and are in agreement with pioneering explorations on this topic [30]. Together these data suggest that sickle-cell trait does not protect against *P. falciparum* malaria or suppress parasitemias by enhancing the retention of sickled, ring-infected RBCs in the spleen.

Our overall results suggest that the malaria-protective effects of HbAS do not involve enhanced retention of ring-infected RBCs in the spleen, and call for a reanalysis of proposed mechanisms of protection that implicate parasite-induced sickling in clearing ring-infected HbAS RBCs or impairing parasite development in HbAS RBCs [17]. Our findings may indirectly reinforce other candidate mechanisms of malaria protection, for example, abnormal PfEMP1 display and impaired cytoadherence of trophozoite-infected HbAS RBCs [31]. By reducing the proportion of mature trophozoite-infected RBCs that is bound to the microvessels of vital organs, HbAS may increase the proportion that is retained and destroyed in the spleen, thus suppressing parasitemias in the next life-cycle and ameliorating the symptoms of uncomplicated and severe malaria. This model of malaria protection is supported by our findings that HbAS is associated with a 50% reduction in the binding of mature trophozoite-infected RBCs to microvascular endothelial cells [31] and that mature trophozoite-infected RBCs are completely retained in microsphilters and isolated perfused human spleens [23]. These two observations suggest a very important role of the

spleen in controlling parasite load in HbAS children by the efficient retention and phagocytosis of those mature trophozoite-infected RBCs that fail to cytoadhere [22].

Acknowledgments

We thank the patients and healthy blood donors for participating in this study; the French National Reference Center for collecting *P. falciparum* clinical isolates; the Necker Hospital staff for collecting blood samples; Profs. Béatrice Aussilhou, and Alain Sauvanet (Department of Chirurgie Digestive et Viscérale, Hôpital Beaujon, AP-HP, Clichy, France) for retrieving human spleens; Drs. Jennifer Anderson and Dick Sakai for providing logistical support; Liliane Ciceron for providing technical assistance; and Drs. Mory Doumbouya, Ibrahim Sanogo, Ismaila Coulibaly, and Abdoul Keita for collecting blood samples and managing patients in Mali.

Funding sources

This work was supported by the DIM Mal Inf Région Ile de France; the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health; the University of Oxford; and the Bill and Melinda Gates Foundation (to P.A.N.). S.A.S.D. and P.A.N were additionally supported by the Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge (GR-Ex), Paris, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflicts of interest

No authors have competing interests.

Ethics statement

The French study is part of an observational program implemented by the National Reference Center (CNR) for Malaria, on behalf of ANSM. Patients provided consent according to a procedure common to all French National Reference Centers (http://www.invs.sante.fr/CNR/). The Malian study is registered at Clinicaltrials.gov (NCT00669084) and was approved by the Institutional Review Board of the NIAID, NIH, and the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Pharmacy, and Odontostomatology, University of Bamako. The parents of all children gave written informed consent.

References

1. Allison, A.C., *The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1954. **48**(4): p. 312-8.
2. Piel, F.B., *[Sickle-cell disease: geographical distribution and population estimates].* Med Sci (Paris). **29**(11): p. 965-7.
3. Taylor, S.M., C.M. Parobek, and R.M. Fairhurst, *Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis.* Lancet Infect Dis. **12**(6): p. 457-68.
4. Lopera-Mesa, T.M., et al., *Impact of red blood cell variants on childhood malaria in Mali: a prospective cohort study.* Lancet Haematol. **2**(4): p. e140-e149.
5. May, J., et al., *Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria.* JAMA, 2007. **297**(20): p. 2220-6.
6. Lederberg, J., *J. B. S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution.* Genetics, 1999. **153**(1): p. 1-3.

7. Aidoo, M., et al., *Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality.* Lancet, 2002. **359**(9314): p. 1311-2.
8. Bunn, H.F., *The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria.* Blood. **121**(1): p. 20-5.
9. Gong, L., et al., *Biochemical and immunological mechanisms by which sickle cell trait protects against malaria.* Malar J. **12**: p. 317.
10. Taylor, S.M., C. Cerami, and R.M. Fairhurst, *Hemoglobinopathies: slicing the Gordian knot of Plasmodium falciparum malaria pathogenesis.* PLoS Pathog. **9**(5): p. e1003327.
11. Shear, H.L., et al., *Transgenic mice expressing human sickle hemoglobin are partially resistant to rodent malaria.* Blood, 1993. **81**(1): p. 222-6.
12. Crompton, P.D., et al., *Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria.* J Infect Dis, 2008. **198**(9): p. 1265-75.
13. Buffet, P.A., et al., *The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology.* Blood. **117**(2): p. 381-92.
14. Buffet, P.A., et al., *Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria.* Curr Opin Hematol, 2009. **16**(3): p. 157-64.
15. Tan, X., et al., *Hemoglobin S and C heterozygosity enhances neither the magnitude nor breadth of antibody responses to a diverse array of Plasmodium falciparum antigens.* J Infect Dis. **204**(11): p. 1750-61.
16. Le Hesran, J.Y., et al., *Longitudinal study of Plasmodium falciparum infection and immune responses in infants with or without the sickle cell trait.* Int J Epidemiol, 1999. **28**(4): p. 793-8.
17. Allen, S.J., et al., *Morbidity from malaria and immune responses to defined Plasmodium falciparum antigens in children with sickle cell trait in The Gambia.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992. **86**(5): p. 494-8.

18. Verra, F., et al., *Haemoglobin C and S role in acquired immunity against Plasmodium falciparum malaria.* PLoS One, 2007. **2**(10): p. e978.
19. Brandao, M.M., et al., *Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease.* Eur J Haematol, 2003. **70**(4): p. 207-11.
20. Luzzatto, L., E.S. Nwachuku-Jarrett, and S. Reddy, *Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait.* Lancet, 1970. **1**(7642): p. 319-21.
21. Roth, E.F., Jr., et al., *Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with Plasmodium falciparum malaria.* Science, 1978. **202**(4368): p. 650-2.
22. Ayi, K., et al., *Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait.* Blood, 2004. **104**(10): p. 3364-71.
23. Deplaine, G., et al., *The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro.* Blood. **117**(8): p. e88-95.
24. Prendki, V., et al., *Reduced deformability of circulating erythrocytes: a marker of hyposplenism.* Am J Hematol. **87**(10): p. E81-2.
25. van Beers, E.J., et al., *Imaging flow cytometry for automated detection of hypoxia-induced erythrocyte shape change in sickle cell disease.* Am J Hematol. **89**(6): p. 598-603.
26. Buffet, P.A., et al., *Ex vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions.* Blood, 2006. **107**(9): p. 3745-52.
27. Novak, R.W. and R.E. Brown, *Multiple renal and splenic infarctions in a neonate following transfusion with sickle trait blood.* Clin Pediatr (Phila), 1982. **21**(4): p. 239-41.
28. Mohandas, N. and W. Groner, *Cell membrane and volume changes during red cell development and aging.* Ann N Y Acad Sci, 1989. **554**: p. 217-24.

29. Safeukui, I., et al., *Surface area loss and increased sphericity account for the splenic entrapment of subpopulations of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes.* PLoS One. **8**(3): p. e60150.

30. Miller, M.J., J.V. Neel, and F.B. Livingstone, *Distribution of parasites in the red cells of sickle-cell trait carriers infected with Plasmodium falciparum.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1956. **50**(3): p. 294-6.

31. Cholera, R., et al., *Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(3): p. 991-6.

Figure legends

Figure 1. Deformability and retention of uninfected RBCs. *A,* Mean elongation index (EI) (±SEM) of uninfected HbAA (n=12), HbAS (n=16), and HbSS (n=5) RBCs, as determined by ektacytometry. ***B,*** Mean EI (±SEM) of uninfected HbAS (n=16) and splenectomized RBCs (n=4) compared to the 100%-normalized mean EI of uninfected HbAA (0.6159, n=12) and non-splenectomized RBCs (0.6344, n=24), respectively. ***C,*** Mean retention rate (±SEM) of uninfected HbAA (n=6) and HbAS RBCs (n=10, 1 HbAA sample served as the control for 2 or 3 HbAS samples in 3 cases) in microsphilters. ***D,*** Mean retention rate (±SEM) of uninfected HbAA (n=2) and HbAS (n=2) RBCs in 2 isolated human spleens over 60 minutes of perfusion ex vivo.

Figure 2. Retention of *P. falciparum* ring-infected RBCs. *A,* Mean retention rate (±SEM) of *P. falciparum* (FUP line) ring-infected HbAA (n=16), HbAS (n=26), and HbSS (n=4) RBCs in microsphilters under normoxic conditions. ***B,*** Mean retention rate (±SEM) of *P. falciparum* (FUP line) ring-infected HbAA (n=4) and HbAS (n=8) RBCs in microsphilters exposed to "moderate" hypoxia (1% O_2, 3% CO_2, and 96% N_2 for 15 minutes). ***C,*** Median retention rate

(interquartile range, range) of ring-infected RBCs obtained directly from Malian HbAA (n=29) and HbAS (n=8) children with *P. falciparum* malaria and passed through microsphilters under normoxic conditions. ***D,*** Mean retention rates (±SEM) of ring-infected HbAA (n=6) and HbAS RBCs (n=6) passed through microsphilters under normoxic conditions. These samples were prepared by obtaining *P. falciparum* isolates from Malian children with malaria, cultivating them to the schizont stage, purifying and inoculating them into fresh HbAA and HbAS RBCs simultaneously, and cultivating them to the ring stage.

Figure 3. Hypoxia-induced sickling of uninfected and *P. falciparum* (FUP line) ring-infected RBCs. ***A,*** Mean sickling rate (±SEM) in uninfected HbAS (n=5) and HbSS RBCs (n=3) exposed to "stringent" hypoxia (0.5% O_2, 5% CO_2, and 94.5% N_2) (left y-axis), and partial pressures of O_2 and CO_2 (right y-axis) measurements over 45 minutes. ***B,*** Morphology of uninfected RBCs and ring-infected RBCs (iRBCs) exposed to stringent hypoxia: discoid RBC (1), sickled RBC (2), indeterminate RBC (3), discoid iRBC (4), sickled iRBC (5), and indeterminate iRBC (6). ***C,*** Mean sickling rate (±SEM) of uninfected and ring-infected HbAS and HbSS RBCs exposed to stringent hypoxia for 45 minutes. RBC morphology was determined by microscopy. ***D,*** Correlation between mean sickling rates obtained using 2 RBC morphology counting methods, microscopy and imaging flow cytometry. The hemoglobin type and infection status of each sample is shown.

Figure 4. Retention of hypoxia-exposed *P. falciparum* (FUP line) ring-infected RBCs. ***A,*** Mean retention rate (±SEM) of ring-infected HbAA (n=2) and HbAS (n=2) RBCs in 2 isolated human spleens over 60 minutes of perfusion ex vivo. ***B,*** Mean retention rate (±SEM) of ring-infected HbAA (n=3), HbAS (n=5), and HbSS (n=4) RBCs in microsphilters after exposure to

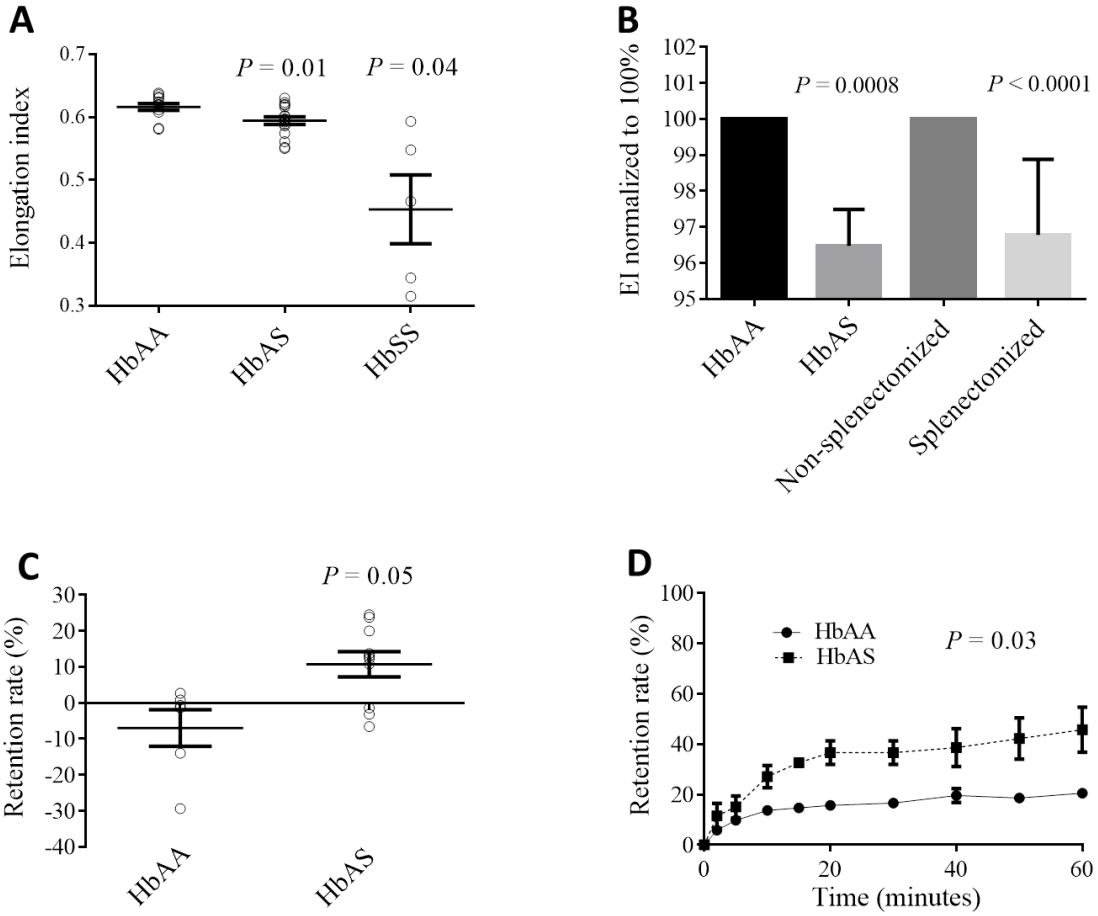
"stringent" hypoxia (0.5% O_2, 5% CO_2, and 94.5% N_2) for 15 minutes. ***C,*** Mean retention rate (±SEM) of ring-infected HbAA (n=3), HbAS (n=5), and HbSS (n=3) RBCs in microsphilters after exposure to stringent hypoxia for 45 minutes.

Supplementary Figure 1. The hermetic plastic tent and gas tank connection used for hypoxia-induced sickling of uninfected and ring-infected RBCs.

Supplementary Figure 2. Flow cytometry scatterplots showing parasitemia detected by Syto® 61 dye (***A***), and parasitemia in HbAA and HbAS RBCs detected by PKH67 (green) and PKH26 (red) dyes, respectively (***B***).

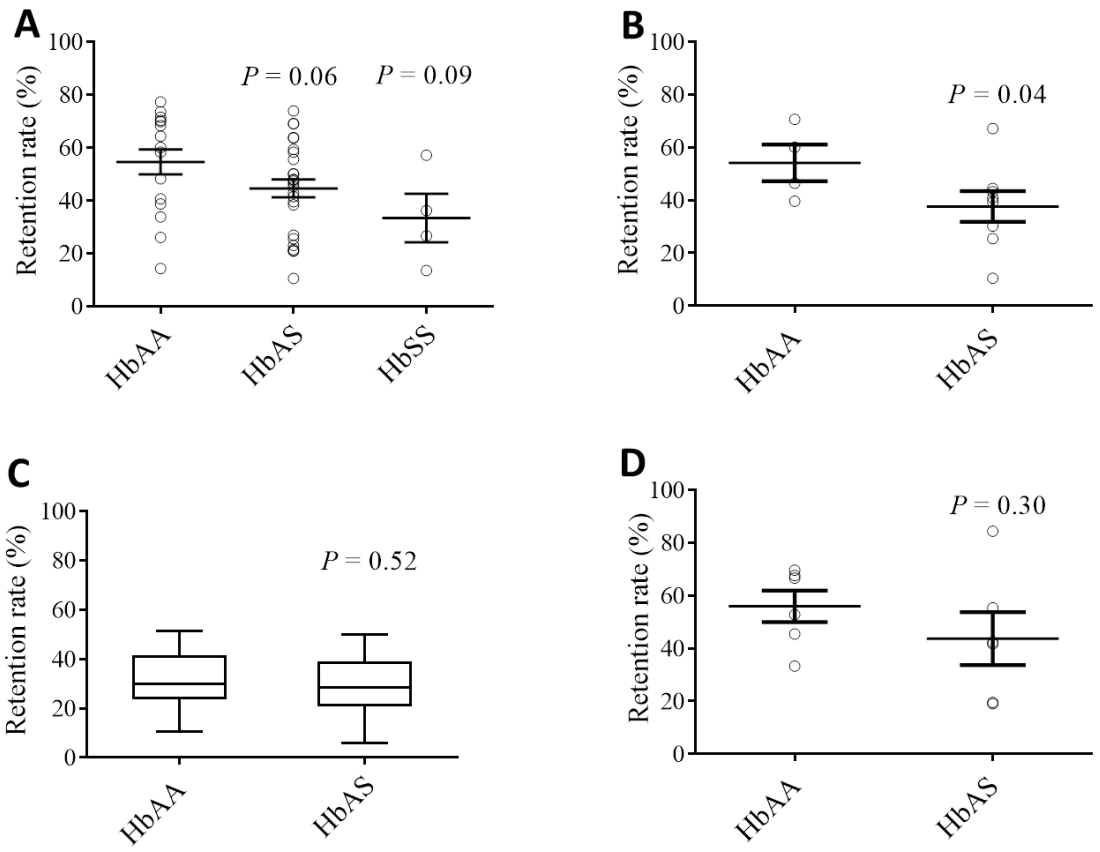
Figure
Click here to download Figure: Figures.docx

Figure 1



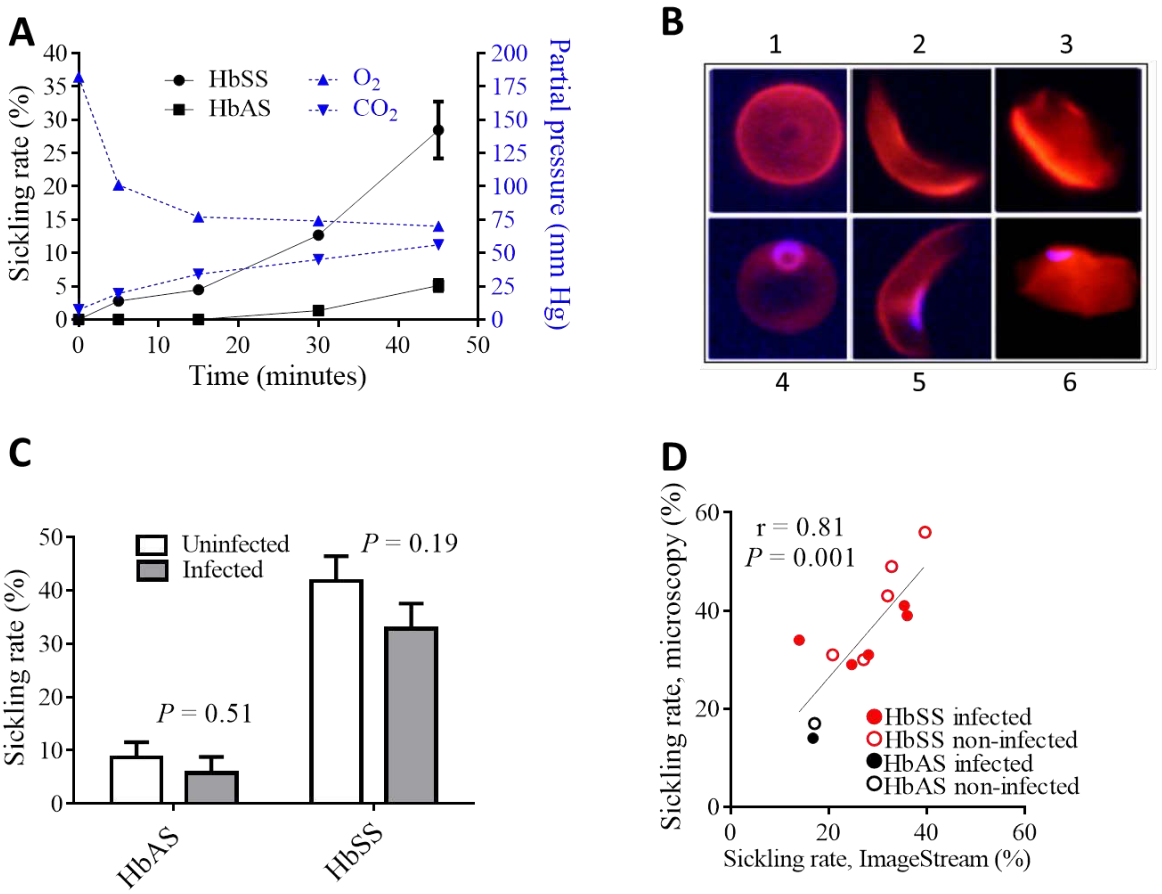
1

Figure 2


A
Retention rate (%)
100
80
60
40
20
0
P = 0.06
P = 0.09
HbAA
HbAS
HbSS
B
Retention rate (%)
P = 0.04
HbAA
HbAS
C
Retention rate (%)
P = 0.52
HbAA
HbAS
D
Retention rate (%)
P = 0.30
HbAA
HbAS

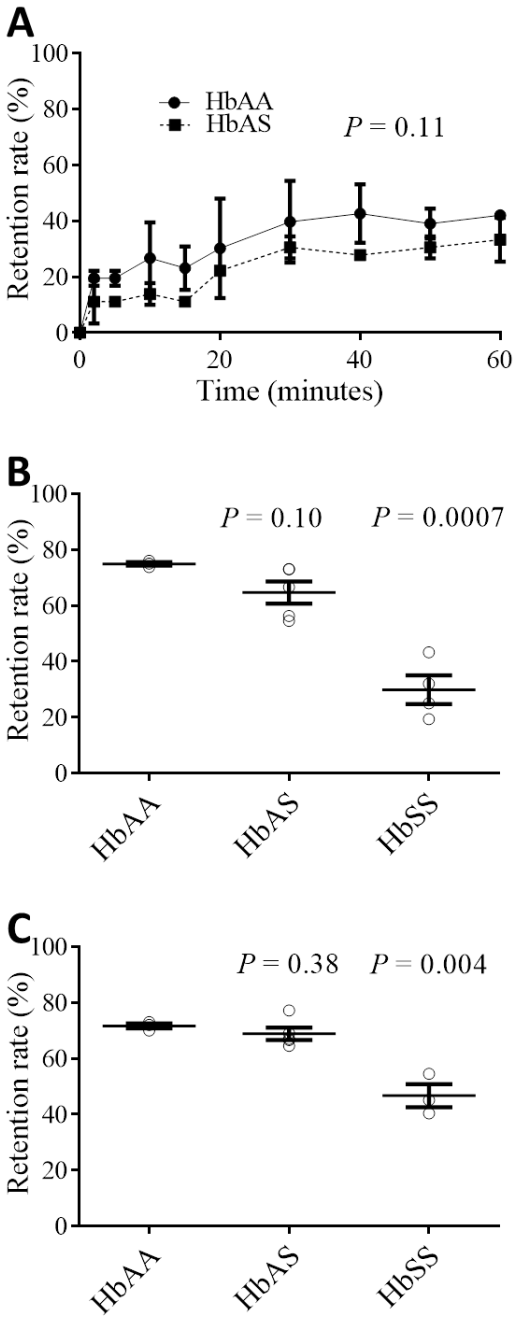
1

Figure 3


A
Sickling rate (%)
Partial pressure (mm Hg)
HbSS
HbAS
O_2
CO_2
Time (minutes)
B
1
2
3
4
5
6
C
Sickling rate (%)
Uninfected
Infected
P = 0.19
P = 0.51
HbAS
HbSS
D
Sickling rate, microscopy (%)
r = 0.81
P = 0.001
HbSS infected
HbSS non-infected
HbAS infected
HbAS non-infected
Sickling rate, ImageStream (%)

1

Figure 4

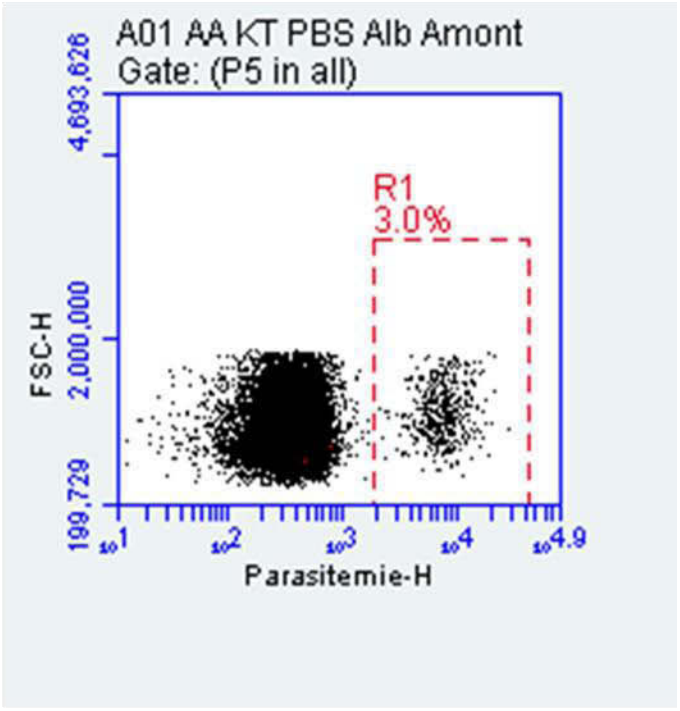

A
Retention rate (%)
HbAA
HbAS
P = 0.11
Time (minutes)
B
Retention rate (%)
P = 0.10
P = 0.0007
HbAA
HbAS
HbSS
C
Retention rate (%)
P = 0.38
P = 0.004
HbAA
HbAS
HbSS

1

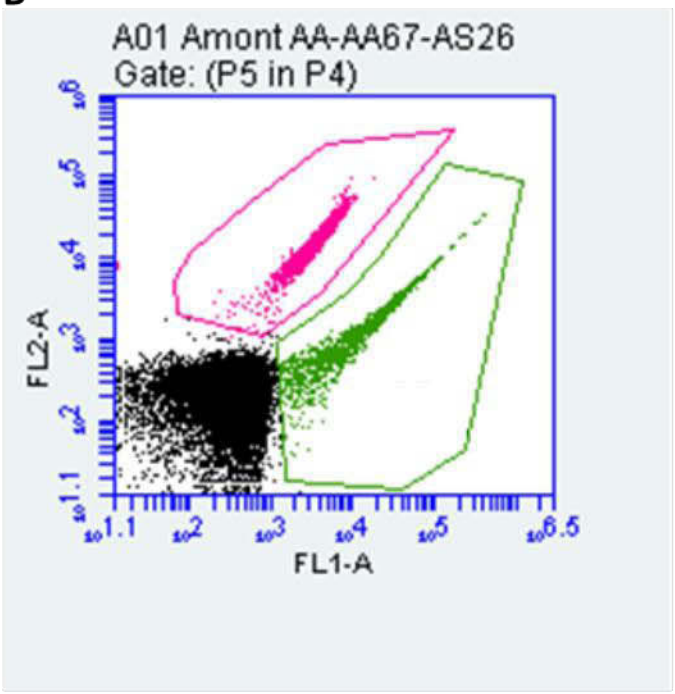
Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 2

A



B



1

Chapitre IV : Discussion générale

Mon travail de thèse a porté sur des mécanismes de la protection contre le paludisme observée chez les sujets porteurs de polymorphismes de l'hémoglobine. Les polymorphismes étudiés sont le trait drépanocytaire (HbAS), l'hémoglobine C et l'α-thalassémie. Les hypothèses de travail ont été élaborées en intégrant les aspects épidémio-cliniques et expérimentaux de la protection que procurent ces polymorphismes contre le paludisme. Trois mécanismes de protection potentiels ont été étudiés chacun dans le contexte d'un polymorphisme. Ils seront commentés tour à tour. Nous finirons par une discussion générale sur les implications potentielles de ces mécanismes et leur impact possible dans la mise en œuvre des stratégies de lutte contre le paludisme

I- Cytoadhérence et protection des sujets α-thalassémiques contre le paludisme grave

Les observations de terrain au cours d'études de cohorte et d'études cas-témoins montrent que l'α-thalassémie protège contre certaines formes graves du paludisme comme le neuropaludisme, l'anémie palustre grave et l'hyperventilation d'acidose [80, 85-87]. Cependant la protection contre le paludisme simple et l'incidence palustre reste un sujet controversé alors qu'aucune preuve formelle n'a été apportée concernant à la protection des sujets α-thalassémiques contre l'infection asymptomatique et la densité parasitaire [80, 85-87, 170] [89, 169, 171, 297, 298]. Pour expliquer ces observations, nous avons formulé l'hypothèse d'une cytoadhérence faible des GR α-thalassémiques parasités comme décrite avec les GR HbAS et HbAC [198, 292].

Nous avons montré une adhésion plus faible des GR α-thalassémiques parasités aux cellules endothéliales humaines et aux monocytes que celle observée avec les GR HbAA contrôles parasités. Cette réduction est corrélée au degré de thalassémie (nombre de gène α non fonctionnels) des GR. En d'autres termes, le score de cytoadhérence avec les GR α-thalassémiques HbH (--/-α) est inférieur à celui des GR α-thalassémiques homozygotes (-α/-α) qui est lui-même inférieur à celui des GR α-thalassémiques hétérozygotes (-α/αα). Le faible niveau d'expression des molécules de PfEMP-1 observé à la surface des ces GR est cohérent avec ces réductions de

cytoadhérence. Nos résultats sont en contradiction avec ceux rapportées par Luzzi et al en 1991 [299] et Williams en 2002 [180]. Ces auteurs ont utilisé des souches de laboratoire de *P. falciparum* adaptées à culture alors que nos résultats ont été obtenus avec des isolats primaires de *P. falciparum* issus directement de patients naturellement infectés. De plus Luzzi avait utilisé des cellules C32 de mélanome qui pourraient être différentes de cellules endothéliales humaines de micro-vaisseaux utilisées dans nos expériences et qui sont celles réellement impliquées dans la cytoadhérence *in vivo*.

En quoi le(s) phénotype(s) cellulaire(s) observé(s) avec les GR thalassémiques expliquent-ils ou pas la protection

L'adhésion des GR parasités aux cellules endothéliales et aux monocytes stimule ces derniers, qui produisent en réponse des cytokines pro-inflammatoires en partie responsables des symptômes du paludisme comme la fièvre et les douleurs articulaires [36, 45, 300, 301]. Ces cytokines stimulent la sur-expression des récepteurs pour le PfEMP-1 comme l'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales cérébrales [302]. Cela a pour conséquence un emballement du phénomène de séquestration des GR parasités aboutissant à une hypoxie cérébrale, élément central de la physiopathologie du neuropaludisme. Les cytokines produites par les monocytes suite à leurs activations par l'adhésion des GR parasités sont aussi responsables de dysérythropoïèse [303] ce qui peut contribuer dans certaines circonstances à la physiopathologie de l'anémie palustre grave [52]. Jusque là, les hypothèses mécanistiques proposées pour expliquer la protection des sujets α-thalassémiques contre le paludisme ne rendaient pas compte de toutes les observations de terrain. La plupart de ces mécanismes suggèrent une réduction de la parasitémie soit en limitant l'invasion et le développement des parasites dans les GR [184, 191] soit en favorisant la phagocytose des GR parasités [180, 184] ou encore par une réponse immunitaire accrue aux antigènes parasitaires [299]. Récemment, la microcytose érythrocytaire a été évoquée pour expliquer la protection contre l'anémie palustre grave chez les sujets α-thalassémiques homozygotes en Papouasie Nouvelle Guinée mais pas chez le hétérozygotes [195]. Ces mécanismes n'expliquent pas comment l'α-thalassémie peut permettre aux sujets

qui en sont porteurs de développer le paludisme simple avec des parasitémies aussi élevées que les autres sujets tout en les protégeant contre les formes graves du paludisme comme le neuropaludisme et l'anémie grave.

Nos résultats sont cohérents avec les caractéristiques biologiques des GR α-thalassémiques ainsi qu'avec les données épidémiologiques relatives à la protection des sujets α-thalassémiques contre le paludisme. En effet, l'instabilité des variants d'hémoglobines (l'HbS, l'HbC et de la β-globine non appariée) pourrait expliquer en partie la perturbation de l'expression des molécules de PfEMP-1 à la surface des GR. En effet, ces hémoglobines sensibles au stress oxydatif se transforment en hémichromes qui se déposent à la face interne de la membrane cytoplasmique des GR [304-306]. Ce processus de dégradation de l'hémoglobine en hémichromes est accéléré au cours de la maturation du parasite en trophozoïte dans le GR [200] (période correspondant à la synthèse de PfEMP-1). Le dépôt d'hémichromes à la face interne de la membrane des GR empêcherait l'extériorisation des molécules de PfEMP-1 à la surface des GR. La grande quantité d'hémichromes contenue dans les GR HbS et HbC inhiberait la polymérisation de l'actine dont les polymères servent de support aux vésicules de Maurer's Clefts (vésicules d'exportation des molécules de PfEMP-1). De façon générale, toute situation innée (hémoglobinopathies ou enzymopathies héréditaires) ou acquise pouvant induire ou accélérer la formation et le dépôt d'hémichromes à l'intérieur des GR pourrait affecter l'expression normale des molécules de PfEMP-1 à la surface des GR et donc le phénomène de cytoadhérence. La perturbation quantitative (biomasse de GR parasités ayant adhéré aux cellules de l'hôte) ou qualitative (avidité de l'interaction entre les GR parasités et les cellules de l'hôte) du phénomène de cytoadhérence constituerait un mécanisme commun aux hémoglobinopathies dans la protection des sujets contre la gravité du paludisme.

La microscopie à force atomique a mis en évidence deux profils de distribution des PfEMP-1 à la surface des GR α-thalassémiques hétérozygotes et homozygotes. Une distribution anormale avec une irrégularité morphologique des boutons de PfEMP-1 de grande taille assez espacés. Cette anomalie de distribution est de nature à fragiliser

l'adhésion des GR parasités aux cellules de l'hôte. Cela a pour conséquence une moindre stimulation de ces cellules à produire des cytokines inflammatoires donc une tolérance accrue des sujets α-thalassémiques hétérozygotes et homozygotes au paludisme [307]. En revanche, nous avons aussi observé des GR α-thalassémiques hétérozygotes et homozygotes parasités présentant des boutons de PfEMP-1 de petite taille recouvrant de façon régulière toute la surface du GR parasité. Ce profil de distribution des molécules de PfEMP-1 est associé à une adhésion massive des GR parasités aux cellules endothéliales, ainsi qu'à un phénotype de formation accrue de rosette et de d'agglutinat de GR parasités [198]. Ce profil de distribution des molécules de PfEMP-1 observé à la surface de certains GR □-thalassémiques (hétérozygotes et homozygotes) parasités expliquerait les observations de terrain rapportant des cas de paludisme grave chez les sujets α-thalassémiques hétérozygotes et homozygotes [85, 142]. De plus malgré l'altération (morphologique et topographique) de l'expression des molécules de PfEMP-1 à la surface des GR parasités, certaines souches virulentes de *P. falciparum* produisant des variants de PfEMP-1 ayant une avidité grande pour leurs récepteurs pourrait stimuler suffisamment les cellules de l'hôte et induire des réponses inflammatoires.

En résumé : Nos observations montrent que l'α-thalassémie à l'instar de l'HbAC et de l'HbAS fragilise l'interaction entre les GR parasités et les cellules de l'hôte à travers une perturbation de l'expression des molécules de PfEMP-1 à leurs surfaces. Ces observations sont cohérentes avec les aspects épidémio-cliniques de la protection conférée contre le paludisme par ces hémoglobinopathies.

II- Phénotype de cytoadhérence des isolats primaires de *Plasmodium falciparum* et hémoglobinopathies

L'HbAS et l'HbC protègent les sujets qui en sont porteurs contre le paludisme grave notamment le neuropaludisme. Plusieurs mécanismes putatifs ont été proposés pour expliquer cette protection (voir chapitre mécanisme de protection HbAS et HbC contre le paludisme). L'un des mécanismes les plus cohérents avec les observations cliniques

et épidémiologiques est la réduction de l'adhérence des GR parasités aux cellules de l'hôte. Cette réduction serait due en partie à une mauvaise expression des molécules de PfEMP-1 à la surface des GR affectant la force d'interaction entre les molécules de PfEMP-1 et leurs récepteurs [198, 199, 308, 309]. Cependant de sujets HbAS et HbC font l'objet d'accès de paludisme symptomatique parfois graves observés sur le terrain (moins fréquents toutefois que chez les sujet HbAA). Nous avons formulé l'hypothèse que les variants de PfEMP-1 exprimés par les parasites au moment de ces accès devraient avoir un phénotype de cytoadhérence assez prononcé pour compenser et même surpasser l'inhibition induite par l'HbAS/HbC

Nous avons observé au cours de ce travail que les isolats de *P. falciparum* obtenus chez des patients HbAS et HbAC avaient un profil de cytoadhérence plus marqué. Ces isolats n'avaient pas des scores de cytoadhérence plus élevés comparés aux isolats issus de sujets HbAA (P= 0.07 et 0.43 respectivement pour les isolats de sujets HbAS et HbAC). Nous avons été relativement limités en nombre d'expérience de comparaison effectuée avec les isolats issu des sujets HbAS et HbAC donc l'absence de différence pourrait relever d'un problème de puissance. L'obtention simultanée d'isolats de parasite issus de sujets HbAS/HbAC et de sujets HbAA est une contrainte très importante sur le terrain. Une autre limite de ce travail était que nous avons utilisé les isolats ayant accompli un cycle complet de développement et de ré invasion en culture *in vitro*. Cela pourrait altérer le profil de cytoadhérence des parasites observé au cours de nos expériences. En effet , une proportion des parasites change de variant de PfEMP-1 exprimées d'un cycle à l'autre [310]. Pour pallier ce biais, nous avons envisagé une analyse génomique des parasites isolés des différents groupes de patients (HbAA, HbAS et HbAC). Ainsi, nous avons extrait de l'ARN messager des isolats primaires avant même leur mise en culture. L'analyse génomique des isolats de *P. falciparum* nous permettra d'identifier un éventuel variant spécifique de PfEMP-1 exprimé par les isolats de parasite issus des patient HbAS et HbAC qui serait associé l'apparition des symptômes de paludisme chez ces sujets. Ce variant de PfEMP-1 qui induirait une adhésion plus forte des GR parasités aux cellules endothéliales constitue

un potentiel candidat vaccin contre des formes graves du paludisme. Les parasites isolés de sujets plus âgés ne présentaient pas aussi un profil de cytoadhérence plus élevée. La protection de sujets âgés étant en grande partie due l'acquisition de l'immunité acquise contre le paludisme, les variations allotypiques concernant le système immunitaire sont plus déterminantes que les variations au niveau des souches de parasite dans l'apparition des symptômes chez les sujets âgés. Il est aussi possible, voire probable, que l'absence de différence observée reflète une véritable stabilité phénotypique des parasites en termes d'adhérence. L'existence d'accès chez des patients thalassémiques pourrait relever alors de facteurs de l'hôte et d'une protection moins efficace chez certains individus, liée elle-même à l'hétérogénéité d'intensité des altérations cellulaires liée à la thalassémie.

En résumé, aucune différence statistiquement significative n'a été observées entre les phénotypes de cytoadhérence des isolats de parasites issus des sujets HbAS/HbAC et HbAA contrôles. Nos résultats en l'état n'indiquent pas de rôle pour les hémoglobinopathies (HbAS et HbAC) dans la sélection et le maintien (en circulation dans une zone géographique) des souches virulentes de *P. falciparum*. Des contraintes de disponibilité simultanée des isolats issus de patients HbAS /HbAC et de patients HbAA contrôles ont limité la puissance de cette étude en terme de nombre d'expériences réalisées. Cependant l'analyse génomique ultérieure des ARNm extraits permettra une meilleure compréhension de la tendance à la hausse observée dans le profil de Cytoadhérence des isolats issus de patients HbAS.

III- Rétention splénique des globules rouges parasités et protection des sujets HbAS contre le paludisme.

La parasitémie est un facteur très important dans la physiopathologie du paludisme. Une parasitémie d'environ 0.01% est généralement nécessaire à l'induction du paludisme symptomatique [54]. Plusieurs études ont rapporté des faibles parasitémies

et une persistance de parasitémie asymptomatique chez les sujets HbAS. Il est désormais établi que les sujets HbAS ont un délai d'apparition de symptômes plus long d'un mois par rapport aux sujets HbAA exposés aux mêmes conditions de transmission [150, 151]. Cela suggère une montée de la parasitémie plus lente chez les sujets HbAS que chez les sujets HbAA. Nous avons exploré le rôle potentiel de la rétention splénique précoce et accrue des GR HbAS parasités dans le contrôle de la parasitémie chez les sujets HbAS.

Déformabilité et rétention des GR HbAS

Comme attendu, nous avons constaté que les GR de sujets HbAS étaient légèrement mais significativement moins déformables que les GR HbAA. La déformabilité des GR HbAS est comparable à celle des GR de sujets splénectomisés. Ces observations pourraient correspondre à un changement du seuil de perception splénique de la déformabilité des GR plutôt qu'à un hyposplénisme complet (il n'a en effet pas été rapporté de sur-incidence d'infections graves chez les sujets HbAS). Ce changement de seuil permettrait aux sujets HbAS de tolérer des GR relativement moins déformables en circulation et éviter ainsi une chute du taux d'hémoglobine. La rigidité des GR HbAS pourrait s'expliquer à la fois par une altération de la membrane du GR due au dépôt des produits de dégradation de l'HbS instable, soit à une augmentation de la viscosité interne de ces GR due à la formation de fins polymères de HbS. Cette différence de déformabilité bien qu'étant faible s'est traduite par une rétention des GR HbAS (par rapport au GR HbAA) de près de 17% en microsphiltration *in vitro*.

Rétention des GR parasités

La microsphiltration in-vitro aussi bien que la perfusion de rate humaine isolée *ex vivo* de suspension de culture de *P. falciparum* jeunes (anneaux de 8-12H) ou de sang de patients infectés par *P. falciparum* (maximum 8 heure après prélèvement) montrent une rétention soit faible, soit similaire (en fonction des conditions d'oxygénation de la filtration) des GR parasités dans les échantillons HbAS comparés aux échantillons HbAA. Notre hypothèse de travail reposait sur une plus grande rigidité des GR HbAS

parasités par rapport au GR HbAA parasités. En effet l'invasion des GR contenant les hémoglobines instables comme l'HbS accélère la dégradation de ces hémoglobines dont les produits de dégradation altèrent la flexibilité de la membrane des GR comme expliqué plus haut. De plus, des protéines parasitaires produites par les stades jeunes de *P. falciparum* comme le RESA altèrent aussi la flexibilité de la membrane des GR [311]. Enfin, des études expérimentales ont rapporté une induction de la polymérisation de l'HbS par l'invasion des GR par *P. falciparum* [201, 202] augmentant la viscosité interne des ces GR et donc leur rigidité. Ici la rétention des GR parasités a été déterminée par rapport aux GR non parasités du même sujet. Cette méthodologie à l'avantage de correspondre à ce qui se passe réellement in-vivo dans la rate des sujets HbAA ou HbAS. Cependant elle ne permet pas une comparaison directe de la déformabilité des GR HbAA parasités à celle des GR HbAS parasités. La rétention de fond des GR HbAS non parasités pourrait masquer celle des GR HbAS parasités et donner l'illusion d'une moindre rétention des GR HbAS parasités. Nous ne pouvons donc pas déterminer si les GR HbAS parasités sont plus déformables que les GR HbAA parasités. Une Co-filtration des GR HbAS parasités et des GR HbAA parasités permettrait cette comparaison mais serait d'interprétation difficile à cause de la rétention différentielle des GR HbAA non parasités et des GR HbAS non parasités. Elle nécessiterait en effet un quadruple marquage que nous ne maitrisons pas encore dans le contexte de la microsphiltration.

Hypoxie et microsphiltration.

La microsphiltration en hypoxie et avec des GR HbAS et HbSS a confirmé que les GR parasités contenant l'HbS (HbAS et HbSS) sont moins retenus que les GR parasités HbAA (en analyse relative comme indiqué ci-dessus). Cette rétention était encore plus faible avec les GR HbSS qu'avec les GR HbAS. Ces résultats ont été obtenus dans des conditions d'hypoxie créées exclusivement par la modification des concentrations d'oxygène et de CO2 dans le milieu ambiant.

Falciformation des GR Hb S parasités.

Nous n'avons pas aussi observé un taux de falciformation plus grand des GR HbAS et HbSS parasités comparées aux GR non parasités de même type hémoglobinique. Cette observation ne présageait donc aucune rétention splénique différentielle des GR parasités par rapport au GR non parasités. Ce constat suggère une rétention des GR HbAS et HbSS non parasités aussi importante que celles des parasités masquant ainsi la rétention des GR HbAS parasités. Ces résultats obtenus en situation d'hypoxie créée en faisant varier uniquement les concentrations en oxygène et en dioxyde de carbone n'indiquent pas une prépondérance dans la rétention splénique précoce (formes jeunes de parasite) des GR parasités dans la protection des sujets HbAS contre le paludisme. Cependant la rate pourrait tout même jouer un rôle dans le contrôle de la parasitémie chez les sujets HbAS à travers une rétention accrue des GR contenant les formes matures de *P. falciparum* (Trophozoïtes matures et schizontes). En effet les GR contenant les formes matures de *P. falciparum* sont presque totalement retenus dans la rate humaine perfusé *exvivo* et en microsphiltration [219, 241]. Nous avons constaté aussi (dans deux expériences de comparaison non incluses dans l'article) que les GR HbAA et HbAS parasités par les trophozoïtes de plus de 20 heures de culture sont pareillement retenus à hauteur d'environ 80%. Or la réduction de 50% observée dans la cytoadhérence des GR HbAS parasités par les formes matures de *P. falciparum* [292] augmente considérablement leur circulation périphérique et donc la probabilité qu'ils soient retenus et détruits dans la rate. La succession d'une séquestration réduite des GR HbAS contenant les formes matures de *P. falciparum* dans les microvaisseaux (par altération de la cytoadhérence) et d'une rétention mécanique dans la rate pourrait donc expliquer l'élévation plus lente de la biomasse parasitaire chez les sujets HbAS. Ce double mécanisme explique bien l'allongement de l'incubation et la protection contre les formes graves.

IV- Proposition de mécanisme générique responsable de la protection des sujets porteurs d'hémoglobinopathie contre les manifestations graves du paludisme

Les résultats de ces travaux de thèse et les données de la littérature nous amènent à formuler une hypothèse intégrant deux mécanismes pour expliquer la protection contre le paludisme grave observée chez les sujets porteurs d'hémoglobinopathies.

- **La réduction de la séquestration des GR parasités,**
- **Et la rétention splénique des GR contenant les formes matures de *P. falciparum*.**

Ces deux phénomènes fonctionnent de façon synergique pour réduire les effets délétères de l'infection palustre chez les sujets porteurs d'Hémoglobinopathies.

(i) En réduisant la séquestration des GR parasités au niveau des tissus, les hémoglobinopathies inhibent tous les effets délétères liés à ce phénomène, notamment l'hypoxie des tissus adjacents, l'amplification de la production des cytokines inflammatoires, la surexpression des molécules récepteurs de PfEMP-1. En plus d'inhiber directement ces processus pathologiques, la réduction de la séquestration constitue un phénomène défavorable à la survie des parasites en les privant d'un microenvironnement gazeux (faible concentration en oxygène) favorable à leur croissance optimale. En revanche, elle augmente la probabilité de passage au niveau de la rate avant l'accomplissement d'un cycle de vie complet.

(ii) En augmentant la proportion de GR contenant les formes matures de *P. falciparum* retenus dans la rate. Cette rétention contribuerait à la réduction de la charge parasitaire qui est un paramètre important de la pathogenèse du paludisme [293]. En effet, les GR contenant les formes matures de *P. falciparum* sont incapables de déformation et donc de passage à travers les fentes inter-endothéliales au niveau de la circulation ouverte et lente de la rate. Avec une faible capacité d'adhésion aux cellules endothéliales vasculaires, les GR de sujets porteurs d'hémoglobinopathies qui contiennent les formes matures de *P. falciparum* ont une probabilité plus élevée d'être retenus au niveau de la pulpe rouge de la rate comparés à ceux des sujets HbAA. Les

GR libres en circulation passant en moyenne la pulpe rouge de la rate chaque 2-3 heure, un GR contenant un parasite de 24 heures (d'âge) a besoin de 8-12 fois plus de temps pour achever son cycle et libérer des mérozoïtes.

Ces deux mécanismes interconnectés peuvent expliquer la quasi-totalité des multiples facettes épidémio-cliniques de la protection contre le paludisme observées chez les sujets porteurs d'hémoglobinopathies.

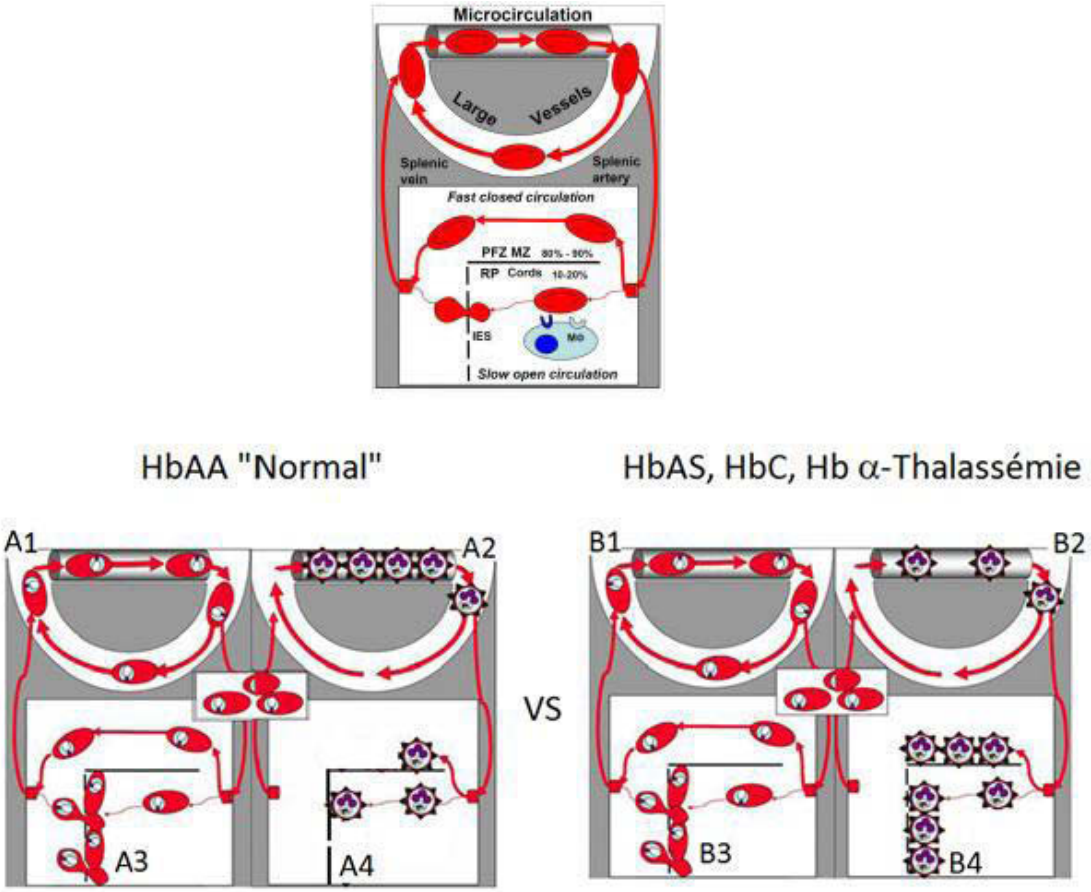


Figure 17 : Proposition de mécanismes de la protection conférée par les hémoglobinopathies

PFZ= Zone perifolicullaire, **MZ**= Zone Marginale, **RP**= Pulpe rouge,
Phase 1 (A1 et B1) = Parcours schématique des GR contenant les formes jeunes « anneaux » de *P. falciparum* dans les gros et petits vaisseaux de la circulation systémique.
Phase 2 (A2) Idem pour formes matures. A2 : la séquestration des GR HbAA contenant les formes mature de *P. falciparum* dans les micro-vaisseaux est intense : une grande majorité des GR contenant les formes matures de *P. falciparum* sont séquestrées dans les petits vaisseaux favorisant la croissance du parasite et leur multiplication et induisant les phénomènes inflammatoires. (B2) Séquestration réduite des GR HbAS contenant les formes matures de *P. falciparum* dans les petits vaisseaux. Cela réduit la chance de survie des parasites qui sont privés l'environnement hypoxique favorable à leur développement. Les GR HbAS parasités matures non adhérents sont reparte dans la circulation systémique, vers le filtre splénique où ils seront retenus. La réduction de la séquestration inhibe sans doute aussi l'inflammation induite par ce phénomène.
Phase 3 (A3 et B3) = Rétention splénique modérée, identique pour les GR HbAA et les GR HbAS parasités par des formes jeunes de *P. falciparum* au niveau des fentes inter endothéliales spléniques.
Phase 4 (A4) : Rétention splénique d'une petite proportion de GR HbAA contenant les formes matures de *P. falciparum* ayant échappés à la séquestration dans les micro-vaisseaux. **(B4)** Rétention splénique d'un grand nombre de GR HbAS contenant des formes matures de *P. falciparum* ayant échappés à la séquestration dans les micro- vaisseaux. Ce phénomène ralentit la croissance de la parasitémie et allonge la durée d'incubation.

V- Quelles implications pour ces études de protections et de leurs mécanismes dans lutte contre le paludisme ?

Les hémoglobinopathies aussi bien que le paludisme constituent de véritables problèmes de santé publique. La protection conférée par les hémoglobinopathies dans la prise en charge du paludisme ne débouche pas sur des propositions médicales à effet immédiat. Cependant une prise en compte de ce phénomène dans la conception et la mise en œuvre des essais cliniques de développement de médicament ou de vaccin antipaludique semble nécessaire. L'association entre le trait drépanocytaire et la protection contre le palustre devrait sans doute être considérée comme un élément de contrôle de qualité lors des études épidémiologiques concernant le paludisme. La protection conférée par les hémoglobinopathies pourrait en effet biaiser les résultats d'essais thérapeutiques ou vaccinaux concernant le paludisme. La randomisation de la plupart des études protège normalement contre une répartition déséquilibrée de sujets HbAS dans l'un des bras, mais un aléa reste possible et il est plus robuste de vérifier l'équilibre de cette répartition. De nombreux investigateurs incluent cet élément dans le dessin de leurs études. L'OMS a recommandé en 2007 que le délai d'apparition des symptômes de la maladie soit considéré comme l'élément clé de mesure de l'efficacité d'un vaccin antipaludique [312]. Comme on l'a vu une des multiples facettes des protections conférée par l'HbAS et l'HbC est justement un rallongement de ce délai [150, 151]. Outre ces retombées méthodologiques utiles, l'élucidation des mécanismes par lesquels ces hémoglobinopathies protègent contre le paludisme grave contribuera significativement à une meilleure compréhension de la physiopathologie du paludisme.

ChapitreV : Conclusion et perspectives

Les travaux de cette thèse avaient pour but d'explorer des hypothèses mécanistiques potentiellement impliquées dans la protection des sujets porteurs d'HbAS, d'HbC et de l'α-thalassémie contre le paludisme. Les résultats obtenus au cours de ces travaux participent à une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels ces hémoglobinopathies protègent contre le paludisme. En effet, nous avons observé une réduction de la cytoadhérence des GR α-thalassémiques parasités aux cellules endothéliales et aux monocytes. Ces résultats suggèrent que cette réduction constitue un mécanisme clé commun à la protection des sujets porteurs d'hémoglobinopathies contre le paludisme grave. En infirmant certaines hypothèses comme la falciformation précoce et accrue des GR HbAS parasités et leur rétention subséquente au niveau de la rate, les résultats de nos travaux facilitent une meilleure compréhension du phénomène de protection des sujets HbAS contre le paludisme. Nos résultats ont été obtenus aussi bien dans des conditions *in vitro* qu'*ex vivo* en utilisant des isolats primaires de *P. falciparum* issus directement de patients infectés naturellement et des souches de *P. falciparum* adaptée à la culture au laboratoire.

Nous avons confirmé au cours de ces travaux que les GR HbAS sont légèrement mais significativement plus rigides que les GR HbAA. Cette différence de déformabilité était perceptible en microsphiltration et se traduisait par une plus grande rétention des GR HbAS par rapport aux GR HbAA. Cette observation ouvre des perspectives par rapport à l'utilisation de la microsphiltration dans le domaine de la transfusion notamment pour le traitement des poches de sang HbAS. Cela pourrait permettre la purification des poches HbAS de GR denses plus rigide pouvant optimiser le rendement transfusionnel, voire prévenir les rares infarctus spléniques observé chez les jeunes enfants après transfusion importante avec du sang HbAS [313].

Nos résultats n'indiquent pas un rôle prépondérant de la rétention splénique précoce des GR parasités mais suggèrent une plus grande implication de la rétention splénique

des formes matures de *P. falciparum* dans la protection des sujets porteurs d'hémoglobinopathie contre le paludisme.

L'ensemble de nos données expérimentales nous ont permis de proposer un mécanisme assez solide et simplifié pouvant expliquer les multiples facettes de la protection conférée par les hémoglobinopathies contre le paludisme. Ce mécanisme qui s'articule autour de la réduction de la Cytoadhérence des GR parasités et de la rétention spléniques des GR contenant les formes mature de *P. falciparum*. Cette hypothèse « uniciste » est cohérente avec de nombreuses observations cliniques et épidémiologiques.

Références Bibliographiques

1. WHO, *World malaria report 2014*, in*: World Health Organization*. 2015. p. 32-41.
2. Mali, m.d.l.s.d., *Enquête Démographique et de Santé du Mali (EDSM-2012-2013). disponible à https://dhsprogram.com/pubs/pdf/FR286/FR286.pdf*. 2012.
3. Singh, B., et al., *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings.* Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1017-24.
4. WHO, *World Malaria Report 2013.* . 2013, World Health Organisation. Available at: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/

5. WHO, *World malaria report*, in *www.who.org*. 2011.
6. Bynum, W.F., *Ronald Ross and the malaria-mosquito cycle.* Parassitologia, 1999. **41**(1-3): p. 49-52.
7. White, G.B., *Malaria prevention by vector control: effectiveness of insecticidal methods.* Parassitologia, 1999. **41**(1-3): p. 385-7.
8. Kuehn, A. and G. Pradel, *The coming-out of malaria gametocytes.* J Biomed Biotechnol. **2010**: p. 976827.
9. Asada, H., *Hypersensitivity to mosquito bites: a unique pathogenic mechanism linking Epstein-Barr virus infection, allergy and oncogenesis.* J Dermatol Sci, 2007. **45**(3): p. 153-60.
10. Wang, H., et al., *Induction of IgE responses using a recombinant mosquito salivary allergen rAed a 2 without adjuvant in mice.* Int Arch Allergy Immunol, 1999. **120**(2): p. 135-40.
11. Rickman, L.S., et al., *Plasmodium falciparum-infected Anopheles stephensi inconsistently transmit malaria to humans.* Am J Trop Med Hyg, 1990. **43**(5): p. 441-5.
12. Kyes, S., P. Horrocks, and C. Newbold, *Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria.* Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 673-707.
13. MACDONALD, G., *The epidemiology and control of malaria.* Oxford, Oxford University Press., 1957.
14. WHO, *Terminology of malaria and of malaria eradication: report of a drafting committe*, in *http://whqlibdoc.int/publications/9241540141.pdf. Geneva: World Health Organization.* 1963.
15. WHO, *World malaria report.* , in *Geneva: World Health organization.* 2008c.
16. WHO, *Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94 Suppl 1**: p. S1-90.
17. Coban, C., et al., *Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin.* J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 19-25.
18. Lopera-Mesa, T.M., et al., *Plasma uric acid levels correlate with inflammation and disease severity in Malian children with Plasmodium falciparum malaria.* PLoS One. **7**(10): p. e46424.
19. Kraemer, S.M. and J.D. Smith, *A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease.* Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 374-80.
20. Craig, A.G., M.F. Khairul, and P.R. Patil, *Cytoadherence and severe malaria.* Malays J Med Sci. **19**(2): p. 5-18.
21. Pain, A., et al., *Platelet-mediated clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1805-10.
22. Fernandez, V. and M. Wahlgren, *Rosetting and autoagglutination in Plasmodium falciparum.* Chem Immunol, 2002. **80**: p. 163-87.
23. Rowe, J.A., et al., *Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications.* Expert Rev Mol Med, 2009. **11**: p. e16.
24. Idro, R., N.E. Jenkins, and C.R. Newton, *Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria.* Lancet Neurol, 2005. **4**(12): p. 827-40.
25. Perkins, D.J., et al., *Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis.* Int J Biol Sci. **7**(9): p. 1427-42.
26. Taylor, W.R., et al., *Respiratory manifestations of malaria.* Chest. **142**(2): p. 492-505.

27. Taylor, S.M., C. Cerami, and R.M. Fairhurst, *Hemoglobinopathies: slicing the Gordian knot of Plasmodium falciparum malaria pathogenesis.* PLoS Pathog. **9**(5): p. e1003327.
28. Chitnis, C.E. and M.J. Blackman, *Host cell invasion by malaria parasites.* Parasitol Today, 2000. **16**(10): p. 411-5.
29. Pasvol, G., et al., *Glycophorin as a possible receptor for Plasmodium falciparum.* Lancet, 1982. **2**(8305): p. 947-50.
30. Chotivanich, K., et al., *Parasite multiplication potential and the severity of Falciparum malaria.* J Infect Dis, 2000. **181**(3): p. 1206-9.
31. Handunnetti, S.M., et al., *Involvement of CD36 on erythrocytes as a rosetting receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.* Blood, 1992. **80**(8): p. 2097-104.
32. Wahlgren, M., et al., *Molecular mechanisms and biological importance of Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992. **87 Suppl 3**: p. 323-9.
33. Carlson, J. and M. Wahlgren, *Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions.* J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1311-7.
34. Clough, B., et al., *Plasmodium falciparum: the importance of IgM in the rosetting of parasite-infected erythrocytes.* Exp Parasitol, 1998. **89**(1): p. 129-32.
35. Somner, E.A., J. Black, and G. Pasvol, *Multiple human serum components act as bridging molecules in rosette formation by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.* Blood, 2000. **95**(2): p. 674-82.
36. Carlson, J., et al., *Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies.* Lancet, 1990. **336**(8729): p. 1457-60.
37. Clough, B., F.A. Atilola, and G. Pasvoi, *The role of rosetting in the multiplication of Plasmodium falciparum: rosette formation neither enhances nor targets parasite invasion into uninfected red cells.* Br J Haematol, 1998. **100**(1): p. 99-104.
38. Udomsanpetch, R., et al., *Rosette formation by Plasmodium vivax.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1995. **89**(6): p. 635-7.
39. Marin-Menendez, A., et al., *Rosetting in Plasmodium vivax: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia.* PLoS Negl Trop Dis. **7**(4): p. e2155.
40. Baruch, D.I., et al., *Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes.* Cell, 1995. **82**(1): p. 77-87.
41. Su, X.Z., et al., *The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.* Cell, 1995. **82**(1): p. 89-100.
42. Chen, Q., et al., *The semiconserved head structure of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors.* J Exp Med, 2000. **192**(1): p. 1-10.
43. Esslinger, C.W., S. Picot, and P. Ambroise-Thomas, *Intra-erythrocytic Plasmodium falciparum induces up-regulation of inter-cellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells in vitro.* Scand J Immunol, 1994. **39**(3): p. 229-32.
44. Cooke, B.M., et al., *Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin.* Br J Haematol, 1994. **87**(1): p. 162-70.
45. Turner, G.D., et al., *An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration.* Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1057-69.
46. Goldring, J.D. and M. Hommel, *Variation in the cytoadherence characteristics of malaria parasites: is this a true virulence factor?* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992. **87 Suppl 3**: p. 313-22.
47. Giribaldi, G., et al., *Involvement of inflammatory chemokines in survival of human monocytes fed with malarial pigment.* Infect Immun. **78**(11): p. 4912-21.
48. Riley, E.M., et al., *Regulating immunity to malaria.* Parasite Immunol, 2006. **28**(1-2): p. 35-49.
49. Zhu, J., G. Krishnegowda, and D.C. Gowda, *Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide.* J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8617-27.

50. Akman-Anderson, L., M. Olivier, and S. Luckhart, *Induction of nitric oxide synthase and activation of signaling proteins in Anopheles mosquitoes by the malaria pigment, hemozoin.* Infect Immun, 2007. **75**(8): p. 4012-9.
51. Price, R.N., et al., *Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria.* Am J Trop Med Hyg, 2001. **65**(5): p. 614-22.
52. Wickramasinghe, S.N. and S.H. Abdalla, *Blood and bone marrow changes in malaria.* Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 2000. **13**(2): p. 277-99.
53. Seed, T.M., et al., *Hemopathologic consequences of protracted gamma irradiation: alterations in granulocyte reserves and granutocyte mobilization.* Blood, 1980. **56**(1): p. 42-51.
54. Buffet, P.A., et al., *Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria.* Curr Opin Hematol, 2009. **16**(3): p. 157-64.
55. Bates, I. and G. Bedu-Addo, *Chronic malaria and splenic lymphoma: clues to understanding lymphoma evolution.* Leukemia, 1997. **11**(12): p. 2162-7.
56. Scherf, A., et al., *Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in Plasmodium falciparum.* EMBO J, 1998. **17**(18): p. 5418-26.
57. Chen, Q., et al., *Developmental selection of var gene expression in Plasmodium falciparum.* Nature, 1998. **394**(6691): p. 392-5.
58. Smith, J.D., et al., *Classification of adhesive domains in the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family.* Mol Biochem Parasitol, 2000. **110**(2): p. 293-310.
59. Kraemer, S.M., et al., *Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in Plasmodium falciparum: comparisons of geographically diverse isolates.* BMC Genomics, 2007. **8**: p. 45.
60. Kyes, S.A., S.M. Kraemer, and J.D. Smith, *Antigenic variation in Plasmodium falciparum: gene organization and regulation of the var multigene family.* Eukaryot Cell, 2007. **6**(9): p. 1511-20.
61. Robinson, B.A., T.L. Welch, and J.D. Smith, *Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome.* Mol Microbiol, 2003. **47**(5): p. 1265-78.
62. Bull, P.C., et al., *Plasmodium falciparum variant surface antigen expression patterns during malaria.* PLoS Pathog, 2005. **1**(3): p. e26.
63. Rowe, J.A., et al., *P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1.* Nature, 1997. **388**(6639): p. 292-5.
64. Vigan-Womas, I., et al., *An in vivo and in vitro model of Plasmodium falciparum rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype.* Infect Immun, 2008. **76**(12): p. 5565-80.
65. Aitman, T.J., et al., *Malaria susceptibility and CD36 mutation.* Nature, 2000. **405**(6790): p. 1015-6.
66. Gamain, B., et al., *Modifications in the CD36 binding domain of the Plasmodium falciparum variant antigen are responsible for the inability of chondroitin sulfate A adherent parasites to bind CD36.* Blood, 2001. **97**(10): p. 3268-74.
67. Omi, K., et al., *CD36 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria.* Am J Hum Genet, 2003. **72**(2): p. 364-74.
68. Chilongola, J., et al., *CD36 deficiency protects against malarial anaemia in children by reducing Plasmodium falciparum-infected red blood cell adherence to vascular endothelium.* Trop Med Int Health, 2009. **14**(7): p. 810-6.
69. Gahmberg, C.G., M. Tolvanen, and P. Kotovuori, *Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands.* Eur J Biochem, 1997. **245**(2): p. 215-32.
70. Berendt, A.R., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum.* Nature, 1989. **341**(6237): p. 57-9.
71. Chakravorty, S.J. and A. Craig, *The role of ICAM-1 in Plasmodium falciparum cytoadherence.* Eur J Cell Biol, 2005. **84**(1): p. 15-27.
72. Kun, J.F., et al., *Association of the ICAM-1Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambarene, Gabon.* Am J Trop Med Hyg, 1999. **61**(5): p. 776-9.
73. Treutiger, C.J., et al., *PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.* Nat Med, 1997. **3**(12): p. 1405-8.

74. Kikuchi, M., et al., *Association of adhesion molecule PECAM-1/CD31 polymorphism with susceptibility to cerebral malaria in Thais.* Parasitol Int, 2001. **50**(4): p. 235-9.
75. Cockburn, I.A., et al., *A human complement receptor 1 polymorphism that reduces Plasmodium falciparum rosetting confers protection against severe malaria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 272-7.
76. Nagayasu, E., et al., *CR1 density polymorphism on erythrocytes of falciparum malaria patients in Thailand.* Am J Trop Med Hyg, 2001. **64**(1-2): p. 1-5.
77. Taylor, S.M., C.M. Parobek, and R.M. Fairhurst, *Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis.* Lancet Infect Dis. **12**(6): p. 457-68.
78. Allison, A.C., *The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1954. **48**(4): p. 312-8.
79. Lopera-Mesa, T.M., et al., *Impact of red blood cell variants on childhood malaria in Mali: a prospective cohort study.* Lancet Haematol. **2**(4): p. e140-e149.
80. May, J., et al., *Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria.* JAMA, 2007. **297**(20): p. 2220-6.
81. Lederberg, J., *J. B. S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution.* Genetics, 1999. **153**(1): p. 1-3.
82. Aidoo, M., et al., *Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality.* Lancet, 2002. **359**(9314): p. 1311-2.
83. Agarwal, A., et al., *Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S.* Blood, 2000. **96**(7): p. 2358-63.
84. Modiano, D., et al., *Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria.* Nature, 2001. **414**(6861): p. 305-8.
85. Mockenhaupt, F.P., et al., *Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria.* Blood, 2004. **104**(7): p. 2003-6.
86. Williams, T.N., et al., *Both heterozygous and homozygous alpha+ thalassemias protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya.* Blood, 2005. **106**(1): p. 368-71.
87. Wambua, S., et al., *The effect of alpha+-thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya.* PLoS Med, 2006. **3**(5): p. e158.
88. Allen, S.J., et al., *alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14736-41.
89. Enevold, A., et al., *Associations between alpha+-thalassemia and Plasmodium falciparum malarial infection in northeastern Tanzania.* J Infect Dis, 2007. **196**(3): p. 451-9.
90. Wilson, R.J., G. Pasvol, and D.J. Weatherall, *Invasion and growth of Plasmodium falciparum in different types of human erythrocyte.* Bull World Health Organ, 1977. **55**(2-3): p. 179-86.
91. Bienzle, U., I. Guggenmoos-Holzmann, and L. Luzzatto, *Malaria and erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in West Africa.* Am J Trop Med Hyg, 1979. **28**(4): p. 619-21.
92. Pasvol, G. and R.J. Wilson, *The interaction of malaria parasites with red blood cells.* Br Med Bull, 1982. **38**(2): p. 133-40.
93. Ayi, K., et al., *Pyruvate kinase deficiency and malaria.* N Engl J Med, 2008. **358**(17): p. 1805-10.
94. Miller, L.H., et al., *The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy.* N Engl J Med, 1976. **295**(6): p. 302-4.
95. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers.* Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.
96. Struik, S.S. and E.M. Riley, *Does malaria suffer from lack of memory?* Immunol Rev, 2004. **201**: p. 268-90.
97. Belkaid, Y., C.M. Sun, and N. Bouladoux, *Parasites and immunoregulatory T cells.* Curr Opin Immunol, 2006. **18**(4): p. 406-12.
98. Cohen, S., G.I. Mc, and S. Carrington, *Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria.* Nature, 1961. **192**: p. 733-7.
99. McGregor, I.A., *The Passive Transfer of Human Malarial Immunity.* Am J Trop Med Hyg, 1964. **13**: p. SUPPL 237-9.

100. Bouharoun-Tayoun, H. and P. Druilhe, *Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality?* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992. **87 Suppl 3**: p. 229-34.
101. Wahlgren, M., et al., *Characterization of the humoral immune response in Plasmodium falciparum malaria. III. Factors influencing the coexpression of antibody isotypes (IgM and IgG-1 to 4).* Clin Exp Immunol, 1986. **63**(2): p. 343-53.
102. Wahlgren, M., et al., *Characterization of the humoral immune response in Plasmodium falciparum malaria. II. IgG subclass levels of anti-P. falciparum antibodies in different sera.* Clin Exp Immunol, 1983. **54**(1): p. 135-42.
103. Ferreira, M.U., et al., *The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-Plasmodium falciparum antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients.* Am J Trop Med Hyg, 1996. **55**(3): p. 315-23.
104. Ferreira, M.U., et al., *The IgG-subclass distribution of naturally acquired antibodies to Plasmodium falciparum, in relation to malaria exposure and severity.* Ann Trop Med Parasitol, 1998. **92**(3): p. 245-56.
105. Aribot, G., et al., *Pattern of immunoglobulin isotype response to Plasmodium falciparum blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa).* Am J Trop Med Hyg, 1996. **54**(5): p. 449-57.
106. Groux, H. and J. Gysin, *Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of Plasmodium falciparum: functional role of IgG subclasses.* Res Immunol, 1990. **141**(6): p. 529-42.
107. Israelsson, E., et al., *Differences in Fcgamma receptor IIa genotypes and IgG subclass pattern of anti-malarial antibodies between sympatric ethnic groups in Mali.* Malar J, 2008. **7**: p. 175.
108. Perlmann, H., et al., *IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in Plasmodium falciparum malaria: association of high IgE levels with cerebral malaria.* Clin Exp Immunol, 1994. **97**(2): p. 284-92.
109. Bereczky, S., et al., *Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria.* Int J Parasitol, 2004. **34**(8): p. 935-42.
110. Israelsson, E., et al., *Antibody responses to a C-terminal fragment of the Plasmodium falciparum blood-stage antigen Pf332 in Senegalese individuals naturally primed to the parasite.* Clin Exp Immunol, 2008. **152**(1): p. 64-71.
111. J., H. *The rate of mutation of human genes.* . in *Eighth International Congress of Genetics*. 1949: Hereditas.
112. Flint, J., et al., *The population genetics of the haemoglobinopathies.* Baillieres Clin Haematol, 1993. **6**(1): p. 215-62.
113. Modiano, G., et al., *Protection against malaria morbidity: near-fixation of the alpha-thalassemia gene in a Nepalese population.* Am J Hum Genet, 1991. **48**(2): p. 390-7.
114. WHO, *rapport du sécrétariat géneral de l'OMS sur les thalassémies et autres hémoglobinopaties*. 2006, http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/EB118/B118_5-fr.pdf.
115. Harteveld, C.L. and D.R. Higgs, *Alpha-thalassaemia.* Orphanet J Rare Dis. **5**: p. 13.
116. Herrick, J.B., *Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910.* Yale J Biol Med, 2001. **74**(3): p. 179-84.
117. Pauling, L., H.A. Itano, and et al., *Sickle cell anemia, a molecular disease.* Science, 1949. **109**(2835): p. 443.
118. Ingram, V.M., *A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin.* Nature, 1956. **178**(4537): p. 792-4.
119. Oner, C., et al., *Beta S haplotypes in various world populations.* Hum Genet, 1992. **89**(1): p. 99-104.
120. Kulozik, A.E., et al., *Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation.* Am J Hum Genet, 1986. **39**(2): p. 239-44.
121. Cheboule, Y., et al., *Structural analysis of the 5' flanking region of the beta-globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(12): p. 4431-5.
122. Lapoumeroulie, C., et al., *A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type.* Hum Genet, 1992. **89**(3): p. 333-7.

123. Itano, H.A., *A Third Abnormal Hemoglobin Associated with Hereditary Hemolytic Anemia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1951. **37**(12): p. 775-84.
124. Livingstone, F.B., *Gene frequency clines of the beta-hemoglobin locus in various human populations and their simulation by models involving differential selection.* Hum Biol, 1969. **41**(2): p. 223-36.
125. Winter, W.P., *Geographic and ethnic distribution of human hemoglobin variants.* Tex Rep Biol Med, 1980. **40**: p. 179-90.
126. Clegg, J.B. and D.J. Weatherall, *Haemoglobin synthesis in alpha-thalassaemia (haemoglobin H disease).* Nature, 1967. **215**(5107): p. 1241-3.
127. Hess, J.F., C.W. Schmid, and C.K. Shen, *A gradient of sequence divergence in the human adult alpha-globin duplication units.* Science, 1984. **226**(4670): p. 67-70.
128. Higgs, D.R., et al., *Detection of alpha thalassaemia in Negro infants.* Br J Haematol, 1980. **46**(1): p. 39-46.
129. Trent, R.J., et al., *A new triplicated alpha-globin gene arrangement in man.* Br J Haematol, 1981. **49**(1): p. 149-52.
130. Hall, G.W., et al., *A mutation in the polyadenylation signal of the alpha 2 globin gene (AATAAA-->AATA--) as a cause of alpha thalassaemia in Asian indians.* Br J Haematol, 1994. **88**(1): p. 225-7.
131. Yuregir, G.T., et al., *Hb H disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional alpha-thalassaemia-1 and a newly discovered poly A mutation.* Br J Haematol, 1992. **80**(4): p. 527-32.
132. Steinberg MH, F.B., Higgs DR, Nagel RL, ed. *Bernini L: Geographic distribution of alpha-thalassemia. In Disorders of Hemoglobin first edition*. Cambridge University Press 2001. 17.
133. Fodde, R., et al., *Prevalence and molecular heterogeneity of alfa+ thalassemia in two tribal populations from Andhra Pradesh, India.* Hum Genet, 1988. **80**(2): p. 157-60.
134. Flint, J., et al., *Why are some genetic diseases common? Distinguishing selection from other processes by molecular analysis of globin gene variants.* Hum Genet, 1993. **91**(2): p. 91-117.
135. Kazazian, H.H., Jr., et al., *Molecular characterization of seven beta-thalassemia mutations in Asian Indians.* EMBO J, 1984. **3**(3): p. 593-6.
136. Da Luz, J., et al., *Beta-globin gene cluster haplotypes in Afro-Uruguayans from two geographical regions (South and North).* Am J Hum Biol. **22**(1): p. 124-8.
137. Nagel, R.L. and A.F. Fleming, *Genetic epidemiology of the beta s gene.* Baillieres Clin Haematol, 1992. **5**(2): p. 331-65.
138. Piel, F.B., *[Sickle-cell disease: geographical distribution and population estimates].* Med Sci (Paris). **29**(11): p. 965-7.
139. Foy, H., et al., *The distribution of sickle cell trait and the incidence of sickle cell anaemia in the Negro tribes of Portuguese East Africa.* East Afr Med J, 1952. **29**(7): p. 247-51.
140. Allison, A.C., *Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malareal infection.* Br Med J, 1954. **1**(4857): p. 290-4.
141. Piel, F.B., et al., *Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis.* Nat Commun. **1**: p. 104.
142. Williams, T.N., et al., *Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases.* J Infect Dis, 2005. **192**(1): p. 178-86.
143. Williams, T.N., et al., *Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+-thalassemia and the sickle cell trait.* Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1253-7.
144. Jallow, M., et al., *Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa.* Nat Genet, 2009. **41**(6): p. 657-65.
145. Ackerman, H., et al., *A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria.* Ann Hum Genet, 2005. **69**(Pt 5): p. 559-65.
146. Willcox, M.C. and L. Beckman, *Haemoglobin variants, beta-thalassaemia and G-6-PD types in Liberia.* Hum Hered, 1981. **31**(6): p. 339-47.
147. Parikh, S., G. Dorsey, and P.J. Rosenthal, *Host polymorphisms and the incidence of malaria in Ugandan children.* Am J Trop Med Hyg, 2004. **71**(6): p. 750-3.
148. Clark, T.D., et al., *Factors determining the heterogeneity of malaria incidence in children in Kampala, Uganda.* J Infect Dis, 2008. **198**(3): p. 393-400.

149. Kreuels, B., et al., *Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth.* Blood. **115**(22): p. 4551-8.
150. Crompton, P.D., et al., *Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria.* J Infect Dis, 2008. **198**(9): p. 1265-75.
151. Travassos, M.A., et al., *Hemoglobin C Trait Provides Protection From Clinical Falciparum Malaria in Malian Children.* J Infect Dis.
152. Colbourne, M.J. and G.M. Edington, *Sickling and malaria in the Gold Coast.* Br Med J, 1956. **1**(4970): p. 784-6.
153. Fleming, A.F., et al., *Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. I. Prevalence of haemoglobins and relationships between sickle cell trait, malaria and survival.* Ann Trop Med Parasitol, 1979. **73**(2): p. 161-72.
154. Billo, M.A., et al., *Sickle cell trait protects against Plasmodium falciparum infection.* Am J Epidemiol. **176 Suppl 7**: p. S175-85.
155. Edington, G.M. and W.N. Laing, *Relationship between haemoglobins C and S and malaria in Ghana.* Br Med J, 1957. **2**(5037): p. 143-5.
156. Thompson, G.R., *Significance of haemoglobins S and C in Ghana.* Br Med J, 1962. **1**(5279): p. 682-5.
157. Aluoch, J.R., *Higher resistance to Plasmodium falciparum infection in patients with homozygous sickle cell disease in western Kenya.* Trop Med Int Health, 1997. **2**(6): p. 568-71.
158. Danquah, I., et al., *Influence of haemoglobins S and C on predominantly asymptomatic Plasmodium infections in northern Ghana.* Trans R Soc Trop Med Hyg. **104**(11): p. 713-9.
159. Bernstein, S.C., J.E. Bowman, and L. Kaptue Noche, *Population studies in Cameroon: hemoglobin S, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and falciparum malaria.* Hum Hered, 1980. **30**(4): p. 251-8.
160. Motulsky, A.G., J. Vandepitte, and G.R. Fraser, *Population genetic studies in the Congo. I. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, hemoglobin S, and malaria.* Am J Hum Genet, 1966. **18**(6): p. 514-37.
161. Bienzle, U., I. Guggenmoos-Holzmann, and L. Luzzatto, *Plasmodium falciparum malaria and human red cells. I. A genetic and clinical study in children.* Int J Epidemiol, 1981. **10**(1): p. 9-15.
162. Jeremiah, Z.A., T.A. Jeremiah, and F.O. Emelike, *Frequencies of some human genetic markers and their association with Plasmodium falciparum malaria in the Niger Delta, Nigeria.* J Vector Borne Dis. **47**(1): p. 11-6.
163. Ringelhann, B., et al., *A new look at the protection of hemoglobin AS and AC genotypes against plasmodium falciparum infection: a census tract approach.* Am J Hum Genet, 1976. **28**(3): p. 270-9.
164. Allen, S.J., et al., *Morbidity from malaria and immune responses to defined Plasmodium falciparum antigens in children with sickle cell trait in The Gambia.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992. **86**(5): p. 494-8.
165. Ntoumi, F., et al., *Plasmodium falciparum: sickle-cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections.* Exp Parasitol, 1997. **87**(1): p. 39-46.
166. Guinet, F., et al., *A comparison of the incidence of severe malaria in Malian children with normal and C-trait hemoglobin profiles.* Acta Trop, 1997. **68**(2): p. 175-82.
167. Rihet, P., et al., *Hemoglobin C is associated with reduced Plasmodium falciparum parasitemia and low risk of mild malaria attack.* Hum Mol Genet, 2004. **13**(1): p. 1-6.
168. Williams, T.N., et al., *High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children.* Nature, 1996. **383**(6600): p. 522-5.
169. Mockenhaupt, F.P., et al., *The contribution of alpha+-thalassaemia to anaemia in a Nigerian population exposed to intense malaria transmission.* Trop Med Int Health, 1999. **4**(4): p. 302-7.
170. Allen, S.J., et al., *A prospective study of the influence of alpha thalassaemia on morbidity from malaria and immune responses to defined Plasmodium falciparum antigens in Gambian children.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1993. **87**(3): p. 282-5.
171. Veenemans, J., et al., *Alpha+ -thalassemia protects against anemia associated with asymptomatic malaria: evidence from community-based surveys in Tanzania and Kenya.* J Infect Dis, 2008. **198**(3): p. 401-8.

172. Lin, E., et al., *Minimal association of common red blood cell polymorphisms with Plasmodium falciparum infection and uncomplicated malaria in Papua New Guinean school children.* Am J Trop Med Hyg. **83**(4): p. 828-33.
173. Fleming, A.F., et al., *Anaemia in young primigravidae in the guinea savanna of Nigeria: sickle-cell trait gives partial protection against malaria.* Ann Trop Med Parasitol, 1984. **78**(4): p. 395-404.
174. Bouyou-Akotet, M.K., et al., *Prevalence of Plasmodium falciparum infection in pregnant women in Gabon.* Malar J, 2003. **2**: p. 18.
175. Mockenhaupt, F.P., et al., *Anaemia in pregnant Ghanaian women: importance of malaria, iron deficiency, and haemoglobinopathies.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94**(5): p. 477-83.
176. Hamilton, P.J., et al., *The role of malaria, folic acid deficiency and haemoglobin AS in pregnancy at Mulago hospital.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1972. **66**(4): p. 594-602.
177. O'Donnell, A., et al., *Alpha+ -thalassaemia and pregnancy in a malaria endemic region of Papua New Guinea.* Br J Haematol, 2006. **135**(2): p. 235-41.
178. Hebbel, R.P., *Sickle hemoglobin instability: a mechanism for malarial protection.* Redox Rep, 2003. **8**(5): p. 238-40.
179. Yuan, J., et al., *The instability of the membrane skeleton in thalassemic red blood cells.* Blood, 1995. **86**(10): p. 3945-50.
180. Williams, T.N., D.J. Weatherall, and C.I. Newbold, *The membrane characteristics of Plasmodium falciparum-infected and -uninfected heterozygous alpha(0)thalassaemic erythrocytes.* Br J Haematol, 2002. **118**(2): p. 663-70.
181. Tokumasu, F., et al., *Band 3 modifications in Plasmodium falciparum-infected AA and CC erythrocytes assayed by autocorrelation analysis using quantum dots.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 1091-8.
182. Tokumasu, F., et al., *Altered membrane structure and surface potential in homozygous hemoglobin C erythrocytes.* PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5828.
183. Ayi, K., et al., *Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait.* Blood, 2004. **104**(10): p. 3364-71.
184. Yuthavong, Y., et al., *Impaired parasite growth and increased susceptibility to phagocytosis of Plasmodium falciparum infected alpha-thalassemia or hemoglobin Constant Spring red blood cells.* Am J Clin Pathol, 1988. **89**(4): p. 521-5.
185. Tan, X., et al., *Hemoglobin S and C heterozygosity enhances neither the magnitude nor breadth of antibody responses to a diverse array of Plasmodium falciparum antigens.* J Infect Dis. **204**(11): p. 1750-61.
186. Zeituni, A.E., et al., *Effects of age, hemoglobin type and parasite strain on IgG recognition of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in Malian children.* PLoS One. **8**(10): p. e76734.
187. Miura, K., et al., *Relationship between malaria incidence and IgG levels to Plasmodium falciparum merozoite antigens in Malian children: impact of hemoglobins S and C.* PLoS One. **8**(3): p. e60182.
188. Shekalaghe, S., et al., *Low density parasitaemia, red blood cell polymorphisms and Plasmodium falciparum specific immune responses in a low endemic area in northern Tanzania.* BMC Infect Dis, 2009. **9**: p. 69.
189. Ifediba, T.C., et al., *Plasmodium falciparum in vitro: diminished growth in hemoglobin H disease erythrocytes.* Blood, 1985. **65**(2): p. 452-5.
190. Brockelman, C.R., et al., *Thalassemic erythrocytes inhibit in vitro growth of Plasmodium falciparum.* J Clin Microbiol, 1987. **25**(1): p. 56-60.
191. Pattanapanyasat, K., et al., *Impairment of Plasmodium falciparum growth in thalassemic red blood cells: further evidence by using biotin labeling and flow cytometry.* Blood, 1999. **93**(9): p. 3116-9.
192. Udomsangpetch, R., et al., *Alteration in cytoadherence and rosetting of Plasmodium falciparum-infected thalassemic red blood cells.* Blood, 1993. **82**(12): p. 3752-9.
193. Bunyaratvej, A., et al., *Reduced deformability of thalassemic erythrocytes and erythrocytes with abnormal hemoglobins and relation with susceptibility to Plasmodium falciparum invasion.* Blood, 1992. **79**(9): p. 2460-3.
194. Glushakova, S., et al., *Hemoglobinopathic erythrocytes affect the intraerythrocytic multiplication of Plasmodium falciparum in vitro.* J Infect Dis. **210**(7): p. 1100-9.

195. Fowkes, F.J., et al., *Increased microerythrocyte count in homozygous alpha(+)-thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia.* PLoS Med, 2008. **5**(3): p. e56.
196. Mockenhaupt, F.P., et al., *Plasmodium falciparum infection: influence on hemoglobin levels in alpha-thalassemia and microcytosis.* J Infect Dis, 1999. **180**(3): p. 925-8.
197. Fairhurst, R.M., et al., *Aberrant development of Plasmodium falciparum in hemoglobin CC red cells: implications for the malaria protective effect of the homozygous state.* Blood, 2003. **101**(8): p. 3309-15.
198. Fairhurst, R.M., et al., *Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria.* Nature, 2005. **435**(7045): p. 1117-21.
199. Cyrklaff, M., et al., *Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.* Science. **334**(6060): p. 1283-6.
200. Giribaldi, G., et al., *Growth of Plasmodium falciparum induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes.* Br J Haematol, 2001. **113**(2): p. 492-9.
201. Luzzatto, L., E.S. Nwachuku-Jarrett, and S. Reddy, *Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait.* Lancet, 1970. **1**(7642): p. 319-21.
202. Roth, E.F., Jr., et al., *Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with Plasmodium falciparum malaria.* Science, 1978. **202**(4368): p. 650-2.
203. Trager, W. and J.B. Jensen, *Human malaria parasites in continuous culture.* Science, 1976. **193**(4254): p. 673-5.
204. Friedman, M.J., *Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(4): p. 1994-7.
205. Pasvol, G., *The interaction between sickle haemoglobin and the malarial parasite Plasmodium falciparum.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1980. **74**(6): p. 701-5.
206. Friedman, M.J., *Ultrastructural damage to the malaria parasite in the sickled cell.* J Protozool, 1979. **26**(2): p. 195-9.
207. Friedman, M.J., et al., *Plasmodium falciparum: physiological interactions with the human sickle cell.* Exp Parasitol, 1979. **47**(1): p. 73-80.
208. Ginsburg, H., et al., *Effects of red blood cell potassium and hypertonicity on the growth of Plasmodium falciparum in culture.* Z Parasitenkd, 1986. **72**(2): p. 185-99.
209. Griffiths, M.J., et al., *Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe Plasmodium falciparum malaria.* Br J Haematol, 2001. **113**(2): p. 486-91.
210. Kuross, S.A., B.H. Rank, and R.P. Hebbel, *Excess heme in sickle erythrocyte inside-out membranes: possible role in thiol oxidation.* Blood, 1988. **71**(4): p. 876-82.
211. Hebbel, R.P., *Auto-oxidation and a membrane-associated 'Fenton reagent': a possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes.* Clin Haematol, 1985. **14**(1): p. 129-40.
212. LaMonte, G., et al., *Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into Plasmodium falciparum inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance.* Cell Host Microbe. **12**(2): p. 187-99.
213. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.* Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
214. Kusenda, B., et al., *MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance.* Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2006. **150**(2): p. 205-15.
215. Dalko, E., et al., *Multifaceted roles of heme during severe Plasmodium falciparum infections in India.* Infect Immun.
216. Liu, M., et al., *Heme mediated STAT3 activation in severe malaria.* PLoS One. **7**(3): p. e34280.
217. Ferreira, A., et al., *Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection.* Cell. **145**(3): p. 398-409.
218. Cranston, H.A., et al., *Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability.* Science, 1984. **223**(4634): p. 400-3.
219. Deplaine, G., et al., *The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro.* Blood. **117**(8): p. e88-95.
220. Buffet, P.A., et al., *Ex vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions.* Blood, 2006. **107**(9): p. 3745-52.

221. Del Portillo, H.A., et al., *The role of the spleen in malaria.* Cell Microbiol. **14**(3): p. 343-55.
222. Faller, A., *Splenic architecture reflected in the connective tissue structure of the human spleen.* Experientia, 1985. **41**(2): p. 164-7.
223. Weiss, L., *The red pulp of the spleen: structural basis of blood flow.* Clin Haematol, 1983. **12**(2): p. 375-93.
224. Weiss, L., *New trends in spleen research: conclusion.* Experientia, 1985. **41**(2): p. 243-8.
225. Fujita, T., M. Kashimura, and K. Adachi, *Scanning electron microscopy (SEM) studies of the spleen--normal and pathological.* Scan Electron Microsc, 1982(Pt 1): p. 435-44.
226. Borrello, M.A. and R.P. Phipps, *Differential Thy-1 expression by splenic fibroblasts defines functionally distinct subsets.* Cell Immunol, 1996. **173**(2): p. 198-206.
227. Liakka, A., et al., *Immuno-electron-microscopic localization of types III pN-collagen and IV collagen, laminin and tenascin in developing and adult human spleen.* Cell Tissue Res, 1995. **282**(1): p. 117-27.
228. Van Vliet, E., et al., *Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody.* J Histochem Cytochem, 1986. **34**(7): p. 883-90.
229. van Ewijk, W. and P. Nieuwenhuis, *Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp.* Experientia, 1985. **41**(2): p. 199-208.
230. van Krieken, J.H. and J. te Velde, *Normal histology of the human spleen.* Am J Surg Pathol, 1988. **12**(10): p. 777-85.
231. Drenckhahn, D. and J. Wagner, *Stress fibers in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix, and contractility.* J Cell Biol, 1986. **102**(5): p. 1738-47.
232. Nossal, G.J., et al., *Antigens in immunity. XII. Antigen trapping in the spleen.* Int Arch Allergy Appl Immunol, 1966. **29**(4): p. 368-83.
233. Burke, J.S. and G.T. Simon, *Electron microscopy of the spleen. II. Phagocytosis of colloidal carbon.* Am J Pathol, 1970. **58**(1): p. 157-81.
234. Mitchell, J. and A. Abbot, *Antigens in immunity. XVI. A light and electron microscope study of antigen localization in the rat spleen.* Immunology, 1971. **21**(2): p. 207-24.
235. Otogawa, K., et al., *Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis.* Am J Pathol, 2007. **170**(3): p. 967-80.
236. Matsumoto, N. and Y. Hiroshige, *Erythrophagocytosis by bone marrow macrophages in hemolytic anemias.* Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi, 1986. **49**(4): p. 823-8.
237. Marton, P.F., *Erythrophagocytosis in the human bone marrow.* Scand J Haematol, 1970. **7**(3): p. 177-83.
238. Groom, A.C., E.E. Schmidt, and I.C. MacDonald, *Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy.* Scanning Microsc, 1991. **5**(1): p. 159-73; discussion 173-4.
239. Mohandas, N. and P.G. Gallagher, *Red cell membrane: past, present, and future.* Blood, 2008. **112**(10): p. 3939-48.
240. Schnitzer, B., et al., *Pitting function of the spleen in malaria: ultrastructural observations.* Science, 1972. **177**(4044): p. 175-7.
241. Safeukui, I., et al., *Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen.* Blood, 2008. **112**(6): p. 2520-8.
242. Looareesuwan, S., et al., *Reduced erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients.* Br J Haematol, 1987. **67**(4): p. 473-8.
243. Turrini, F., 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): p. 801-8.
244. Lutz, H.U., *Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2004. **50**(2): p. 107-16.
245. Buffet, P.A., et al., *The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology.* Blood. **117**(2): p. 381-92.

246. Bach, O., 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): p. 861-7.
247. Snow, R.W., et al., *Relation between severe malaria morbidity in children and level of Plasmodium falciparum transmission in Africa.* Lancet, 1997. **349**(9066): p. 1650-4.
248. Giha, H.A., 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): p. 661-5.
249. Imbert, P., et al., *Left upper quadrant abdominal pain in malaria: suspect pathological splenic rupture first.* Trans R Soc Trop Med Hyg. **104**(9): p. 628.
250. Urban, B.C., et al., *Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells.* Nature, 1999. **400**(6739): p. 73-7.
251. Prommano, O., 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): p. 1359-70.
252. Pongponratn, E., et al., *Spleen in falciparum malaria: ultrastructural study.* Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1987. **18**(4): p. 491-501.
253. Oo, M.M., et al., *Human cerebral malaria: a pathological study.* J Neuropathol Exp Neurol, 1987. **46**(2): p. 223-31.
254. Looareesuwan, S., et al., *Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria.* N Engl J Med, 1987. **317**(11): p. 675-9.
255. Lee, S.H., 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): p. 396-402.
256. ter Kuile, F.O., et al., *Impact of permethrin-treated bed nets on malaria and all-cause morbidity in young children in an area of intense perennial malaria transmission in western Kenya: cross-sectional survey.* Am J Trop Med Hyg, 2003. **68**(4 Suppl): p. 100-7.
257. Gomez, B., et al., *[Splenic pseudocystic. Report of a case].* G E N, 1994. **48**(2): p. 108-10.
258. Dondorp, A.M., et al., *Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria.* Am J Trop Med Hyg, 1999. **60**(5): p. 733-7.
259. 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): p. 983-91.
260. Mulenga, M., et al., *A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of atovaquone-proguanil vs. sulphadoxine-pyrimethamine in the treatment of malarial anaemia in Zambian children.* Trop Med Int Health, 2006. **11**(11): p. 1643-52.
261. Lackritz, E.M., et al., *Effect of blood transfusion on survival among children in a Kenyan hospital.* Lancet, 1992. **340**(8818): p. 524-8.
262. Douglas, N.M., et al., *The anaemia of Plasmodium vivax malaria.* Malar J. **11**: p. 135.
263. Marsh, K., et al., *Indicators of life-threatening malaria in African children.* N Engl J Med, 1995. **332**(21): p. 1399-404.
264. Reyburn, H., et al., *Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe Plasmodium falciparum malaria.* JAMA, 2005. **293**(12): p. 1461-70.
265. Kotlyar, S., et al., *Spleen volume and clinical disease manifestations of severe Plasmodium falciparum malaria in African children.* Trans R Soc Trop Med Hyg. **108**(5): p. 283-9.
266. Snow, R.W., et al., *Severe childhood malaria in two areas of markedly different falciparum transmission in east Africa.* Acta Trop, 1994. **57**(4): p. 289-300.
267. Bull, P.C. and K. Marsh, *The role of antibodies to Plasmodium falciparum-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria.* Trends Microbiol, 2002. **10**(2): p. 55-8.
268. Dondorp, A.M., et al., *The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria.* Clin Infect Dis, 2008. **47**(2): p. 151-7.
269. Zintl, A., et al., *Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis.* Parasite Immunol, 2005. **27**(4): p. 115-20.
270. Mohandas, N., W.M. Phillips, and M. Bessis, *Red blood cell deformability and hemolytic anemias.* Semin Hematol, 1979. **16**(2): p. 95-114.

271. Mohandas, N., et al., *Analysis of factors regulating erythrocyte deformability.* J Clin Invest, 1980. **66**(3): p. 563-73.
272. LaCelle, P.L., *Alteration of membrane deformability in hemolytic anemias.* Semin Hematol, 1970. **7**(4): p. 355-71.
273. Mohandas, N. and J.A. Chasis, *Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids.* Semin Hematol, 1993. **30**(3): p. 171-92.
274. Dondorp, A.M., et al., *Red cell deformability, splenic function and anaemia in thalassaemia.* Br J Haematol, 1999. **105**(2): p. 505-8.
275. Evans, E.A. and P.L. La Celle, *Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation.* Blood, 1975. **45**(1): p. 29-43.
276. Shiga, T., N. Maeda, and K. Kon, *Erythrocyte rheology.* Crit Rev Oncol Hematol, 1990. **10**(1): p. 9-48.
277. Hochmuth, R.M., *Micropipette aspiration of living cells.* J Biomech, 2000. **33**(1): p. 15-22.
278. Bessis, M., N. Mohandas, and C. Feo, *Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices.* Blood Cells, 1980. **6**(3): p. 315-27.
279. Mohandas, N., et al., *Ektacytometric analysis of factors regulating red cell deformability.* Blood Cells, 1980. **6**(3): p. 329-34.
280. Li, J., et al., *Spectrin-level modeling of the cytoskeleton and optical tweezers stretching of the erythrocyte.* Biophys J, 2005. **88**(5): p. 3707-19.
281. Shelby, J.P., et al., *A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 14618-22.
282. Antia, M., T. Herricks, and P.K. Rathod, *Microfluidic approaches to malaria pathogenesis.* Cell Microbiol, 2008. **10**(10): p. 1968-74.
283. Juhan, I., et al., *Abnormalities of erythrocyte deformability and platelet aggregation in insulin-dependent diabetics corrected by insulin in vivo and in vitro.* Lancet, 1982. **1**(8271): p. 535-7.
284. Baskurt, O.K., D. Gelmont, and H.J. Meiselman, *Red blood cell deformability in sepsis.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(2): p. 421-7.
285. Jandl, J.H., R.L. Simmons, and W.B. Castle, *Red cell filtration and the pathogenesis of certain hemolytic anemias.* Blood, 1961. **18**: p. 133-48.
286. Nash, G.B., et al., *Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by Plasmodium falciparum.* Blood, 1989. **74**(2): p. 855-61.
287. Herricks, T., M. Antia, and P.K. Rathod, *Deformability limits of Plasmodium falciparum-infected red blood cells.* Cell Microbiol, 2009. **11**(9): p. 1340-53.
288. Safeukui, I., et al., *Surface area loss and increased sphericity account for the splenic entrapment of subpopulations of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes.* PLoS One. **8**(3): p. e60150.
289. Dondorp, A.M., et al., *Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria.* Parasitol Today, 2000. **16**(6): p. 228-32.
290. Paulitschke, M. and G.B. Nash, *Membrane rigidity of red blood cells parasitized by different strains of Plasmodium falciparum.* J Lab Clin Med, 1993. **122**(5): p. 581-9.
291. Lavazec, C., et al., *Microsphiltration: a microsphere matrix to explore erythrocyte deformability.* Methods Mol Biol. **923**: p. 291-7.
292. Cholera, R., et al., *Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(3): p. 991-6.
293. Dondorp, A.M., et al., *Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2.* PLoS Med, 2005. **2**(8): p. e204.
294. Barodka, V.M., et al., *New insights provided by a comparison of impaired deformability with erythrocyte oxidative stress for sickle cell disease.* Blood Cells Mol Dis. **52**(4): p. 230-5.
295. Tillmann, W., *[Reduced deformability of erythrocytes as a common denominator of hemolytic anemias].* Wien Med Wochenschr, 1986. **136 Spec No**: p. 14-6.
296. Brandao, M.M., et al., *Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease.* Eur J Haematol, 2003. **70**(4): p. 207-11.
297. Mockenhaupt, F.P., et al., *Evidence for a reduced effect of chloroquine against Plasmodium falciparum in alpha-thalassaemic children.* Trop Med Int Health, 2001. **6**(2): p. 102-7.

298. Imrie, H., et al., *Haptoglobin levels are associated with haptoglobin genotype and alpha+ - Thalassemia in a malaria-endemic area.* Am J Trop Med Hyg, 2006. **74**(6): p. 965-71.
299. Luzzi, G.A., et al., *Protection by alpha-thalassaemia against Plasmodium falciparum malaria: modified surface antigen expression rather than impaired growth or cytoadherence.* Immunol Lett, 1991. **30**(2): p. 233-40.
300. Miller, L.H., et al., *The pathogenic basis of malaria.* Nature, 2002. **415**(6872): p. 673-9.
301. Rowe, A., et al., *Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya.* Infect Immun, 1995. **63**(6): p. 2323-6.
302. Wu, Y., et al., *Amplification of P. falciparum Cytoadherence through induction of a pro-adhesive state in host endothelium.* PLoS One. **6**(10): p. e24784.
303. Ekvall, H., *Malaria and anemia.* Curr Opin Hematol, 2003. **10**(2): p. 108-14.
304. Campwala, H.Q. and J.F. Desforges, *Membrane-bound hemichrome in density-separated cohorts of normal (AA) and sickled (SS) cells.* J Lab Clin Med, 1982. **99**(1): p. 25-8.
305. Hebbel, R.P., et al., *Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes.* J Clin Invest, 1982. **70**(6): p. 1253-9.
306. MacDonald, V.W. and S. Charache, *Drug-induced oxidation and precipitation of hemoglobins A, S and C.* Biochim Biophys Acta, 1982. **701**(1): p. 39-44.
307. Chakravorty, S.J., K.R. Hughes, and A.G. Craig, *Host response to cytoadherence in Plasmodium falciparum.* Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 2): p. 221-8.
308. Rug, M., et al., *Export of virulence proteins by malaria-infected erythrocytes involves remodeling of host actin cytoskeleton.* Blood. **124**(23): p. 3459-68.
309. Cyrklaff, M., et al., *Host actin remodeling and protection from malaria by hemoglobinopathies.* Trends Parasitol. **28**(11): p. 479-85.
310. Gatton, M.L., et al., *Switching rates of Plasmodium falciparum var genes: faster than we thought?* Trends Parasitol, 2003. **19**(5): p. 202-8.
311. Diez-Silva, M., et al., *Pf155/RESA protein influences the dynamic microcirculatory behavior of ring-stage Plasmodium falciparum infected red blood cells.* Sci Rep. **2**: p. 614.
312. Moorthy, V., Z. Reed, and P.G. Smith, *Measurement of malaria vaccine efficacy in phase III trials: report of a WHO consultation.* Vaccine, 2007. **25**(28): p. 5115-23.
313. Novak, R.W. and R.E. Brown, *Multiple renal and splenic infarctions in a neonate following transfusion with sickle trait blood.* Clin Pediatr (Phila), 1982. **21**(4): p. 239-41.

Annexes

LMVR #033 BLD-1 021 Visit #100

Subject ID# 107-ML 9 - ☐☐☐ **Subject Initials** ☐☐ **Enrollment Date** ☐☐ dd ☐☐ mm 2011 yyyy

DONOR BLOOD COLLECTION

ELIGIBILITY

Inclusion Criteria *(*all should be marked *yes)*

1. Aged 18 to 65 years, inclusive..... ☐ yes ☐ no
2. Hemoglobin level ≥ 8.5 g/dL..... ☐ yes ☐ no
3. Willingness to participate in the study as evidenced by informed consent..... ☐ yes ☐ no

Exclusion Criteria *(*all should be marked *no, negative, or N/A)*

4. If female age 18 to 45 years, pregnancy test result..... ☐ positive ☐ negative or N/A
5. Any condition that in the opinion of the investigator would render the participant unable to comply with the protocol (e.g., psychiatric disease)..... ☐ yes ☐ no
6. Any health condition that in the opinion of the investigator would confound data analysis or pose unnecessary exposure risks to study personnel (e.g., individuals who are known to be HIV-infected) or to the participant (e.g., severe malnutrition)..... ☐ yes ☐ no
7. Is participant enrolled in cohort study of 13-I-N107..... ☐ yes ☐ no

Consent and Enrollment *(*all should be marked *yes*)

8. Has participant signed the consent form prior to any study related procedures being performed?..... ☐ yes ☐ no
9. Has a copy of informed the consent been provided to the participant?..... ☐ yes ☐ no
10. Is the participant eligible to participate in the study?..... ☐ yes ☐ no
11. Has participant been enrolled in the study?..... ☐ yes ☐ no

11.1. If subject is eligible to participate in the study but has not been enrolled, explain:_____

_____

DEMOGRAPHICS

12. Age: ☐☐

13. Hemoglobin level: ☐☐.☐ g/dL

14. Gender: ☐ male ☐ female

15. Village/city of residence: ☐ Kenieroba ☐ Bamako

Investigator/Designee Signature: _____ Date: _____

LMVR #033 BLD-2 022 Visit #100

Subject ID# 107-ML 9 - ☐☐☐

Subject Initials ☐☐

BLOOD COLLECTION LOG

Collection 1:

1. Collection Date ☐☐ (*dd*) ☐☐ (*mm*) 2 0 1 ☐ (*yyyy*)
2. Hb Level ☐☐.☐ g/dL
3. Pregnancy Test Result ☐ positive* ☐ negative ☐ N/A
*If positive, complete End of Study page
4. Weight ☐☐☐ kg
5. Volume Collected ☐☐ mL

Comments: _____

Investigator/Designee Signature: _____ Date: _____

Collection 2:

6. Collection Date ☐☐ (*dd*) ☐☐ (*mm*) 2 0 1 ☐ (*yyyy*)
7. Hb Level ☐☐.☐ g/dL
8. Pregnancy Test Result ☐ positive* ☐ negative ☐ N/A
*If positive, complete End of Study page
9. Weight ☐☐☐ kg
10. Volume Collected ☐☐ mL

Comments: _____

Investigator/Designee Signature: _____ Date: _____

Collection 3:

11. Collection Date ☐☐ (*dd*) ☐☐ (*mm*) 2 0 1 ☐ (*yyyy*)
12. Hb Level ☐☐.☐ g/dL
13. Pregnancy Test Result ☐ positive* ☐ negative ☐ N/A
*If positive, complete End of Study page
14. Weight ☐☐☐ kg
15. Volume Collected: ☐☐ mL

Comments: _____

Investigator/Designee Signature: _____ Date: _____

Collection 4:

16. Collection Date ☐☐ (*dd*) ☐☐ (*mm*) 2 0 1 ☐ (*yyyy*)
17. Hb Level ☐☐.☐ g/dL
18. Pregnancy Test Result ☐ positive* ☐ negative ☐ N/A
*If positive, complete End of Study page
19. Weight ☐☐☐ kg
20. Volume Collected ☐☐ mL

Comments: _____

Investigator/Designee Signature: _____ Date: _____

DataFax #033 ConMed/AE 304

Subject ID# 107-ML 9 - ☐☐☐ **Subject Initials** ☐☐ **ConMed/AE pg. #** ☐☐

CONCOMITANT MEDICATIONS

☐ "X" if none

A. Record any concomitant medications from enrollment to study end.

Date	Time	Name of Drug	Dose	Route	Indication	Initials

ADVERSE EVENTS

☐ "X" if none

*B. List any adverse events from enrollment though study end. *If SAE, notify IRB per protocol. †Complete End of Study CRF.*

Event # ☐ **Adverse Event** ☐ **Start Date** ☐☐ dd ☐☐ mm 2011 yyyy **End Date** ☐ ongoing ☐☐ dd ☐☐ mm 2011 yyyy

If <24 hours, record duration ☐☐ : ☐☐ hr min

Intensity ☐ 1=Mild 2=Moderate 3=Severe 4=Life threatening

Outcome ☐ 1=Resolved 2=Residual effect 3=Ongoing 4=Death† 5=Unknown

SAE yes* ☐ no ☐

Relationship to Study Procedure ☐ 1=Unrelated 2=Unlikely 3=Possibly 4=Probable 5=Definite

---

Event # ☐ **Adverse Event** ☐ **Start Date** ☐☐ dd ☐☐ mm 2011 yyyy **End Date** ☐ ongoing ☐☐ dd ☐☐ mm 2011 yyyy

If <24 hours, record duration ☐☐ : ☐☐ hr min

Intensity ☐ 1=Mild 2=Moderate 3=Severe 4=Life threatening

Outcome ☐ 1=Resolved 2=Residual effect 3=Ongoing 4=Death† 5=Unknown

SAE yes* ☐ no ☐

Relationship to Study Procedure ☐ 1=Unrelated 2=Unlikely 3=Possibly 4=Probable 5=Definite

---

Event # ☐ **Adverse Event** ☐ **Start Date** ☐☐ dd ☐☐ mm 2011 yyyy **End Date** ☐ ongoing ☐☐ dd ☐☐ mm 2011 yyyy

If <24 hours, record duration ☐☐ : ☐☐ hr min

Intensity ☐ 1=Mild 2=Moderate 3=Severe 4=Life threatening

Outcome ☐ 1=Resolved 2=Residual effect 3=Ongoing 4=Death† 5=Unknown

SAE yes* ☐ no ☐

Relationship to Study Procedure ☐ 1=Unrelated 2=Unlikely 3=Possibly 4=Probable 5=Definite

---

☐ *Mark if last ConMed/AE page.*

Principal Investigator/MD Signature: _____ Date: _____

DataFax #033 END-1 499 Termination Visit 099

Subject ID# 107-ML 9 - ☐☐☐ **Subject Initials** ☐☐ **Date Page Completed** ☐☐ *dd* ☐☐ *mm* 2011 *yyyy*

END OF STUDY

1.Did the subject complete the study per protocol? ☐ yes ☐ no

1.1. If *yes*, date subject completed the study: OR If *no*, date of last contact:

☐☐ *dd* ☐☐ *mm* 2011 *yyyy*

1.2. If 'no', please indicate the reason for the subject not completing the study and provide explanation:

☐ Self or parent/guardian request

_____

_____

☐ Lost to follow-up

_____

_____

☐ Death

_____

_____

☐ Other

_____

_____

I certify that:

1. I have reviewed all entries on the Case Report Forms.

2. All information entered onto the Case Report Forms by my associates or me for this subject is, to the best of my knowledge, correct.

Site Principal Investigator Signature: _____ Date: _____

DataFax #033 LOG-2 302

8001

BLOOD DONOR LOG

Page ____ of ____

	1. Screening Date *(dd/mm/yyyy)*	2. Initials	3. Age	4. Gender	5. Subject Enrolled?	6. Consent obtained on day of screening?	7. Subject ID#	8. Comments:
	____ ____ 201 ____	____	____	☐ male ☐ female	☐ yes ☐ no	☐ yes ☐ no	107-ML 9 - ____	_____
	9. Screening Date *(dd/mm/yyyy)*	10. Initials	11. Age	12. Gender	13. Subject Enrolled?	14. Consent obtained on day of screening?	15. Subject ID#	16. Comments:
	____ ____ 201 ____	____	____	☐ male ☐ female	☐ yes ☐ no	☐ yes ☐ no	107-ML 9 - ____	_____
	17. Screening Date *(dd/mm/yyyy)*	18. Initials	19. Age	20. Gender	21. Subject Enrolled?	22. Consent obtained on day of screening?	23. Subject ID#	24. Comments:
	____ ____ 201 ____	____	____	☐ male ☐ female	☐ yes ☐ no	☐ yes ☐ no	107-ML 9 - ____	_____
	25. Screening Date *(dd/mm/yyyy)*	26. Initials	27. Age	28. Gender	29. Subject Enrolled?	30. Consent obtained on day of screening?	31. Subject ID#	32. Comments:
	____ ____ 201 ____	____	____	☐ male ☐ female	☐ yes ☐ no	☐ yes ☐ no	107-ML 9 - ____	_____
	33. Screening Date *(dd/mm/yyyy)*	34. Initials	35. Age	36. Gender	37. Subject Enrolled?	38. Consent obtained on day of screening?	39. Subject ID#	40. Comments:
	____ ____ 201 ____	____	____	☐ male ☐ female	☐ yes ☐ no	☐ yes ☐ no	107-ML 9 - ____	_____
	41. Screening Date *(dd/mm/yyyy)*	42. Initials	43. Age	44. Gender	45. Subject Enrolled?	46. Consent obtained on day of screening?	47. Subject ID#	48. Comments:
	____ ____ 201 ____	____	____	☐ male ☐ female	☐ yes ☐ no	☐ yes ☐ no	107-ML 9 - ____	_____
	49. Screening Date *(dd/mm/yyyy)*	50. Initials	51. Age	52. Gender	53. Subject Enrolled?	54. Consent obtained on day of screening?	55. Subject ID#	56. Comments:
	____ ____ 201 ____	____	____	☐ male ☐ female	☐ yes ☐ no	☐ yes ☐ no	107-ML 9 - ____	_____

Investigator/Designee Signature: _____ Date: _____

CONFIDENTIAL: This material will not be disclosed or used except as authorized by the Investigator or Sponsor.

Consentement de participation à une étude de recherche clinique
« Études épidémiologiques de la gamétocytémie à *Plasmodium falciparum* et de l'immunité bloquant la transmission à Kéniéroba, au Mali » [**Epidemiologic Studies of *Plasmodium falciparum* Gametocytemia and Transmission-blocking Immunity in Kenieroba, Mali**]

Étude de prélèvement sanguin sur des adulte

Nom du sujet _____ Âge (en années) _____ Nº d'identification de l'étude _____

INFORMATIONS GÉNÉRALES

Nous vous invitons à participer à une étude de recherche intitulée : **« Études épidémiologiques de la gamétocytémie à *Plasmodium falciparum* et de l'immunité bloquant la transmission à Kéniéroba, au Mali » [Epidemiologic Studies of *Plasmodium falciparum* Gametocytemia and Transmission-blocking Immunity in Kenieroba, Mali].** Cette étude est subventionnée par la Faculté de Pharmacie, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), au Mali et par les Instituts Nationaux de la Santé [National Institutes of Health/NIH] des États-Unis. La participation à cette étude est entièrement volontaire. Avant de décider de participer à cette étude, prenez tout le temps nécessaire pour poser toutes les questions que vous pourriez avoir et discuter de cette étude avec quiconque à votre centre de santé local ou avec votre famille, vos amis ou votre médecin traitant ou tout autre professionnel de la santé.

OBJECTIF DE L'ÉTUDE/INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le paludisme est une maladie provenant d'un très petit parasite pouvant s'infiltrer dans l'organisme à la suite d'une piqûre de moustique. Il peut provoquer de la fièvre et d'autres symptômes comme des maux de tête et des douleurs corporelles. En l'absence de traitement, il peut rendre certaines personnes très malades. Lorsqu'un moustique pique une personne infectée par un type particulier de parasite (appelé gamétocyte), il peut alors transmettre l'infection à une autre personne. Chaque personne infectée de parasites n'est pas forcément porteuse de gamétocytes dans son sang et par conséquent pas tout le monde peut transmettre le paludisme à d'autres personnes. Le but de cette étude est de déterminer pourquoi certaines personnes en bonne santé sont porteuses de gamétocytes dans leur sang et d'autres pas. S'il nous était possible d'identifier les personnes porteuses de gamétocytes dans leur sang, nous pourrions alors les traiter et peut-être réduire la quantité de transmission du paludisme dans tout le village.

IDENTIFICATION DE LA POPULATION DE L'ÉTUDE

Vous pouvez participer à cette étude si vous êtes âgé(e) de 18 à 65 ans, en bonne santé, pas enceinte, ni enrôlé(e) dans l'étude de cohorte. Nous prévoyons d'enrôler jusqu'à 100 adultes dans cette étude au cours de l'année à venir.

DESCRIPTION DES PROCÉDURES

Si vous acceptez de participer à cette étude, nous prélèverons jusqu'à 4 cuillerées à soupe de sang de la veine dans votre bras. Grâce à cet échantillon sanguin, nous essaierons de découvrir des informations sur des particularités sanguines empêchant les gamétocytes de se développer chez les moustiques. Il se peut que nous vous invitions à fournir jusqu'à 3 échantillons sanguins supplémentaires au cours de l'année et demie suivante, mais nous attendrons au moins 1 mois entre chaque prélèvement sanguin. Si vous êtes une femme âgée de 14 à 45 ans ou si une grossesse est soupçonnée, nous procéderons à une analyse d'urine avant de prélever votre sang afin de déterminer si vous êtes enceinte. Si c'est le cas, nous ne vous demanderons pas d'échantillon sanguin maintenant ni à l'avenir.

Consentement de participation à une étude de recherche clinique
« Études épidémiologiques de la gamétocytémie à *Plasmodium falciparum* et de l'immunité bloquant la transmission à Kéniéroba, au Mali » [**Epidemiologic Studies of *Plasmodium falciparum* Gametocytemia and Transmission-blocking Immunity in Kenieroba, Mali**]

ALTERNATIVE À LA PARTICIPATION

L'alternative à la participation à cette étude est de ne pas y participer. La non-participation à cette étude ne vous empêchera pas de participer à une étude ultérieure. Si vous souhaitez vous retirer de l'étude, vous pouvez le faire à tout moment.

SANG CONSERVÉ

Nous conserverons une partie du sang prélevé, au cas où nous souhaiterions procéder à des tests supplémentaires à l'avenir, y compris des tests génétiques relatifs au paludisme. Ces échantillons conservés pourront être utilisés par nous et par d'autres investigateurs, uniquement pour des études portant sur le paludisme et seront envoyés à l'étranger, aux États-Unis, pour y être étudiés. Les échantillons seront étiquetés non pas avec votre nom, mais avec un code que seule l'équipe d'étude pourra retracer jusqu'à vous et auquel seuls les investigateurs de l'étude auront accès. Nous conserverons confidentiellement toutes les informations pouvant être retracées jusqu'à vous, dans la mesure autorisée par la loi. En participant à cette étude, vous acceptez que nous puissions conserver vos échantillons sanguins. À tout moment dans l'avenir, vous pouvez contacter le personnel de l'étude ou le Professeur Mahamadou Diakité à l'USTTB pour demander que les échantillons ne soient pas conservés, mais détruits.

DESCRIPTION DES RISQUES ET DES DÉSAGRÉMENTS

Les risques associés à cette étude sont minimes, bien qu'il puisse y avoir des risques imprévisibles. Le prélèvement de sang peut entraîner un certain désagrément, saignement et éventuellement un bleu au site de ponction ; rarement un évanouissement ou une infection. Nous nettoierons votre bras ou doigt avant de procéder au prélèvement sanguin et nous utiliserons de nouvelles aiguilles pour ce faire.

DESCRIPTION DES AVANTAGES ÉVENTUELS

Vous ne retirerez aucun avantage de votre participation à cette étude, mais il est possible que nous fassions l'acquisition de connaissances susceptibles d'aider d'autres personnes.

DESCRIPTION DES COMPENSATIONS

En compensation de votre temps de travail perdu et de votre dérangement pour venir à la clinique, vous recevrez 10 kg de sucre chaque fois que nous prélèverons du sang de votre bras.

DÉCLARATION DE DISCUSSION DES NOUVEAUX RÉSULTATS

Les découvertes réalisées à la suite de cette étude peuvent être rapportées lors de réunions ou dans des revues médicales, sans toutefois mentionner votre nom et les informations spécifiques vous concernant, ne seront pas partagées avec qui que ce soit, excepté les investigateurs de l'étude et les moniteurs cliniques.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Le NIH passe en revue les chercheurs scientifiques membres de son personnel, au moins une fois par an, afin de détecter tout conflit d'intérêts de nature financière ou autre dans le domaine de la recherche sur des sujets humains. Vous pouvez demander à votre équipe de recherche des renseignements supplémentaires ou une copie du Guide d'examen des protocoles (Protocol Review Guide). Ce protocole peut comporter des investigateurs qui ne sont pas des employés du NIH. Il est demandé aux investigateurs n'appartenant pas au NIH d'adhérer aux principes du Guide d'examen des protocoles [Protocol Review Guide], mais ils ne sont pas tenus de rapporter leurs avoirs financiers personnels au NIH.

Consentement de participation à une étude de recherche clinique
« Études épidémiologiques de la gamétocytémie à *Plasmodium falciparum* et de l'immunité bloquant la transmission à Kéniéroba, au Mali » [**Epidemiologic Studies of *Plasmodium falciparum* Gametocytemia and Transmission-blocking Immunity in Kenieroba, Mali**]

LISTE DE CONTACTS

Pour toute question ou préoccupation que vous pourriez avoir concernant votre participation à cette étude, maintenant ou à une date ultérieure, vous pouvez parler à l'un des membres de notre personnel au Centre de santé de Kéniéroba ou transmettre un message au Professeur Mahamadou Diakité à l'USTTB. Vous pouvez également contacter le président du comité d'éthique, à savoir le Dr Marouf Keita à l'hôpital Gabriel Touré de Bamako. Les médecins du Centre de santé de Kéniéroba peuvent vous aider à contacter le professeur Diakité ou Keita.

Si vous acceptez de participer à cette étude, veuillez apposer votre signature ou votre empreinte digitale ci-dessous.

_____	_____	_____
Empreinte digitale - ou -	Signature	Date
	_____	_____
	Signature de l'investigateur	Date
	_____	_____
	Témoin	Date

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

****

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE / BP 1805

☎ : (223) 20 22 52 77 — 🖷 : (223) 20 22 96 58

BAMAKO – MALI

N°2013/_117_/CE/FMPOS

Le Président du Comité
D'Ethique de la FMPOS

Bamako, le 13 décembre 2013

/-)w **Professeur Mahamadou DIAKITE**

Cher Professeur,

J'ai le plaisir de vous informer que votre projet de recherche intitulé 13-I-N107: « **Étude épidémiologique de la gamétocytémie et de l'immunité bloquant la transmission de *Plasmodium falciparum* à Kéniéroba, Commune rurale de Bancoumana, Mali** » et les fiches de consentement éclairé (ICF) #3 version1 du 16 octobre 2013 et d'assentiment #2 version1 du 16 octobre 2013 ont été examinées en comité restreint par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'USTTB.

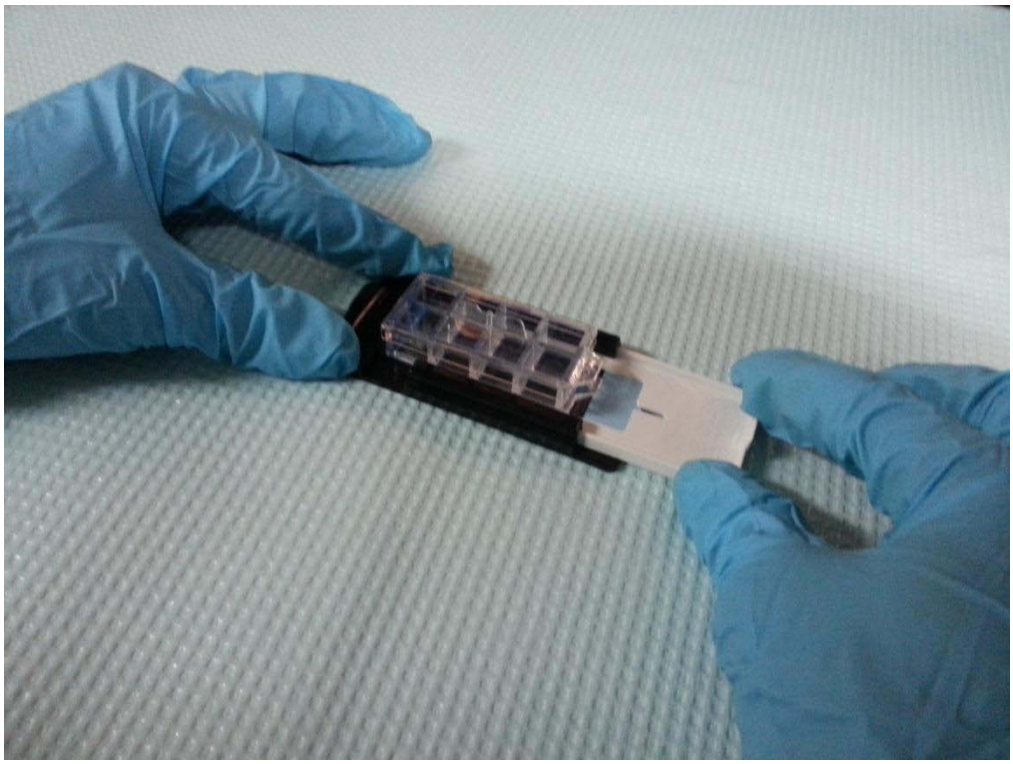
Le comité d'éthique a décidé d'accepter les changements proposés qui permettront d'améliorer la qualité des résultats attendus et par conséquent, vous donne son accord pour la poursuite de vos travaux.

Le comité d'éthique de la FMPOS approuve l'amendement et vous souhaite plein succès dans vos recherches.

P/LE PRESIDENT P.O
LE VICE- PRESIDENT

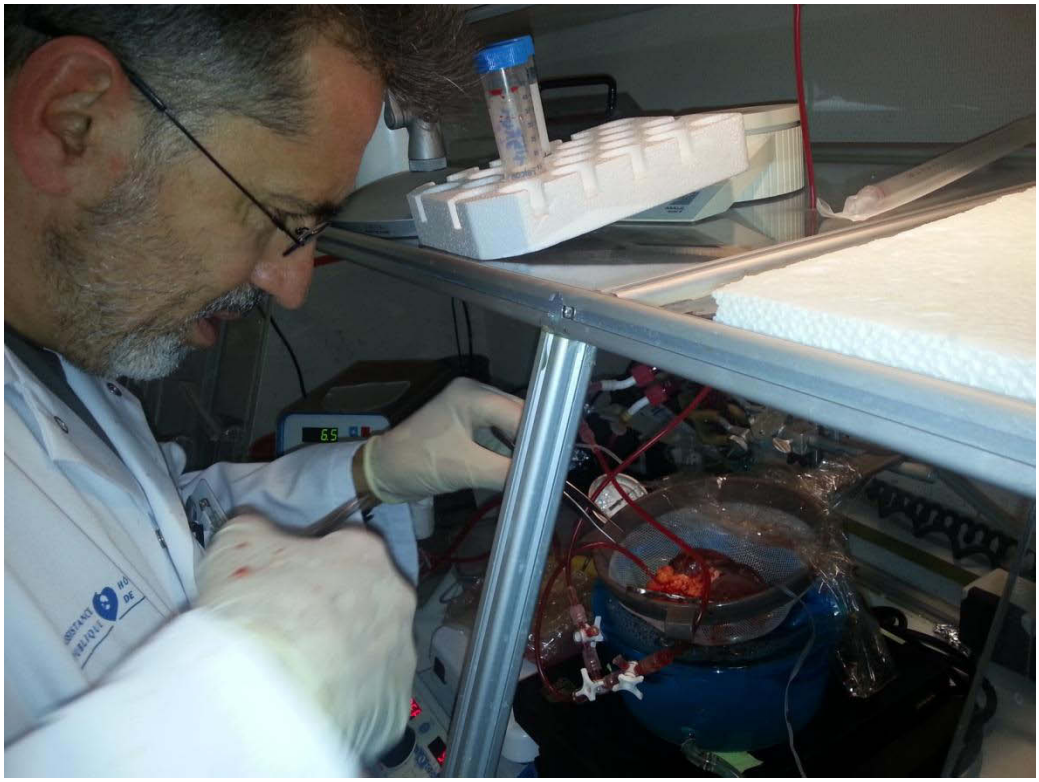
Prof. Amadou DIALLO

Comité d'Ethique de la FMPOS



Lames « LabTek CC-2 coated 8-well chamber slides » (Nalge Nunc International, Rochester, NY)

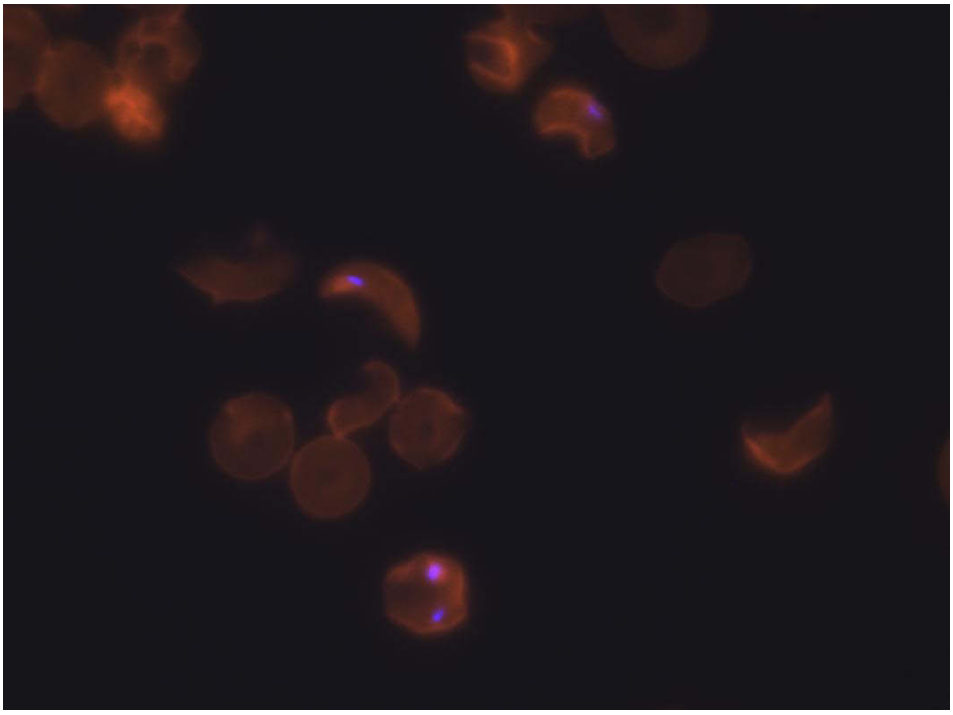
Laboratoire d’immunogénétique MRTC/FMPOS Bamako



Le Pr Buffet lors d'une séance de perfusion de rate humaine isolée ex-vivo au laboratoire de laboratoire de Parasitologie et de Mycologie de la pitié Salpêtrière (CIMI-Paris /U1135) Paris/ France

Image de l'incubateur de Culture du laboratoire d'Immunogénétique du MRTC /FMPOS Bamako (Mali)

Image de microsphiltration en hypoxie sous tente Plastique hermétique au laboratoire de laboratoire de Parasitologie et de Mycologie de la pitié Salpêtrière (CIMI-Paris /U1135) Paris/ France



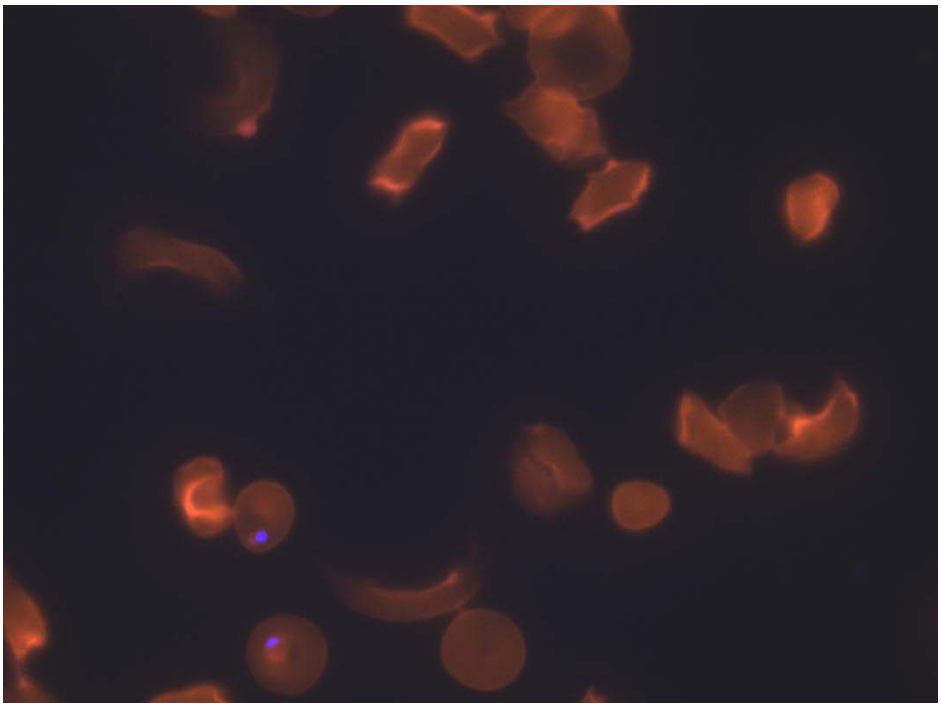


Image superposée de microscopie à Fluorescence (rouge et UV) de frottis d'échantillon de GR parasité exposé à l'hypoxie. (Les GR ont été fixés au Glutaraldéhyde et marqué avec Hoechst 33342)

Liste des papiers scientifiques publiés pendant la période de thèse

1- Mechanical clearance of red blood cells by the human spleen: Potential therapeutic applications of a biomimetic RBC filtration method.

Duez J, Holleran JP, Ndour PA, Pionneau C, **Diakité S**, Roussel C, Dussiot M, Amireault P, Avery VM, Buffet PA. Transfus Clin Biol. 2015 Aug;22(3):151-7.

2- Impact of red blood cell variants on childhood malaria in Mali: a prospective cohort study.

Lopera-Mesa TM, Doumbia S, Konaté D, Anderson JM, Doumbouya M, Keita AS, **Diakité SA**, Traoré K, Krause MA, Diouf A, Moretz SE, STullo G, Miura K, Gu W, Fay MP, Taylor SM, Long CA, Diakité M, Fairhurst RM. *Lancet Haematol. 2015 Apr 1;2(4)*

3- *Plasmodium falciparum* clearance is rapid and pitting independent in immune Malian children treated with artesunate for malaria.

Ndour PA, Lopera-Mesa TM, **Diakité SA**, Chiang S, Mouri O, Roussel C, Jauréguiberry S, Biligui S, Kendjo E, Claessens A, Ciceron L, Mazier D, Thellier M, Diakité M, Fairhurst RM, Buffet PA. *J Infect Dis. 2015 Jan 15;211(2):290-7.*

4- *Ex vivo* cytoadherence phenotypes of *Plasmodium falciparum* strains from Malian children with hemoglobins A, S, and C.

Beaudry JT, Krause MA, **Diakite SA**, Fay MP, Joshi G, Diakite M, White NJ, Fairhurst RM.

PLoS One. 2014 Mar 19;9(3)

5- *Plasmodium falciparum* clearance rates in response to artesunate in Malian children with malaria: effect of acquired immunity.

Lopera-Mesa TM, Doumbia S, Chiang S, Zeituni AE, Konate DS, Doumbouya M, Keita AS, Stepniewska K, Traore K, **Diakite SA**, Ndiaye D, Sa JM, Anderson JM, Fay MP, Long CA, Diakite M, Fairhurst RM.. *J Infect Dis. 2013 Jun 1;207(11):1655-63.*

6- Filariasis attenuates anemia and proinflammatory responses associated with clinical malaria: a matched prospective study in children and young adults.

Dolo H, Coulibaly YI, Dembele B, Konate S, Coulibaly SY, Doumbia SS, Diallo AA, Soumaoro L, Coulibaly ME, **Diakite SA**, Guindo A, Fay MP, Metenou S, Nutman TB, Klion AD. *PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(11).*

7- Plasma uric acid levels correlate with inflammation and disease severity in Malian children with *Plasmodium falciparum* malaria.

Lopera-Mesa TM, Mita-Mendoza NK, van de Hoef DL, Doumbia S, Konaté D, Doumbouya M, Gu W, Traoré K, **Diakité SA**, Remaley AT, Anderson JM, Rodriguez A, Fay MP, Long CA, Diakité M, Fairhurst RM. *PLoS One. 2012;7(10).*

8- α-Thalassemia impairs the cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.

Krause MA, **Diakite SA**, Lopera-Mesa TM, Amaratunga C, Arie T, Traore K, Doumbia S, Konate D, Keefer JR, Diakite M, Fairhurst RM. *PLoS One. 2012;7(5).*

9- A novel cytofluorometric assay for the detection and quantification of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.

Shah SS, **Diakite SA**, Traore K, Diakite M, Kwiatkowski DP, Rockett KA, Wellems TE, Fairhurst RM. *Sci Rep. 2012;2:299.*

Table des illustrations

Figure 1: Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* chez le moustique et chez l'homme 9
Figure 2: pathogénèse du paludisme à *P. falciparum* 13
Figure 3: Distribution géographique mondiale des hémoglobinopathies 25
Figure 4: Structure 3D de l'hémoglobine 26
Figure 5: Structure de la famille des gènes de l'α-globine 29
Figure 6: Distribution globale de l'allèle S et du paludisme. 33
Figure 7 : Schéma des structures comparées des rates chez l'homme et chez la souris. 51
Figure 8 : Structure fine des fentes inter endothéliales au niveau de la paroi des sinus veineux de la pulpe rouge de la rate humaine. 52
Figure 9 : Le splenon: L'unité fonctionnelle de la filtration splénique des GR 56
Figure 10 : Dimensions et géométrie des fentes inter endothéliales et déformations correspondantes des globules rouges 66
Figure 11 : *Illustration spéculative du rôle possible de la rétention splénique des GR parasités circulants, dans l'évolution du paludisme vers les différentes formes cliniques* 72
Figure 12: Plan de la démarche expérimentale de l'article 1 77
Figure 13: Plan de la démarche expérimentale de l'article 2 82
Figure 14 : Schéma de la microsphiltration 85
Figure 15: Plan de la démarche expérimentale de l'article 3 86
Figure 16: Plan de la démarche expérimentale pour la perfusion *ex vivo* des rates 90
Figure 17 : Proposition de mécanismes de la protection conférée par les hémoglobinopathies 103

Liste de tableaux

Tableau 1: Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme [14] 11
Tableau 2: Tableau récapitulatif des études épidémiologiques sur les hémoglobinopathies et le paludisme 36
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des études sur les mécanismes de la protection conféré par les Hémoglobinopathies contre le paludisme 45

Résumé

La forte prévalence des hémoglobinopathies, notamment l'HbAS, l'HbC et l'α-thalassémie dans des zones d'endémie palustre est considérée comme la conséquence de la protection qu'elles procurent contre les formes létales du paludisme. De nombreux mécanismes ont été évoqués pour expliquer cette protection, ne sont pas cohérentes avec toutes les observations épidémio-cliniques disponibles. La première partie de ces travaux de thèse a abordé la réduction de la cytoadhérence des globules rouges (GR) parasités comme mécanisme potentiel commun aux trois hémoglobinopathies. Pour explorer plus en profondeur ce mécanisme, nous avons mené une étude comparative des phénotypes de cytoadhérence des isolats primaires de *P. falciparum* obtenus chez des patients HbAS et HbAC et HbAA. Cela avait pour but de déterminer si l'HbAS et l'HbAC jouaient un rôle dans la sélection et le maintien des souches virulentes de *P. falciparum* dans la nature. La deuxième partie de la thèse a concerné l'influence du trait drépanocytaire (HbAS) sur la déformabilité des GR non parasités d'une part et sur la rétention splénique des GR non parasités et parasités par les formes jeunes de *P. falciparum* d'autre part.

Nous avons observé que l'adhésion des GR parasités aux cellules endothéliales micro-vasculaires humaines ainsi qu'aux monocytes était réduite avec les GR α-thalassémiques par rapport aux GR HbAA. Aucune différence statistiquement significative n'a en revanche été observée entre les profils de cytoadhérence des isolats primaires de *P. falciparum* issus de sujets HbAA, HbAS ou HbAC. L'étude de la déformabilité des GR a montré que les GR HbAS sont légèrement mais significativement moins déformables que les GR HbAA. En revanche, les GR HbAS parasités par les jeunes parasites de *P. falciparum* (anneaux) n'étaient pas plus retenus que leurs homologues HbAA dans la rate humaine isolé perfusée *ex vivo*, ou en microsphiltration, quelles que soient les conditions d'oxygénation. Nous n'avons observé aucune différence au niveau du taux de falciformation entre les GR parasités et non parasités que ce soit avec les GR HbAS ou avec les GR HbSS.

En conclusion, nous proposons que la réduction de la cythoadhérence et la rétention splénique des GR contenant les formes matures de *P. falciparum* constituent un mécanisme commun à la protection des sujets HbAS, HbC et α-thalassémiques contre le paludisme. Ces deux phénomènes interconnectés peuvent rendre compte de l'ensemble des observations épidemio-cliniques disponibles sur la protection conférée par ces hémoglobinopathies.

Mots clés : Paludisme, Globule rouge, Hémoglobinopathie, Cytoadhérence, Rétention splénique, Protection.

Summary

The high prevalence of several inherited hemoglobin disorders, namely sickle cell trait (HbAS), HbAC and α-thalassemia, in malaria endemic areas is thought to be the consequence of their protective effects against malaria life-threatening manifestations. Numerous potential mechanisms have been proposed to explain this protective effect although many of them are not fully consistent with all available epidemiologic and clinical data. The first part of this thesis work explored the reduction of cytoadherence of infected RBC as a potential common mechanism for α-thalassemia-, HbAS- and HbAC-induced protection against malaria. To further explore this mechanism, and determine whether HbAS and HbAC select and maintain virulent *P. falciparum* parasite in nature, we compared the cytoadherence phenotype of *P. falciparum* isolates obtained from HbAS/HbAC and controls HbAA patients. The second part of the thesis work addressed the influence of HbAS on the deformability of uninfected RBC as well as the splenic retention of both uninfected RBCs and ring-infected RBCs.

We observed a reduced adherence of α-thalassemic infected RBCs to human micro-vascular endothelial cells and monocytes compared to controls HbAA infected RBCs. The reduction was correlated to the number of non functional α- gene. Expression of PfEMP-1 on the surface of α-thalassemic infected RBCs was lower than on the surface of HbAA infected RBCs. There was no statistically significant difference between the cytoadherence of *P. falciparum* isolates obtained either from HbAS/HbAC or control HbAA malaria patients.

The deformability of uninfected HbAS RBCs was slightly but significant lower than that of control uninfected HbAA RBCs. Retention rates of ring-infected HbAS and HbAA RBCs were similar either in human isolated spleen perfusion *ex vivo* and in microsphilters *in vitro* regardless of the oxygenation level. We did not observe any enhanced sickling of ring-infected RBCs compared to non infected RBCs, both in HbAS and HbSS samples.

Based on these results along with available epidemiologic and previous experimental data, we propose a common malaria-protective mechanism of HbAS, HbAC and α-thalassemia whereby these hemoglobin disorders reduce the cytoadherence of mature *P. falciparum*-infected RBCs that stay in circulation where they are exposed to an enhanced splenic retention. These 2 mechanisms would act in conjunction to slower the rise of parasites loads in infected patients and protect them from sequestration-related complications of malaria.

Key words: Malaria, Red blood cell, Hemoglobinopathy, Cytoadherence, Splenic retention, Protection.