



**HAL**  
open science

# Étude de la modulation, par l'hémoglobine S, de la présentation des antigènes plasmodiaux à la surface du globule rouge infecté par *Plasmodium falciparum*, et de la réponse immunitaire contre le paludisme

Margaux Chauvet

► **To cite this version:**

Margaux Chauvet. Étude de la modulation, par l'hémoglobine S, de la présentation des antigènes plasmodiaux à la surface du globule rouge infecté par *Plasmodium falciparum*, et de la réponse immunitaire contre le paludisme. Microbiologie et Parasitologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019USPCB037 . tel-03131215

**HAL Id: tel-03131215**

**<https://theses.hal.science/tel-03131215v1>**

Submitted on 4 Feb 2021

**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 Paris Descartes

**Ecole Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité**

UMR261 IRD/UPD - « Mère et enfant en milieu tropical : pathogènes,  
système de santé et transition épidémiologique »

---

**Etude de la modulation, par l'hémoglobine S, de la  
présentation des antigènes plasmodiaux à la surface du globule  
rouge infecté par *Plasmodium falciparum*, et de la réponse  
immunitaire contre le paludisme**

---

**Par Margaux Chauvet**

**Thèse de doctorat d'Infectiologie-Microbiologie**

Dirigée par Adrian J.F. LUTY

Co-encadrée par Anaïs MERCKX et Florence MIGOT-NABIAS

Présentée et soutenue publiquement le 19 Avril 2019

Devant un jury composé de :

Mr le Dr. Stéphane EGEE	Rapporteur
Mme le Dr. Sylviane PIED	Rapporteur
Mme le Dr. Najma RACHIDI	Examineur
Mr le Dr. Olivier SILVIE	Examineur
Mr le Dr. Adrian J.F. LUTY	Directeur de thèse
Mme le Dr. Anaïs MERCKX	Co-encadrante
Mme le Dr. Florence MIGOT-NABIAS	Co-encadrante

*« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien: il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées »*

Marie Curie

# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury pour avoir pris le temps d'évaluer ce travail. Merci aux Dr. Stéphane EGEE et au Dr. Sylviane PIED d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'au Dr. Najma RACHIDI et au Dr. Olivier SILVIE d'en être examinateurs.

Je souhaite aussi adresser tout mes remerciements au GR-Ex, qui a financé une partie des projets de cette thèse, ma prolongation de 6 mois me permettant d'achever mes travaux, et pour m'avoir permis de participer à la « Gordon Research Seminar - Red Cells » à Newport en Juillet 2017.

Un grand merci au Dr. Philippe DELORON, qui m'a accueillie au sein de l'UMR216 pendant quatre années pour mon stage de Master 2 et mon doctorat, ainsi qu'au Dr. André GARCIA, qui dirige l'unité depuis janvier 2019, sous le nom d'UMR261.

Une immense merci à Anaïs MERCKX. Plus qu'une encadrante, tu m'as soutenue et épaulée pendant ces quatre années. Travailler avec toi fut un immense plaisir. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, pour ton implication (24h/24h, 7j/7 !), tes conseils, et ta gentillesse. Tu as partagé avec moi tes connaissances, ton expérience et ta passion pour la recherche ce qui m'a permis de vivre une thèse très dynamique et enrichissante. Ce projet n'a pas toujours été facile, mais tu as toujours fait en sorte qu'il se déroule au mieux. Merci de t'être battue pour ça ! Je garderai de très bons souvenirs de ce travail effectué à tes côtés.

Tous mes remerciements vont également à Florence MIGOT-NABIAS, qui m'a aussi accompagnée pendant ces quatre années. Merci pour ta disponibilité, tes conseils, et ton expérience. Pour la confiance que tu m'as accordée durant cette thèse, et ton implication m'ayant permis de réaliser ce doctorat dans des conditions optimales.

Un grand merci à Adrian J.F. LUTY, qui a accepté d'être le directeur de cette thèse. On ne se connaissait pas avant le début de ce doctorat, mais tu m'as toujours fait confiance. Merci pour ton aide et ta disponibilité, malgré la distance. Tes conseils et ton expérience m'ont beaucoup aidée pour avancer tout au long de ce doctorat.

Murielle, ma Mumu, ma Mme Butterfly. Merci pour tout ce que tu m'as montré et appris pendant ces 4 années (les coups de pipettes !), et pour toute l'aide que tu m'as apportée. Merci pour les week-ends et les nuits où tu m'as accompagnée au laboratoire pour s'occuper des parasites. Et surtout pour ta gentillesse et ta bonne humeur. J'ai adoré travailler avec toi, on formait une superbe équipe ! Merci pour tout !

Mes remerciements vont aussi à Gilles COTTRELL et à Jaqueline MILET pour leur temps et leur disponibilité pour les analyses statistiques que nous avons réalisées ensemble. Gilles, un grand merci pour ta réactivité, même dans les moments de stress (^^).

Je souhaite remercier Nathalie KAPEL, qui m'a proposé de rejoindre l'équipe d'encadrement des TPs de Parasitologie et Mycologie de 3<sup>ème</sup> année de pharmacie. Merci à Nicolas ARGY, Jérôme CLAIN, Sandrine HOUZE, Denis MAGNE, Audrey SABBAGH, Murielle et Anaïs, aux côtés desquels j'ai pris beaucoup de plaisir à découvrir l'enseignement.

Je tiens aussi à remercier Florentin AUSSÉNAC, Emeline BROSSIER, Luc DENOYEL, Marion HANNY, Damien PINEAU, et Jocelyne ROMAN qui m'ont aidée pour la réalisation de plusieurs expériences et ont contribué à l'obtention de certains résultats de ma thèse.

Un grand merci au Dr. Yves COLIN, au Dr. Caroline Le VAN KIM et à tous les membres de l'UMR\_S 1134 pour l'accueil chaleureux dont j'ai bénéficié dans votre unité et dans l'équipe 1. J'ai partagé plusieurs mois à vos côtés, et ce fut un réel plaisir. Travailler dans votre unité m'a permis d'obtenir de nombreux résultats pour ma thèse, et je vous remercie pour l'aide que vous m'avez apportée. Je tiens à remercier particulièrement Alioune, Bérangère, Cédric, Claude, Jacques, Lydie, Mickaël, Mahmoud, Maria, Marie-Catherine, Martina, Patricia, Pierre, Romain, Sara, Sandrine, Sébastien, Thierry, et Wassim pour l'aide qu'ils m'ont apportée. Je souhaite remercier particulièrement Slim AZOUZI qui m'a prise sous son aile et m'a permis d'avancer dans cette thèse. Merci pour toutes les idées que tu as eues, pour les discussions scientifiques que nous avons partagées. Merci pour ton implication pour mes projets, et pour la confiance que tu m'as accordée. J'ai adoré travailler avec ton équipe, et tester toutes les questions scientifiques que nous nous sommes posées !

Je tiens à remercier l'équipe de Benoît GAMAIN, avec laquelle j'ai travaillé pendant plusieurs semaines. Merci à Arnaud, Dominique, Jean-Philippe, Sylvain et Zeineb pour votre accueil, votre disponibilité et votre aide. Un grand merci à Marilou TETARD, avec laquelle j'ai travaillé sur les échantillons de la cohorte STOPPAM. Malgré les difficultés que nous avons rencontrées, je suis très heureuse d'avoir effectué cette étude avec toi, et très contente que nous ayons réussi à aller au bout de ce projet.

Je tiens également à remercier l'équipe de la plateforme de protéomique Paris-Descartes 3P5 de Necker: Chiara GUERRERA, Joanna LIPECKA, et Cerina CHHUON pour leur collaboration et les analyses réalisées. Je suis très contente d'avoir travaillé avec vous, et je suis ravie des résultats que nous avons réussi à obtenir après toutes ces heures de travail !

Une grosse pensée pour la team TPP, Claire, Romain, et Sissoko. Pour la cohésion dont nous avons fait preuve, et l'amitié qui s'est tissée entre nous. Nous avons commencé cette thèse presque

tous en même temps. Aujourd'hui, l'aventure du doctorat se termine pour moi, mais j'espère que celle de notre groupe continuera.

BIG HUP à mes collègues de bureau qui sont devenus mes amis, la team TPP, Diana, Emilie, Guillaume, Jérémy, Laure, Laurine, Léa, Puthy et Valentin. J'ai passé de superbes moments à vos côtés. J'espère continuer de vous retrouver à l'académie. Merci pour l'aide que vous avez pu m'apporter, mais aussi et surtout pour tous les moments de rire et de discussion que nous avons passés ensemble.

Je souhaite également remercier tous les autres membres de l'UMR261 pour leur accueil chaleureux et tous les bons moments partagés : Alexandra, Alexandre, Azizath, Bernard, Brigitte, Carine, Carmen, Célia, Cornélia, David, Edwidge, François, Friso, Gino, Gwladys, Isabelle, Isabelle, Jean-Yves, Jemila, Komi, Laura, Laura, Léonidas, Magalie, Manfred, Michel, Nadine, Nicaise, Pascale, Rachida, Rafiou, Richard, Romain, Sayeh, Tania, Tatiana, Valérie et Violeta. Merci à Jean-Gérard d'avoir veillé sur ma santé et tout particulièrement sur mon hypertension pendant ce doctorat. Je le rappelle ici, « ni sel, ni sucre ajouté !! ».

Tous mes remerciements vont aussi au Dr. Jean-Antoine RIBEIL, au Dr. Sandra MANCEAU et aux donateurs volontaires, qui nous ont permis d'obtenir les échantillons nécessaires pour nos travaux. Un grand merci à l'infirmier, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

C'est avec beaucoup d'émotion que je souhaite remercier mes proches et ma famille. Cette thèse n'aurait pas été la même sans votre soutien.

A mes parents et ma sœur, qui ont été présents depuis le début de mes études, qui m'ont soutenue et supportée aussi bien dans les moments heureux que difficiles. Je suis ravie que vous soyez là à mes côtés aujourd'hui pour l'aboutissement de tout ce travail.

A ma famille, mes grands-parents, mes oncles, mes tantes, et mes cousines, qui sont toujours là pour célébrer avec moi les grandes étapes de ma vie, et avec qui j'ai une fois de plus l'immense plaisir de partager ce moment.

A mes amis, Alex, Anice, Annaëlle, Anthony, Aurore, Barbara, Camille, Caribou, Caroline, Cédric, Chloé, Clément, Coline, Florimond, Gab, Gala, Grégoire, Jean-Medhi, Joris, Julie, Juliette, Laurène G., Laurène J., Lucie, Madeleine, Manon, Marjolaine, Matthieu, Maud, Mohammed, Morgane. LB., Morgane R., Pierre, Sabine, Valentine et Yasmine, avec lesquels j'ai partagé des moments inoubliables pendant ces trois années de thèse. Des treks de folies dans les montagnes, une course de 18h non stop à vélo, un mariage dans un palais à Marrakech, mais aussi le simple plaisir de la vie quotidienne à vos côtés. Une pensée toute particulière pour Mallory et Mathilde. Nous avons vécu et partagé en même temps l'expérience de la thèse. Mathilde, tout au long de ces

kilomètres que nous avons faits en courant ; Mallory, pendant ces heures passées au téléphone, malgré la distance.

A toi, Nicolas, pour ton soutien sans faille, ton affection, tes conseils et tes encouragements. Pour la patience dont tu as fait preuve pour me supporter dans les moments de difficultés et de doute, mais aussi pour l'écoute que tu m'as apportée. Il faut le dire, certaines idées d'expérience me sont venues en discutant avec toi. Tu as suivi le déroulement de ma thèse avec précision, et je suis sûre que tu pourrais en présenter une partie tellement je t'en ai parlé. Merci d'avoir toujours été présent à mes côtés pendant ces trois années ♥.

C'est avec beaucoup d'émotion que j'adresse une pensée toute particulière pour Françoise, que j'admire pour sa force, son courage, et surtout son éternel sourire.

# Sommaire

---

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	7
LISTE DES ABREVIATIONS	11
TABLES DES ILLUSTRATIONS	15
<b>1-INTRODUCTION</b>	19
1.1. Le paludisme, première parasitose mondiale	20
1.1.1. Epidémiologie, répartition géographique et manifestations cliniques du paludisme	20
1.1.2. Agents pathogènes responsables du paludisme	22
1.1.3. Cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	23
1.1.4. Lutte contre le paludisme : diagnostic, traitements et prévention	25
1.1.4.1. Méthodes de diagnostic du paludisme	26
1.1.4.2. Traitements curatifs et prophylactiques	28
a. Les dérivés quinoléiques	28
b. Les dérivés de l'artémisinine	29
c. Les anti-métabolites	29
d. Les antibiotiques	29
1.1.4.3. Prévention	31
a. Traitements préventifs	31
b. Développement de vaccins contre le paludisme	31
c. Lutte et protection contre le vecteur du paludisme	35
1.2. Développement intra-érythrocytaire de <i>Plasmodium falciparum</i>	36
1.2.1. Multiplication asexuée au sein du globule rouge	36
1.2.2. Les protéines PfEMP1 sont responsables de la cytoadhérence	40
1.2.3. Cytoadhérence des globules rouges infectés dans le placenta : le paludisme de la femme enceinte	41
1.3. Interaction du parasite avec sa cellule hôte, le globule rouge	43
1.3.1. Le squelette érythrocytaire	43
1.3.1.1. Cytosquelette de spectrine-actine	43
1.3.1.2. Ancrage du cytosquelette spectrine-actine à la membrane	44
1.3.1.3. Le complexe ankyrine	45
1.3.1.4. Le complexe jonctionnel d'actine	47
1.3.2. Importance du cytosquelette du globule rouge pour le développement intra-érythrocytaire de <i>P. falciparum</i>	50
1.3.2.1. Invasion et formation de la vacuole parasitophore	50
1.3.2.2. Trafic protéique et Maurer's Clefts	54
1.3.2.3. Propriétés membranaires et cytoadhérence	55
1.3.2.4. Sortie des mérozoïtes à la fin du cycle érythrocytaire	59
1.4. Le paludisme participe à la sélection positive de l'hémoglobine S	61

1.4.1. L'hémoglobine, protéine majeure des globules rouges	61
1.4.2. L'hémoglobine S, associée à la drépanocytose	61
1.4.3. Hémoglobine S et stress oxydant	63
1.4.4. L'hémoglobine S confère une protection relative contre le paludisme	65
1.4.5. Autres désordres du globule rouge conférant une protection contre le paludisme	68
1.4.5.1. Le déficit en Glucose-6-Phosphate Deshydrogénase	68
1.4.5.2. L'alpha-thalassémie	72
1.5. Mécanismes protecteurs de l'hémoglobine S contre le paludisme	76
1.5.1. Modulation de l'export des protéines parasitaires	76
1.5.2. Modulation de la présentation de PfEMP1 et de la cytoadhérence	77
1.5.3. Modulation de l'activation endothéliale lors de la cytoadhérence	80
1.5.4. Altération de la croissance parasitaire dans les globules rouges HbAS	80
1.5.5. L'hémoglobine S génère un stress oxydant altérant le développement parasitaire	82
1.5.6. L'hémoglobine S induit la production d'hème oxygénase-1	83
1.5.7. Les globules rouges porteurs d'hémoglobine S sont plus efficacement éliminés	84
1.5.8. Rôle de l'immunité dans la protection conférée par l'hémoglobine S	86
1.5.9. Mécanismes de résistance conférés par d'autres désordres érythrocytaires	88
<b>2-OBJECTIFS DE THESE</b>	89
2.1. Objectifs principaux de la thèse	90
2.2. Quel est l'impact de l'altération par l'hémoglobine S de la présentation de PfEMP1 à la surface des globules rouges HbAS sur la réponse immune anti-palustre ?	91
2.3. Quels sont les mécanismes à l'origine de l'altération de la présentation des antigènes à la surface du globule rouge HbAS infecté par <i>P. falciparum</i> ?	92
<b>3-CHAPITRE 1 : Modulation, par l'hémoglobine S, de la réponse immune contre le globule rouge infecté par <i>Plasmodium falciparum</i> dans le cadre du paludisme gestationnel</b>	94
3.1. Présentation et objectifs du projet	95
3.2. Matériels et méthodes	98
3.2.1. Réalisation de la sous-cohorte STOPPAM	98
3.2.2. Vérification du génotype d'hémoglobine par PCR-RFLP	99
3.2.3. Détermination du génotype G6PD par PCR-RFLP	101
3.2.4. Caractérisation du génotype alpha-thalassémie par PCR multiplexe	104
3.2.5. Culture parasitaire de <i>P. falciparum</i>	105
3.2.5.1. Obtention de sang de porteurs d'hémoglobine anormale	105
3.2.5.2. Conditions de culture de <i>P. falciparum</i>	106
3.2.5.3. Evaluation de la parasitémie des cultures parasitaires	106
3.2.5.4. Synchronisation des cultures par sorbitol	106
3.2.5.5. Infection des globules rouges HbAS - Synchronisation par MACS	106
3.2.6. Mesure du taux de liaison des plasmas à la surface des érythrocytes infectés par cytométrie en flux	107
3.2.7. Mesure de l'inhibition de cytoadhérence par des plasmas	107
3.2.8. Analyses statistiques	108
3.3. Article	109

3.4. Résultats non inclus dans l'article	129
3.4.1. Résultats des géotypages	129
3.4.1.1. Vérification du géotype du donneur HbAS	129
3.4.1.2. Géotypage HbS/C, G6PD et alpha-thalassémie des femmes de la cohorte	130
a. Géotypage HbS/C	130
b. Géotypage G6PD	131
c. Géotypage alpha-thalassémie	132
3.4.2. Les anticorps d'un même plasma ont une reconnaissance plus importante des antigènes de la surface de globules rouges HbAA que HbAS infectés	133
3.4.3. Etude de l'inhibition, par les plasmas, de la cytoadhérence à la CSA des érythrocytes HbAA et HbAS infectés selon le polymorphisme érythrocytaire des mères	133
3.5. Discussion	136
<b>4-CHAPITRE 2 : Modulation, par l'hémoglobine S, du protéome et du phosphoprotéome de la membrane du globule rouge infecté par <i>Plasmodium falciparum</i></b>	139
4.1. Présentation et objectifs du projet	140
4.2. Matériels et méthodes	143
4.2.1. Vérification du portage d'anomalies érythrocytaires	143
4.2.2. Culture parasitaire de <i>P. falciparum</i>	143
4.2.2.1. Obtention de sang de porteurs d'hémoglobine anormale	143
4.2.2.2. Culture de <i>P. falciparum</i> dans les globules rouges HbAA et HbAS	144
4.2.2.3. Suivi de la croissance parasitaire par cytométrie en flux	144
4.2.3. Préparation des extraits membranaires de globules rouges infectés par <i>P. falciparum</i>	146
4.2.3.1. Préparation des ghosts érythrocytaires	146
4.2.3.2. Préparation des lysats érythrocytaires	146
4.2.4. Etude protéomique des lysats par Western-Blot	147
4.2.5. Etude des protéines par spectrométrie de masse	147
4.3. Résultats	150
4.3.1. Géotypages d'hémoglobine, G6PD et alpha-thalassémie des donneurs	150
4.3.2. Comparaison de la croissance de <i>P. falciparum</i> dans les hématies HbAA et HbAS	152
4.3.3. Protéome et phosphoprotéome de la membrane des érythrocytes en fonction de l'infection par <i>P. falciparum</i> et du portage hétérozygote de l'HbS	154
4.3.3.1. Protéome des protéines érythrocytaires de la membrane du globule rouge HbAA et HbAS non infecté et infecté par <i>P. falciparum</i>	155
4.3.3.2. Phosphoprotéome des protéines érythrocytaires de la membrane du globule rouge HbAA et HbAS non infecté et infecté par <i>P. falciparum</i>	158
4.3.3.3. Protéome et phosphoprotéome des protéines parasitaires de la membrane du globule rouge HbAA et HbAS infecté par <i>P. falciparum</i>	162
4.3.4. Modulation de la phosphorylation de tyrosines de la Bande 3 selon l'infection et le géotype HbAS	164
4.3.5. Croissance de <i>P. falciparum</i> dans les globules rouges Lu-CAM et ENT1 null	166
4.4. Discussion	168
<b>5-DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	177

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	186
<b>ANNEXES</b>	225
1. Posters présentés en congrès	226
2. Présentations orales	230
3. Publications	230
<b>RESUME</b>	231

# Liste des abréviations

---

$\alpha$  : Alpha  
 $\beta$  : Béta  
 $\gamma$  : Gamma  
 $\chi^2$  : (test) de « chi-deux »  
AA : Acide Aminé  
ABCB6 : « ATP-Binding Cassette sub-family B member 6 » (ABCB6)  
ACT : « Artemisinin-based Combination Therapy »  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
AHA : « Acute Hemolytic Anemia » ou Anémie Hémolytique Aiguë  
AMA1 : « Apical Membrane Antigen 1 »  
ARN : Acide RiboNucléique  
BCA : « BiCinchoninique Assay » ou dosage colorimétrique basé sur l'acide bicinchoninique  
BSA : « Bovine Serum Albumin » ou Sérum Albumine Bovine  
CaM : CalModuline  
Ca<sup>2+</sup> : Calcium  
CdB3 : « Cytoplasmic domain of Band 3 » ou Domaine Cytoplasmique de Bande 3  
CIDR : « Cystein-rich InterDomain Region »  
Cl<sup>-</sup> : Chlorure ou ion chlorure  
CNRGS : Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins  
CNSHA : « Chronic NonSpherocytic Hemolytic Anemia » ou Anémie Hémolytique Chronique Non Sphérocytique  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone  
CSA : Chondroïtine Sulfate A  
CSP : « CircumSporozoite Protein »  
DBL : « Duffy Binding-Like »  
DC : Domaine Cassette  
DHA : DiHydroArtémisinine  
DHFR : DiHydroFolate Réductase  
DHPS : DiHydroPtéorate Synthétase  
dNTP : Désoxyribonucléotide  
DO : Densité Optique  
DTT : DiThioThréitol  
EBP ou EBA : « Erythrocyte Binding like Protein » ou « Erythrocyte Binding like Antigen »  
EBA-175 : « Erythrocyte Binding Antigen-175 »  
ECL : « ElectroChemiLuminescence »  
EDTA : ÉthylèneDiamineTétraAcétique ou acide éthylènediaminetétraacétique  
EDV : « Electron Dense Vesicle » ou Vésicules Denses aux Electrons  
EFS : Etablissement Français du Sang  
ELISA : « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »  
ENT1 : « Equilibrative Nucleoside Transporter 1 »  
EPCR : « Endothelial Protein C Receptor »

FACS : « Fluorescence-Activated Cell Sorting »  
 FASP : « Filter Aided Sample Preparation »  
 FDR : « False Discovery Rate »  
 Fe<sup>2+</sup> : Fer ferreux  
 Fe<sup>3+</sup> : Fer ferrique  
 GLURP : « GLUtamate-Rich Protein »  
 GLUT1 : « GLUcose Transporter-1 » ou Transporteur de GLUcose 1  
 GPA : GlycoPhorine A  
 GPB : GlycoPhorine B  
 GPC : GlycoPhorine C  
 GR : Globule Rouge  
 GSH : Glutathion réduit  
 G3PD : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase  
 G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase  
 Hb : Hémoglobine  
 HE : « Hereditary Elliptocytosis » ou Elliptocytose héréditaire  
 HEBP1 : « HEMe-Binding Protein 1 »  
 HEPES : acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique  
 HO : Hoechst  
 HO-1 : Hème Oxygénase-1  
 HPLC : « High-Performance Liquid Chromatography » ou Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance  
 HRP : « Horse Radish Peroxidase » ou peroxydase de raifort  
 HS : « Hereditary Spherocytosis » ou Sphérocytose Héréditaire  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Péroxyde d'hydrogène  
 ICAM1 : « InterCellular Adhesion Molecule 1 »  
 IDT : « Integrated DNA Technologies »  
 iGR : Globule rouge infecté  
 INOD : « Indolone-N-OxiDes »  
 INTS : Institut National de la Transfusion Sanguine  
 IRD : Institut de Recherche pour le Développement  
 KAHRP : « Knob-Associated Histidine-Rich Protein »  
 kDa : KiloDalton  
 K<sup>+</sup> : Potassium ou ion potassium  
 LAMP : « Loop-mediated isothermal AMPlification »  
 LBW : « Low Birth Weight » ou petit poids de naissance  
 LDH : Lactate DésHydrogénase  
 LFQ : « Label-Free Quantification »  
 Lu-BCAM : « Lutheran-Basal Cell Adhesion Molecule »  
 M/z : Masse/charge  
 MAHRP2 : « Membrane-Associated Histidine-Rich Protein 2 »  
 MACS : « Magnetic-Activated Cell Sorting »  
 MBD : « Membrane Binding Domain »  
 ME : « Multiple Epitope »

MESA : « Mature parasite-infected Erythrocyte Surface Antigen »  
 MFI : « Mean Fluorescence Intensity » ou Moyenne d'Intensité de Fluorescence  
 MS : « Mass Spectrometry » ou Spectrométrie de Masse  
 MSP : « Merozoite Surface Protein »  
 NADPH : Forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
 NEB : « New England Biolabs »  
 NO : « Nitric Oxide » ou Oxyde Nitrique  
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
 O<sub>2</sub> : Oxygène (dioxygène)  
 PAGE : « PolyAcrylamide Gel Electrophoresis »  
 PAM : « Pregnancy-Associated Malaria » ou Paludisme associé à la grossesse  
 PFA : ParaFormaldéhyde  
 Pb : Paire de bases  
 PBMC : « Peripheral Blood Mononuclear Cell »  
 PBS : « Phosphate Buffered Saline »  
 PCR : « Polymerisation Chain Reaction » ou Réaction de Polymérisation en chaîne  
 PE : Phyco-Erythrine  
 PEXEL : « *Plasmodium falciparum* Exported Element »  
 PfEMP1 : « *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 »  
 PfEMP3 : « *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 3 »  
 PfHRP2 : « *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 »  
 PFK : PhosphoFructoKinase  
 PfPPT1 : « *Plasmodium falciparum* PfEMP1 Trafficking Protein 1 »  
 PfRH5 : « *Plasmodium falciparum* Reticulocyte binding protein Homologue 5 »  
 PfSBP1 : « *Plasmodium falciparum* Skeleton Binding Protein 1 »  
 PfSUB1 : « *Plasmodium falciparum* SUBtilisin-like 1 »  
 PK : Pyruvate Kinase  
 PKA : Protéine Kinase A  
 PKC : Protéine Kinase C  
 PNEP : « PEXEL/HT Negative Exported Protein »  
 PPM : « Parasite Plasma Membrane » ou Membrane Plasmique Parasitaire  
 PPN : Plateau Protéome Necker  
 PS : Phosphatidyl-Sérine  
 PTA : « Protein Transport Aggregate »  
 PTB : « PreTerm Birth » ou naissance prématurée  
 PTEX : « *Plasmodium* Translocon of EXported proteins »  
 PV : « Parasitophorous Vacuole » ou Vacuole Parasitophore  
 PVM : « Parasitophorous Vacuole Membrane » ou Membrane de la Vacuole Parasitophore  
 RBL ou Rh : « Reticulocyte Binding Like Homologue »  
 RE : Réticulum Endoplasmique  
 RESA : « Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen »  
 RFLP : « Restriction Fragment Length Polymorphism »  
 ROM1 : « Rhomboid protease 1 »  
 RON2 : « Rhoptry Neck protein 2 »

ROS : « Reactive Oxygen Species » ou Espèces réactives de l'oxygène  
RPAL : RPMI- ALbumax  
RPAS : RPMI- Albumax-Sérum  
Rpm : Rotation par minute  
RPMI : « Roswell Park Memorial Institute »  
SABD : « Spectrin-Actin BinDing »  
SAO : « Southeast Asian Ovalocytosis » ou Ovalocytose d'Asie du Sud-Est  
SDS : « Sodium Dodecyl Sulfate »  
SERA : « SERine-Repeat Antigen »  
Ser/S : Sérine  
SOD : « SuperOxyde Dismutase »  
STOPPAM : « Strategies To Prevent Pregnancy-Associated Malaria »  
SVF : Sérum de Veau Fœtal  
TA : Température Ambiante  
TBE : Tris Borate EDTA  
TBS : « Tris Buffered Saline »  
TDR : Test de Diagnostic Rapide  
Thr/T : Thréonine  
TiO<sub>2</sub> : Dioxyde de titane  
TMB : 3,3',5,5'-TétraMéthylBenzidine  
TO : Thiazole Orange  
TPI : Traitement Préventif Intermittent  
TRAP : « Thrombospondin-Related Adhesion Protein »  
Tyr/Y : Tyrosine  
U : Unité enzymatique  
UV : Ultra-Violet  
VAR2CSA : « Variant Antigen Surface 2 Chondroitin Sulfate A » ou Antigène Variant de Surface 2 se liant à la Chondroïtine Sulfate A  
V : Volts  
VSA : « Variant Surface Antigen » ou Antigène Variant de Surface  
WB : « Western Blot »

# Table des illustrations

---

- Figure 1. Endémicité du paludisme dans le monde entre 2000 et 2016
- Figure 2. Relation entre l'âge et la sévérité du paludisme
- Figure 3. Cycle de vie de *Plasmodium* chez l'Homme et l'anophèle
- Figure 4. Répartition géographique des résistances de *Plasmodium* contre la chloroquine, la méfloquine et la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine
- Figure 5. Etapes principales du développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum*
- Figure 6. Schéma représentant les voies d'export des protéines synthétisées par le parasite au sein du globule rouge
- Figure 7. Niveau d'anticorps reconnaissant des érythrocytes infectés par *P. falciparum*-VAR2CSA selon la gestité
- Figure 8. Schéma représentant le réseau pseudo-hexagonal du cytosquelette érythrocytaire sous la membrane du globule rouge
- Figure 9. Complexe ankyrine, premier ancrage du cytosquelette érythrocytaire à la membrane (gauche) et complexe jonctionnel d'actine, deuxième ancrage du cytosquelette érythrocytaire à la membrane (droite)
- Figure 10. Organisation de l'ankyrine érythrocytaire et de ses domaines de liaison à la Bande 3 et à la spectrine
- Figure 11. Organisation de la Bande 3 et de ses domaines de liaison
- Figure 12. Liaison du complexe jonctionnel à la membrane plasmique par l'interaction de l'adducine et de la dématine à GLUT-1
- Figure 13. Séquence primaire, structures secondaires et sites de liaison du domaine N-terminal de la protéine 4.1
- Figure 14. Les différentes étapes de l'invasion du globule rouge par le mérozoïte
- Figure 15. Interaction de l'extrémité apicale du mérozoïte avec la membrane du globule rouge lors de l'invasion
- Figure 16. Modifications du cytosquelette lors de l'invasion parasitaire
- Figure 17. Régulation de l'agrégation de la protéine Bande 3 oxydée au cours du cycle intra-érythrocytaire et de la reconnaissance immune des agrégats formés
- Figure 18. Modèle du complexe de cytoadhérence induit par *P. falciparum* à la surface des érythrocytes infectés
- Figure 19. Interaction de PfEMP1 et d'autres protéines parasitaires avec le cytosquelette érythrocytaire
- Figure 20. Modèle présentant le rôle de MSP1 dans la sortie des mérozoïtes à la fin du cycle érythrocytaire
- Figure 21. Structure quaternaire de la molécule d'hémoglobine
- Figure 22. Mécanisme de polymérisation de l'hémoglobine S menant à la falciformation des globules rouges HbSS
- Figure 23. Mesure de la fluorescence des produits de dégradation de l'hème de globules rouges HbAA, HbAS et HbSS
- Figure 24. Comparaison de la distribution mondiale de l'allèle HbS et des zones d'endémie palustre

Figure 25. La G6PD permet la production de NADPH, source de pouvoir réducteur nécessaire au système anti-oxydant érythrocytaire

Figure 26. Distribution géographique du déficit en G6PD et du paludisme selon l'OMS

Figure 27. Formes d'alpha-thalassémie en fonction du nombre de gènes altérés

Figure 28. Fréquence et distribution géographique des principaux variants génétiques à l'origine de l'alpha-thalassémie, des cas d'alpha-thalassémie majeure, et d'hémoglobinose H

Figure 29. Taille des filaments d'actine dans les globules rouges HbAA et HbAS selon l'infection par *P. falciparum*

Figure 30. Tomographies des structures présentes dans le cytoplasme d'érythrocytes HbAA et HbAS infectés par *P. falciparum*

Figure 31. Mesure du niveau de cytoadhérence des globules rouges HbAA, HbAS et HbSS infectés par *P. falciparum* aux cellules HMVECs exprimant CD36 (A) ou à la CSA (B)

Figure 32. Taux de présentation de PfEMP1 à la surface des globules rouges HbAA, HbAS et HbSS *in vitro* (A). Images de la surface des globules rouges HbAA et HbAS infectés obtenues par microscopie à balayage (B)

Figure 33. Modèle des mécanismes à l'origine de la protection conférée par l'HbS contre le paludisme sévère

Figure 34. Croissance de *P. falciparum* dans des globules rouges HbAA et HbAS lorsque la concentration en oxygène est faible

Figure 35. Le stress oxydant est généré à la fois par la présence d'hémoglobine S et par l'infection par *P. falciparum*

Figure 36. L'HbS confère une tolérance par rapport au paludisme et prévient la réponse inflammatoire associée au paludisme cérébral

Figure 37. Taux de liaison des hémichromes, des IgG, du complément à la membrane érythrocytaire, de la Bande 3 agrégée, et de la phagocytose des globules rouges selon le génotype d'hémoglobine

Figure 38. Schéma représentant les différents mécanismes de protection conférés par le trait drépanocytaire contre le paludisme

Figure 39. Distribution des variants G6PD en Afrique

Figure 40. Schéma expérimental des mesures du taux de liaison par les plasmas des globules rouges HbAA et HbAS infectés par cytométrie en flux

Figure 41. Sites de coupure des enzymes *Dde* I et *Bse* RI au sein du fragment du gène de la  $\beta$ -globine et activité des enzymes en fonction des mutations portées

Figure 42. Sites de coupure de l'enzyme *Fok* I au sein du fragment amplifié du gène *g6pd* en fonction de la présence de la mutation A376G

Figure 43. Représentation des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et du gène hybride  $\alpha 1/\alpha 2$  et taille des fragments amplifiés en fonction du génotype

Figure 44. Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique des fragments de 369 pb du gène de la  $\beta$ -globine pour la détermination du génotype d'hémoglobine du donneur HbAS

Figure 45. Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique du fragment de 585 pb du gène *g6pd* pour la détermination du génotype G6PD du donneur HbAS

Figure 46. Profil de bandes obtenues après amplification par PCR multiplexe des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour la détermination du génotype alpha-thalassémie du donneur HbAS

Figure 47. Profil de bandes obtenues après digestion des fragments de 369 pb du gène de la  $\beta$ -globine pour la détermination du génotype d'hémoglobine des femmes de la cohorte STOPPAM

- Figure 48. Profil de bandes obtenues après digestion du fragment de 585 pb du gène *g6pd* pour la détermination du génotype G6PD des femmes de la cohorte STOPPAM
- Figure 49. Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique pour la recherche des mutations G202A (A) et T968C (B) pour les femmes de la cohorte STOPPAM
- Figure 50. Profil de bandes obtenues après amplification par PCR multiplexe des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour la détermination du génotype alpha-thalassémie des femmes de la cohorte STOPPAM
- Figure 51. Comparaison du taux de liaison des érythrocytes HbAA et HbAS infectés pour un même plasma
- Figure 52. Association entre la cytoadhérence à la CSA des globules rouges HbAA infectés et les différentes variables d'intérêt
- Figure 53. Schéma expérimental de l'étude du protéome et du phosphoprotéome de la membrane du globule rouge HbAA et HbAS infecté par *P. falciparum*
- Figure 54. Procédure de culture de *P. falciparum* dans les globules rouges HbAA et HbAS pour l'analyse en protéomique et en phosphoprotéomique
- Figure 55. Représentation théorique des différents stades du cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum* selon leur marquage HO-TO
- Figure 56. Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique des fragments de 369 pb du gène de la  $\beta$ -globine pour la vérification du génotype d'hémoglobine des donneurs
- Figure 57. Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique des fragments de 585 pb du gène *g6pd* pour la détermination du génotype G6PD des donneurs
- Figure 58. Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique pour la recherche des mutations G202A (A) et T968C (B) pour les donneurs HbAS<sub>2</sub> et HbAS<sub>3</sub>
- Figure 59. Profil de bandes obtenues après amplification par PCR multiplexe des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour la détermination du génotype alpha-thalassémie des donneurs
- Figure 60. Taux de réplication de *P. falciparum* dans les globules rouges HbAA et HbAS au cours de trois cycles de développement intra-érythrocytaire
- Figure 61. Proportions des différents stades parasitaires dans les érythrocytes HbAA et HbAS au cours de trois cycles de développement intra-érythrocytaire
- Figure 62. Carte de chaleur des protéines érythrocytaires différenciellement détectées en fonction de l'infection et/ou du génotype HbAS
- Figure 63. Sites différenciellement phosphorylés des protéines humaines en fonction de l'infection par *P. falciparum* et/ou du génotype HbAS
- Figure 64. Sites différenciellement phosphorylés des protéines humaines en fonction de la combinaison de l'infection par *P. falciparum* et du génotype HbAS
- Figure 65. Sites différenciellement phosphorylés des protéines parasitaires en fonction du génotype d'hémoglobine de la cellule hôte
- Figure 66. Différences de la phosphorylation de la Y<sup>21</sup> (A) et de la Y<sup>359</sup> (B) de Bande 3 selon l'infection par *P. falciparum* et le génotype HbAS
- Figure 67. Croissance de la souche 3D7 de *P. falciparum* dans des globules rouges Lu-BCAM (A) et ENT1 null (B)

Tableau 1. Présentation des caractéristiques des 5 espèces de *Plasmodium* affectant l'Homme

Tableau 2. Classification des variants G6PD

Tableau 3. Forme d'alpha-thalassémie et symptômes associés en fonction du nombre de gènes touchés

Tableau 4. Caractéristiques des femmes de la cohorte STOPPAM incluses dans l'étude

Tableau 5. Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification du fragment de 369 pb du gène codant la  $\beta$ -globine

Tableau 6. Composition des milieux réactionnels pour la digestion enzymatique des fragments préalablement amplifiés par PCR par *Dde* I et *Bse* RI

Tableau 7. Taille des fragments obtenus après digestion enzymatique par *Dde* I et *Bse* RI selon les mutations portées

Tableau 8. Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification du fragment de 585 pb du gène codant l'enzyme G6PD

Tableau 9. Composition du milieu réactionnel pour la digestion enzymatique par *Fok* I du fragment du gène *g6pd* préalablement amplifié par PCR

Tableau 10. Taille des fragments obtenus après digestion enzymatique par *Fok* I selon le génotype G6PD

Tableau 11. Taille des fragments obtenus après digestion par *Nla* III ou *Nci* I selon la présence des mutations G202A ou T968C

Tableau 12. Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  codant l' $\alpha$ -globine

Tableau 13. Association entre la cytoadhérence à la CSA des globules rouges HbAA infectés et les différentes variables d'intérêt

Tableau 14. Génotypes G6PD et alpha-thalassémie des donneurs HbAA et HbAS

# INTRODUCTION

## 1.1. Le paludisme, première parasitose mondiale

### 1.1.1. Epidémiologie, répartition géographique et manifestations cliniques du paludisme

Le paludisme, ou « malaria », est une maladie infectieuse qui touche près d'une centaine de pays des régions tropicales, chaudes et humides <sup>1</sup>. Il est très fortement retrouvé en Afrique Sub-Saharienne, où près de 90% des cas et 90% de la mortalité sont observés (dont 61% sont des enfants de moins de 5 ans) <sup>2</sup>, mais aussi en Amérique centrale et en Amérique du Sud, en Asie du Sud-Est et dans certaines îles d'Océanie (Nouvelle-Guinée, Iles Salomon, Vanuatu). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a relevé 219 millions de nouveaux cas en 2017, dont 435 000 décès <sup>2</sup>.

Le paludisme est la première parasitose mondiale due au parasite du genre *Plasmodium* <sup>1</sup> qui est transmis à l'Homme par une piqûre d'un moustique culicidé du genre *Anopheles*, de l'ordre des diptères <sup>3</sup>. Seule la femelle anophèle, hémaphysogone, transmet la maladie lors de son repas sanguin, classiquement entre le crépuscule et l'aube. Il existe aujourd'hui approximativement 480 espèces d'anophèles différentes, présentes partout dans le monde, sauf en régions très froides et dans certaines îles du Pacifique, de l'Atlantique et de l'océan indien. Parmi ces espèces, seule une trentaine transmet efficacement le paludisme à l'Homme <sup>4</sup>. C'est notamment le cas d'*Anopheles gambiae*, vecteur majoritaire du paludisme en Afrique <sup>5</sup>.

Le paludisme est endémique dans 91 pays <sup>6</sup> (Figure 1).

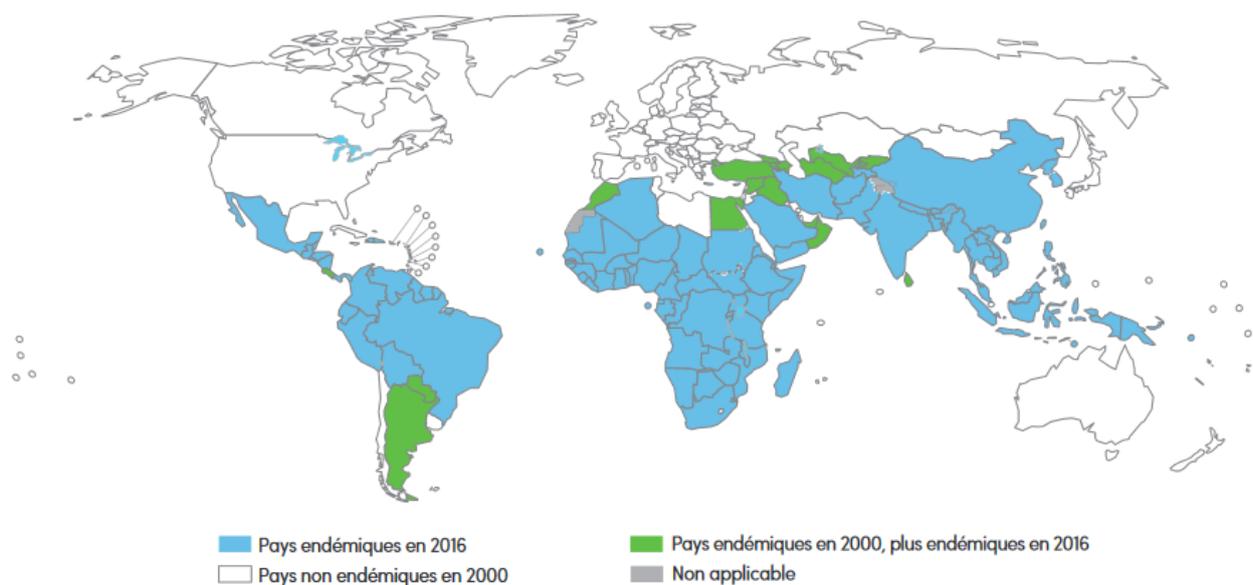


Figure 1. **Endémicité du paludisme dans le monde entre 2000 et 2016.** Le paludisme était endémique dans 108 pays en 2000. La lutte contre le paludisme est un enjeu mondial. Les moyens mis en œuvre dans cette démarche ont permis de diminuer la mortalité et la morbidité du paludisme, qui reste aujourd'hui endémique dans 91 pays (*WHO Malaria Report 2016* <sup>6</sup>).

Sa transmission est multifactorielle <sup>1</sup>, dépendant de la distribution des anophèles (liée au climat), de leur capacité vectorielle <sup>7</sup>, des facteurs parasitaires (caractéristiques des différentes espèces de *Plasmodium*) et de l'hôte (facteurs génétiques associés à la protection, immunité, âge, ...). La transmission est souvent saisonnière, et très forte lors ou juste après la saison des pluies.

En zone de forte endémie où la transmission est stable, l'immunité se développe avec l'âge, au cours des infections et suite à une exposition continue <sup>8</sup>. Cette immunité n'est pas stérilisante et ne protège pas de l'infection, mais empêche progressivement le développement de formes sévères de paludisme (Figure 2). Ce phénomène appelé « prémunition » explique pourquoi les personnes les plus à risque sont les jeunes enfants, âgés de 4-6 mois (auparavant protégés par l'immunité maternelle transmise lors de la grossesse) à 5 ans, les femmes enceintes dont le statut immunitaire est particulier, les individus immunodéficients et les voyageurs en zone d'endémie de tout âge, n'ayant jamais rencontré le parasite. La prémunition n'est jamais définitive et se perd progressivement en cas d'absence d'exposition pendant une grande durée.

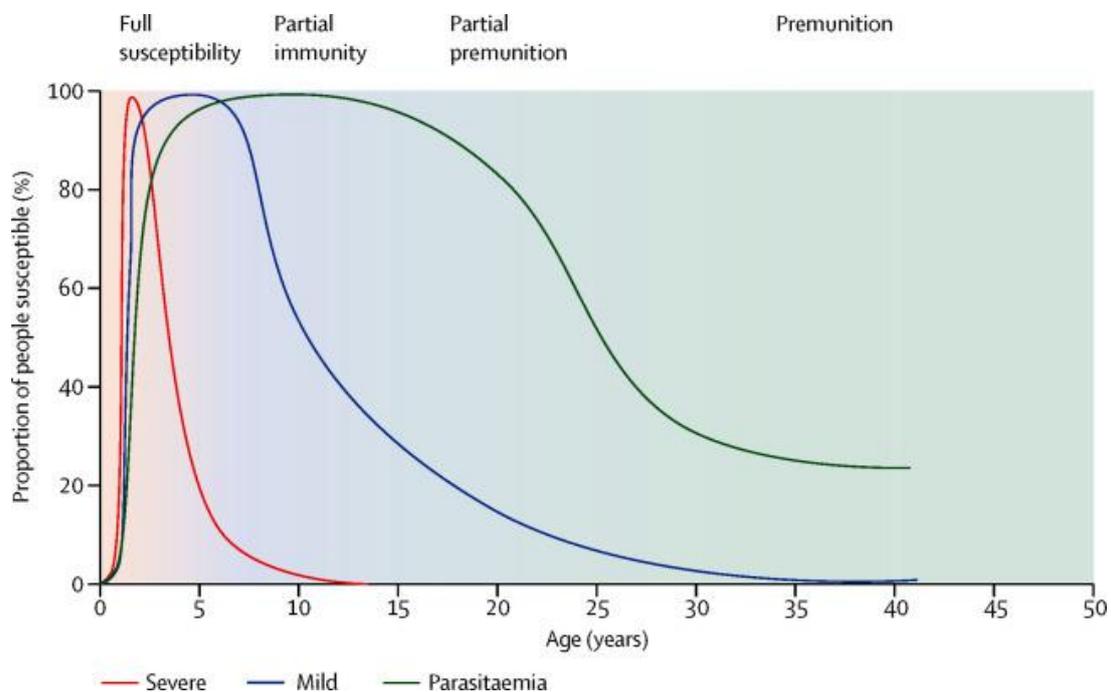


Figure 2. **Relation entre l'âge et la sévérité du paludisme.** En zone de forte endémie où la transmission est stable et intense, l'exposition continue des individus au paludisme contribue au développement progressif d'une protection appelée « prémunition ». Les jeunes enfants, non encore immunisés, sont les plus susceptibles de développer des formes graves (« sévères »). Avec l'âge, les sujets ne souffrent plus que de paludisme simple (« mild ») ou d'infection asymptomatique (« parasitemia »). Les adultes développent très rarement des formes sévères de paludisme (White et al., 2014 <sup>1</sup>).

### 1.1.2. Agents pathogènes responsables du paludisme

Le parasite *Plasmodium* est un eucaryote unicellulaire du phylum des apicomplexes <sup>1</sup>. Retrouvé dans le sang, il s'agit d'un hématozoaire. Il existe plus de 140 espèces de *Plasmodium*, mais 5 sont capables d'infecter l'Homme : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* et *P. knowlesi* <sup>9</sup> (découvert en 2004, résultant probablement d'une zoonose avec les grands singes de Malaisie) <sup>10</sup>. *P. falciparum* est l'espèce la plus répandue, la plus abondante en Afrique et responsable de la forme de paludisme la plus sévère et mortelle. *P. vivax* est l'espèce la plus fréquente hors du continent Africain. Ces 5 espèces diffèrent par leurs caractéristiques cliniques, biologiques et leur répartition géographique (Tableau 1).

Espèce	Localisation	Clinique	Incubation	Particularités
<i>P. falciparum</i>	Afrique, Asie, Amériques, Océanie <sup>11</sup>	simple à sévère mortalité élevée	7 à 12 jours	Espèce la plus mortelle Cytoadhérence
<i>P. vivax</i>	Asie, Amérique latine, régions d'Afrique de l'Est et certaines îles de l'océan indien <sup>12</sup>	Simple	11 à 15 jours	Rechutes pendant 3-4 ans - Hypnozoïtes
<i>P. ovale</i>	Afrique intertropicale centrale et de l'Ouest, régions du Pacifique	Simple	15 jours minimum	Rechutes tardives (5ans) - Hypnozoïtes
<i>P. malariae</i>	Afrique, Asie, Amériques, Océanie	Simple	15 à 21 jours	Sporadique Rechutes jusqu'à 20 ans après 1 <sup>ère</sup> infection
<i>P. knowlesi</i>	Asie du Sud-Est <sup>10</sup>	Souvent simple Parfois grave		Provient d'une zoonose avec les singes de Malaisie

Tableau 1. **Présentation des caractéristiques des 5 espèces de *Plasmodium* affectant l'Homme.** (White et al., 2014 <sup>1</sup>, Sabbatani et al., 2010 <sup>10</sup>; Gething et al., 2011 <sup>11</sup>, Gething et al., 2012 <sup>12</sup>).

Plusieurs manifestations cliniques peuvent être observées suite à l'infection par *Plasmodium*. L'infection peut être « asymptomatique », la présence de parasites est détectée, mais les sujets ne présentent aucun symptôme associé. Le paludisme peut être « simple », les sujets sont alors atteints de symptômes non spécifiques : fièvre, frissons, maux de tête, fatigue, douleurs abdominales, articulaires et musculaires, troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée), anémie faible <sup>1</sup>. La rate est souvent palpable quelques jours après le début de l'infection. La taille du foie augmente fréquemment, surtout chez les jeunes enfants, et les adultes souffrent parfois d'une jaunisse légère. Chez les jeunes enfants vivant en zones où la transmission est stable, les infections récurrentes peuvent causer des anémies chroniques et des splénomégalies. La pathologie peut aussi causer des symptômes plus sévères, lors du

« paludisme grave ». Les sujets peuvent alors souffrir de graves anémies, de détresses respiratoires, d'acidose métabolique, d'obstructions vasculaires, d'atteintes graves d'organes vitaux, ou de comas (neuropaludisme)<sup>1</sup>. Les formes sévères sont associées à la forte mortalité du paludisme.

### 1.1.3. Cycle de vie de *Plasmodium*

Le cycle de vie de *Plasmodium* s'effectue en deux phases chez deux hôtes différents. Le parasite se multiplie de manière asexuée, phase schizogonique chez l'Homme, qui est ainsi son « hôte intermédiaire », mais effectue sa multiplication sexuée, phase sporogonique chez l'anophèle, qui est donc son « hôte définitif » (Figure 3). *Plasmodium* a un cycle de vie haplonte. Il s'agit d'un organisme haploïde disposant d'une phase de multiplication sexuée à l'origine de formes diploïdes.

Lors de son repas sanguin, l'anophèle transmet à l'Homme moins d'une centaine de sporozoïtes (haploïdes) mobiles (formes infectieuses du parasite pour l'Homme) présents dans ses glandes salivaires. Les sporozoïtes inoculés dans le derme migrent alors en quelques heures jusqu'au foie, en passant par la lymphe et le sang. Au niveau du foie, chaque sporozoïte envahit un hépatocyte. Le parasite, mononucléé, est alors appelé trophozoïte. Il s'y multiplie par schizogonie, amplifie son ADN puis le divise de façon binaire, sans division du matériel cytoplasmique, formant un schizonte hépatique pré-érythrocytaire multinucléé. Chaque sporozoïte peut donner entre 10 000 et 30 000 cellules filles appelées mérozoïtes. Il s'agit du cycle exo-érythrocytaire, qui est asymptomatique. Après 8 à 10 jours, le schizonte hépatique éclate, libérant des milliers de mérozoïtes uninucléés dans le flux sanguin, qui envahissent les Globules Rouges (GRs) et s'y multiplient<sup>1</sup>.

Une étude a également montré, chez les rongeurs, qu'une partie des sporozoïtes injectés étaient capables de se développer dans la peau et de se différencier en mérozoïtes<sup>13</sup>.

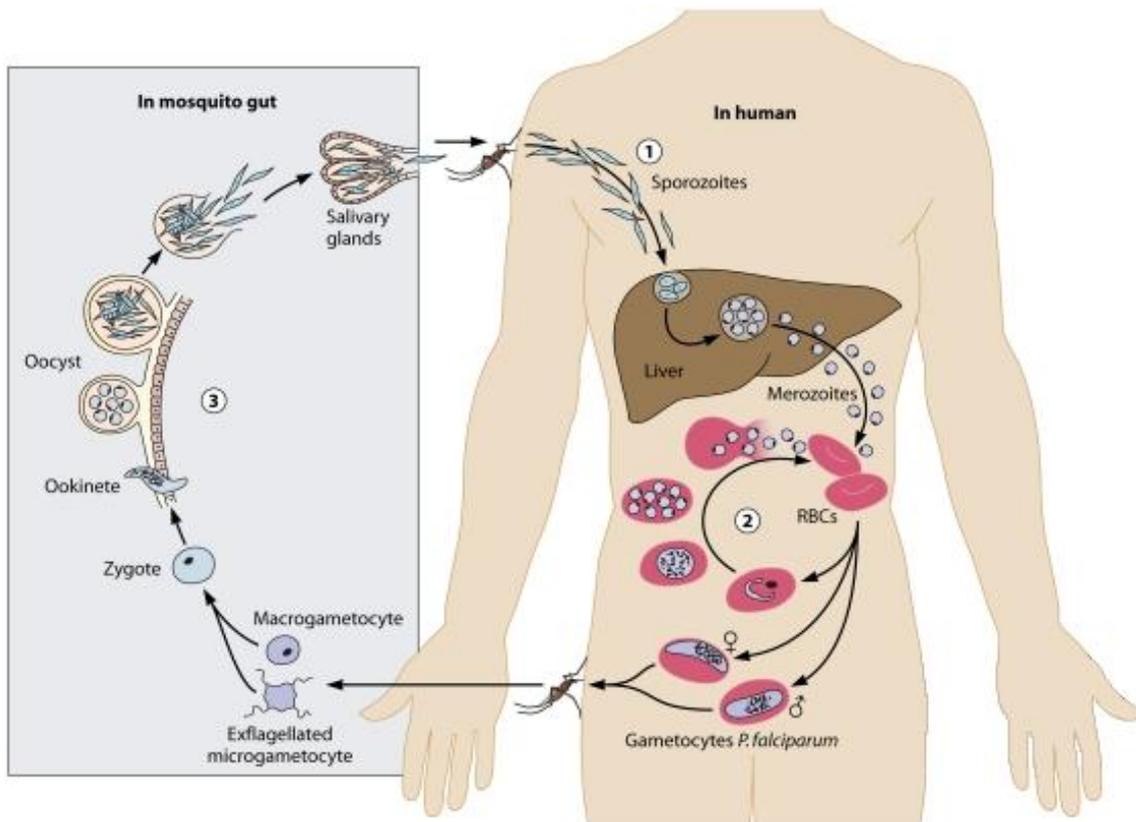


Figure 3. **Cycle de vie de *Plasmodium* chez l'Homme et l'anophèle.** *Plasmodium* effectue son cycle de vie chez deux hôtes différents, l'Homme et l'anophèle femelle. Lors de son repas sanguin, le moustique transmet le parasite à l'Homme, où il se multipliera de manière asexuée. (1) Les sporozoïtes inoculés dans le derme rejoignent le foie pour la phase de multiplication pré-érythrocytaire non symptomatique. (2) Les mérozoïtes issus de cette phase se multiplient alors dans les GRs, générant les symptômes du paludisme. Certaines formes sanguines se transforment en gamétocytes, formes infectantes pour le moustique. (3) Ces gamétocytes sont ingérés par l'anophèle lors de son repas sanguin. Le parasite y effectuera sa multiplication sexuée. Les gamétocytes se transforment en gamètes mâles et femelles dans l'estomac du moustique, et leur fusion donne naissance à un œuf mobile, l'ookinète, qui rejoint la surface externe de l'estomac et s'y accroche. L'ookinète se transforme alors en oocyste, dans lequel les sporozoïtes se forment et rejoignent les glandes salivaires pour être inoculés à l'Homme lors du prochain repas sanguin (Adapté de Bousema et al., 2011<sup>14</sup>).

Lors d'infection par *P. vivax* ou *P. ovale*, certains trophozoïtes hépatiques peuvent rester quiescents dans le foie<sup>15</sup>. Ces formes parasitaires, appelées « hypnozoïtes », peuvent se réveiller et causer une nouvelle infection plusieurs semaines à plusieurs années après la première infection. Ils effectuent alors une schizogonie hépatique retardée, libérant à nouveau des mérozoïtes dans le sang, à l'origine de reviviscences tardives, ou rechutes.

Le cycle érythrocytaire dure environ 48h pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, approximativement 72h pour *P. malariae*, et seulement 24h pour *P. knowlesi*. Après invasion de GR, les mérozoïtes se transforment en trophozoïtes (uninucléés), puis en schizontes après multiplication du matériel génétique. Le parasite se nourrit du cytoplasme de la cellule hôte, et principalement de l'hémoglobine (Hb), protéine érythrocytaire majoritaire, dont il utilise les

Acides Aminés (AA) pour sa propre synthèse protéique. L'hème libéré suite à la digestion de l'Hb est toxique pour le parasite. Il est cristallisé (en association avec la protoporphyrine IX et un ion ferreux) en pigment malarique inerte, aussi appelé hémozoïne, dans la vacuole digestive du parasite. *Plasmodium* exporte également certaines de ses protéines, notamment pour modifier la membrane du GR et exprimer sa pathogénicité. A la fin du cycle érythrocytaire, le parasite réplique son matériel cytoplasmique et forme des membranes autour de chaque nouveau mérozoïte. Après rupture de l'érythrocyte infecté, 4 à 32 nouveaux mérozoïtes, selon l'espèce de *Plasmodium*, sont libérés dans la circulation sanguine, et peuvent infecter à nouveau les GRs <sup>1</sup>. La phase érythrocytaire correspond à la phase clinique du cycle de vie de *Plasmodium*. Les symptômes apparaissent quand le nombre de parasites asexués atteint environ 100 millions dans la circulation sanguine.

Certains trophozoïtes se différencient en formes sexuées, les gamétocytes (haploïdes). Ces formes sexuées subissent une maturation d'une dizaine de jours dans le compartiment médullaire. Une fois matures, les gamétocytes, à potentiel mâle ou femelle, rejoignent à nouveau la circulation sanguine, et y circulent pendant plusieurs semaines. Ils peuvent être ingérés lors du repas sanguin d'un anophèle, où le parasite effectue sa reproduction sexuée. Dans l'estomac du moustique, les gamétocytes se transforment en gamètes mâles et femelles (haploïdes), et fusionnent pour former un œuf mobile nommé ookinète (diploïde). Cet ookinète migre jusqu'à la paroi externe de l'estomac du moustique pour s'y accrocher et se transformer en oocyste (diploïde), où les cellules parasitaires se multiplient par une méiose et une succession de mitoses, pour former de nouveaux sporozoïtes (haploïdes). Enfin, l'oocyste éclate et libère des sporozoïtes, qui migrent dans les glandes salivaires, afin d'être inoculés avec la salive du moustique lors du prochain repas sanguin. La durée de la reproduction sexuée de *Plasmodium* chez le moustique nécessite entre 9 jours et un mois, en fonction de l'espèce et de la température <sup>16</sup>.

#### 1.1.4. Lutte contre le paludisme : diagnostic, traitements et prévention

L'éradication du paludisme est un des objectifs majeurs en termes de santé mondiale selon l'OMS, qui prévoit en 2015 de réduire de 40% l'incidence de la pathologie et la mortalité au niveau mondial d'ici 2030. L'incidence et la mortalité du paludisme ont déjà diminué respectivement de 21% et 29% entre 2010 et 2015, principalement en raison de l'utilisation de moustiquaires imprégnées, et du traitement par les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine.

Les symptômes d'un paludisme simple ne sont pas spécifiques du paludisme (fièvre, nausée, douleurs articulaires et musculaires, ...), et peuvent mener à un autre diagnostic sans prise en compte d'un voyage en zone d'endémie. Toute fièvre au retour d'un pays impaludé est considérée comme un paludisme jusqu'à preuve du contraire. En cas d'infection par *P. falciparum*, le paludisme simple peut évoluer en paludisme sévère (rapidement mortel) en quelques heures s'il n'est pas correctement pris en charge. De plus, il est impossible de prédire l'évolution d'un épisode de paludisme. Le diagnostic constitue donc une étape cruciale de la prise en charge d'un patient atteint de paludisme.

#### 1.1.4.1. Méthodes de diagnostic du paludisme

Les parasites sont détectables chez les moustiques et dans les GRs, mais ne le sont pas lors des stades hépatocytaires. Le diagnostic du paludisme repose sur trois techniques principales : l'observation de frottis ou de gouttes épaisses par microscopie, les Tests de Diagnostic Rapides (TDRs), et la « Réaction de Polymérisation en chaîne » (PCR). L'OMS recommande l'utilisation de la microscopie et des TDRs pour les cas cliniques de paludisme<sup>17</sup>. Les techniques basées sur la PCR, par leur sensibilité plus importante, sont utilisées pour contrôler la transmission et les réservoirs de parasites.

L'observation au microscope (grossissement x1000) de frottis sanguins ou de gouttes épaisses colorés au Giemsa reste la méthode conventionnelle<sup>18</sup>. Cette technique permet d'identifier l'espèce de *Plasmodium* responsable de l'infection, de différencier et quantifier les stades de développement. Cependant, le diagnostic est plus compliqué lorsque les parasitémies sont faibles ou pour des cas de co-infections par plusieurs espèces plasmodiales.

Les TDRs reposent sur la détection d'antigènes parasitaires présents dans le sang de l'individu par des anticorps spécifiques suivant le principe d'immunochromatographie. Ces tests sont très utilisés grâce à leur simplicité et rapidité (résultat obtenu en moins de 30 min) : il suffit de déposer une goutte de sang sur la bandelette du test, contenant les anticorps. La réaction antigène-anticorps crée une ligne visuelle indiquant un test positif. Les TDRs permettent de détecter une infection palustre, et certains sont capables d'identifier *P. falciparum* et *P. vivax*. Toutefois, le diagnostic reste qualitatif car aucune mesure quantitative de la parasitémie n'est effectuée. De même, les TDRs ne permettent pas de connaître le stade de développement du parasite.

Plusieurs types de TDRs existent aujourd'hui. La détection de *P. falciparum* est basée sur la reconnaissance de l'antigène "P. falciparum Histidine-Rich Protein 2" (*PfHRP2*)<sup>19</sup>

(protéine exprimée dans le cytoplasme du parasite ou au niveau des membranes des mérozoïtes). Des antigènes non spécifiques d'espèce sont également utilisés, comme la lactate déshydrogénase (pLDH) et l'aldolase, permettant de dépister une infection palustre. La plupart des TDRs disposent d'anticorps dirigés contre *PfHRP2* et un antigène non spécifique d'espèce. Plus récemment, des TDRs ont été développés pour distinguer les infections à *P. vivax* en utilisant un anticorps reconnaissant la pLDH ou l'aldolase de *P. vivax*<sup>20</sup>. Enfin, il existe des TDRs avec *PfHRP2* (pour *P. falciparum*) et pLDH de *P. vivax*, pouvant détecter spécifiquement ces deux espèces<sup>20</sup>.

Ces dernières années, l'utilisation des TDRs a permis d'améliorer le diagnostic du paludisme en cas de fièvre dans les zones endémiques, et de diminuer la sur-utilisation des traitements<sup>21</sup>.

Toutefois, afin de surveiller et de limiter la transmission, des techniques encore plus sensibles sont nécessaires pour détecter les parasites<sup>22</sup>. En effet, la prévalence d'infections sub-microscopiques (infections non détectables au microscope, et dont le dépistage requiert une technique de haute sensibilité) est élevée chez les adultes et dans les zones de faible endémicité. Dans les zones à faible transmission, les porteurs d'infections sub-microscopiques peuvent être la source de 20 à 50% de transmission de l'Homme au moustique<sup>23</sup>. Afin de détecter ces infections, ainsi que les infections à faible densité, ou de détecter les « réservoirs asymptomatiques », des techniques plus sensibles et plus précises reposant sur l'amplification d'ADN ou ARN parasitaire par PCR sont utilisées. L'observation par microscopie ou les TDRs sous-estiment la prévalence des infections à faible densité parasitaire (<100 parasites/ $\mu$ l). La prévalence des infections mesurées au microscope représente en moyenne 50,8% de celle mesurée par PCR<sup>24</sup>. Cette sous-estimation est encore plus importante pour les gamétocytes (formes parasitaires transmises de l'Homme au moustique), dont le taux moyen de détection par microscope est de 8,7% de celui mesuré par PCR. La détection de parasite par PCR permet d'identifier l'espèce de *Plasmodium* responsable de l'infection, mais ne différencie pas les stades de développement. Ces techniques permettent aussi la détection de potentielles résistances, afin de mieux orienter la prise en charge thérapeutique du patient.

La première technique largement utilisée reposait sur l'amplification de l'ARN ribosomique de la petite ou grande sous-unité 18S (18SrRNA) de *Plasmodium*<sup>25</sup>. Cette méthode permet d'identifier l'espèce de *Plasmodium*. Des méthodes quantitatives (qPCR) ont également été développées, ainsi que des PCR multiplexes afin de détecter des infections mixtes<sup>26</sup>. Une nouvelle technique récente, « Loop-mediated isothermal AMPlification » (LAMP), permet de détecter de manière quantitative et spécifique les différentes espèces de

*Plasmodium* en utilisant une lecture visuelle et indépendante des thermocycleurs. De plus, cette technique rapide et nécessitant un équipement simple, pourrait constituer une alternative aux PCR conventionnelles. En effet, la PCR reste utilisée principalement en recherche, et peu en zone d'endémie à cause de contraintes logistiques.

#### 1.1.4.2. Traitements curatifs et prophylactiques

Les symptômes du paludisme sont liés au développement intra-érythrocytaire de *Plasmodium*. Les traitements curatifs agissent donc au niveau de cette phase. Les antipaludiques actuellement utilisés peuvent être classés en 4 groupes selon leur mode d'action. Deux groupes sont de sources naturelles, et utilisés depuis des milliers d'années en médecine traditionnelle : les dérivés quinoléiques, basés sur la quinine, provenant de l'écorce d'un arbre tropical d'Amérique du Sud, le quinquina, et les dérivés de l'artémisinine, extraite d'une plante chinoise, *Artemisia annua* (qinghaosu). Les autres antipaludiques, les antibiotiques et les anti-métabolites, sont des molécules de synthèse.

##### a. Les dérivés quinoléiques

Ce premier groupe d'antipaludiques comprend plusieurs classes : les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine), les autres quinoléines (pipéraquline, pyronaridine, primaquine), les arylaminoalcools (quinine, méfloquine, luméfántrine, halofántrine) et les naphthoquinones (atovaquone). Toutes ces molécules sont des dérivés de la quinine <sup>27</sup>.

Les amino-4-quinoléines, les autres quinoléines, et les arylaminoalcools agissent au niveau de la vacuole digestive de *Plasmodium*. Le parasite possède un compartiment acide équivalent aux lysosomes (pH 5), contenant des protéases et des hydrolases pour la digestion de l'Hb érythrocytaire. Les dérivés quinoléiques étant des bases faibles, ils s'accumulent dans la vacuole digestive et perturbent la digestion de l'Hb ainsi que la cristallisation de l'hème <sup>28</sup>. Ce sont des activateurs du stress oxydant, car l'hème génère des radicaux libres.

La primaquine est un antipaludique apparenté au groupe des quinoléines. Son fonctionnement est mal connu, mais elle semble agir au niveau de la mitochondrie (où est produite l'énergie grâce au transfert d'électrons). La primaquine est une des seules molécules capables d'éliminer les hypnozoïtes, formes dormantes des espèces *P. vivax* et *P. ovale* résidant dans le foie <sup>29</sup>. Toutefois, elle ne peut être utilisée massivement, car elle est toxique chez les individus atteints d'un déficit en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD), pathologie fréquemment retrouvée en zone d'endémie. De nombreuses recherches sont

effectuées afin de trouver de nouvelles molécules capables d'éliminer ces formes, ou de perturber leur dormance<sup>30</sup>. La primaquine pourrait aussi être utilisée pour éliminer les gamétocytes, et ainsi limiter la transmission du parasite de l'Homme à l'anophèle<sup>29</sup>. Les gamétocytes ont un métabolisme différent, et peu d'antipaludiques utilisés de manière curative agissent sur ces formes. Certaines recherches étudient la possibilité d'utiliser la primaquine en complément d'un traitement, afin de réduire l'infection tout en limitant la transmission.

Les naphthoquinones sont des inhibiteurs des fonctions mitochondriales<sup>31</sup>. Ils inhibent la chaîne respiratoire. C'est le cas de l'atovaquone. Seule, cette molécule a peu d'action, le parasite développant alors rapidement des mécanismes de résistance<sup>32</sup>. Elle est donc utilisée en combinaison avec un antimétabolite, le proguanil.

#### b. Les dérivés de l'artémisinine

L'artémisinine est une pro-drogue, nécessitant d'être activée par une source de fer, qui est probablement l'hème, synthétisé par la mitochondrie et provenant de la digestion de l'Hb. Après activation, les dérivés de l'artémisinine (DiHydroArtémisinine (DHA), artéméther, artésunate...) libèrent, par leur pont endoperoxyde, des radicaux libres, qui vont agir sur de nombreuses cibles parasitaires. Ces antipaludiques ont donc une activité pléiotropique<sup>33</sup>.

#### c. Les anti-métabolites

Les anti-métabolites sont des inhibiteurs de la synthèse d'ADN. Les plus connus sont la pyriméthamine, le cycloguanil, et la sulfadoxine. Les deux premiers inhibent la DiHydroFolate Réductase (DHFR), et le troisième cible la DiHydroPtéorate Synthétase (DHPS). Ces deux enzymes agissent dans la voie de synthèse des pyrimidines du parasite, qui est donc inhibée.

#### d. Les antibiotiques

Certains antibiotiques, dont les cyclines (doxycycline), les macrolides (érythromycine, azythromycine, clindamycine), la ciprofloxacine et la rifampicine présentent une action contre *Plasmodium*. Ils agissent sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines de l'apicoplaste du parasite (qui est un reliquat d'un ancien chloroplaste)<sup>31</sup>.

La doxycycline est utilisée en prophylaxie, car son mécanisme d'action est trop lent pour traiter une infection établie. En effet, l'antibiotique n'agit pas sur le cycle érythrocytaire en

cours, mais sur le suivant. Par contre, la prise de doxycycline est associée à un risque de photoréaction. L'exposition au soleil ou aux UVs est donc contre-indiquée lors de la prise de cet antibiotique.

La plus grande difficulté rencontrée dans le traitement contre le paludisme est l'émergence de résistance contre les molécules utilisées (Figure 4). Des résistances ont été observées pour la plupart des médicaments actuellement utilisés<sup>34</sup>. Le parasite résiste généralement au traitement basé sur une seule molécule. L'OMS préconise le remplacement des mono-thérapies par l'utilisation de combinaison de plusieurs molécules, notamment de classes différentes pour éviter l'apparition de souches multi-résistantes. Les combinaisons comprenant une molécule à base d'artémisinine, appelées « Artemisinin-based Combination Therapy » (ACT), recommandées comme traitements de première ligne par l'OMS<sup>2</sup>, sont les plus efficaces et les plus largement utilisées depuis les années 2000<sup>35</sup>.

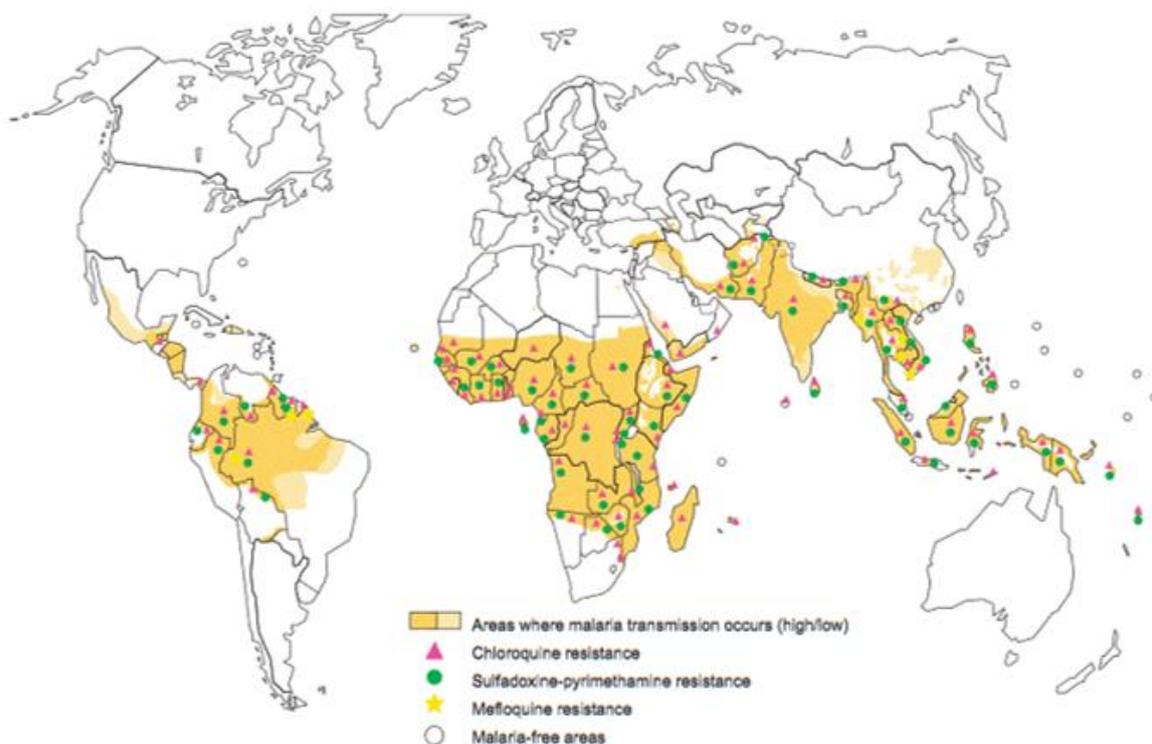


Figure 4. Répartition géographique des résistances de *Plasmodium* contre la chloroquine, la méfloquine et la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine. La chloroquine a longtemps été utilisée pour traiter le paludisme, mais aujourd'hui *Plasmodium* présente des résistances face à cette molécule dans toutes les régions du monde (Amérique du Sud, Afrique, Asie). Des résistances face à la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine et la méfloquine sont aussi observées dans les différentes régions du monde. Depuis quelques années, des résistances face à l'artémisinine sont observées en Asie du Sud-Est (World Malaria Report 2005<sup>34</sup>).

### 1.1.4.3. Prévention

#### a. Traitements préventifs

L'OMS préconise le Traitement Préventif Intermittent (TPI) pour les femmes enceintes résidant en zones d'endémie, où la transmission est modérée à forte. Le TPI consiste à prendre une combinaison de sulfadoxine-pyriméthamine au minimum 3 fois au cours de la grossesse lors des visites prénatales à partir du deuxième trimestre<sup>36</sup>. Ainsi, il permettrait de diminuer le risque de paludisme placentaire, néfaste pour la mère et l'enfant<sup>37</sup>. Bien que préconisé par l'OMS, le TPI n'est pas mis en place dans tous les pays. Suite à l'émergence de résistance contre le traitement sulfadoxine-pyriméthamine, une alternative au TPI est proposée pour les femmes enceintes : l'« Intermittent Screening & Treatment ». Cette stratégie prévoit le traitement des femmes enceintes pour lesquelles la vérification par TDR est positive<sup>38</sup>.

Le TPI est aussi préconisé pour les nourrissons afin de réduire le risque de paludisme clinique et sévère. Trois prises seraient nécessaires lors de la première année de vie, à 10 semaines, à 14 semaines et à 9 mois<sup>39</sup>.

De plus, l'OMS recommande depuis 2012 la chimioprévention du paludisme saisonnier au Sahel, consistant à administrer, lors de la saison où la transmission de paludisme est importante, un traitement à base de sulfadoxine-pyriméthamine et d'amodiaquine et chez les enfants de moins de 5 ans pendant un mois<sup>40</sup>.

La prévention contre le paludisme s'effectue aussi auprès des voyageurs par des chimioprophylaxies empêchant le développement sanguin du parasite et ainsi l'apparition des symptômes<sup>41</sup>. La prophylaxie dépend du pays visité (intensité de transmission, présence de résistance aux antipaludiques,...), de l'individu (âge, grossesse, antécédents médicaux, ...), de la saison et des conditions de séjour. Notamment, la combinaison atovaquone-proguanil fonctionnant aussi sur les stades hépatocytaires, est utilisée en prophylaxie. La protection par la prophylaxie n'est jamais totale, et toute fièvre après un voyage en pays d'endémie demeure suspecte comme énoncée précédemment.

#### b. Développement de vaccins contre le paludisme

Beaucoup d'efforts, de temps et d'argent sont aujourd'hui dépensés pour le développement de vaccins contre le paludisme. La majorité des recherches pour le développement d'un vaccin se sont intéressées à *P. falciparum*. Il n'existe actuellement pas de vaccin totalement efficace contre le paludisme, nécessaire pour éradiquer cette pathologie. Le polymorphisme génétique des parasites, extrêmement vaste, est un obstacle pour trouver un

antigène conservé permettant de conférer une protection totale <sup>26</sup>. De plus, les isolats parasitaires présentent de fortes différences inter-continentales <sup>42</sup>, mais aussi une grande variabilité au sein d'un même continent, liée aux hauts niveaux de transmission du paludisme. La difficulté réside aussi dans la complexité du cycle de vie de *Plasmodium*, avec plusieurs stades de développement, chacun exprimant une centaine d'antigènes. Enfin, une meilleure compréhension des réponses immunitaires de l'hôte, qui diffèrent selon les stades parasitaires, est nécessaire pour le développement d'un vaccin générant une immunité protectrice.

L'OMS a pour but de commercialiser d'ici 2030 des vaccins contre *P. falciparum* et *P. vivax*, avec un minimum d'efficacité de protection de 75% contre le paludisme clinique, afin de réduire la transmission pour permettre l'élimination de cette pathologie <sup>43</sup>. Les vaccins en cours de développement peuvent être classés selon 3 catégories : les vaccins pré-érythrocytaires, les vaccins contre les stades sanguins, et les autres vaccins incluant les vaccins bloquant la transmission et les vaccins contre le paludisme de la femme enceinte.

#### Les vaccins ciblant la phase pré-érythrocytaire

Après plus de 35 ans de recherche, le vaccin le plus avancé est le RTS,S/AS01, aussi appelé Mosquirix<sup>TM</sup>. Il s'agit du premier vaccin de première génération à atteindre la troisième phase d'essai clinique depuis 2009. Il est aujourd'hui testé dans 7 pays africains. RTS,S est un antigène recombinant, comprenant les domaines R et T de la « Circum Sporozoite Protein » (CSP), protéine majeure de couverture des sporozoïtes de *P. falciparum*, liés de manière covalente avec un antigène du virus de l'hépatite B. Il induit des titres importants d'anticorps contre la CSP. Les anticorps anti-CSP inhibent l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes, et donc la formation de mérozoïtes dans le foie <sup>44</sup>. Les enfants vaccinés sont protégés contre le paludisme simple et sévère <sup>45</sup>. Un an après la vaccination, près de la moitié des jeunes enfants (âgés de 5 à 17 mois au moment de la vaccination) et un tiers des nourrissons (âgés de 6 à 12 semaines au moment de la vaccination) sont encore protégés contre le paludisme. Cependant, la protection ne dure pas longtemps, et disparaît dès 4 ans après la vaccination <sup>46</sup>. L'incidence du paludisme chez les enfants et les nourrissons vaccinés augmente progressivement avec le temps <sup>26,47</sup>. Les recherches continuent afin d'augmenter l'efficacité de ce vaccin, notamment en combinant le RTS,S avec d'autres antigènes <sup>48</sup>.

D'autres stratégies vaccinales contre la phase pré-érythrocytaire sont également en cours de développement, ciblant les antigènes hépatocytaires « Multiple Epitope » (ME), la

« Thrombospondin-Related Adhesion Protein » (TRAP), ou ciblant ces deux antigènes fusionnés ME-TRAP. Ce dernier vaccin n'a pas démontré de protection en phase d'essai 2b conduite au Kenya<sup>49</sup>, mais d'autres variants sont en développement<sup>50</sup>.

Des stratégies utilisant des parasites entiers sont aussi développées. C'est le cas du vaccin *PfSPZ*, qui montre une protection totale lors des essais cliniques de phase 1. Des sporozoïtes métaboliquement actifs, mais répliquativement inactifs, qui ont été atténués par radiations ionisantes sont inoculés<sup>51</sup>. Lors de l'essai en phase 1, six volontaires ont reçu 5 doses de ce vaccin, et n'ont pas développé de paludisme lorsqu'ils ont été piqués par des femelles anophèles infectées. Cependant, parmi 9 volontaires ayant reçu seulement 4 doses de vaccins, seulement 4 ont présenté une protection complète. Une corrélation entre les doses administrées et les taux d'anticorps développés a été observée. Toutefois, le mode d'inoculation, qui se fait par voie intraveineuse, est compliqué pour une administration de masse. De plus, les vaccins doivent être conservés dans l'azote liquide et n'assurent pas forcément une protection contre les souches hétérogènes. Une alternative aux sporozoïtes atténués par irradiation a été proposée par Mikolajczak *et al.* (2014), qui ont développé une lignée de *P. falciparum* délétée pour 3 gènes impliqués dans le développement de la pathologie : ce sont des sporozoïtes génétiquement atténués. Les gènes délétés sont *P36* et *P52* ayant un rôle dans la formation de la « vacuole parasitophore » (voir page 36) (PV) et *SAP1* qui régule la stabilité de l'ARN et ainsi l'expression du génome du parasite<sup>52</sup>. Les triples mutants ont une gamétocytogenèse normale, infectent normalement les moustiques et mènent à une production normale de sporozoïtes. Ces sporozoïtes ne réalisent pas une multiplication efficace dans le foie et ne produisent pas de mérozoïtes pouvant infecter les GRs et générer les symptômes<sup>52</sup>. Les vaccins *p36<sup>-</sup> p52<sup>-</sup> sap1<sup>-</sup>* doivent être aujourd'hui testés en termes de sécurité, pour l'induction de réponses immunitaires et de la protection conférée.

### Les vaccins contre la phase érythrocytaire

Même si la phase érythrocytaire correspond à la phase symptomatique, ces vaccins sont supposés prévenir la maladie et la mort sans empêcher l'infection. Les candidats vaccins sont des antigènes exprimés à la surface des mérozoïtes et des GR infectés (iGRs), comme les « Merozoite Surface Protein » 1, 2, et 3 (MSP1, MSP2, et MSP3) ; la « SERine-Repeat Antigen » (SERA), « Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen » (RESA) ; « GLUtamate-Rich Protein » (GLURP) et « Apical Membrane Antigen 1 » (AMA1). Récemment, 4 antigènes des stades sanguins (AMA1, MSP1, MSP3 et GLURP) ont été testés en phase 2.

Aucun de ces vaccins n'a montré d'efficacité suffisante contre le paludisme clinique, excepté celui ciblant AMA1. AMA1 est une protéine de micronème de *P. falciparum* présente au niveau des sporozoïtes et des mérozoïtes. Cet antigène est essentiel pour l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes et des GRs par les mérozoïtes. Les anticorps contre AMA1 bloquent la multiplication des parasites au niveau de stades à la fois hépatiques et érythrocytaire<sup>53</sup>. Un des vaccins basés sur AMA1, est en phase d'essai 2 au Mali. Ce vaccin, nommé FMP 2.1/A502A, a montré une efficacité contre les infections cliniques<sup>54</sup>. Les enfants âgés entre 1 et 6 ans ont reçu le vaccin à 0, 1 et 2 mois et ont été suivis pendant une année. Ce vaccin induit des hauts niveaux d'anticorps contre AMA1 chez les enfants exposés au paludisme. S'il passe avec succès la phase 2, ce vaccin pourrait être utilisé en combinaison avec le vaccin RTS,S pour des effets additifs ou synergiques<sup>55</sup>. Toutefois, AMA1 présente une variabilité considérable parmi les isolats de *P. falciparum*. Sa capacité à stopper le paludisme n'est donc pas certaine, *P. falciparum* ayant d'autres allèles AMA1 génétiquement différents des parasites 3D7 (vaccin basé sur AMA1 de la souche de laboratoire de référence 3D7). Dutta *et al.* ont développé « AMA1-based Qvax », un vaccin à base d'une association de plusieurs allèles. Ici, les protéines AMA1 de 4 souches de laboratoire de *P. falciparum* (3D7, FVO, HB3 et W2mef) ont été combinées. Les anticorps formés contre Qvax ont inhibé 26 souches parasitaires différentes. Dans un essai préliminaire, ce vaccin induisait 100% de protection. Pour en améliorer l'efficacité du AMA1 a été combiné à la protéine « Rhoptry Neck Protein 2 » (RON2)<sup>53</sup>. Le complexe AMA1 et RON2 injecté à des souris protège les souris vaccinées du paludisme léthal<sup>56</sup>. Les vaccins basés sur AMA1 dans leurs nombreuses formes, le vaccin Mosquirix<sup>TM</sup> et les autres vaccins offrent la possibilité de vaccins abordables protégeant contre le paludisme. Ils pourraient être utilisés en combinaison pour associer leurs réponses anticorps additives ou synergiques.

### Les vaccins bloquant la transmission

Des vaccins bloquant la transmission sont aussi développés. Ces vaccins ne présentent aucun avantage pour les personnes vaccinées, n'induisant pas d'immunité protectrice, mais sont nécessaires pour éradiquer le paludisme. Ces vaccins ciblent les gamétocytes ou autres stades sexués, bloquant la reproduction parasitaire<sup>57</sup>. Les antigènes majoritairement utilisés sont les protéines de surface des ookinètes P25 et P28, et deux vaccins à base de P25 de *P. falciparum* et *P. vivax* ont été testés en phase 1<sup>58, 59</sup>. Les plasmas de participants immunisés avec un vaccin à bases d'antigène P25 de *P. falciparum* présentent une capacité

inhibitrice de la transmission plus importante que des plasmas d'individus non immunisés <sup>60</sup>. Un candidat vaccin basé sur P25 est actuellement testé en phase 2 chez des adultes Maliens <sup>44</sup>.

### Les vaccins contre le paludisme associé à la grossesse

Le paludisme associé à la grossesse (ou « Pregnancy-Associated Malaria » (PAM)) résulte de la liaison de iGRs au placenta, par l'interaction de la protéine parasitaire « Variant Antigen Surface 2 Chondroïtin Sulfate A » (VAR2CSA), de la famille des protéines « *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 » (PfEMP1) à la chondroïtine sulfate A (CSA) (voir page 41) exprimée à la surface des syncytiotrophoblastes. Le PAM atteint surtout les femmes primigestes (première grossesse) qui n'ont pas encore développé de réponse immunitaire protectrice contre la protéine VAR2CSA. En effet, les femmes multigestes (au moins 2 grossesses) ayant déjà été infectées lors de leur(s) grossesse(s) précédente(s) disposent d'anticorps anti-VAR2CSA, leur fournissant une protection contre le PAM. Les femmes avec des titres anticorps élevés contre VAR2CSA présentent des risques plus réduits de donner naissance à des bébés de petits poids de naissance (ou « Low Birth Weight » (LBW)) que les femmes avec des titres plus faibles <sup>61</sup>. Le premier vaccin contre le PAM est actuellement en développement pré-clinique <sup>62, 63</sup>. Très récemment, les candidats vaccins PAMVAC <sup>64</sup> et PRIMALVAC <sup>65</sup> ont été testés en phase I et présentent des résultats très prometteurs. Notamment, le candidat PAMVAC génère des réponses anticorps capables d'inhiber la cytoadhérence à la CSA de GRs infectés par des parasites exprimant VAR2CSA <sup>64</sup>.

### c. Lutte et protection contre le vecteur du paludisme

La lutte contre les vecteurs est un composant essentiel de la prévention contre le paludisme, recommandée par l'OMS. Cette lutte s'effectue par la pulvérisation d'insecticides dans les maisons, mais aussi par l'utilisation de moustiquaires imprégnées <sup>26</sup>, qui a permis de diminuer fortement la mortalité et la morbidité dues au paludisme <sup>66</sup>. A l'extérieur, il est préconisé de porter des vêtements longs imprégnés d'insecticide, et de protéger les parties du corps non couvertes avec des répulsifs (à base de DEET 30 à 50 %) <sup>67</sup>. Toutefois, des résistances des vecteurs contre les insecticides émergent depuis plusieurs années <sup>68</sup>.

Au cours de nos recherches, nous avons uniquement considéré *P. falciparum*, seule cette espèce sera alors décrite dans la suite du manuscrit. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la phase de multiplication asexuée de *P. falciparum* au sein des GRs.

## 1.2. Développement intra-érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*

### 1.2.1. Multiplication asexuée au sein du globule rouge

Les symptômes du paludisme se manifestent chez l'Homme lors de la phase de développement asexuée érythrocytaire du parasite (se déroulant pendant près de 48h pour *P. falciparum*), durant laquelle les parasites envahissent les GRs et s'y multiplient. L'invasion se déroule en plusieurs étapes, et consiste en l'entrée du mérozoïte dans le GR. Après jonction entre le mérozoïte et l'hématie, la membrane du GR s'invagine pour former, au sein du cytoplasme érythrocytaire, la PV où se développe le parasite. Il progresse du stade « trophozoïte » jeune ou « ring » (le parasite adopte une forme d'anneau) au stade trophozoïte mature, durant lequel le parasite réplique le matériel cytoplasmique sans division nucléaire, et enfin au stade multinucléé « schizonte », pendant lequel le matériel génétique est divisé et les nouveaux mérozoïtes sont formés. A la fin du cycle, les iGRs éclatent, libérant dans le sang les mérozoïtes synthétisés (entre 6 et 32 par iGR), pouvant alors envahir de nouveaux érythrocytes (Figure 5). La rupture des iGRs libère les parasites et le matériel de la cellule hôte, ce qui active les monocytes et les macrophages et induit la libération de cytokines proinflammatoires, causant la fièvre et d'autres effets pathologiques caractéristiques du paludisme <sup>69</sup>. Lors de son développement, le parasite digère les protéines érythrocytaires pour son métabolisme. Il dénature les protéines et utilise les AAs résultants pour sa propre synthèse protéique. La principale protéine érythrocytaire est l'Hb. Au cours de ce cycle, certains parasites se différencient en formes sexuées, les gamétocytes, qui peuvent être ingérés lors du repas sanguin d'un moustique, chez lequel la multiplication sexuée produira de nouveaux sporozoïtes. Chez *P. falciparum*, la gamétocytogenèse débute 7 à 10 jours après le début de la phase érythrocytaire. Ainsi, toutes les multiplications chez l'Homme sont des mitoses, les méioses ne se produisent que chez le moustique.

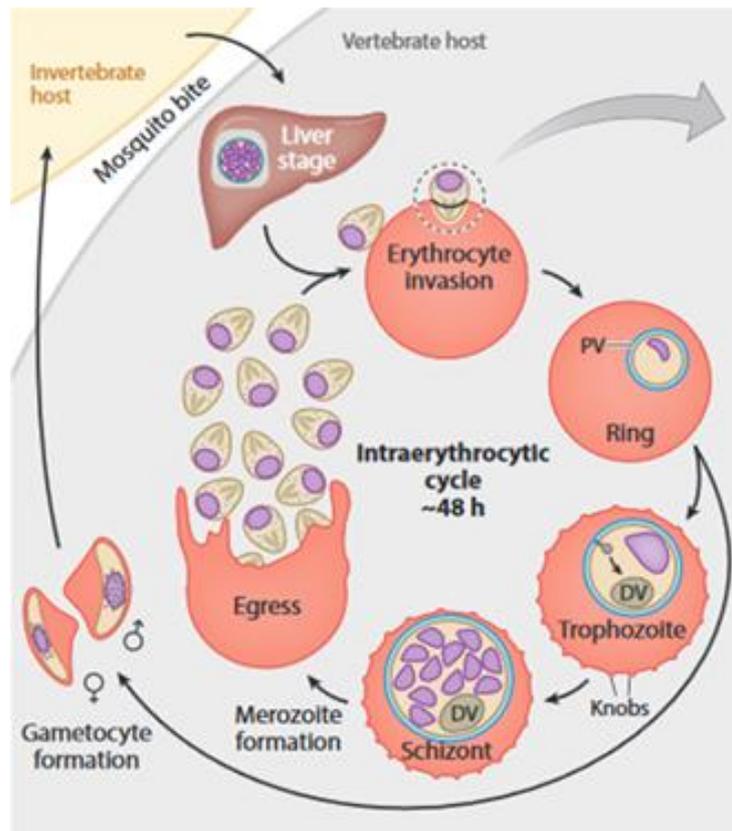


Figure 5. **Etapes principales du développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum*.** Après le développement extra-érythrocytaire dans le foie, les mérozoïtes formés sont libérés dans le sang et envahissent les GRs. Le parasite y effectue un cycle de développement d'environ 48h, se transformant successivement en ring, trophozoïte et schizonte. A la fin du cycle, la rupture des érythrocytes libère de nouveaux mérozoïtes, capables d'envahir de nouveaux GRs. Certains parasites se différencient en gamétocytes, pouvant être prélevés lors du repas sanguin d'un moustique, chez qui la multiplication sexuée permettra la production de nouveaux sporozoïtes (Adapté de Spillman et al., 2015<sup>70</sup>).

Lors de la phase de multiplication asexuée, *P. falciparum* exprime des protéines dont il exporte près de 5% dans le cytoplasme et à la surface du GR afin de le remodeler (Figure 6A). Ces protéines traversent premièrement le système de sécrétion parasitaire. Dans le Réticulum Endoplasmique (RE) du parasite, une partie de ces protéines est exportée grâce à un motif appelé « *Plasmodium falciparum* Exported Element » (PEXEL) (RxLx/E/D/Q)<sup>71</sup>. Ce motif est clivé par la plasmepsine V dans la lumière du RE, exposant la partie N-terminale de la protéine, la dirigeant vers une voie de trafic vésiculaire pour l'export. Toutefois, certaines protéines parasitaires ne disposant pas du motif PEXEL, appelées « *Plasmodium falciparum* Negative Exported Proteins » (PNEPs), sont aussi exportées<sup>72</sup>, grâce à la présence d'une région hydrophobe en N-terminale (Figure 6B). Les PNEPs sont insérées dans la membrane du RE, et les protéines parasitaires suivent alors une voie de transport vésiculaire au sein du parasite (les protéines solubles et les protéines transmembranaires sont probablement transportées dans les mêmes vésicules). Puis ces vésicules fusionnent avec la Membrane

Plasmique Parasitaire (ou « Parasite Plasma Membrane » (PPM)). Les protéines solubles sont alors délivrées dans la PV, et les protéines transmembranaires au niveau de la PPM, dont elles seront ensuite extraites. Les protéines sont alors transportées dans le GR : elles sont d'abord exportées dans la PV, puis elles sont transloquées dans le cytoplasme érythrocytaire. Ce phénomène n'est pas encore totalement caractérisé, mais il semblerait qu'il soit réalisé grâce au translocon « *Plasmodium* Translocon of EXported proteins » (PTEX), un complexe macromoléculaire de plus d'1,2 MDa (au moins 5 protéines différentes) localisé dans la membrane de la PV (PVM) (Figure 6C).

Une fois dans le cytoplasme érythrocytaire, les protéines peuvent y rester ou alors rejoindre la surface érythrocytaire en passant par les « Maurer's Clefs » (MCs), organites sécrétoires induits par le parasite, provenant probablement d'un bourgeonnement de la PVM, formant des compartiments intermédiaires pour les protéines codées par le parasite<sup>73,74</sup>. Les MCs sont des ultrastructures indépendantes physiquement liées à la membrane, mesurant 0,2 à 0,5µm de long et 60 à 100 nm d'épaisseur. Elles comportent une membrane simple et sont associées entre elles en réseau tubulo-vésiculaire. Ces structures, premièrement mobiles (jusqu'à environ 18h post-invasion), se connectent et s'ancrent par la suite à la membrane érythrocytaire<sup>75</sup>. Les protéines transmembranaires rejoignent probablement les MCs dans le cytoplasme érythrocytaire dans des Agrégats Protéiques de Transport ou « Protein Transport Aggregates » (PTAs) contenant des protéines chaperones. Depuis les MCs, les protéines peuvent être transportées à la surface érythrocytaire de la cellule hôte dans des vésicules denses aux électrons ou « electron dense vesicles » (EDVs), ou le long des câbles d'actine érythrocytaire, dérivés par le parasite. Les protéines solubles atteignent leur destination finale par diffusion ou par interaction spécifique de domaine, notamment avec le cytosquelette érythrocytaire, ou les knobs, élévations de la membrane des iGRs qui se présentent comme des protubérances denses aux électrons (Figure 6D). Le parasite exporte notamment un de ses principaux facteurs de virulence, *PfEMP1*.

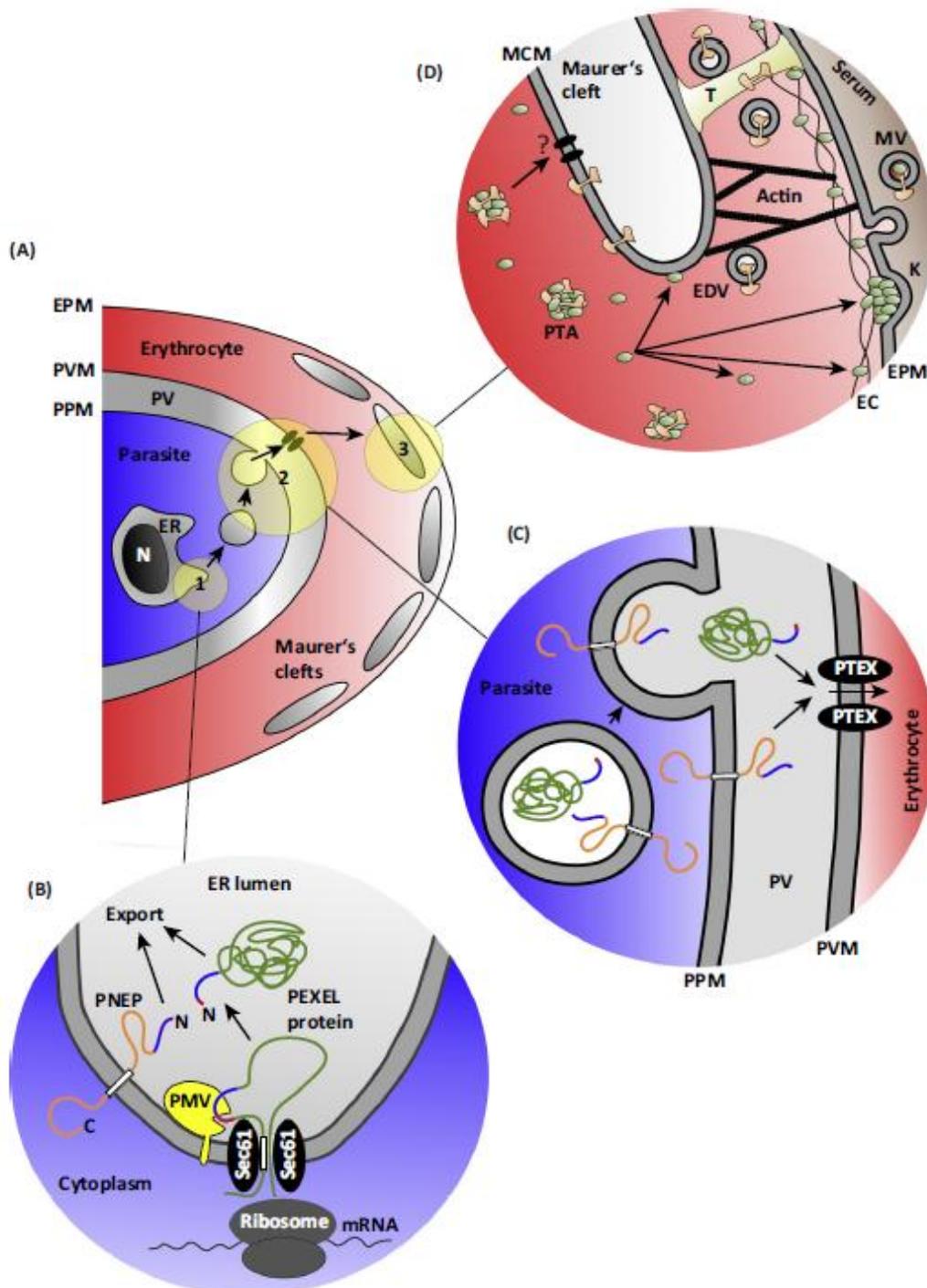


Figure 6. Schéma représentant les voies d'export des protéines synthétisées par le parasite au sein du globule rouge. Le parasite synthétise et exporte des protéines dans le cytoplasme et à la surface du GR (A). Après synthèse, les protéines sont exportées depuis le RE du parasite (B), sont transloquées dans la PV, puis dans le cytoplasme érythrocytaire grâce au PTEX (C), puis rejoignent leur destination finale. Les protéines transmembranaires rejoignent les MCs, puis la surface érythrocytaire (D) (Spielmann *et al.*, 2015<sup>69</sup>).

Le parasite modifie ainsi fortement la membrane érythrocytaire, altérant la morphologie des GRs qui deviennent plus sphériques, plus rigides, moins déformables et capables d'adhérer à l'endothélium vasculaire. La cytoadhérence des iGR est au cœur de la

physiopathologie du paludisme, permettant la séquestration des iGRs au niveau des capillaires sanguins et prévenant leur passage dans la rate, qui élimine les GR sénescents et pathologiques.

### 1.2.2. Les protéines *PfEMP1* sont responsables de la cytoadhérence

Lors du cycle intra-érythrocytaire, les stades asexués tardifs de *P. falciparum* modifient fortement la surface du GR et présentent *PfEMP1* grâce à la mise en place d'un « complexe de cytoadhérence » associant des protéines parasitaires et érythrocytaires. *PfEMP1* est alors présentée au sein des knobs qui ponctuent la surface des iGRs. Les knobs présentent un diamètre de 75 à 150 nm, une hauteur de 25 nm et une surface d'environ 500 000 nm<sup>3</sup> <sup>77</sup>. Ils apparaissent au stade trophozoïte âgé. Les protéines *PfEMP1* sont des antigènes variants de surface (VSA) de hauts poids moléculaire (entre 200 et 450 kDa) capables d'interagir avec les récepteurs endothéliaux, permettant aux iGRs d'adhérer à la microvasculature. Ainsi, seuls les iGRs par des stades asexués immatures (ring) et les stades circulant de gamétocytes (stade V <sup>78</sup>) sont présents dans la circulation sanguine périphérique.

La cytoadhérence est un processus central de la pathogénicité du paludisme à *P. falciparum*, favorisant l'installation d'une infection chronique. Elle permet aux iGRs d'échapper au système immunitaire de l'Homme. Le développement du parasite rend le GR plus rigide et moins déformable, et donc plus susceptible d'être retenu par le filtre splénique <sup>79</sup>. La cytoadhérence permet donc aux iGRs d'éviter le passage dans la rate où ils seraient retenus, puis reconnus et détruits par les macrophages spléniques <sup>80</sup>.

Les iGRs séquestrent dans de nombreux organes, grâce au grand répertoire de la famille des protéines *PfEMP1*, et donc aux multiples capacités de liaison aux différents récepteurs endothéliaux de l'hôte. Les VSA sont codés de manière clonale par les gènes « *var* » parasitaires et sont insérés dans la membrane du iGR. L'expression de ces gènes est exclusive: chaque parasite n'exprime qu'un gène *var* à la fois, les autres étant maintenus transcriptionnellement silencieux. Le génome parasite comprend environ 60 gènes *var*, chacun codant une protéine *PfEMP1* différente. De plus, les phénomènes de recombinaison génétique entre les gènes *var* paralogues sont importants et à l'origine de la grande diversité du répertoire des VSA <sup>81</sup>. Le parasite change fréquemment l'expression des *PfEMP1*. Cette variation antigénique lui permet d'échapper au système immunitaire <sup>82</sup>.

Les protéines *PfEMP1* ont un ectodomaine polymorphe, lié par une hélice transmembranaire à une région cytoplasmique bien conservée. La queue cytoplasmique ancre

*PfEMP1* au niveau de la protrusion de la membrane du GR. La région extracellulaire de *PfEMP1* est composée de multiples domaines d'adhérence, appelés « Domaines Cassette » (DC) qui peuvent reconnaître simultanément plusieurs récepteurs de l'hôte. Ces DC sont composés d'un nombre variable de domaines « Duffy Binding-Like » (DBL) (de 5 types), et 1 ou 2 domaine(s) « Cystein-rich InterDomain Region » (CIDR)<sup>83</sup>. La combinaison des différents domaines DC est caractéristique de la spécificité d'adhérence du variant *PfEMP1*<sup>83,84</sup>. Les différents *PfEMP1* diffèrent en taille et en nombre de domaines extracellulaires DBL et CIDR. Les *PfEMP1* liant CD36 sont associés à un paludisme non compliqué<sup>85</sup>, ceux liant le récepteur « Endothelial Protein C Receptor » (EPCR) ou la molécule « InterCellular Adhesion Molecule 1 » ICAM-1 au paludisme cérébral<sup>86</sup> (séquestration des iGRs au niveau de l'endothélium cérébral) et le variant VAR2 liant la CSA, au paludisme placentaire<sup>61</sup> (séquestration des iGRs dans la placenta).

L'adhérence des iGRs interfère avec le flux sanguin<sup>87</sup>, endommage l'intégrité de la barrière endothéliale, et induit des voies pro-inflammatoires et pro-coagulatives<sup>88</sup>, réduisant le tonus vasomoteur<sup>86</sup>. Les iGRs peuvent aussi adhérer entre eux, par agglutination<sup>89</sup>, ou à des GRs non infectés<sup>90</sup> (phénomène de « rosetting »).

### 1.2.3. Cytoadhérence des globules rouges infectés dans le placenta : le paludisme de la femme enceinte

Chaque année, en Afrique Sub-Saharienne, plus de 30 millions de femmes sont exposées au risque de contracter un PAM<sup>91</sup>. Le paludisme cause 10 000 morts maternelles et 200 000 morts néonatales chaque année<sup>92</sup>. Le PAM est causé par l'adhérence et la séquestration des iGRs par *P. falciparum* dans les espaces intervilleux du placenta<sup>93</sup>, résultant de l'interaction de VAR2CSA<sup>61</sup> avec la CSA exprimée à la surface des syncytiotrophoblastes du placenta<sup>94</sup>. Le paludisme placentaire cause de l'anémie maternelle<sup>95</sup> et fœtale<sup>96</sup>, des retards de croissance pour le fœtus<sup>97</sup>, des naissances prématurées (« PreTerm Birth » (PTB)), des morts intrautérines<sup>98</sup>, et des LBW (moins de 2,5 kg à la naissance)<sup>99</sup>.

Les femmes les plus susceptibles de développer un PAM sont les femmes primigestes (première grossesse) car elles ne possèdent pas d'immunité spécifique contre le paludisme gestationnel. En effet, les femmes développent une immunité protectrice contre le PAM au cours des grossesses et des expositions aux parasites présentant la protéine VAR2CSA. L'exposition répétée de iGRs qui séquestrent dans le placenta entraîne le développement d'anticorps anti-VAR2CSA<sup>100</sup>. Le niveau des anticorps anti-VAR2CSA augmente avec la

gestité<sup>101,102</sup> (Figure 7), et la présence de ces anticorps dans le placenta est associée à un meilleur pronostic pour la mère et l'enfant<sup>103,104</sup>.

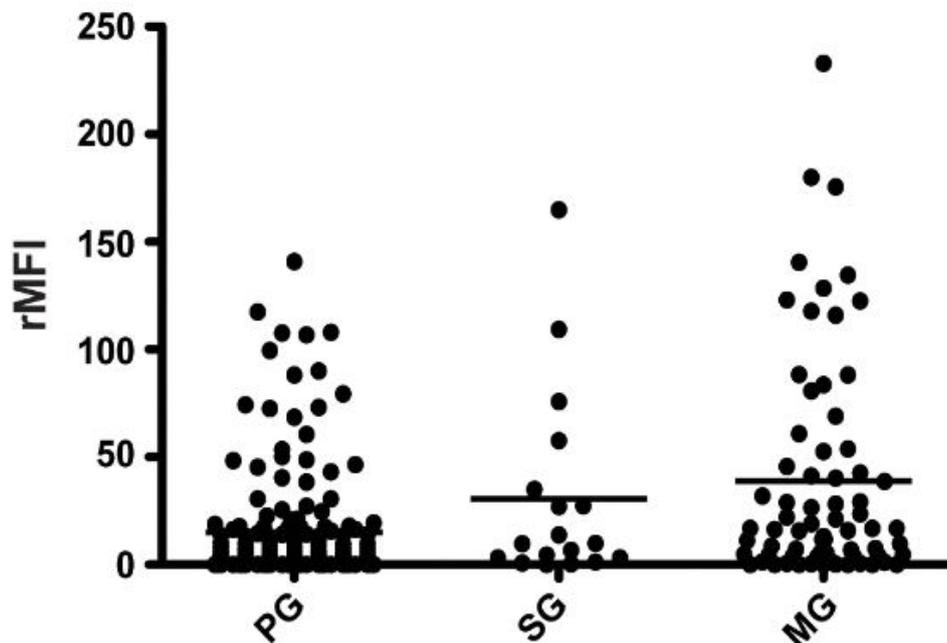


Figure 7. Niveau d'anticorps reconnaissant des érythrocytes infectés par *P. falciparum*-VAR2CSA selon la gestité. Le taux d'anticorps spécifiques de VAR2CSA a été mesuré par cytométrie en flux. Les niveaux de fluorescence (rMFI) correspondent aux taux d'anticorps mesurés. Les femmes primigestes (« PG ») ont moins d'anticorps spécifiques de VAR2CSA que les femmes secondigestes (« SG »), qui elles-mêmes en ont moins que les femmes multigestes (« MG ») (Adapté de Brolin et al., 2010<sup>105</sup>).

Ces anticorps confèrent une immunité protectrice car ils inhibent la cytoadhérence des iGRs à la CSA<sup>102</sup>. Cette capacité d'inhibition de cytoadhérence est plus forte pour les femmes multigestes que pour les primigestes<sup>101</sup>.

VAR2CSA est ainsi l'antigène utilisé pour la conception du vaccin contre le PAM<sup>63-65,93,98,99</sup>. Cependant, VAR2CSA est une grande protéine multidomaine d'environ 350 kDa présentant un polymorphisme important. Le défi réside donc dans l'identification d'un domaine conservé de VAR2CSA qui serait capable de générer une réponse immunitaire protectrice.

La cytoadhérence responsable notamment du PAM est la conséquence de modifications importantes de la membrane érythrocytaire par le parasite. L'ensemble de ces modifications résultent de l'interaction entre les protéines parasites et le cytosquelette du GR.

### 1.3. Interaction du parasite avec sa cellule hôte, le globule rouge

#### 1.3.1. Le squelette érythrocytaire

Les GRs doivent évoluer au travers de capillaires sanguins étroits. La force et la stabilité de leur membrane plasmique repose sur le cytosquelette, réseau pseudo hexagonal ancré et étendu sous la bicouche lipidique des érythrocytes. Le cytosquelette stratifie la surface membranaire interne et permet à l'hématie de se déformer massivement et réversiblement lors du passage dans les capillaires ou le filtre splénique.

##### 1.3.1.1. Cytosquelette de spectrine-actine

Ce réseau pseudo hexagonal est formé principalement du squelette spectrine-actine ancré à la membrane par des interactions avec des protéines membranaires appartenant à des complexes macromoléculaires (Figure 8).

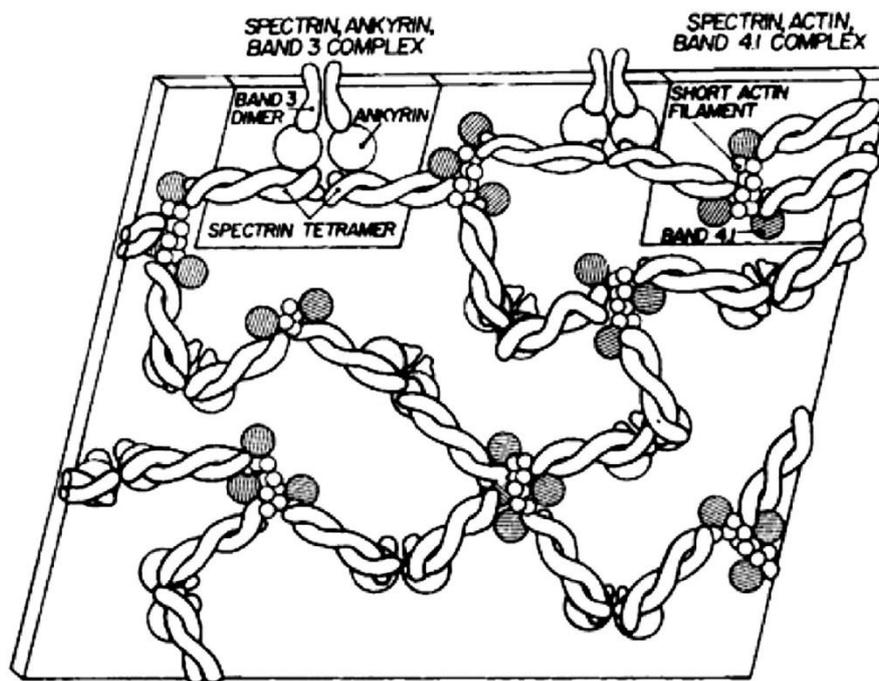


Figure 8. Schéma représentant le réseau pseudo-hexagonal du cytosquelette érythrocytaire sous la membrane du globule rouge<sup>106</sup>. Le cytosquelette érythrocytaire est majoritairement formé des tétramères de spectrine liés à l'actine. Il est ancré à la membrane plasmique par l'interaction de la spectrine avec des complexes membranaires (complexe ankyrine et complexes jonctionnel d'actine). Ce cytosquelette confère au GR sa grande déformabilité (Lux, 2016<sup>106</sup>).

Le composant principal du cytosquelette érythrocytaire est la spectrine, dimère composé de deux chaînes parallèles alpha ( $\alpha$ ) et bêta ( $\beta$ ), orientées dans des directions opposées, constituant une protéine longue et flexible. Les domaines à l'extrémité N-terminale de la

spectrine  $\beta$  se lie aux filaments courts d'actine et à d'autres protéines. En moyenne, six tétramères de spectrine se lient par filament d'actine, créant l'arrangement pseudo hexagonal<sup>106</sup>. D'autres protéines cytosquelettiques comme la protéine 4.1, l'adducine et la dématine se lient à la fois à la spectrine et à l'actine, générant un complexe ternaire de haute affinité favorisant la liaison spectrine-actine.

Les protofilaments d'actine-F (fibrillaire) sont des homopolymères de sous-unités de  $\beta$ -actine ou d'actine-G (globulaire), formant des filaments courts en double hélice. Chaque filament contient six à huit monomères d'actine. Les GRs contiennent approximativement 30 000 à 40 000 protofilaments, qui s'étendent parallèlement à la membrane (+/-20°) et sont orientés aléatoirement. Certaines protéines régulent la dynamique des filaments l'actine, comme l'adducine qui se lie à l'actine pour empêcher sa polymérisation, et la tropomoduline et la tropomyosine pour inhiber sa dépolymérisation.

#### 1.3.1.2. Ancrage du cytosquelette spectrine-actine à la membrane

Le cytosquelette de spectrine-actine est ancré à la membrane par deux complexes protéiques : le complexe ankyrine et le complexe jonctionnel d'actine (Figure 9). Le cytosquelette lie des protéines membranaires périphériques, l'ankyrine ou la protéine 4.1, ces dernières liées à une protéine membranaire intégrale, la Bande 3 ou la glycophorine C (GPC), pour les complexes ankyrine et jonctionnel d'actine, respectivement.

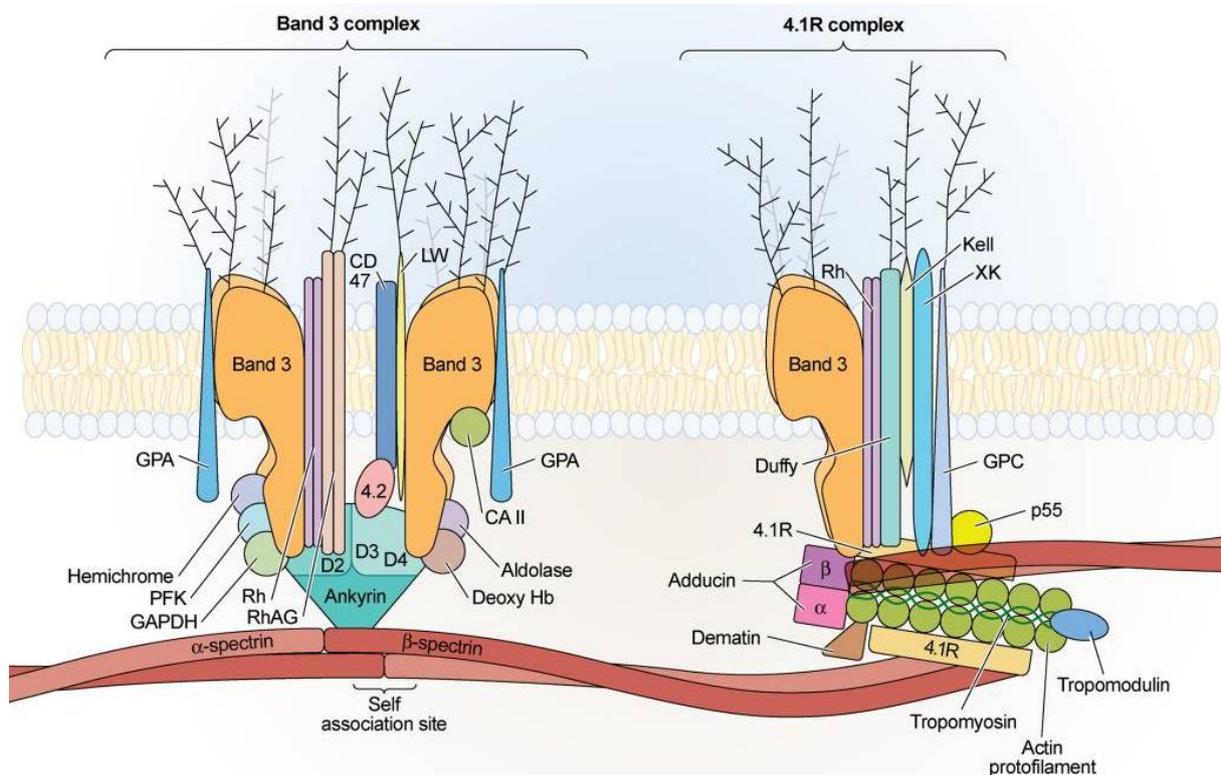


Figure 9. **Complexe ankyrine, premier ancrage du cytosquelette érythrocytaire à la membrane (gauche) et complexe jonctionnel d'actine, deuxième ancrage du cytosquelette érythrocytaire à la membrane (droite).** Le complexe ankyrine contient une ankyrine, un tétramère de Bande 3, deux protéines 4.2, deux homo- ou hétérodimères de glycophorine A (GPA) et B (GPB) et un complexe Rh (1 trimère de RhAG combiné avec RhD et RhCE). Le complexe jonctionnel contient des dimères de Bande 3, de l'actine, spectrine, glycophorine C/D (GPC/D), protéine 4.1, dématine, adducine, GPA, stomatine et p55 (stœchiométrie complète inconnue) (Salomao *et al.*, 2008<sup>107</sup>).

### 1.3.1.3. Le complexe ankyrine

Le complexe ankyrine assure le premier lien entre la spectrine et la membrane : Bande 3 / ankyrine / spectrine  $\beta$ <sup>107</sup>. L'ankyrine érythrocytaire (monomère de 206 kDa) lie la spectrine et la Bande 3. Les GRs contiennent environ 100 000 copies d'ankyrine, chacune possédant trois domaines (Figure 10) :

- le domaine membranaire, responsable de la liaison au domaine cytoplasmique de la Bande 3 (cdB3). L'ankyrine possède deux sites de liaison pour la Bande 3.
- le domaine de liaison de la spectrine. La liaison de l'ankyrine promeut la formation de tétramères ou d'oligomères de spectrine d'environ 10 fois, l'oligomérisation de la spectrine favorisant la liaison de l'ankyrine.
- le domaine C-terminal régulateur, qui module probablement les fonctions de liaison des deux autres domaines.

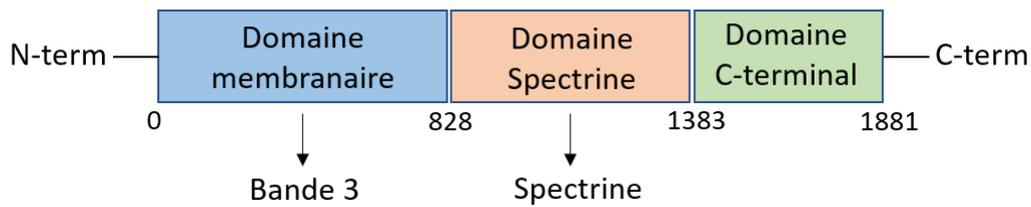


Figure 10. **Organisation de l'ankyrine érythrocytaire et de ses domaines de liaison à la Bande 3 et à la spectrine.** L'ankyrine est constituée de trois domaines : le domaine membranaire N-terminal, se liant à la Bande 3 ; le domaine spectrine qui interagit avec la spectrine ; et le domaine C-terminal régule probablement la fonction des deux autres domaines.

La Bande 3 est la protéine membranaire érythrocytaire majeure, chaque GR contenant approximativement 1,2 million de copies. Cette protéine comprend deux domaines fonctionnellement différents (Figure 11) :

- un domaine N-terminal cytoplasmique (AAs 1-359), ou cdB3, qui est le site d'attache clé du squelette membranaire, des enzymes glycolytiques et de la désoxyHb,
- un domaine membranaire intégral en C-terminal (résidus 360-911) qui forme un échangeur d'ions chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) et bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) au travers de la membrane plasmique <sup>108</sup>.

Au niveau du cdB3, des enzymes glycolytiques forment un complexe métabolique appelé « métabolon ». La PhosphoFructoKinase (PFK), l'aldolase, et la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase (G3PD) se lient directement au cdB3 et aux résidus 356 et 384, proches lorsque la protéine Bande 3 est repliée. L'énolase, la Pyruvate Kinase (PK) et la LDH se lient indirectement dans le cadre du complexe. Ces enzymes sont inactives lorsqu'elles sont liées au cdB3, mais deviennent actives si elles sont déplacées soit par la désoxyHb qui se lie aussi à l'extrémité N-terminale, ou par phosphorylation de la Bande 3 sur les Tyrosines (Tyr/Y)<sup>8</sup> et Y<sup>21</sup>. La liaison de ces protéines permet de réguler le métabolisme du glucose. Tout comme le métabolon glycolytique, l'ankyrine est déplacée de la Bande 3 par la désoxyHb, ainsi que par la liaison de la protéine 4.1 du complexe jonctionnel au cdB3. Le cdB3 joue donc un rôle crucial dans la structure et l'organisation membranaire, car il lie certaines protéines squelettiques (adducine, ankyrine, protéine 4.1, protéine 4.2), ancrant ainsi le cytosquelette de spectrine et d'actine à la membrane du GR <sup>109</sup>. La phosphorylation du cdB3 est un mécanisme de régulation clé du GR.

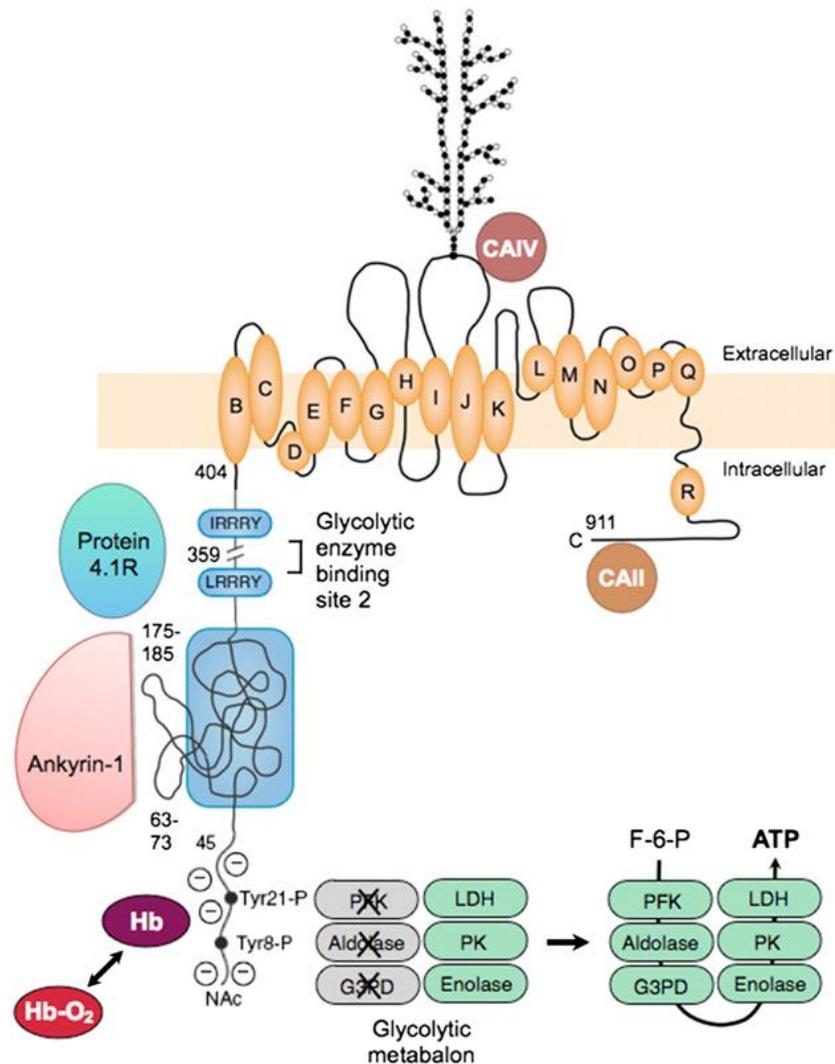


Figure 11. **Organisation de la Bande 3 et de ses domaines de liaison.** Le cdb3 (N-terminal) joue un rôle structural, en se liant aux protéines cytosquelettiques, mais aussi un rôle régulateur du métabolisme du glucose en interagissant avec les enzymes de la glycolyse. Son domaine membranaire C-terminal constitue un échangeur d'anions nécessaire pour les échanges gazeux effectués par le GR (Lux, 2016<sup>106</sup>).

#### 1.3.1.4. Le complexe jonctionnel d'actine

Le complexe jonctionnel d'actine ancre le cytosquelette spectrine-actine à la membrane par différentes interactions : GPC/protéine 4.1/spectrine  $\beta$ <sup>107</sup> et Bande 3/adducine/spectrine  $\beta$ <sup>110</sup> (Figure 9). De plus, la dématine et l'adducine peuvent se lier indépendamment au transporteur de glucose 1 (ou « GLUcose Transporter-1 » (GLUT-1)), constituant un autre lien du complexe à la membrane: GLUT-1/dématine/adducine/spectrine<sup>111</sup> (Figure 12).

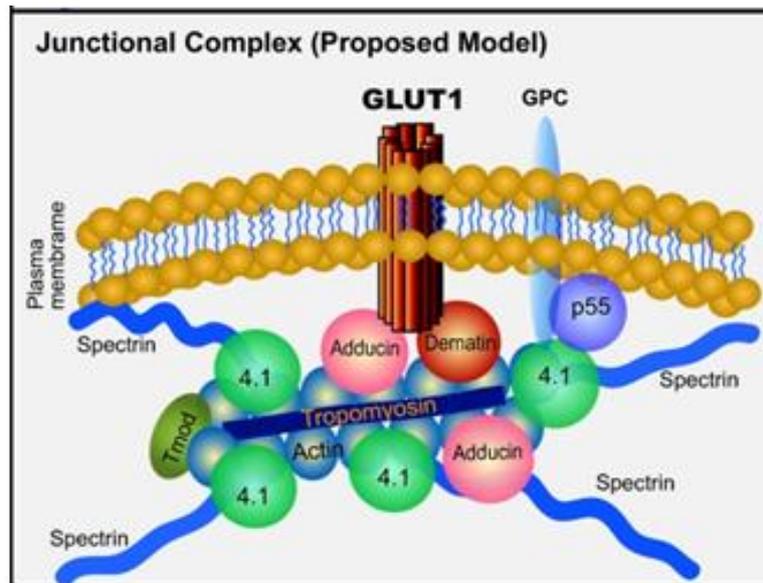


Figure 12. **Liaison du complexe jonctionnel à la membrane plasmique par l'interaction de l'adducine et de la dématine à GLUT-1** (Khan et al., 2008<sup>111</sup>).

La Bande 3 est présente au sein des deux complexes. 40% des molécules de Bande 3 sont des tétramères liés à l'ankyrine et 40% seraient des dimères localisés dans le complexe jonctionnel. Les dimères de Bande 3 restants (20-30%) diffusent librement dans la membrane, contraints pour la plupart par les liaisons au réseau de spectrine.

Les complexes ankyrine et jonctionnel d'actine sont assez proches *in situ* dans la membrane et doivent souvent entrer en collision, particulièrement lors de la déformation du GR. Ainsi, la Bande 3, la protéine 4.1, la protéine 4.2, et l'adducine, qui ont des partenaires dans les deux complexes, pourraient parfois changer de complexe. Du fait que certaines protéines entrent en compétition pour les mêmes sites de liaison, ce processus pourrait être un mode de régulation.

La protéine 4.1 (66,4 kDa) possède un domaine « Spectrin-Actin BinDing » (SABD) qui se lie à la spectrine  $\beta$  et l'actine, favorisant la liaison spectrine-actine. Elle dispose aussi d'un domaine N-terminal « Membrane Binding Domain » (MBD) qui attache le cytosquelette à la membrane, par liaison à la glycophorine A (GPA), à la GPC, à p55, et au cdB3. Le domaine N-terminal de la protéine 4.1 contient deux régions de liaison à la CalModuline (CaM), une insensible au  $\text{Ca}^{2+}$  et l'autre sensible<sup>112</sup> (Figure 13). La CaM est une protéine régulatrice ubiquitaire impliquée dans de nombreuses voies de signalisation dépendantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , et régule la liaison de la protéine 4.1 à la membrane et aux protéines cytosquelettiques.

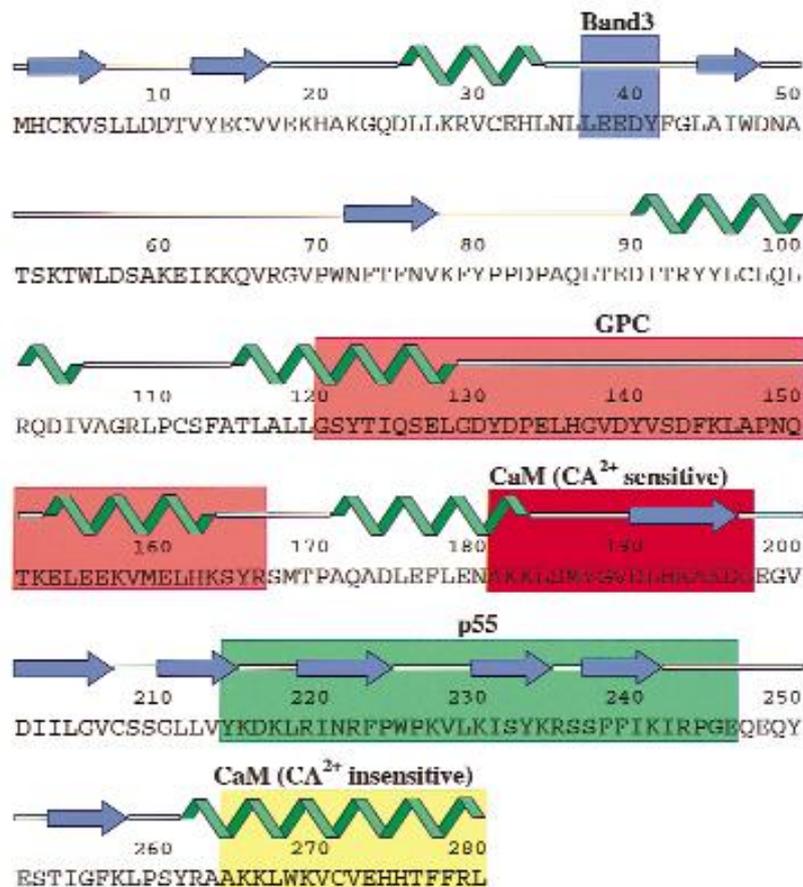


Figure 13. **Séquence primaire, structures secondaires et sites de liaison du domaine N-terminal de la protéine 4.1.** La protéine 4.1 contient deux sites de liaison à la CaM. Le premier, insensible au Ca<sup>2+</sup> contient un cluster hydrophobe. Le deuxième site de liaison est sensible au Ca<sup>2+</sup>. Le domaine N-terminal contient aussi les sites de liaison pour les protéines Bande 3, GPC et p55 (*d'après Han et al., 2000*<sup>112</sup>).

L'adducine, autre composant du complexe jonctionnel, est une protéine multifonctionnelle formée d'une sous-unité  $\alpha$  associée à une sous-unité  $\beta$ , ou, moins souvent, à une sous-unité gamma ( $\gamma$ ). Chaque sous-unité contient : un domaine globulaire « head » en N-terminal, où les sous-unités interagissent entre elles ; un domaine « neck » et un domaine « tail » en C-terminal, contenant le site de liaison à la Bande 3 et des complexes spectrine-actine, dans les 100 derniers AAs C-terminaux. Les GRs contiennent approximativement 30 000 dimères (aussi des tétramères) d'adducine. L'adducine participe à l'ancrage du cytosquelette membranaire à la bicouche lipidique en interagissant avec la Bande 3 et GLUT-1 au sein du complexe jonctionnel.

La dématine (ou bande 4.9) est une protéine existant probablement sous forme de trimère dans les GRs. Cette protéine favorise la liaison spectrine-actine. Cette fonction est perdue lorsque la dématine est phosphorylée par la protéine kinase A.

GLUT-1 est une protéine transmembranaire existant sous forme de dimère et tétramère dans les GRs. GLUT-1 est un transporteur basal du glucose, le plus abondant dans les érythrocytes. En effet, il représente 2 à 6% de la masse totale des protéines membranaires des GRs. Ce transporteur présente une cinétique de transport de glucose rapide, répondant de loin aux nécessités physiologiques des hématies. Son abondance est donc surprenante et suggère un autre rôle, qui pourrait être structural. GLUT-1 transporte l'acide L-déhydroascorbique lorsqu'il est lié à la stomatine. De plus, il interagit avec la dématine et l'adducine, et participe ainsi à l'ancrage des complexes spectrine-actine à la membrane (Figure 12).

### 1.3.2. Importance du cytosquelette du globule rouge pour le développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum*

#### 1.3.2.1. Invasion et formation de la vacuole parasitophore

Le cytosquelette érythrocytaire est crucial pour le processus d'invasion parasitaire. Le mérozoïte envahit le GR en interagissant avec certaines protéines cytosquelettiques puis entraîne la modification de la structure du squelette érythrocytaire. L'invasion est un processus complexe se produisant en plusieurs étapes (Figure 14). Après sa libération dans la circulation sanguine, le mérozoïte s'attache tout d'abord au GR et se réoriente afin d'exposer son extrémité apicale face à la membrane érythrocytaire. Puis il établit des interactions entre ses protéines de surface ou ligands, et des récepteurs érythrocytaires, afin d'établir la « jonction serrée ». Une fois ancré à la membrane du GR par son extrémité apicale, le parasite entre dans l'érythrocyte grâce à son propre moteur d'actine en s'invaginant dans la membrane, créant la PV dans laquelle il se développera au sein du GR.

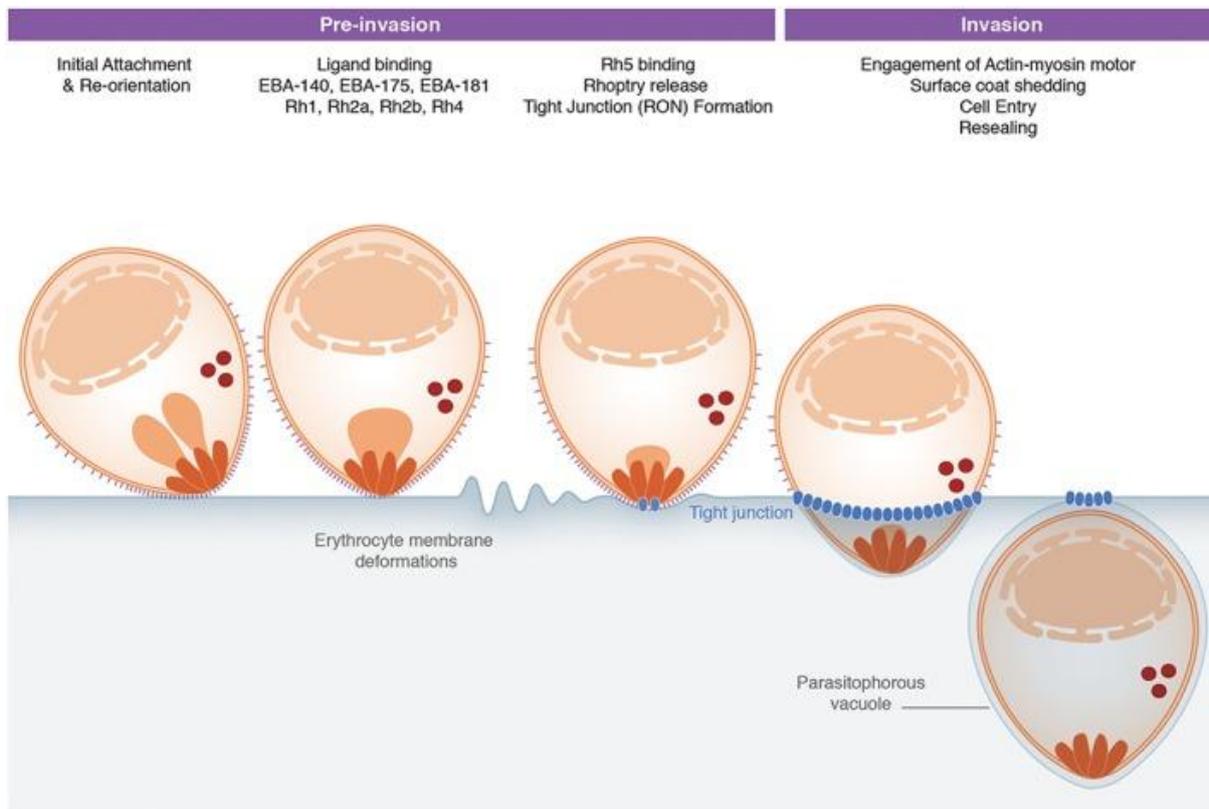


Figure 14. **Les différentes étapes de l'invasion du globule rouge par le mérozoïte.** Dans le sang, le mérozoïte s'attache au GR et se ré-oriente pour exposer son extrémité apicale à la surface érythrocytaire. Le mérozoïte sécrète alors des adhésines qui interagissent avec des récepteurs érythrocytaires pour établir la « jonction serrée ». Une fois ancré au GR, le processus d'invasion débute, le mérozoïte entre dans le GR en s'invaginant dans sa PV grâce à son moteur d'actine (Koch et Baum, 2016 <sup>113</sup>).

L'interaction des protéines parasitaires avec le GR entraîne la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le mérozoïte. Ce signal calcique entraîne la sécrétion d'adhésines de deux classes majeures au niveau de son extrémité apicale : les protéines « Erythrocyte Binding like Protein » (EBP) ou « Erythrocyte Binding Antigen » (EBA) et « Reticulocyte Binding Like Homologue » (RBL ou Rh) <sup>114,115</sup>. Ces protéines interagissent avec des récepteurs du GR. La localisation et l'affinité de ces ligands, probablement plus importante que celle de MSP1, permet probablement la ré-orientation du mérozoïte pour exposer son extrémité apicale à la surface du GR et s'y ancrer <sup>113</sup>. Notamment, la protéine « Erythrocyte Binding Antigen-175 » (EBA-175) interagit avec la GPA, entraînant une augmentation de la tension du cytosquelette du GR <sup>116</sup>. De plus, l'interaction des protéines Rh régule certaines voies de signalisation intracellulaire du mérozoïte et du GR. Notamment, la liaison de la protéine « *Plasmodium falciparum* Reticulocyte binding protein Homologue 5 » (*PfRh5*) à la basigine <sup>117</sup> entraîne l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol érythrocytaire <sup>118</sup> (Figure 15).

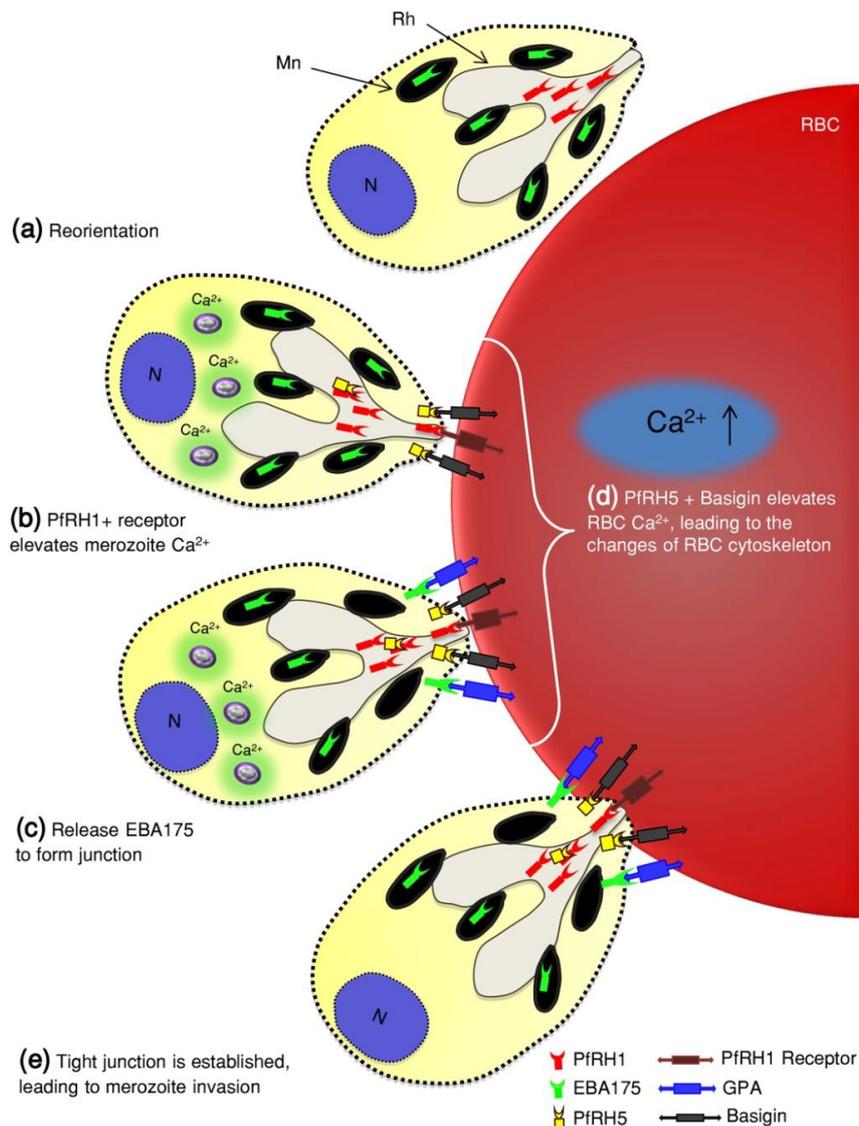


Figure 15. **Interaction de l'extrémité apicale du mérozoïte avec la membrane du globule rouge lors de l'invasion.** Après sa réorientation (a), des protéines de l'extrémité apicale du mérozoïte se lient avec des récepteurs érythrocytaires, entraînant une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du mérozoïte (b), causant la libération des adhésines comme EBA175 qui se lie à la GPA (c). La liaison de PfRH5 à la basigine mène à une augmentation de la concentration cytosolique du GR en  $\text{Ca}^{2+}$ , causant des modifications de la structure du cytosquelette érythrocytaire pour permettre l'invasion (d). L'ensemble des interactions entre les protéines du mérozoïte au niveau de l'extrémité apicale et les récepteurs érythrocytaires permettent la mise en place de la jonction serrée (e) (Rh : rhoptrie) (Mn : micronème) (Aniweh *et al.*, 2017<sup>118</sup>).

Ce signal calcique cause des changements de phosphorylation de protéines du cytosquelette érythrocytaire, dont une augmentation de la phosphorylation des protéines 4.1, GPA, GPC, de l'ankyrine, la spectrine  $\beta$  et de la dématine (résultant probablement de l'activation de kinases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ )<sup>119</sup> (Figure 16). Ces changements de phosphorylation sont associés à des modifications de la structure du cytosquelette érythrocytaire. Aniweh *et al.* ont observé une diminution de la présence de l'ankyrine et de l'adducine au niveau du cytosquelette érythrocytaire suite à l'augmentation de la

concentration calcique après liaison d'une protéine RH5 recombinante à la basigine, ainsi que l'augmentation de la taille du maillage du réseau de spectrine. Ces modifications pourraient permettre le relâchement de la membrane du GR nécessaire pour l'entrée du mérozoïte <sup>118</sup>.

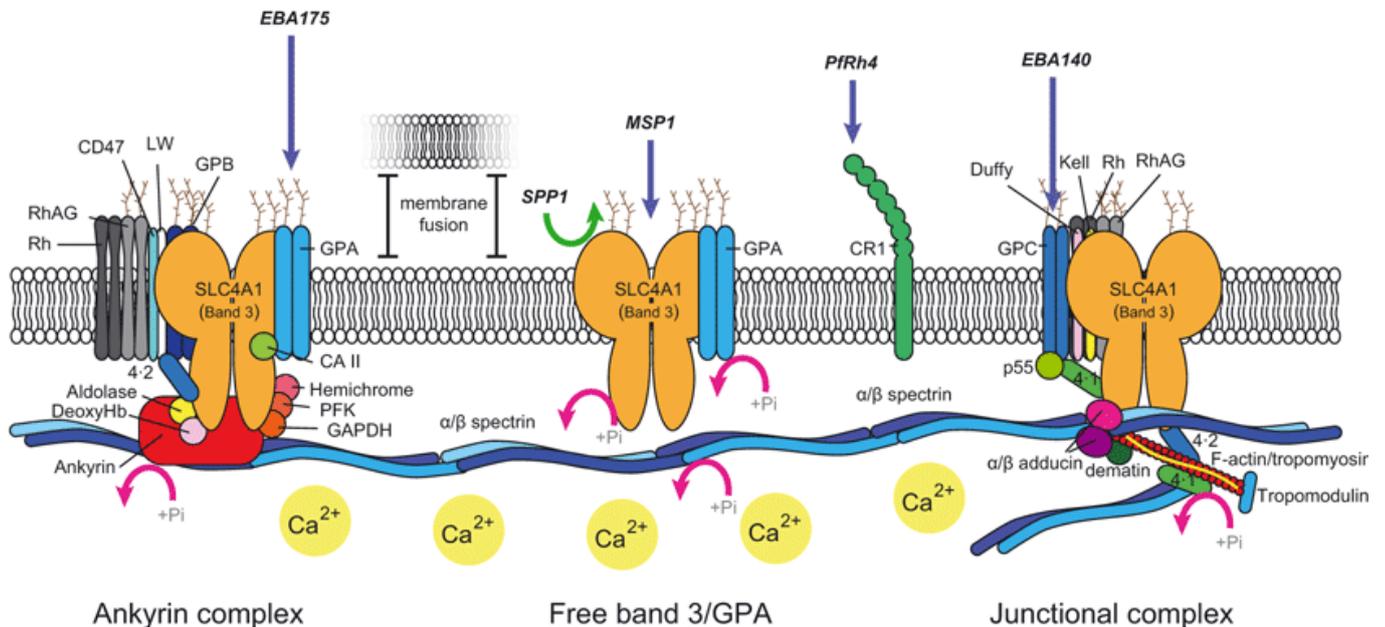


Figure 16. **Modifications du cytosquelette lors de l'invasion parasitaire.** Le mérozoïte interagit avec la membrane du GR (flèches bleues), par MSP1 lors de l'attachement initial, puis par les adhésines qu'il sécrète (EBA-175, *PfRh4*, EBA-140). Afin de restructurer la membrane érythrocytaire qui s'invagine lors de l'invasion, le parasite engendre le clivage de protéines membranaires du GR comme la Bande 3 (flèche verte); ainsi qu'un changement de phosphorylation facilitant la restructuration du cytosquelette érythrocytaire (flèches roses) (*Adapté de Zuccala et al., 2011* <sup>119</sup>).

Après l'établissement de la jonction serrée, le parasite crée la PV et entre dans le GR. La PVM résulte de l'invagination de la membrane plasmique et de la sécrétion de phospholipides par le mérozoïte <sup>113</sup>. Certaines protéines érythrocytaires sont exclues de la portion de membrane invaginée, et a posteriori de la membrane de la PV, dont la spectrine, l'ankyrine, la stomatine et la Bande 3 <sup>119</sup>. Le squelette érythrocytaire est donc modifié afin d'exclure le cytosquelette de spectrine et d'actine de la membrane de la future PV. Ces modifications s'effectuent notamment par le biais de protéases parasitaires sécrétées lors de l'invasion après liaison du mérozoïte avec les récepteurs érythrocytaires (Figure 16) <sup>120</sup>, dont la sérine protéase gp76 qui clive la Bande 3 et la GPA. La dégradation de la GPA pourrait être nécessaire pour dissocier le complexe GPA-EBA-175 et permettre l'entrée du mérozoïte dans le GR <sup>121</sup>. Le clivage de Bande 3 et de la GPA par la gp76 permettrait aussi la restructuration du cytosquelette érythrocytaire, puis la création de la PV et l'entrée du mérozoïte dans le GR. Les modifications du cytosquelette s'effectuent aussi par le biais de phosphorylations (Figure

16). Au début de l'invasion, la Bande 3 est Y-phosphorylée (par une Y kinase dont l'origine n'est pas connue), diminuant son attachement au cytosquelette érythrocytaire. La Bande 3 est ainsi exclue du site d'invasion où le parasite crée sa PV. De plus, cette déstabilisation membranaire pourrait faciliter l'entrée du mérozoïte. A la fin de l'invasion, le mérozoïte libère une Y-phosphatase parasitaire, *PfShelp2*, qui hydrolyse le cdB3. Cette activité restaure l'affinité de la Bande 3 pour l'ankyrine, et permet le retour de la Bande 3 au niveau du site d'invasion, liée aux autres composants du cytosquelette <sup>122</sup>.

### 1.3.2.2. Trafic protéique et Maurer's Clefts

Lors de son cycle intra-érythrocytaire, *P. falciparum* génère des modifications importantes du GR. Les GRs ayant perdu leur capacité sécrétrice, le parasite synthétise et exporte ses propres protéines dans le cytoplasme érythrocytaire, et au niveau du squelette et de la membrane du GR. *P. falciparum* génère un exportome de plus de 400 protéines <sup>123</sup>. Pour cela, le parasite établit un système de trafic protéique par la formation d'organites lamellaires, les MCs. Les mécanismes d'ancrage des MCs à la membrane plasmique ne sont pas encore totalement élucidés et sont encore débattus. Certaines études suggèrent que l'ancrage des MCs à la membrane s'effectue par des structures dites d'attache (« tether ») <sup>124</sup>, contenant la protéine « Membrane-Associated Histidine-Rich Protein 2 » (MAHRP2) <sup>125</sup>. Ces structures pourraient initier l'ancrage des MCs à la membrane, par la suite renforcé par des interactions avec le cytosquelette érythrocytaire <sup>75</sup>. D'autres travaux suggèrent que *P. falciparum* détournerait le réseau d'actine de l'hôte pour ancrer les MCs à la membrane et pour exporter les protéines dérivées des MCs par transport vésiculaire le long de ces filaments <sup>126,127</sup>. La protéine « *Plasmodium falciparum* PfEMP1 Trafficking Protein 1 » (*PfPTP1*), une protéine membranaire intégrale des MCs est cruciale pour l'architecture des MCs et pour le trafic de *PfEMP1* <sup>128</sup>. Elle forme un large complexe incluant la protéine « *Plasmodium falciparum* Skeleton Binding Protein 1 » (*PfSBP1*) permettant de lier les MCs au squelette érythrocytaire <sup>128,129</sup>. *PfSBP1* est une protéine membranaire intégrale des MCs, dont le domaine C-terminal (exposé à la surface des MCs) lie la spectrine  $\alpha$  et la protéine 4.1. La liaison de *PfSBP1* avec la protéine 4.1 est requise pour la localisation des MCs au niveau du squelette membranaire <sup>130</sup>. Enfin, *PfSBP1* joue un rôle crucial pour le trafic de *PfEMP1*.

*Pf332*, la plus grande protéine parasitaire exportée (700 kDa) <sup>131</sup>, est une protéine membranaire des MCs <sup>132</sup>. Elle interagit avec l'actine <sup>133</sup>, et pourrait donc participer à l'ancrage des MCs à la membrane du GR. En effet, ces structures ont une morphologie et une

localisation anormale en absence de *Pf332*. *Pf332* semble aussi jouer un rôle pour la cytoadhérence, car la présentation de *PfEMP1* et l'adhérence du iGR diminuent en son absence<sup>134</sup>. Les résidus 5115-5201 du domaine C-terminal de *Pf332* se lient à l'actine, diminuant probablement l'affinité de la spectrine pour la protéine 4.1, menant à une réduction de la rigidité membranaire<sup>133</sup>, protégeant les iGRs de la séquestration et de l'élimination splénique<sup>134</sup>.

### 1.3.2.3. Propriétés membranaires et cytoadhérence

Le développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum* mène à des changements drastiques de la morphologie et des propriétés membranaires du GR, causant l'augmentation de sa rigidité et de son adhérence<sup>135</sup>.

La Bande 3 et les glycophorines, les protéines membranaires érythrocytaires majeures, présentent d'importantes réductions de leur mobilité membranaire dès le stade ring et de manière plus prononcée au stade trophozoïte<sup>136</sup>. En effet, le stress oxydant, ici causé par l'infection, induit la phosphorylation de tyrosines de la protéine Bande 3, qui augmente fortement du stade ring jusqu'au stade trophozoïte, bien qu'une déphosphorylation massive se produise au stade schizonte tardif<sup>137</sup>. Les espèces oxydantes dont les hémichromes se lient au cdB3 et entraînent son oxydation. Le cdB3 possède des résidus cystéine hautement réactifs, qui se lient après oxydation de la protéine permettant l'amarrage de la Y-kinase p72Syk (qui interagit préférentiellement avec la forme oxydée et désoxygénée de la Bande 3), puis la phosphorylation de la protéine<sup>138,139</sup>. Le cdB3 est séquentiellement phosphorylé par Syk, sur les résidus Y<sup>8</sup> et Y<sup>21</sup>, puis par une autre Y-kinase, Lyn sur les Y<sup>359</sup> et Y<sup>904</sup><sup>140</sup>. La phosphorylation de Y de la Bande 3 réduit son affinité pour l'ankyrine et diminue ainsi son attachement au cytosquelette érythrocytaire<sup>141</sup>. Ainsi, la mobilité de la Bande 3 dans la membrane augmente, entraînant son agrégation<sup>142</sup>. Ces agrégats de Bande 3 forment des sites antigéniques reconnus par des auto-anticorps (IgG autologues) et le complément C3 (par le fragment C3c du complément plus précisément), facilitant l'opsonisation par les macrophages spléniques et ainsi l'élimination des GRs les présentant<sup>143</sup>. Ces différents processus augmentent au cours du cycle intraérythrocytaire du parasite<sup>144,145</sup> (Figure 17).

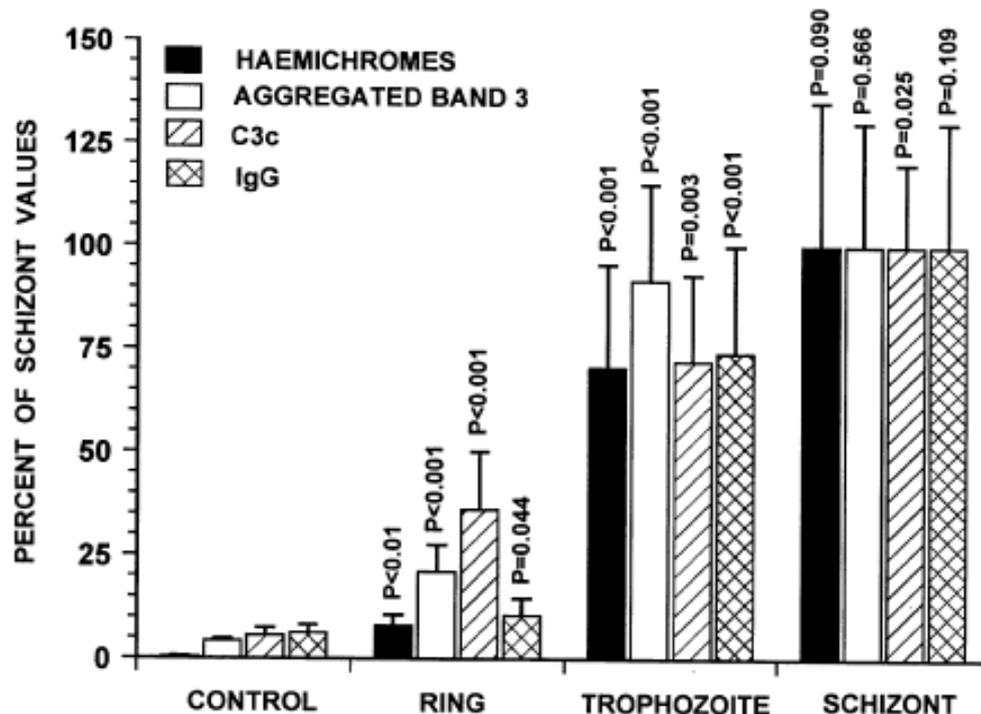


Figure 17. Régulation de l'agrégation de la protéine Bande 3 oxydée au cours du cycle intra-érythrocytaire et de la reconnaissance immunitaire des agrégats formés. La production d'hémichromes augmente avec la maturation parasitaire, ainsi que l'agrégation de la Bande 3 et la reconnaissance par le complément (C3c) et les auto-anticorps (IgG) des agrégats formés. Les valeurs sont rapportées en pourcentage par rapport à celles mesurées au stade schizonte (Giribaldi *et al.*, 2001<sup>144</sup>).

L'importance de la régulation de la phosphorylation de Y de la Bande 3 est illustrée par l'impact des « Indolone-N-OxiDes » (INOD), antipaludiques connus, sur la croissance parasitaire. Ces traitements génèrent des radicaux libres et entraînent au stade ring une forte augmentation de la phosphorylation de Y de la Bande 3, ainsi que de la formation d'agrégats membranaires la contenant. Les INOD inhibent le développement parasitaire de 80% au stade ring, mais l'ajout d'un inhibiteur de la kinase Syk réduit leur effet de 40%<sup>146</sup>, soulignant le rôle majeur de la phosphorylation de Y de la Bande 3 pour le développement parasitaire.

Une des modifications majeures induite par le parasite est l'apparition, 12 à 15h après l'invasion, de knobs à la surface des GRs. Ces structures sont responsables de la cytoadhérence des iGRs. En effet, *PfEMP1* est présentée à la surface des hématies, grâce à la mise en place d'un complexe de cytoadhérence, résultant de l'interaction de protéines parasitaires (« Knob-Associated Histidine Rich Protein » (KAHRP) et *PfEMP1*) avec les protéines de la membrane et du squelette du GR (Figure 18). Ces interactions ancrent les knobs présentant *PfEMP1* dans la membrane érythrocytaire, fournissant la force et la stabilité suffisantes pour permettre au iGR de cytoadhérer dans le flux sanguin<sup>147</sup>.

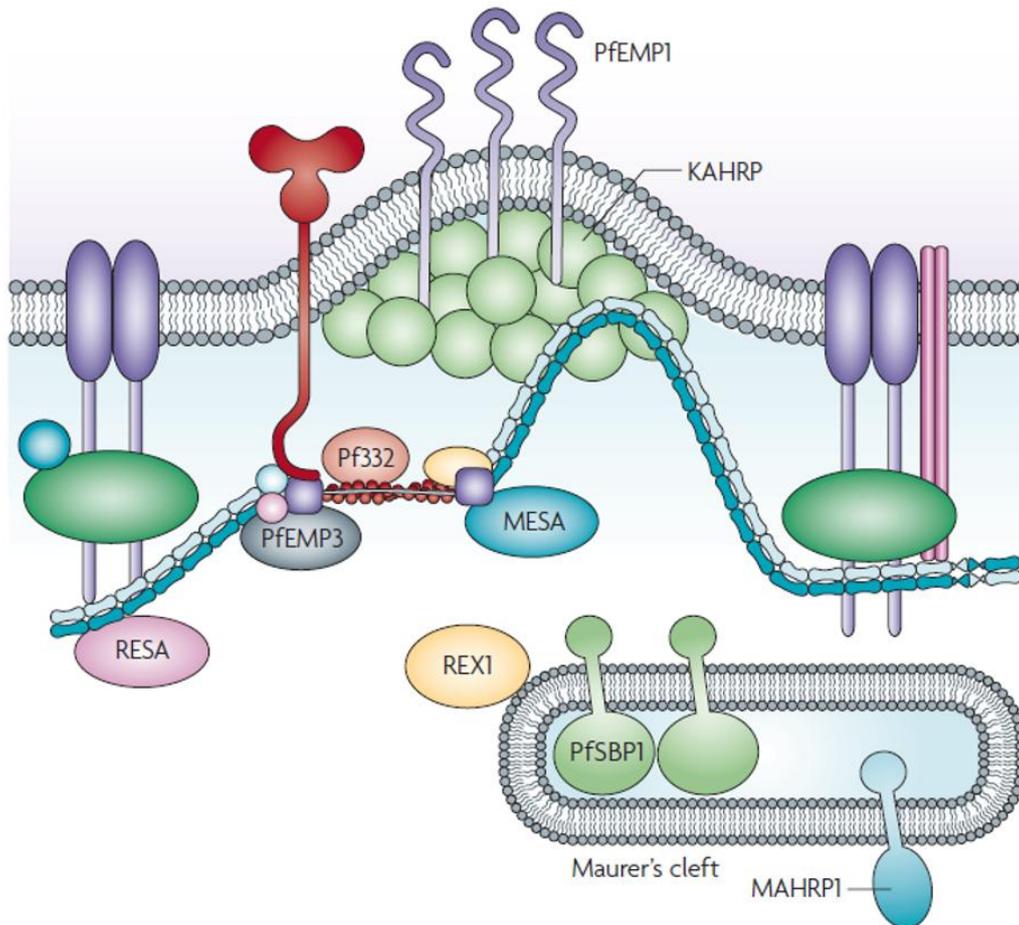


Figure 18. **Modèle du complexe de cytoadhérence induit par *P. falciparum* à la surface des érythrocytes infectés.** *PfEMP1* est ancrée dans les knobs par son interaction avec KAHRP, la protéine 4.1, la spectrine et l'actine. MESA interagit avec la protéine 4.1, *PfEMP3* avec la spectrine et l'actine. Toutes ces interactions permettent de restructurer le cytosquelette érythrocytaire, afin de modifier les propriétés de la membrane du GR (Adapté de Maier et al., 2009<sup>147</sup>).

La protéine KAHRP est le composant majeur des knobs<sup>148</sup>. Les molécules de KAHRP s'auto-associent pour former des structures coniques, à l'origine des knobs, qui interagissent avec le squelette membranaire érythrocytaire. *PfEMP1* présente son domaine N-terminal à la surface extracellulaire où elle peut interagir avec les récepteurs endothéliaux, et interagit avec KAHRP<sup>149</sup> par son domaine cytoplasmique<sup>150</sup>, permettant de concentrer l'adhésine dans les knobs et d'augmenter l'avidité de l'adhérence<sup>151</sup>. KAHRP interagit avec la spectrine et l'ankyrine, une molécule de KAHRP peut en effet lier et stabiliser à la fois ces deux protéines<sup>151</sup>. Cette interaction est nécessaire pour l'attachement de KAHRP à la membrane et la formation des knobs<sup>152</sup>. KAHRP, par son interaction avec l'ankyrine, interagit probablement avec *PfEMP1* au niveau du complexe ankyrine. *PfEMP1* est en liaison directe avec le cytosquelette de spectrine-actine<sup>153</sup> et la protéine 4.1, et se lie donc aussi probablement à la membrane érythrocytaire au niveau du complexe jonctionnel (Figure 19).

KAHRP est donc cruciale pour la formation des knobs<sup>154,148</sup>, pour l'ancrage de *PfEMP1* au niveau du squelette érythrocytaire et pour le phénomène de cytoadhérence en flux (mais pas en conditions statiques)<sup>155</sup>. Enfin, la protéine KAHRP, par son interaction avec l'actine<sup>156</sup>, pourrait attacher les filaments d'actine induits par le parasite à la membrane érythrocytaire, et ainsi diriger les vésicules cargo provenant des MCs.

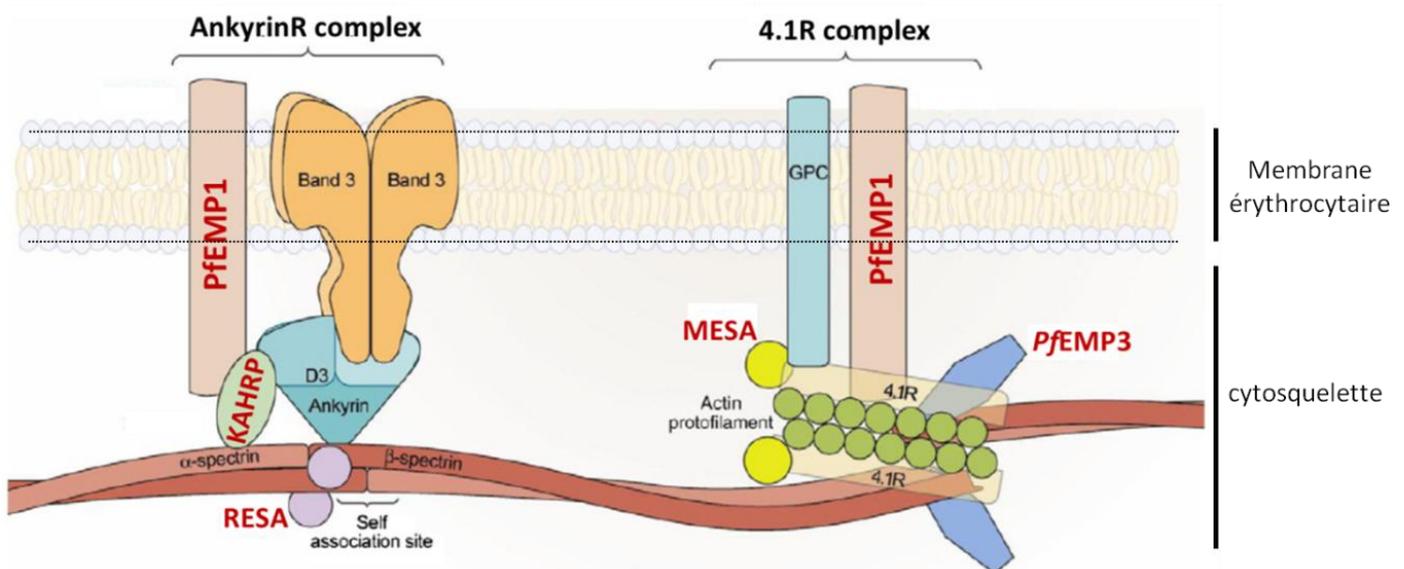


Figure 19. **Interaction de *PfEMP1* et d'autres protéines parasites avec le cytosquelette érythrocytaire.** Au stade ring, RESA interagit avec la spectrine et stabilise le squelette membranaire. Aux stades matures, les protéines KAHRP s'auto-assoient et ancrent les knobs présentant *PfEMP1* dans le squelette membranaire en interagissant avec la spectrine et l'ankyrine (probablement au niveau du complexe ankyrine). *PfEMP1* se lie aussi avec le cytosquelette d'actine-spectrine et la protéine 4.1, et interagit donc aussi probablement avec le squelette érythrocytaire au niveau du complexe jonctionnel. *PfEMP3* et MESA interagissent avec la protéine 4.1, et participent à la modification des propriétés membranaires du iGR, qui devient plus rigide et moins déformable (*Adapté de Weng et al., 2014*<sup>151</sup>).

D'autres protéines parasites, les protéines MESA et *PfEMP3*, se lient à la membrane érythrocytaire et participent à la diminution de la stabilité membranaire.

MESA (250-300 kDa) est produite au début du stade trophozoïte et se localise au niveau du squelette érythrocytaire en interaction avec la protéine 4.1<sup>157,158</sup>. MESA et la protéine 4.1 sont des phosphoprotéines. MESA est cytosolique dans les GRs déficients en protéine 4.1<sup>159</sup>.

*PfEMP3* est localisée au niveau de la membrane érythrocytaire, en interaction avec le cytosquelette du GR, à la fois avec la spectrine et l'actine<sup>160</sup>. *PfEMP3* semble aussi essentielle pour le trafic de *PfEMP1* et ainsi pour la cytoadhérence<sup>161</sup>.

La spectrine semble jouer un rôle majeur dans la localisation des protéines parasites au niveau de la membrane du GR. En effet, RESA, KAHRP, et *PfEMP3* se lient toutes à la spectrine, mais au niveau de domaines protéiques différents, ce qui augmenterait fortement la

rigidité membranaire, potentiellement en contraignant la flexibilité de la spectrine<sup>162</sup>. La taille du maillage du réseau de spectrine augmente graduellement lors de la maturation parasitaire, avec une agrégation de ce réseau autour des knobs alors que celui-ci est plus étiré sous les zones membranaires ne présentant pas de protrusion<sup>163</sup>.

#### 1.3.2.4. Sortie des mérozoïtes à la fin du cycle érythrocytaire

La sortie des mérozoïtes se produit en 3 étapes : 1) Environ 10 min avant la sortie, la PVM se rompt, libérant les mérozoïtes dans le cytoplasme des GRs. 2) Une minute après, quelques mérozoïtes sont libérés dans le sang par l'ouverture de pores dans la membrane érythrocytaire<sup>164</sup>. 3). La rupture de la membrane du GR libère les mérozoïtes dans le sang.

La rupture de la PVM résulte de l'action de protéases parasitaires, qui agissent en cascade et lysent la PVM, mais aussi d'un gonflement osmotique, probablement dû à l'entrée d'eau provenant du compartiment érythrocytaire, générant une tension sur la PVM<sup>164</sup>.

Le cytosquelette commence à se désorganiser 15 à 20h avant la rupture du GR. Cet affaiblissement avant la sortie des mérozoïtes pourrait faciliter la rupture un peu plus tard de la membrane<sup>165</sup>. Au stade schizonte, une augmentation de la taille du maillage du réseau de spectrine est observée, ce qui pourrait correspondre à une déstabilisation du cytosquelette<sup>165</sup>. Dès 35h après l'invasion, la présence des adducines  $\alpha$  et  $\beta$  diminue au niveau de la membrane<sup>165</sup>, ce qui pourrait perturber la liaison entre la spectrine et l'actine et entraîner la diminution de la déformabilité des GRs. La rupture de la membrane des GRs résulte aussi de l'action de protéases. Au stade trophozoïte tardif et schizonte, la cystéine protéase falcipaine 2 parasite clive l'ankyrine (dans le domaine de liaison à la spectrine)<sup>166</sup> et la protéine 4.1 (dans la région du domaine de liaison à la spectrine et à l'actine)<sup>167,168</sup>. La protéase aspartique plasmepsine 2 parasite a la capacité de dégrader la protéine 4.1, l'actine, et la spectrine et elle se retrouve en périphérie des parasites aux stades matures<sup>169</sup>. Le parasite semble même utiliser une protéase érythrocytaire, la calpaïne 1<sup>170</sup>. Enfin, la protéase « *Plasmodium falciparum* SUBtilisin-like 1 » (*PfSUB1*) clive MSP1 à la surface des mérozoïtes. Cette protéolyse confère à MSP1 la capacité de lier la spectrine<sup>171</sup>. L'interaction du mérozoïte avec le cytosquelette érythrocytaire semble nécessaire pour la rupture de la membrane du GR. La liaison du mérozoïte à la spectrine pourrait générer des forces de cisaillement perturbant le cytosquelette et déstabilisant la membrane du GR<sup>172</sup> (Figure 20).

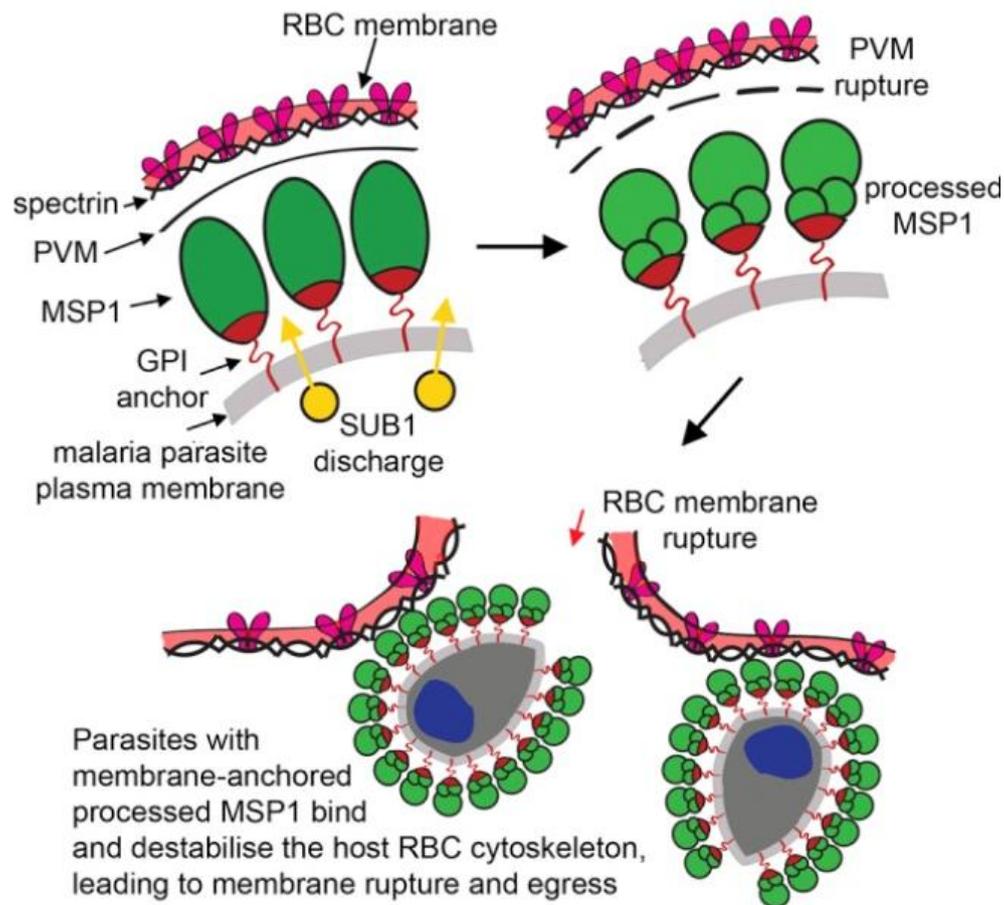


Figure 20. **Modèle présentant le rôle de MSP1 dans la sortie des mérozoïtes à la fin du cycle érythrocytaire.** *Pf*SUB1, sécrétée dans la PV, clive MSP1 à la surface des mérozoïtes en 4 fragments majeurs, qui restent associés en complexe. Cette modification rend MSP1 capable d'interagir avec la spectrine et ainsi avec le cytosquelette érythrocytaire. La liaison du mérozoïte destabiliserait la membrane du GR, permettant sa rupture et la sortie des mérozoïtes (Adapté de Das et al., 2015<sup>172</sup>).

La phosphorylation de Y de la Bande 3 semble jouer un rôle crucial dans la sortie des mérozoïtes. Le traitement de iGRs (stade schizonte) par des inhibiteurs de la kinase Syk inhibe la phosphorylation de la Bande 3, et prévient la sortie des parasites<sup>173</sup>. La phosphorylation de Y de la Bande 3 pourrait entraîner la destabilisation et l'affaiblissement de la membrane, requis pour la sortie<sup>174</sup>.

*Plasmodium* a besoin d'un squelette érythrocytaire efficace pour son développement intra-érythrocytaire. Ceci est bien illustré par la pression de sélection des désordres du GR dans les zones où le paludisme est endémique. Les GRs déficients en protéine 4.1 (en cas d'elliptocytose héréditaire) sont résistants à la croissance de *P. falciparum*. Mais des altérations du développement intra-érythrocytaire ont aussi été observées dans les GRs possédant des hémoglobinopathies (HbS, HbC, HbE, thalassémies  $\alpha$  et  $\beta$ ), dans le déficit en G6PD, ou encore dans les GRs avec une anomalie de la Bande 3 (ovalocytose).

## 1.4. Le paludisme participe à la sélection positive de l'hémoglobine S

### 1.4.1. L'hémoglobine, protéine majeure des globules rouges

L'Hb est la protéine majoritaire des GRs, cellules responsables du transport des gaz respiratoires dans le sang. Les érythrocytes transportent l'oxygène ( $O_2$ ) des poumons aux tissus périphériques et le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) des tissus périphériques aux poumons. L'Hb est constituée de 2 chaînes  $\alpha$  de 141 AAs et de 2 chaînes  $\beta$  de 146 AAs, liées de manière non-covalente, formant ainsi un hétérotétramère ( $\alpha_2\beta_2$ ). Chaque chaîne est associée à une molécule d'hème (Figure 21) <sup>175</sup>, liant l' $O_2$  apporté à toutes les cellules de l'organisme.

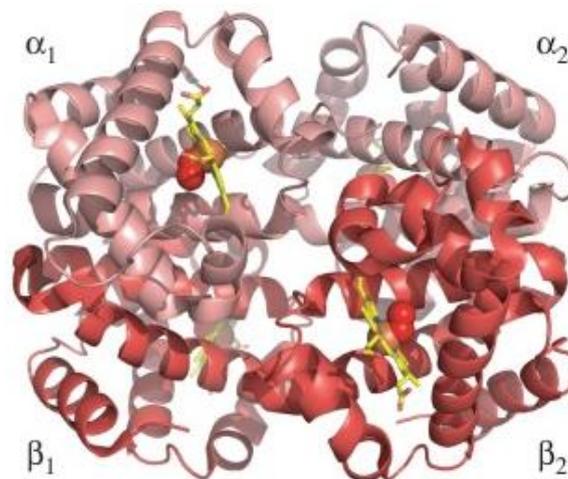


Figure 21. **Structure quaternaire de la molécule d'hémoglobine.** Sous la forme oxygénée, l'Hb présente une forte affinité pour l' $O_2$  (sphères rouges), qui se lie à chaque hème (en jaune, avec l'atome de fer central en orange) associé à chaque sous-unité de l'Hb (*Adapté de C.S. Thom et al., 2013* <sup>176</sup>).

L'hème peut lier l' $O_2$  lorsque le fer est ferreux ( $Fe^{2+}$ ), mais pas sous la forme ferrique ( $Fe^{3+}$ ). Les molécules d'hème sont situées à la surface externe de l'Hb, afin que l' $O_2$  puisse se lier de manière réversible aux atomes de fer dans le cytoplasme érythrocytaire. Les molécules d'hème résident dans des poches hydrophobes des globines, capables de protéger le fer  $Fe^{2+}$  de s'oxyder en  $Fe^{3+}$  <sup>177</sup>. L'Hb change de structure selon son état d'oxygénation. Elle peut adopter une configuration oxygénée lorsqu'elle fixe des molécules d' $O_2$  (oxyHb) ou désoxygénée, suite à la libération d' $O_2$  aux différentes cellules de l'organisme lors du passage du GR dans la microcirculation (désoxyHb).

### 1.4.2. L'hémoglobine S, associée à la drépanocytose

Il existe plusieurs centaines de variants des chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'Hb. L'HbA est la forme normale de la protéine. Des mutations du 6<sup>ème</sup> codon du gène codant la  $\beta$ -globine (chromosome 11) mènent à la formation d'Hbs anormales S et C. Ces deux Hbs appartiennent

aux variants les plus fréquents. Il s'agit de variants de surface. En effet, les mutations touchent des résidus polaires dont la fonction est de maintenir la molécule en solution.

L'HbC, sous forme homozygote, cause l'hémoglobinose C, responsable de manifestations cliniques légères (splénomégalie modérée mais constante, syndrome anémique modéré, et microcytose hyperchromique) <sup>178</sup>.

L'HbS est associée à la drépanocytose <sup>179</sup>. Cette pathologie correspond à un défaut qualitatif de l'Hb, qui est produite en quantité normale. La drépanocytose, aussi appelée « anémie falciforme » est l'hémoglobinopathie grave la plus fréquente. La formation de l'HbS est due au remplacement de l'acide glutamique, AA en 6<sup>ème</sup> position, par une valine (due à la substitution d'une base adénine en thymine au niveau du gène) <sup>180</sup>. La mutation d'un résidu chargé négativement (acide glutamique) par une valine crée un site hydrophobe, présent sur l'extérieur de l'Hb. Ce site peut établir des liaisons hydrophobes avec la phénylalanine en position 85 et la leucine en position 88 d'une autre chaîne  $\beta$  lorsque la pression en O<sub>2</sub> est faible <sup>179</sup>. En effet, ces deux derniers résidus s'externalisent dans la désoxyHb. Chez les homozygotes HbSS, lors du passage dans la microcirculation, entraînant ainsi la désoxygénation de l'Hb, l'interaction entre deux chaînes  $\beta$  de deux molécules provoque la polymérisation de l'Hb <sup>181</sup>. Ces polymères forment des fibres <sup>182</sup>, qui se regroupent et se rigidifient, déformant le GR en forme de faucille (Figure 22) <sup>183</sup>.

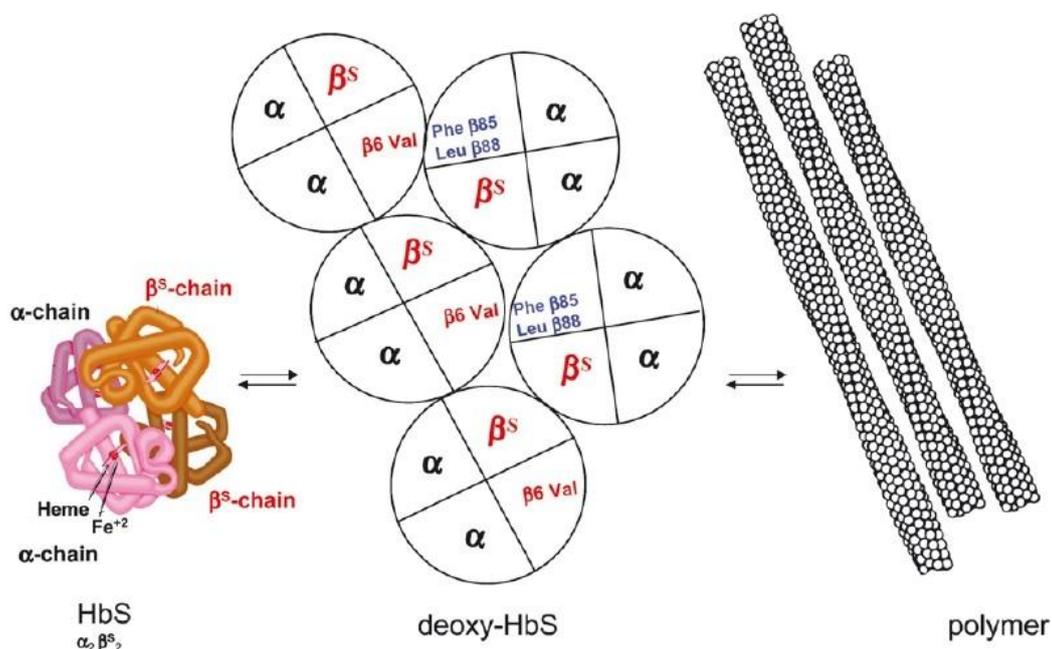


Figure 22. **Mécanisme de polymérisation de l'hémoglobine S menant à la falciformation des globules rouges HbSS.** Lors du passage dans la microcirculation, l'Hb passe sous forme désoxygénée. L'acide glutamique en 6<sup>ème</sup> position de la  $\beta$ -globine établit alors des liaisons hydrophobes avec la phénylalanine 85 et la leucine 88 de la chaîne  $\beta$  d'une molécule d'HbS adjacente. Ces interactions entraînent la polymérisation de l'HbS, qui forme des fibres qui se regroupent et déforment le GR dans la forme caractéristique de faucille associée à la drépanocytose (M-H Odièvre et al., 2011 <sup>184</sup>).

Cette déformation provoque aussi la microvésiculation de la membrane érythrocytaire. La formation des fibres de polymères d'HbS entraîne une cascade d'anomalies cellulaires, notamment la dérégulation de l'homéostasie en cations suite à l'activation de certains canaux ioniques, comme le co-transporteur potassium ( $K^+$ )-chlorure ( $Cl^-$ ) et le canal potassique dépendant du  $Ca^{2+}$  (ou canal Gardos) <sup>185</sup>. Cette dérégulation cause la déshydratation des GRs HbSS <sup>186</sup>, ce qui augmente la concentration en Hb intracellulaire, et favorise davantage la polymérisation de la désoxyHb. La falciformation des GRs HbSS est à l'origine des symptômes sévères de la drépanocytose: anémie hémolytique, crises vaso-occlusives et susceptibilité aux infections <sup>187, 188</sup>. Les GRs falciformes peuvent s'accumuler et obstruer le flux sanguin, causant des crises douloureuses dites « vaso-occlusives ». Le flux sanguin est premièrement ralenti par l'adhérence de réticulocytes exprimant des molécules d'adhérence pour l'endothélium vasculaire sous l'effet du stress oxydant. Les GRs HbSS circulent alors plus longtemps en condition d'hypoxie, ce qui induit leur falciformation. Ce phénomène piège d'autres GRs HbSS qui falciforment de manière irréversible, menant à l'obstruction des microvaisseaux <sup>184</sup>. De plus, l'hémolyse associée à la pathologie libère l'Hb dont la concentration augmente dans le sang. L'Hb piège l'Oxyde Nitrique (NO), molécule à l'action vaso-dilatatrice. L'hémolyse libère aussi l'arginase érythrocytaire, enzyme qui dégrade le précurseur du NO. Ainsi, la déplétion en NO diminue le potentiel vaso-dilatateur de l'endothélium vasculaire <sup>189</sup>. Par ailleurs, les GRs HbSS, suite à leur déformabilité réduite, sont plus fortement retenus et éliminés par la rate, organe important de l'immunité. Cet organe fonctionne de manière plus importante, ce qui peut affecter son rôle immunitaire et rendre les individus plus susceptibles aux infections.

Chez l'Homme, la drépanocytose est une maladie héréditaire autosomique récessive. La mutation causant l'HbS est co-dominante. Les individus hétérozygotes HbAS expriment à la fois l'Hb A et S. Plus de la moitié du contenu en Hb d'un GR HbAS est de l'HbA, qui empêche la polymérisation de l'HbS, et ainsi l'apparition des symptômes de la pathologie. Les individus HbAS sont donc asymptomatiques et sont dits « porteurs du trait drépanocytaire ». Leurs GRs présentent une morphologie normale.

#### 1.4.3. Hémoglobine S et stress oxydant

L'oxydation de l'Hb mène à la formation de la metHb <sup>190</sup> qui est instable et donc plus susceptible à la dénaturation, formant des superoxydes se transformant en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) <sup>191</sup>. Ce processus s'accompagne de la perte d'hème et de la libération de

$Fe^{3+}$ , qui favorise l'existence d'un microenvironnement oxydant. L'hémine libérée de l'hème, se liant au niveau de la membrane érythrocytaire<sup>192</sup> et le fer libre sont à l'origine de la peroxydation des lipides. L'Hb oxydée forme des hémichromes, qui se concentrent au niveau de la membrane interne, au niveau des protéines du cytosquelette et membranaires, notamment au niveau de la protéine Bande 3. Dans le GR normal, la metHb se forme à taux « physiologique », générant une source continue d' $O_2^{\cdot-}$ , se transformant en  $H_2O_2$ <sup>193</sup>. Les GRs possèdent des systèmes de défenses anti-oxydants pour maintenir l'Hb sous forme réduite et limiter la production de stress oxydant: la méthHb réductase (qui convertit la méthHb en Hb réduite), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase, et des molécules à l'action anti-oxydante (le glutathion réduit (GSH), les vitamines C et E)<sup>194</sup>.

L'HbS, moins stable que l'HbA, est donc plus susceptible à l'oxydation, ce qui génère un stress oxydant plus important dans les GRs porteurs d'HbS. De plus grandes quantités de metHb et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont ainsi générées. Dans les hématies HbSS, l'HbS polymérise lors de la désoxygénation, et forme des fibres de polymères, menant à la falciformation des GRs. Cette falciformation est réversible, car les fibres se dissolvent lors de la réoxygénation de l'Hb<sup>195</sup>. Toutefois, les cycles de polymérisation/dépolymérisation de l'HbS augmente la production de ROS<sup>196,197</sup>. Deux fois plus de superoxydes, de peroxides, et de radicaux hydroxyl sont mesurés dans le GR HbSS que dans des GRs HbAA<sup>198,199,200</sup>. Le système anti-oxydant ne suffit pas alors à neutraliser la production excessive d'espèces oxydantes<sup>201</sup>. Notamment, la concentration en GSH réduit (qui est de 95% en condition normale), co-facteur de la glutathion peroxydase réduisant l' $H_2O_2$ , diminue dans les GRs HbSS suite à sa forte oxydation en disulfure de glutathion par les espèces oxydantes<sup>202,203</sup>. La dégradation de l'hème augmente aussi dans les GRs HbSS<sup>204</sup>. Le stress oxydant entraîne des dommages oxydatifs au niveau de la membrane érythrocytaire qui pourraient contribuer à augmenter la sénescence. Notamment, l'accumulation d'hémichromes au niveau du cytosquelette membranaire provoque l'agrégation de la Bande 3, indicateur de sénescence, associée à l'élimination de ces GRs par les macrophages spléniques<sup>205</sup>. De plus, la symétrie membranaire des GRs HbSS est perturbée, provoquant l'exposition de Phosphatidyl-Sérines (PS) au niveau de la membrane externe<sup>184</sup>. Ces PS sont reconnues par les macrophages spléniques de la rate, qui éliminent alors les GRs<sup>206</sup>.

Le stress oxydant a été mesuré dans des GRs HbAA, HbAS, et HbSS (Figure 23). Il augmente significativement chez les individus HbAS, est encore plus important chez les patients drépanocytaires, et s'élève encore lors d'une crise<sup>183</sup>.

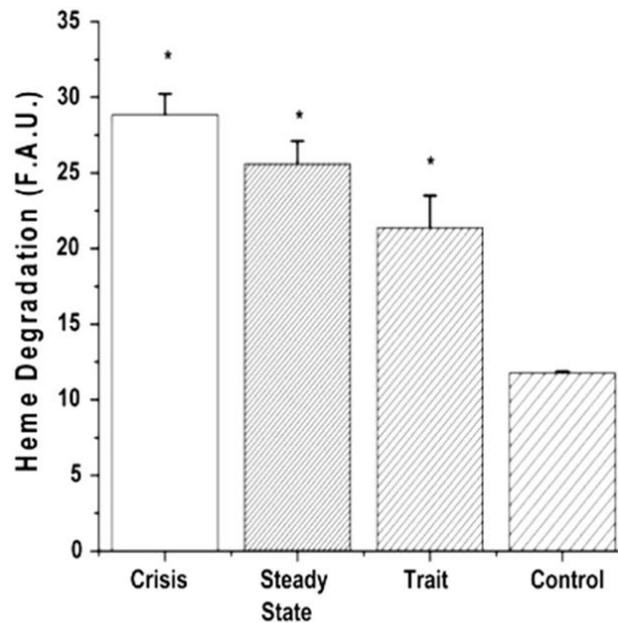


Figure 23. **Mesure de la fluorescence des produits de dégradation de l'hème de globules rouges HbAA, HbAS et HbSS.** L' $H_2O_2$  dégrade l'hème en produits fluorescents à 321 nm<sup>207,208,209</sup>. Les ROS étant à l'origine de la dégradation de l'hème, la valeur de cette fluorescence permet donc de mesurer le stress oxydant au sein d'un GR. Les valeurs de fluorescence sont données en valeurs arbitraires (Fluorescent Arbitrary Units (F.A.U.)). Ces mesures ont été effectuées chez 11 patients HbSS en crise (« Crisis »), 16 patients HbSS stables (« Steady State »), 7 individus porteurs du trait drépanocytaire (HbAS) (« Trait ») et 50 individus HbAA (« Control »). Le stress oxydant augmente de manière significative chez les individus HbAS par rapport aux individus HbAA. Il est plus élevé chez les patients HbSS, et augmente encore lors d'une crise (Barodka et al., 2014<sup>183</sup>).

L'HbS est fortement retrouvée dans les régions d'endémie palustre. La sévérité du paludisme a exercé des pressions de sélection sur le génome humain, menant à l'apparition et à la persistance de nombreuses mutations génétiques, dont celle à l'origine de l'HbS.

#### 1.4.4. L'hémoglobine S confère une protection relative contre le paludisme

Chaque année, près de 300 000 nouveaux-nés naissent avec la drépanocytose<sup>210</sup>. De plus, il est estimé que 300 million d'individus portent le trait drépanocytaire dans le monde<sup>211</sup>. Le continent le plus affecté par la drépanocytose est l'Afrique, où 85% des cas sont localisés. L'HbS présente une fréquence importante (supérieure à 0,5%) en Afrique, en Inde, au Moyen-Orient, et dans certaines régions méditerranéennes. La prévalence du trait drépanocytaire est supérieure à 15% dans une grande partie de l'Afrique Centrale, pouvant atteindre 18% en Angola<sup>212</sup>.

L'HbS homozygote confère une forte mortalité dans ces régions, en raison du manque de soins. Les individus drépanocytaires ont une espérance de vie faible et la majorité des enfants n'atteignent pas l'âge adulte<sup>213</sup>. Une diminution constante de la fréquence de l'allèle HbS à chaque génération devrait donc se produire en absence d'autres forces de sélection. Des

études ont été réalisées afin de déterminer les forces maintenant ce caractère à haute fréquence. En 1949, Haldane propose la « Malaria Hypothesis » selon laquelle de hautes fréquences d'anomalies génétiques sanguines pourraient résulter d'un avantage sélectif de protection contre le paludisme à *P. falciparum* conféré par ces désordres génétiques<sup>214</sup>. Cette hypothèse a premièrement été formulée pour expliquer la similarité de distribution géographique de thalassémie et de paludisme dans la région Méditerranéenne. En 1954, Allison observe une correspondance similaire des distributions géographiques de l'HbS et du paludisme en Afrique (en Ouganda plus précisément) : l'incidence du trait drépanocytaire était plus importante dans les régions où le paludisme était hautement prévalent. De plus, il observe que les porteurs du trait drépanocytaire présentent moins d'infections sévères à *P. falciparum*<sup>215,216</sup>. En 2010, Piel *et al.* ont modélisé la distribution des fréquences de l'allèle HbS et de l'endémicité du paludisme à l'échelle mondiale. Ces données montrent que les régions géographiques portant l'HbS sont fortement corrélées avec les zones de forte endémicité palustre (Figure 24).

Le paludisme participe donc à la sélection positive de l'allèle HbS<sup>212</sup> (ou sélection balancée de l'HbS par le paludisme). Ainsi, la persistance de l'HbS dans les populations humaines a été attribuée à la « résistance » qu'elle fournit contre le paludisme à *P. falciparum* sous forme hétérozygote<sup>217</sup>, sous laquelle cette mutation n'engendre aucune conséquence délétère, contrairement à la forme homozygote. La résistance conférée par le trait drépanocytaire n'est pas absolue mais relative. En effet, les porteurs de l'HbS ne sont pas protégés de l'infection par *P. falciparum* mais présentent une probabilité beaucoup plus faible de développer les formes graves du paludisme. Cette protection relative est suffisante pour permettre aux individus de développer une immunité acquise active contre le paludisme lors des premières années de leur vie (85% de la mortalité du paludisme sont représentés par des enfants de moins de 5 ans).

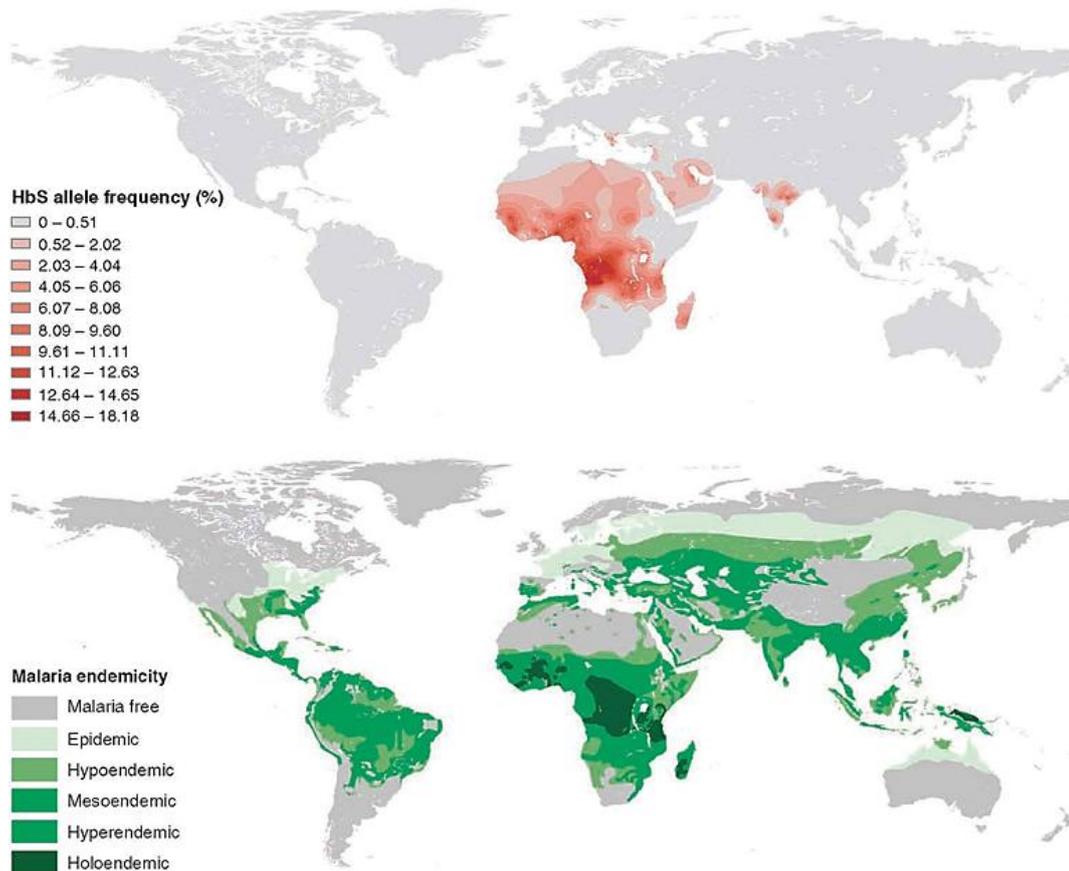


Figure 24. **Comparaison de la distribution mondiale de l'allèle HbS et des zones d'endémie palustre.** Les valeurs d'endémicité du paludisme ont été prédites grâce aux informations malariométriques historiques, identifiant 6 catégories : « absence de paludisme », « épidémique », « hypoendémique », « mésoendémique », « hyperendémique » et « holoendémique ». Il y a une augmentation graduelle de la fréquence de l'allèle HbS depuis les zones épidémiques à holoendémiques en Afrique (*Adapté de Piel et al., 2010*<sup>212</sup>).

De nombreuses études ont montré que le trait drépanocytaire protégeait contre les formes sévères de paludisme<sup>218–221</sup>, notamment contre le paludisme cérébral<sup>219,221</sup>, et contre le paludisme non compliqué<sup>221–224</sup>. Par exemple, une étude a montré que le génotype HbAS était associé à une réduction de 50% de l'incidence du paludisme simple et de 90% de celle du paludisme sévère<sup>221</sup>. Toutefois, la protection du trait drépanocytaire contre le paludisme asymptomatique est controversée, certaines études observant des densités parasitaires (associées au paludisme asymptomatique) plus faibles chez les sujets HbAS que HbAA<sup>216,225</sup>, alors que d'autres décrivent des parasitémies similaires<sup>221</sup>. Peu de choses sont connues à propos de la potentielle protection du génotype HbAS contre le PAM. Bien que des études aient montré une présentation anormale de VAR2CSA à la surface des iGR HbAS et une cytoadhérence réduite à la CSA<sup>226</sup>, d'autres n'ont pas observé de lien entre le génotype HbAS et le PAM<sup>227,228</sup>.

Bien que l'HbS soit l'exemple le plus connu, l'effet protecteur d'autres anomalies du GR contre le paludisme à *P. falciparum* a aussi été démontré. C'est le cas des hémoglobinoses C et E, du déficit en G6PD et des thalassémies ( $\alpha$  et  $\beta$ )<sup>218,229-231</sup>. Dans cette thèse, les co-portages de l' $\alpha$ -thalassémie et du déficit en G6PD avec l'HbS ont été considérés, car nos échantillons provenaient de régions où ces deux autres désordres étaient fortement prévalents.

#### 1.4.5. Autres désordres du globule rouge conférant une protection contre le paludisme

##### 1.4.5.1. Le déficit en Glucose-6-Phosphate Deshydrogénase

Le déficit en G6PD, aussi connu sous le nom de « favisme » est l'enzymopathie la plus répandue au monde, affectant 400 millions de personnes<sup>232</sup>. Ce déficit résulte de la mutation du gène codant l'enzyme G6PD, situé dans la région télomérique du bras long du chromosome X (Xq28). Il s'agit d'une maladie héréditaire récessive, plus fréquente chez les hommes qui sont hémizygotés pour la mutation. Les femmes homozygotes mutées souffrent aussi de cette maladie, et les femmes hétérozygotes pour la mutation peuvent aussi présenter quelques symptômes, en raison de l'inactivation d'un chromosome X. Ce phénomène entraîne chez ces femmes la production de deux populations de GRs : une population normale et une population touchée par ce déficit<sup>233</sup>. Le déficit en G6PD n'est donc pas forcément totalement récessif, se manifestant selon le ratio de GRs déficients par rapport aux GRs normaux<sup>234</sup>.

La G6PD est une enzyme clé de la voie des pentoses phosphate. Il s'agit de la première enzyme de cette voie métabolique. Elle catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phospho-D-gluconolactone (Figure 25)<sup>235</sup>. Cette réaction produit simultanément la forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate (NADPH), qui constitue une source de pouvoir réducteur nécessaire aux cellules pour faire face à un stress oxydant. Contrairement aux autres cellules de l'organisme, les GRs ne possèdent plus de mitochondrie. La seule source de NADPH provient donc de la voie des pentoses phosphate. Le NADPH est crucial pour le fonctionnement du système anti-oxydant érythrocytaire. Il est en effet utilisé par la glutathione réductase pour réduire le glutathion oxydé (GSSG) en GSH (Figure 25)<sup>236</sup>. De plus, le NADPH maintient la catalase sous forme active, qui transforme l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$ <sup>236</sup>. Enfin, le NADPH permet aussi à la métHb-réductase de réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  dans la métHb en  $\text{Fe}^{2+}$ , permettant à l'Hb de lier l' $\text{O}_2$ <sup>236</sup>. Ainsi, les GRs déficients en G6PD sont plus vulnérables face aux ROS générés lors d'un stress oxydant, qui induisent la peroxydation des lipides et des protéines, entraînant la lyse des GRs et leur élimination par les macrophages.

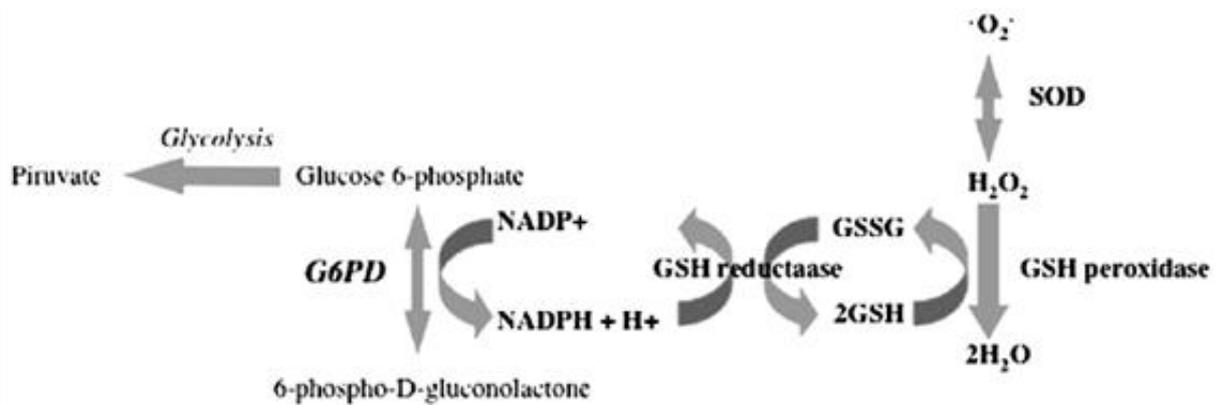


Figure 25. **La G6PD permet la production de NADPH, source de pouvoir réducteur nécessaire au système anti-oxydant érythrocytaire.** La G6PD est la première enzyme de la voie des pentoses phosphate. Elle produit du 6-phospho-D-gluconolactone et du NADPH à partir de glucose-6-phosphate. Le NADPH est nécessaire pour le fonctionnement de la GSH réductase et ainsi pour la production de glutathion réduit (*Adapté de Manganeli et al., 2013*<sup>235</sup>).

Le déficit en G6PD cause une Anémie Hémolytique Aiguë (AHA) suite à un stress exogène comme l'ingestion de fèves (à l'origine du mot « favisme »), de certains médicaments ou lors d'infections (comme les hépatites A et B, la pneumonie ou une infection par le cytomégalovirus)<sup>233</sup>. La sensibilité aux diverses sources déclenchant l'AHA est très variable d'un patient à un autre, et en fonction de la mutation à l'origine du déficit en G6PD. L'AHA peut entraîner des malaises, un affaiblissement de l'organisme, des douleurs abdominales et lombaires, et une hémoglobinurie se manifestant par une jaunisse et des urines foncées<sup>235</sup>. Les patients atteints des déficits les plus sévères souffrent d'Anémie Hémolytique Chronique Non Sphérocytique (ou « Chronic NonSpherocytic Hemolytic Anemia » (CNSHA)). Dans ces cas-là, l'hémolyse est chronique sans déclenchement exogène et sa sévérité varie de légère à sévère nécessitant une transfusion. Les sources exogènes de stress oxydant peuvent exacerber cette hémolyse. Certains nouveau-nés atteints du déficit en G6PD souffrent de jaunisse néonatale<sup>232</sup> (les raisons de cette manifestation clinique ne sont pas encore totalement élucidées).

Près de 186 mutations génétiques et de 400 variants biochimiques ont été actuellement identifiés<sup>237</sup>. L'OMS répertorie ces variants en 5 classes selon l'activité enzymatique résiduelle de la G6PD et l'association avec la CNSHA (Tableau 2)<sup>232</sup>. Les variants de classe I sont les plus sévères. La G6PD présente alors moins de 1% d'activité résiduelle et les patients souffrent de CNSHA. L'activité enzymatique des variants de classe II est inférieure à 10% mais les patients ne souffrent pas de CNSHA. Les variants de classe III sont responsables de désordres modérés, la G6PD présentant entre 10 et 60% d'activité enzymatique. Les patients aux variants de classe II et III ne présentent pas d'hémolyse chronique mais peuvent souffrir

d'épisodes d'hémolyse suite à des infections, ou substance exogène générant un stress oxydant <sup>236</sup>. Les variants de classe IV présentent une activité normale entre 60 et 150% ; et les variants de classe V une activité augmentée de plus de 150% ; ces deux types ne déclenchant pas de symptômes. Les variants sont aussi répertoriés selon leur fréquence. Ils sont « sporadiques » (fréquence <1%) ou « polymorphiques » (fréquence >1%). Les variants de classe I sont tous sporadiques car l'atteinte est très sévère.

Variants	Activité résiduelle de la G6PD	Symptôme	Degré de sévérité	Fréquence
Classe I	<1%	CNSHA	Sévère	Sporadique
Classe II	1-10%	AHA	Sévère	Polymorphique
Classe III	10-60%	AHA	Modéré	Polymorphique
Classe IV	60-150%	Aucun	Aucun	Polymorphique
Classe V	>150%	Aucun	Aucun	Polymorphique

Tableau 2. **Classification des variants G6PD.** Les variants sont classés par l'OMS selon l'activité résiduelle de la G6PD et l'association à la CNSHA <sup>232,236</sup>.

De manière générale, la distribution géographique du déficit en G6PD coïncide avec les zones où le paludisme est fortement présent <sup>238</sup>. En effet, de nombreuses études ont montré que ce déficit confère une protection contre les formes sévères de paludisme. Les plus fortes fréquences de déficit en G6PD sont donc retrouvées en Afrique, en Asie du Sud-Est, au Moyen-Orient, aux Antilles, mais aussi dans le bassin Méditerranéen et en Amérique du Nord (Figure 26). Ces deux dernières régions sont exemptes de paludisme. En Europe du Sud, la présence du déficit en G6PD peut s'expliquer par l'éradication récente du paludisme (au 20<sup>ème</sup> siècle) <sup>233</sup>. En Amérique du Nord, ce déficit n'est retrouvé que chez les personnes provenant de régions du monde où le paludisme est présent ou chez leur ascendants <sup>233</sup>.

La forme sauvage de l'enzyme G6PD est appelée « G6PD B ». Le variant le plus fréquent est le variant A- fortement retrouvé en Afrique Sub-saharienne. Le deuxième variant le plus commun est le variant Méditerranéen. La mutation A376G est responsable de la production du variant A. Il dispose encore de 85% d'activité et ne confère donc pas ou peu de symptômes <sup>239</sup>. Le variant A<sup>-</sup> est généré par des mutations additionnelles de la mutation A376G <sup>240</sup>, dont la nature varie selon la zone géographique.

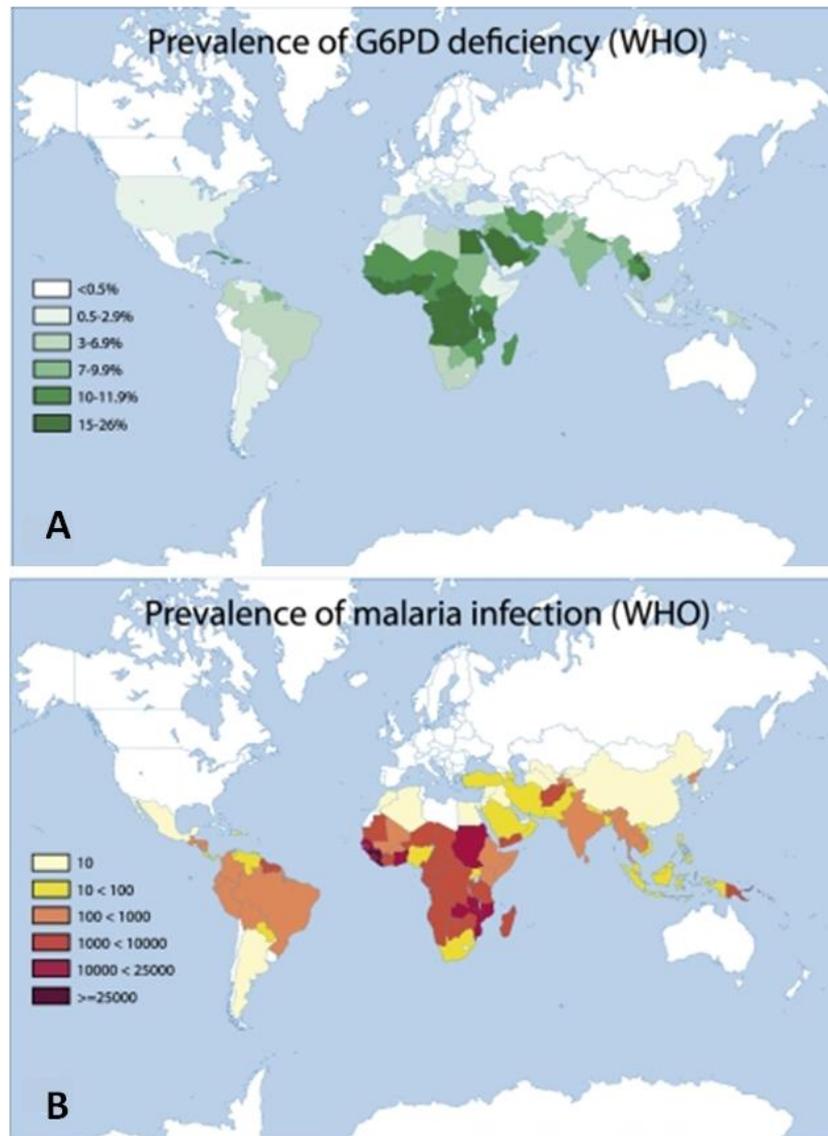


Figure 26. **Distribution géographique du déficit en G6PD et du paludisme selon l'OMS.** A. Carte représentant la prévalence moyenne du déficit en G6PD en pourcentage. B. Carte représentant la prévalence du paludisme, exprimée en nombre d'infections pour 100 000 personnes. Le déficit en G6PD est fortement présent en Afrique, en Asie du Sud-Est et au Moyen-Orient, zones où le paludisme est fréquent. Ce déficit est également retrouvé en Amérique du Nord et en Europe du Sud (Adapté de Peters et Van Noorden, 2009<sup>241</sup>).

Le déficit en G6PD est fortement lié au paludisme car il interfère avec la primaquine, qui est la seule molécule efficace contre les rechutes causées par les hypnozoïtes de *P. vivax*<sup>242</sup> et contre les gamétocytes de *P. falciparum*, responsables de la transmission<sup>243</sup>. Cette molécule est donc nécessaire pour l'élimination du paludisme. Mais elle peut être aussi toxique chez les patients atteints du déficit en G6PD, causant des hémolyses pouvant être très graves<sup>244</sup>. Les femmes hétérozygotes peuvent également souffrir d'hémolyses modérées selon leur ratio de GRs normaux et déficitaires en G6PD. La sensibilité diffère selon le variant biochimique de la G6PD, et cette sensibilité n'est pas connue pour tous les variants. Les difficultés de diagnostic du déficit en G6PD empêchent actuellement l'utilisation de masse de la primaquine.

### 1.4.5.2. L'alpha-thalassémie

L' $\alpha$ -thalassémie est une hémoglobinopathie héréditaire autosomique récessive, résultant de l'altération de la synthèse de l' $\alpha$ -globine<sup>245,246</sup>. L'Hb normale à l'âge adulte est composée de 2 chaînes  $\alpha$  et de 2 chaînes  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ). L' $\alpha$ -thalassémie est caractérisée par la diminution de la synthèse des chaînes d' $\alpha$ -globine, et donc d'Hb foetale (HbF,  $\alpha_2\gamma_2$ ) et d'Hb adulte (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ )<sup>247</sup>. Les gènes codant l' $\alpha$ -globine, présents sur le chromosome 16, sont dupliqués ( $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ). La synthèse d' $\alpha$ -globine est donc contrôlée par 4 gènes. L'inactivation partielle ou totale des gènes d' $\alpha$ -globine peut se faire par délétion ou par mutation. L' $\alpha$ -thalassémie est très hétérogène à la fois au niveau clinique et moléculaire. La sévérité de ce désordre est souvent corrélée au nombre de copies non fonctionnelles de gènes. Aujourd'hui, 4 niveaux de manifestations cliniques sont reconnus (Figure 27).

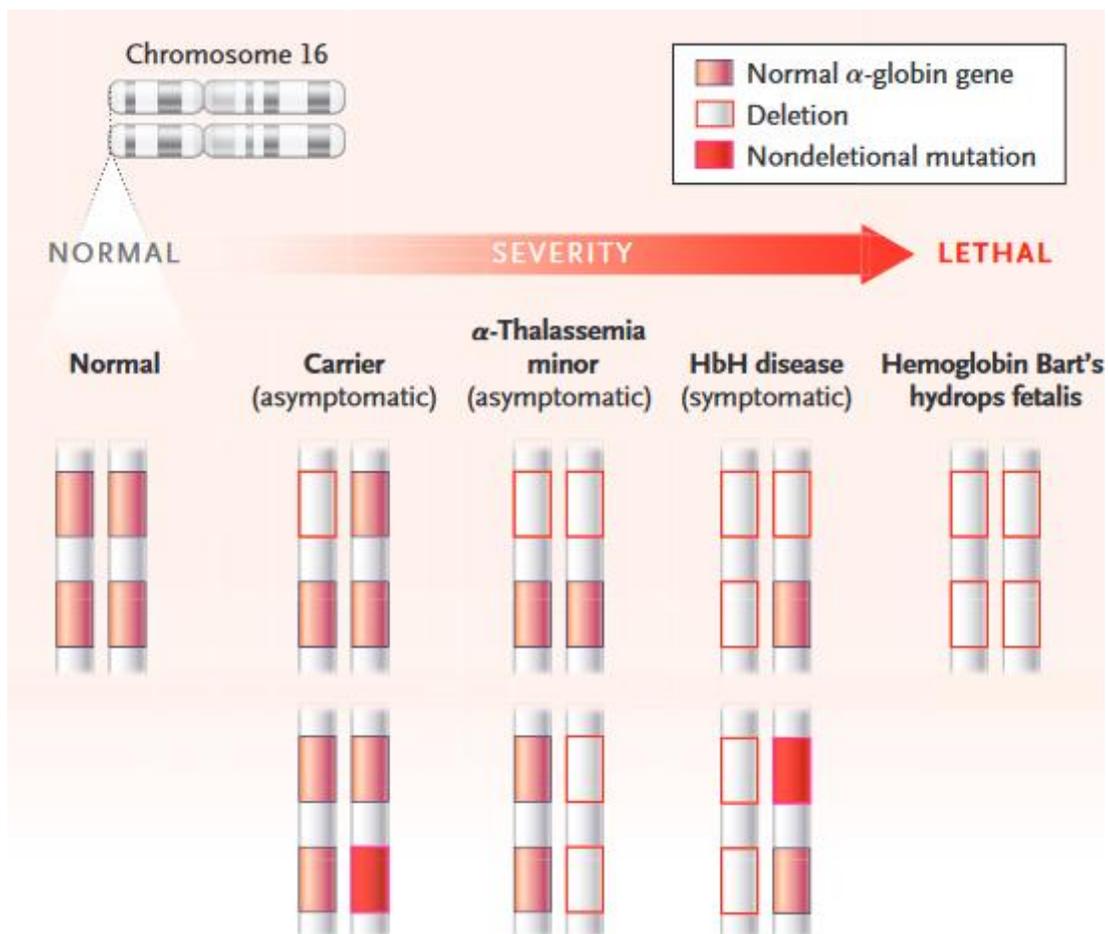


Figure 27. **Formes d'alpha-thalassémie en fonction du nombre de gènes altérés.** Les gènes codant l' $\alpha$ -globine sont dupliqués et localisés dans un cluster sur le chromosome 16. La sévérité de l' $\alpha$ -thalassémie est corrélée au nombre de gènes altérés. L'altération des gènes  $\alpha$  peut être due à des délétions ou des mutations génétiques (Piel et al., 2014<sup>248</sup>).

L'altération d'un gène est asymptomatique. Lorsque deux gènes sont touchés, l' $\alpha$ -thalassémie est dite mineure, et les conséquences sont nulles ou très légères. L' $\alpha$ -thalassémie intermédiaire, aussi appelée hémoglobinoses H, est causée par l'altération de trois gènes. La production d' $\alpha$ -globine est alors insuffisante et les chaînes de  $\beta$ -globine sont en excès. L'Hb produite, possédant 4 chaînes de  $\beta$ -globine, appelée HbH, est anormale, et ne permet pas un transport correct d'O<sub>2</sub><sup>248</sup>. Cette Hb est instable et précipite dans les plus vieux GRs, qui sont détruits par la rate. Cette forme cause des symptômes modérés, rarement sévères. Les personnes souffrent d'anémie, nécessitant parfois des transfusions. Généralement, les personnes atteintes d'hémoglobinoses H produisent moins de 30% du taux normal d' $\alpha$ -globine, et présentent un taux variable d'HbH (entre 0,8 et 40%)<sup>245</sup>. La complication la plus fréquente est la splénomégalie. La sévérité des manifestations cliniques de l'hémoglobinoses H est très variée et dépend du type de mutation associée. Enfin, la forme la plus sévère, l' $\alpha$ -thalassémie majeure, et souvent létale, est due à l'altération de quatre gènes. Chez le fœtus, l'Hb fœtale est composée de 2 chaînes  $\alpha$  et de 2 chaînes  $\gamma$ . Quand quatre gènes sont altérés, l'Hb produite, appelée Hb Bart, possédant 4 chaînes de  $\gamma$ -globine, est anormale, et ne permet pas de transporter l'O<sub>2</sub><sup>248</sup>. L'anémie est très importante dès le stade fœtus, associée à une hépatosplénomégalie, à une insuffisance cardiaque, pouvant se compliquer en anasarque fœtale, ou « hydrops fetalis » (accumulation de liquide dans l'abdomen du fœtus ou dans le placenta (on parle alors d'anasarque foeto-placentaire)). Ces symptômes mènent à un décès *in utero* ou juste après la naissance<sup>249,250</sup>. Des anomalies congénitales cardiaques, squelettiques, et du système urogénital sont aussi observées (Tableau 3).

Nombre de gènes altérés	Forme d' $\alpha$ -thalassémie	Conséquences cliniques
1	Portage asymptomatique	Asymptomatique
2	$\alpha$ -thalassémie mineure ou trait $\alpha$ -thalassémique	Souvent asymptomatique. Anémie légère, microcytose, hypochromie
3	$\alpha$ -thalassémie intermédiaire, aussi appelée hémoglobinoses H	Anémie modérée à sévère, degrés modeste d'érythropoïèse inefficace, splénomégalie
4	$\alpha$ -thalassémie majeure	Anémie profonde en période fœtale, se compliquant d'anasarque fœtale (« Hydrops fetalis »), mort <i>in utero</i>

Tableau 3. **Formes d' $\alpha$ -thalassémie et symptômes associés en fonction du nombre de gènes touchés.** Le degré de sévérité et les manifestations cliniques de l' $\alpha$ -thalassémie dépendent du nombre de gènes altérés par mutation ou délétion<sup>245,248,250</sup>.

Le cluster de gènes d' $\alpha$ -globine (noté cluster  $\alpha\alpha$ ), est localisé sur le chromosome 16. A ce jour, près de 128 défauts génétiques différents causant l' $\alpha$ -thalassémie ont été décrits<sup>245,248</sup>. Lorsqu'un seul gène  $\alpha$  est affecté, on parle d' $\alpha^+$ -thalassémie, et lorsque les deux gènes  $\alpha$  16 le sont, on parle d' $\alpha^0$ -thalassémie. Ces deux formes d' $\alpha$ -thalassémie peuvent résulter de délétion ou de mutation. Les formes d'hémoglobine H associées à des mutations non délétionnelles sont généralement plus sévères que celles associées à des délétions<sup>251,252</sup>.

L' $\alpha$ -thalassémie est causée majoritairement par des délétions. Certaines délétions n'affectent qu'un gène  $\alpha$  du cluster ( $\alpha^+$ -thalassémie). C'est le cas des délétions de 3,7 kb (délétion  $\alpha^{-3,7}$ ) et de 4,2 kb (délétion  $\alpha^{-4,2}$ ), résultant de recombinaisons de séquences, qui sont les délétions les plus fréquentes à l'origine d' $\alpha^+$ -thalassémie<sup>250</sup>. Des délétions plus grandes, de 100 à plus de 250 kb, sont à l'origine de l'absence d'une partie ou de la totalité du cluster  $\alpha\alpha$ , résultant en l'absence totale de chaîne  $\alpha$  ( $\alpha^0$ -thalassémie). Plus de 40 délétions  $\alpha^0$  différentes ont été décrites, les plus fréquentes étant les délétions « Southeast Asian » (-SEA), et « Mediterranean » (-MED)<sup>250</sup>. Certaines délétions peuvent aussi supprimer les éléments régulateurs présents en amont du cluster  $\alpha\alpha$ <sup>253</sup>.

Les formes d' $\alpha$ -thalassémie non délétionnelles sont moins fréquentes. Elles résultent de la substitution, insertion ou délétion d'un ou de plusieurs nucléotide(s).

Plus de 300 000 nouveau-nés souffrant d' $\alpha$ -thalassémie sévère sont enregistrés chaque année dans le monde<sup>253</sup>. L' $\alpha$ -thalassémie est probablement le désordre monogénique le plus répandu pouvant atteindre une fréquence polymorphique (> 1%) dans les régions tropicales et sub-tropicales<sup>245</sup>. Ces fortes fréquences résultent de l'avantage sélectif que confère l' $\alpha$ -thalassémie contre le paludisme à *P. falciparum*, qui est (ou a été) endémique dans ces régions<sup>254</sup>. Ainsi, l' $\alpha$ -thalassémie est fréquente dans les pays méditerranéens, en Asie du Sud-Est, en Afrique, au Moyen-Orient et en Inde. Dans les dernières décennies, l'incidence de l' $\alpha$ -thalassémie a augmenté en Europe du Nord, en Amérique du Nord et en Australie à cause des mouvements démographiques, causant la dispersion d'hémoglobine H et d' $\alpha$ -thalassémie majeure (le nombre de nouveau-nés souffrant de ces formes d' $\alpha$ -thalassémie est estimé dans les Figures 28B et C).

Les variants les plus fréquents à l'origine d' $\alpha^0$ -thalassémie, majoritairement le variant -SEA en Asie du Sud-Est et le variant -MED dans les pays méditerranéens, atteignent des fréquences d'environ 5% (Figure 28A). Les variants  $\alpha^{-3,7}$  sont les variants les plus fréquents à l'origine d' $\alpha^+$ -thalassémie (Figure 28A).

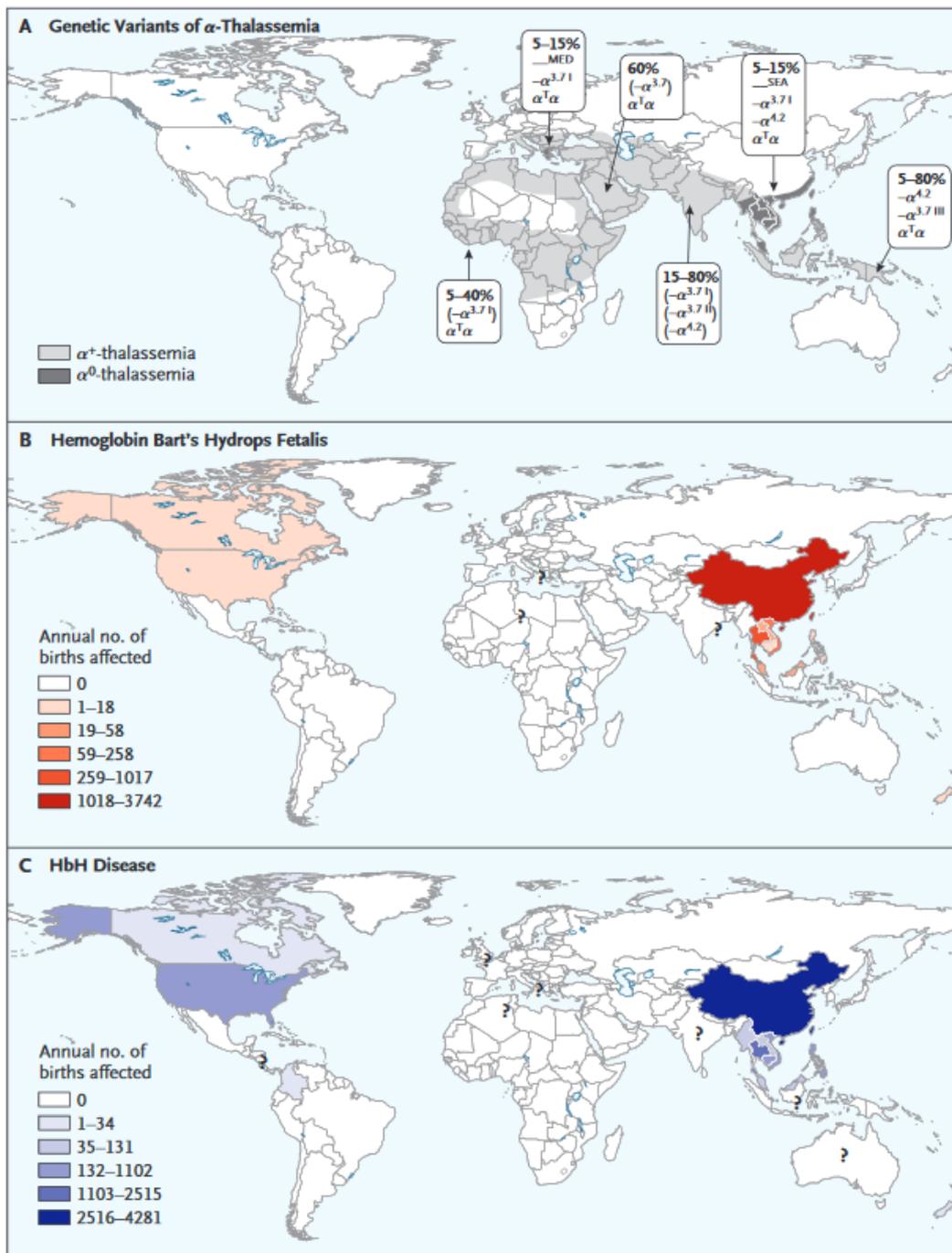


Figure 28. **Fréquence et distribution géographique des principaux variants génétiques à l'origine de l'alpha-thalassémie, des cas d'alpha-thalassémie majeure, et d'hémoglobinoses H.** La figure A représente la distribution géographique des variants les plus fréquents à l'origine d' $\alpha^+$ -thalassémie et d' $\alpha^0$ -thalassémie. L' $\alpha$ -thalassémie peut se manifester sous formes sévères, l'hémoglobinoses H ( $-\alpha/-$ ) et l' $\alpha$ -thalassémie majeure ( $--/--$ ) (associée à la présence d'Hb Bart et d'hydrops fœtal). Le nombre de nouveau-nés souffrant de ces formes d' $\alpha$ -thalassémie est estimé dans les figures B et C. Ces nombres sont parfois mal renseignés (notées du signe ?) (Piel et al., 2014<sup>248</sup>).

Certaines études ont décrit un phénomène d'épistasie négative entre l' $\alpha^+$ -thalassémie et le trait drépanocytaire pour la protection conférée contre le paludisme, qui est plus faible en cas de co-portage combiné de ces deux désordres<sup>255</sup>. Certaines études suggèrent également que les fréquences d' $\alpha^+$ -thalassémie sont limitées en Afrique par la présence de l'allèle HbS<sup>256</sup>.

## 1.5. Mécanismes protecteurs de l'hémoglobine S contre le paludisme

### 1.5.1. Modulation de l'export des protéines parasitaires

Lors de son développement intra-érythrocytaire, le parasite génère un réseau d'actine dérivé de celui de l'hôte à l'intérieur du cytoplasme érythrocytaire. Les filaments d'actine connectent les MCs jusqu'à la surface de l'hématie, et les vésicules de transport produites par les MCs y sont attachées. Ainsi, ce réseau d'actine est important pour l'export des protéines parasitaires. La présence d'HbS interfère avec cette machinerie d'export. En effet, la taille des filaments d'actine augmente avec l'infection par *P. falciparum*. Or, même si la taille de ces filaments augmente suite à l'infection de GRs HbAS, leur taille est significativement plus faible que celle des filaments observés dans les iGRs HbAA<sup>226</sup> (Figure 29).

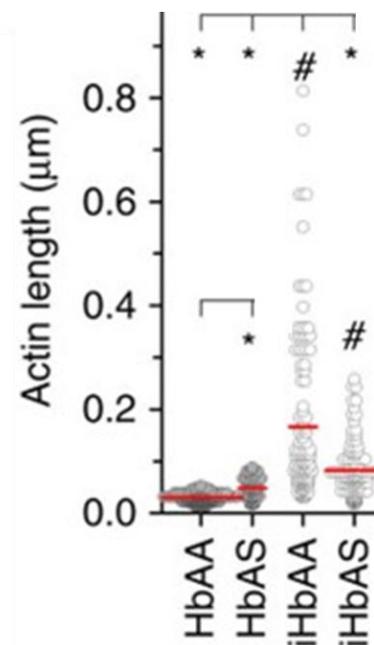


Figure 29. **Taille des filaments d'actine dans les globules rouges HbAA et HbAS selon l'infection par *P. falciparum*.** La taille des filaments d'actine a été mesurée dans les GRs HbAA et HbAS avant et après infection par *P. falciparum*, à partir de tomographies grâce au logiciel « AMIRA volume processing ». Les GRs infectés sont notés avec le préfixe « i ». \* représente une  $p$ -value < 0,001 après comparaison avec les GRs HbAA non infectés (ligne du bas) ou infectés (ligne du haut). # indique une  $p$ -value < 0,01 après comparaison, pour un même génotype de GR, de la condition infectée et non infectée (Adapté de Cyrklaff et al., 2016<sup>226</sup>).

Ce réseau d'actine est également nécessaire à la formation des MCs. Les filaments d'actine sont anormalement courts et non rattachés aux MCs dans les GRs HbSC et HbAS infectés<sup>226,257</sup>, et les MCs sont destructurées<sup>126,226</sup> (Figure 30). De plus, les GRs HbAA traités à la cytochalasine D (agent dépolymérisant de l'actine) présentent aussi des MCs anormalement formées<sup>226</sup>.

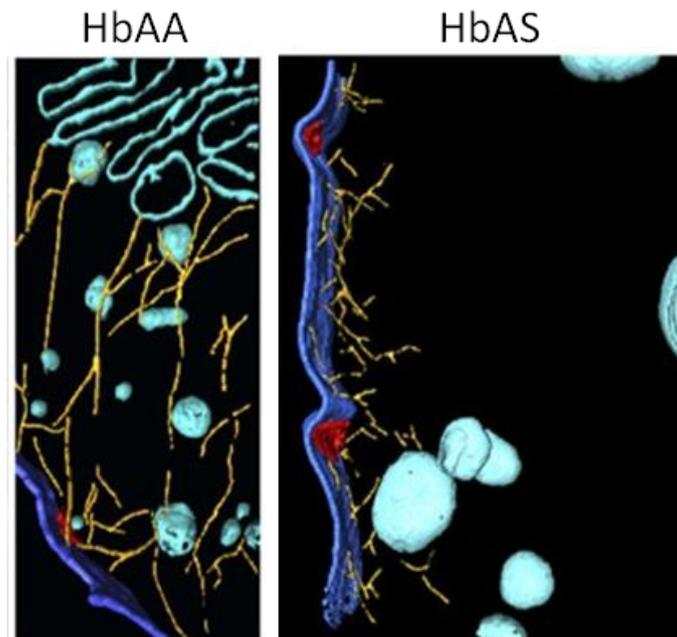


Figure 30. **Tomographies des structures présentes dans le cytoplasme d'érythrocytes HbAA et HbAS infectés par *P. falciparum*.** Dans les GRs HbAA, les MCs (bleu turquoise) ont une structure lamellaire. Ces organites produisent des vésicules de transport (bleu turquoise) contenant des protéines destinées à la surface érythrocytaire, dont certaines vont joindre les knobs (rouges). Des vésicules de transport sont liées aux filaments d'actine (jaune). Dans les érythrocytes HbAS, les MCs ne forment pas la structure multicouche. Les filaments d'actine sont plus courts et peu d'entre eux se lient aux MCs. (Adapté de Cyrklaff et al., 2016 <sup>226</sup>).

Le mouvement des MCs est aussi affecté par la présence d'HbS. Dans les iGRs HbAA, le mouvement des MCs ralentit entre le stade ring (où les MCs ne sont pas encore entièrement formées) et le stade trophozoïte. Le mouvement des MCs est significativement plus rapide dans les GRs HbAS infectés par des trophozoïtes. De plus, ce mouvement est similaire à celui des MCs observé dans les GRs HbAA traités à la cytochalasine D <sup>127</sup>. L'ensemble de ces anomalies observées dans les GRs HbAS semble associé au stress oxydant généré par l'HbS. En effet, des GRs HbAA pré-traités par des agents simulant un stress oxydant puis infectés par *P. falciparum* présentent des filaments d'actine plus courts, et des MCs déstructurées <sup>226</sup>.

Enfin, une autre étude a montré que l'export de protéines parasitaires était retardé, et plus faible pour certaines protéines parasitaires dans les GRs HbAS <sup>258</sup>.

Toutes ces études montrent que l'export des protéines parasitaires au sein des hématies HbAS est altéré. Or le parasite exporte des protéines parasitaires pour exprimer sa pathogénicité, qui pourrait ainsi être affectée en présence d'HbS.

### 1.5.2. Modulation de la présentation de PfEMP1 et de la cytoadhérence

La cytoadhérence résulte de l'interaction de PfEMP1 avec les récepteurs endothéliaux humains. Ce phénomène entraîne la séquestration des iGRs dans les vaisseaux sanguins, et

prévient leur passage et élimination par la rate. La cytoadhérence des iGRs active l'endothélium, entraînant l'inflammation et des dommages tissulaires, associés au paludisme sévère. De nombreuses études ont montré que les GRs HbAS présentait une altération du phénomène de cytoadhérence. Ce phénomène a été observé avec différentes souches de laboratoire de *P. falciparum* ainsi qu'avec des isolats de terrain, en conditions statiques et en flux<sup>226,259,260</sup> (Figure 31A). Des études ont aussi montré que les GRs HbAS présentait une plus faible cytoadhérence à la CSA dans le cadre du PAM<sup>226</sup>(Figure 31B), ou à ICAM-1<sup>261</sup>.

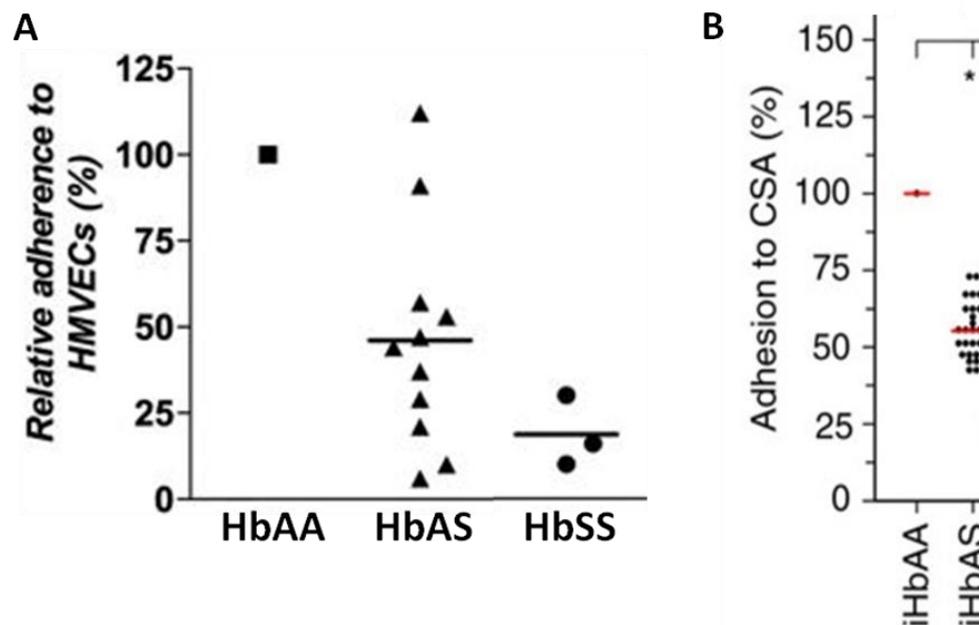
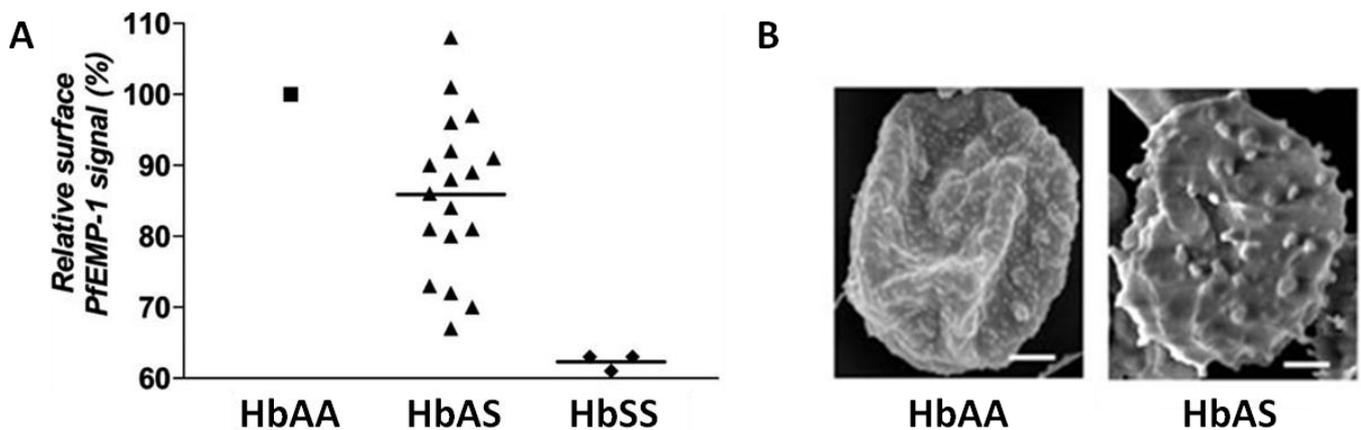
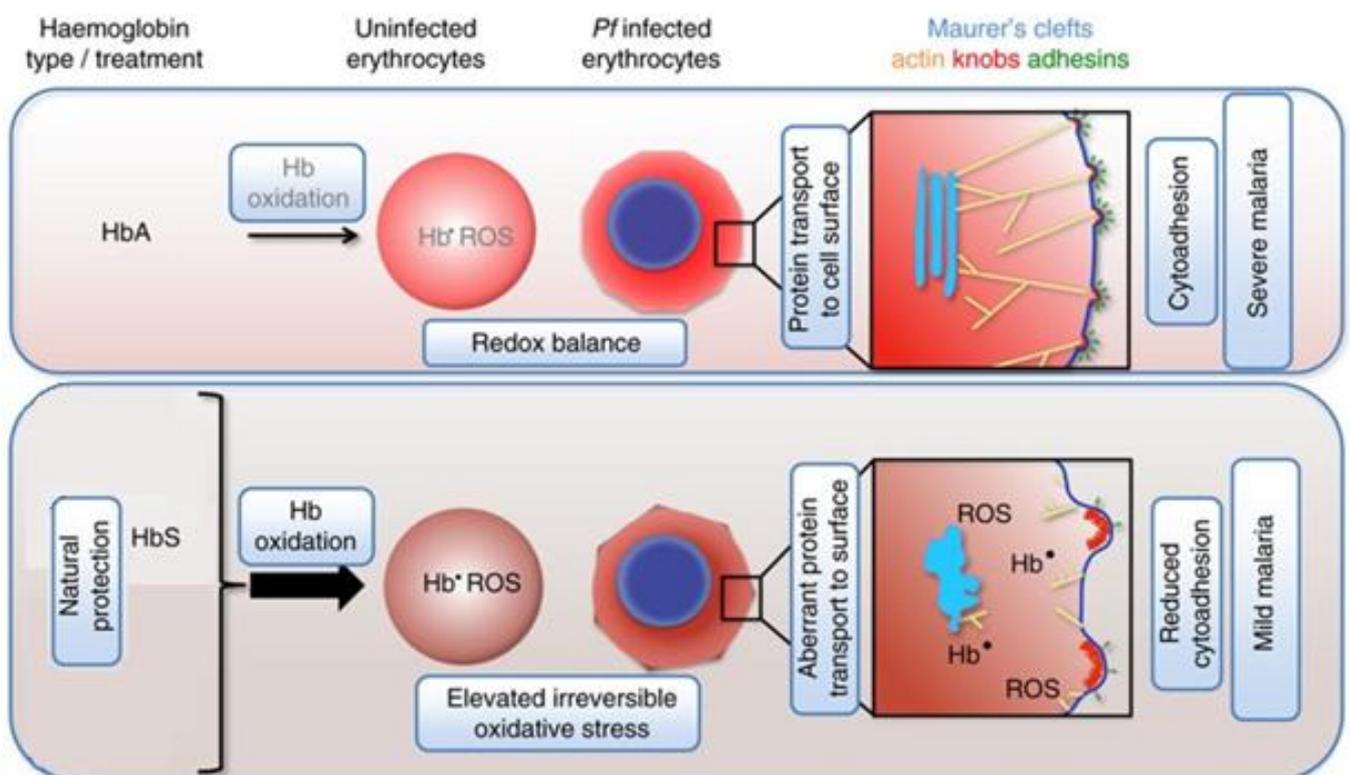


Figure 31. Mesure du niveau de cytoadhérence des globules rouges HbAA, HbAS et HbSS infectés par *P. falciparum* aux cellules HMVECs exprimant CD36 (A) ou à la CSA (B). Les GRs HbAS et HbSS infectés par les souches parasitaires 3D7, FVO et 7G8 présentent une réduction de cytoadhérence de 54% et plus de 70%, respectivement, pour CD36 exprimé à la surface des cellules HMVEC (Human MicroVascular Endothelial Cells) dans des conditions semi-statiques (agitation horizontale, 100 rpm pendant 1h) (A). (Adapté de Cholera et al., 2008<sup>259</sup>). Les GRs HbAS infectés par la souche FCR3 exprimant majoritairement VAR2CSA présentent une cytoadhérence significativement plus faible à la CSA que les GRs HbAA infectés par la même souche parasitaire (B) (Adapté de Cyrklaff et al., 2016<sup>226</sup>).

La diminution de la cytoadhérence des GRs HbAS pourrait résulter de la présentation anormale de *PfEMP1* à la surface de ces érythrocytes. En effet, des études ont mesuré un plus faible taux de reconnaissance de *PfEMP1* ou de VAR2CSA, par des anticorps murins, à la surface des GRs HbAS infectés par *P. falciparum*<sup>226,259,262</sup>. Une étude a également mesuré une réduction de 14% et de 38% de la reconnaissance de *PfEMP1* à la surface des GRs HbAS et HbSS, respectivement, par des plasmas<sup>259</sup> (Figure 32A). Enfin, les iGR HbAS présentent une distribution hétérogène des knobs à leur surface ; ces derniers étant anormalement élargis (Figure 32B)<sup>258,259</sup>.



Cyrklaff *et al.* ont proposé un modèle expliquant les mécanismes à l'origine de la protection par l'HbS (et d'autres Hb anormales) contre les formes sévères de paludisme (Figure 33).



L'HbS, anormale, est instable et s'auto-oxyde plus fortement que l'HbA, générant un environnement oxydant et la production de ROS au sein du GR. Le stress oxydant interfère avec la mise en place d'un système d'export des protéines parasites au sein du cytoplasme du GR, dont la génération de Maurer's Clefts ancrés à la surface de l'hématie grâce à un réseau d'actine dérivant du cytosquelette érythrocytaire. L'export des protéines parasites est ainsi altéré, comme la mise en place du complexe de cytoadhérence présentant *PfEMP1* à la surface du GR anormal. En conséquence la cytoadhérence des GRs HbAS aux récepteurs endothéliaux est plus faible, et donc la sévérité de la pathologie moindre (Figure 33).

### 1.5.3. Modulation de l'activation endothéliale lors de la cytoadhérence

Une étude a récemment montré que les GRs HbAS présentaient une surface et un temps d'interaction plus courts à l'endothélium, associés à une activation de l'endothélium plus faible <sup>264</sup>. *PfEMP1* est aussi capable d'interagir avec CD36 exprimé par les monocytes, qui sont alors activés, entraînant la production importante de cytokines associées à l'inflammation se produisant lors des formes sévères de paludisme. Une étude a montré que les iGRs HbAS et HbSS présentaient une altération de cette interaction avec ces monocytes <sup>259</sup>. De plus, en condition où la pression en O<sub>2</sub> est faible, les GRs HbAS sont associés avec un phénomène plus faible de « rosetting » <sup>261,265</sup>, qui est l'interaction des iGRs avec les GRs non-infectés, favorisant l'obstruction des microvaisseaux dans les formes sévères de paludisme, notamment dans le cas de paludisme cérébral <sup>266</sup>.

### 1.5.4. Altération de la croissance parasitaire dans les globules rouges HbAS

Depuis de nombreuses années, plusieurs études ont montré que la croissance de *P. falciparum* était plus faible dans les GRs HbAS lorsque la pression en O<sub>2</sub> était faible <sup>267-270</sup>. Notamment, une étude récente a montré que les parasites s'arrêtaient au stade ring tardif/jeune trophozoïte dans les GRs HbAS à 1% d'O<sub>2</sub> (Figure 34A et B). De plus, dans ces mêmes conditions, la réplication de l'ADN parasite était inhibée (Figure 34C) <sup>268</sup>. Cette inhibition de croissance est partiellement restaurée lorsque les GRs HbAS sont traités avec un agent inhibant la falciformation des GRs, suggérant un lien entre la polymérisation de l'HbS et l'inhibition de croissance à faible concentration d'O<sub>2</sub>. Les auteurs proposent un modèle stipulant que suite à la cytoadhérence des iGRs à partir des stades trophozoïtes, les GRs séquestrent dans les capillaires profonds où la pression en O<sub>2</sub> est faible. Les parasites se développant au sein d'érythrocytes HbAS présentent alors une inhibition de croissance

associée à la polymérisation de l'HbS. Notamment, l'inhibition de croissance pourrait résulter de l'inaccessibilité à l'Hb, sous forme polymérisée, dont la digestion par le parasite est nécessaire pour sa croissance.

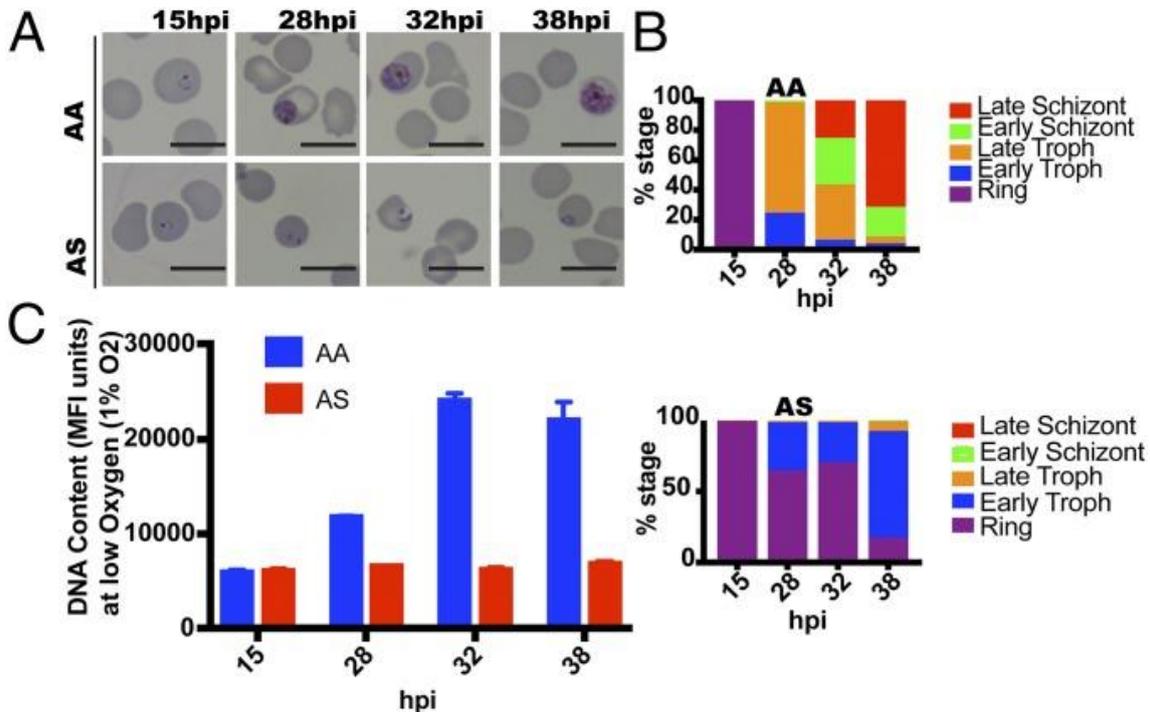


Figure 34. **Croissance de *P. falciparum* dans des globules rouges HbAA et HbAS lorsque la concentration en oxygène est faible.** Les expériences ont été réalisées à une concentration en O<sub>2</sub> de 1%. L'observation de frottis sanguin (A) et la détermination des stades parasites observés au cours du développement intra-érythrocytaire (B) montre que les parasites restent bloqués au stade ring tardif/jeune trophozoïte dans les GRs HbAS à partir de 28 h après invasion. La réplication parasitaire, suivie par mesure de la quantité d'ADN dans les GRs infectés au cours du cycle de développement, est inhibée lorsque *P. falciparum* est cultivé dans les GRs HbAS (C) (Archer et al., 2018<sup>268</sup>).

Toutefois, dans des conditions de culture standard, de nombreuses études rapportent une croissance parasitaire normale dans les GRs HbAS<sup>226,271</sup>. De plus, une étude a récemment mesuré des densités parasitaires similaires chez des enfants HbAA et HbAS infectés par *P. falciparum*<sup>272</sup>.

L'inhibition de croissance pourrait résulter de la déshydratation des GRs portant l'HbS. En effet, les GRs HbSS présentent un fort taux de déshydratation. De plus, l'invasion et la croissance de *P. falciparum* ont été montrées comme altérées dans les GRs fortement déshydratés<sup>273</sup>. Toutefois, l'impact du niveau de déshydratation des GRs HbAS sur la croissance de *P. falciparum* n'a pas été étudié à ce jour.

Plus récemment, une étude a suggéré que l'inhibition de croissance pourrait s'effectuer grâce à des micro-RNA de l'hôte qui seraient transloqués dans le parasite<sup>274</sup>. Les auteurs ont montré qu'une centaine de mi-RNAs du GRs étaient transloqués au sein du parasite lors du

développement intra-érythrocytaire. Ils ont montré que ces miRNAs pouvaient s'intégrer dans les ARNm parasites, inhibant leur traduction. De plus, il a été observé que deux micro-RNA étaient enrichis dans les GRs HbAS, miR-451 and let-7i. La translocation de ces miRNA dans les GRs HbAA impacte négativement la croissance de *P. falciparum*. De plus, les auteurs ont démontré que miR-451 s'accumulait fortement dans le parasite et inhibait la traduction de l'ARNm parasite responsable de la sous-unité régulatrice de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA-R).

### 1.5.5. L'hémoglobine S génère un stress oxydant altérant le développement parasitaire

Une étude a montré que le stress oxydant causé par l'instabilité de l'HbS était associé au développement anormal de *P. falciparum* au sein de GR HbAS<sup>226</sup>. L'application d'un tel stress à des GR normaux entraîne les mêmes anomalies de développement parasitaire que celles observées dans les érythrocytes porteurs d'HbS, à savoir des MCs destructurés, une altération de la présentation de PfEMP1 et une diminution de la cytoadhérence des hématies parasitées<sup>226</sup>. Récemment, une étude a mesuré le taux de carbonylation protéique, reflétant les dommages oxydatifs des protéines érythrocytaires lors de la croissance de *P. falciparum*. Les auteurs ont montré que ce taux était plus important dans les iGRs HbAS que dans les hématies HbAA parasitées<sup>275</sup>. L'infection parasitaire et l'HbS génèrent tous deux du stress oxydant au sein du GR. Ainsi, le stress oxydant pourrait être exacerbé suite à l'infection d'un GR HbAS (Figure 35), et délétère pour la croissance de *P. falciparum*.

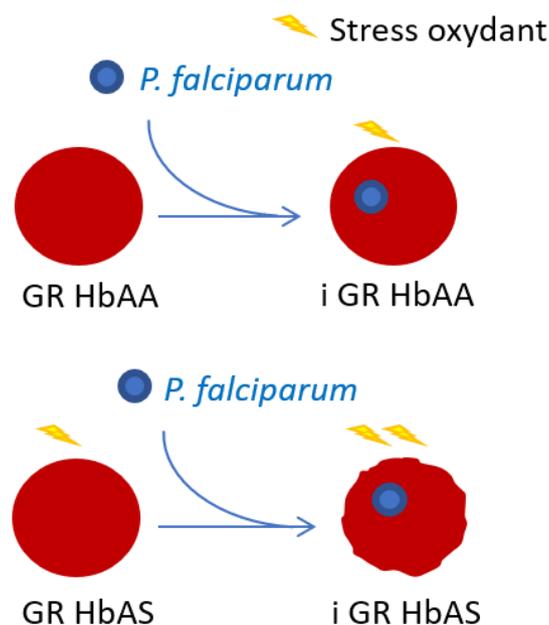


Figure 35. **Le stress oxydant est généré à la fois par la présence d'hémoglobine S et par l'infection par *P. falciparum*.** Lors de l'infection de GR HbAS par *P. falciparum*, le stress oxydant pourrait altérer la croissance parasitaire. i : infecté

### 1.5.6. L'hémoglobine S induit la production d'hème oxygénase-1

Des études ont montré que l'HbS était associée à un meilleur contrôle de la réponse inflammatoire associée au paludisme cérébral, grâce à un meilleur contrôle du taux d'hème libre lors de l'infection par *P. falciparum*. L'HbS, étant anormale, est plus fréquemment oxydée, libérant de l'hème dans la circulation sanguine. L'hème est le principal inducteur de l'hème oxygénase-1 (HO-1), une enzyme qui catalyse en retour l'hème afin d'en limiter les quantités dans la circulation. Le catabolisme de l'hème par HO-1 entraîne la production de monoxyde de carbone, qui inhibe l'oxydation de l'Hb, et ainsi le relargage d'hème libre en trop grande quantité dans la circulation, notamment lors de l'infection par *P. falciparum*. L'hème libre est cytotoxique, et peut activer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Une étude chez les souris drépanocytaires et les souris présentant un phénotype équivalent au trait drépanocytaire a mesuré des taux plus élevés d'HO-1 chez ces souris par rapport aux contrôles. Ces souris, contrairement aux souris sauvages, ne souffrent pas de paludisme cérébral<sup>276</sup>. Ainsi, chez ces souris, les taux élevés de HO-1 permettraient de prévenir l'accumulation de l'hème libre cytotoxique, limitant les dommages engendrés aux tissus. De plus, les auteurs ont relevé des niveaux plus faibles de l'expansion des cellules T CD8 cytotoxiques, pouvant être associés à la protection contre le paludisme cérébral observée. Enfin, les auteurs ont observé que l'administration d'hème libre à des souris sauvages les protégeait du paludisme cérébral.

Une autre étude a mesuré une augmentation du taux d'hème libre lors de l'infection par *P. falciparum* chez les individus HbAA, mais pas chez les individus HbAS<sup>272</sup>. Cette augmentation résulte probablement de la libération de l'hème lors de la rupture des iGRs à la fin du cycle intra-érythrocytaire. Cependant, des taux plus faibles d'hème ont été mesurés chez les enfants HbAS par rapport aux enfants HbAA lors de l'infection. De plus les individus HbAA ont un niveau d'HO-1 plus élevé lors de l'infection que les individus HbAS. Or, la forte induction de HO-1 peut aussi engendrer un stress oxydant. Cette étude a aussi montré que le taux de cytokines pro-inflammatoires augmentait significativement avec l'infection chez les individus HbAA, mais pas chez les individus HbAS. Ainsi, les sujets HbAS semblent mieux contrôler leur niveau d'hème lors d'une infection par *P. falciparum*, générant une réponse inflammatoire plus faible. Ce phénomène pourrait expliquer la plus faible susceptibilité des enfants HbAS face au paludisme sévère.

De plus, une étude précédente a montré que l'induction de HO-1 prévenait le développement des formes de paludisme non cérébrales chez la souris<sup>277</sup>.

Ainsi, la présence chronique d'hème libre résultant de la présence d'HbS entraînerait un meilleur catabolisme de l'hème généré lors de l'infection par *P. falciparum*, modulant la réponse inflammatoire, associée au paludisme grave (Figure 36).

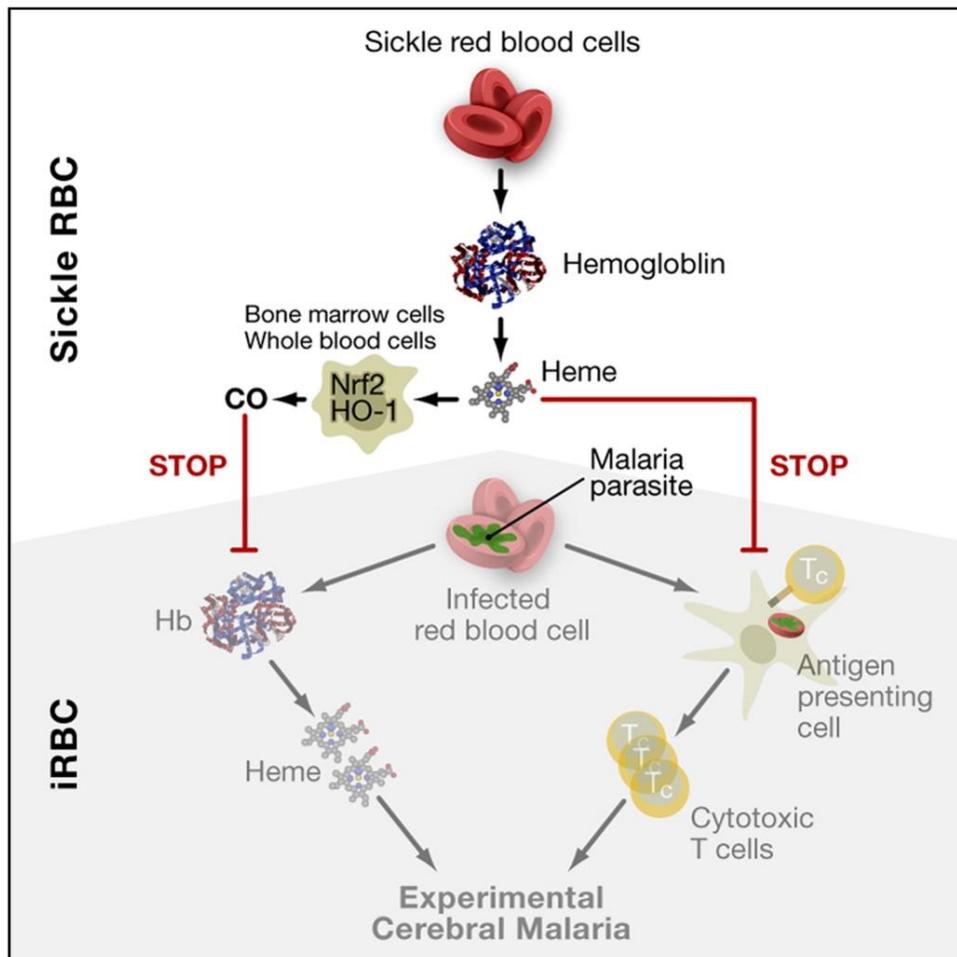


Figure 36. **L'HbS confère une tolérance par rapport au paludisme et prévient la réponse inflammatoire associée au paludisme cérébral.** L'HbS, plus instable que l'HbA, entraîne la production chronique d'hème libre dans la circulation sanguine. L'hème est le principal inducteur de HO-1, qui catabolise l'hème à son tour. Ce catabolisme de l'hème génère du monoxyde de carbone (CO), qui inhibe l'oxydation de l'Hb, permettant de réguler la quantité d'hème libre en circulation. Ainsi, lors de l'infection par *P. falciparum*, la quantité d'hème générée par la rupture des iGRs portant l'HbS est mieux contrôlée. Ce phénomène permet ainsi de limiter son effet cytotoxique, et prévient la production de cytokines pro-inflammatoires (Ferreira et al., 2011<sup>276</sup>).

#### 1.5.7. Les globules rouges porteurs d'hémoglobine S sont plus efficacement éliminés

Dans les années 1970, deux études ont observé que les GRs HbAS falciforment 2 à 8 fois plus lorsqu'ils étaient infectés (par des formes parasitaires jeunes seulement)<sup>267,278,279</sup>. Ce phénomène pourrait favoriser la phagocytose de ces iGRs et permettre une meilleure élimination des érythrocytes parasités.

Il a été démontré que les GRs HbAS infectés par des formes jeunes (ring) de parasite sont plus facilement éliminés car plus fortement phagocytés que les GRs HbAA parasités par les

mêmes formes (Figure 37)<sup>271</sup>. Ces GRs HbAS présentent une augmentation de l'agrégation de la Bande 3 ainsi que la liaison d'hémichromes au cdB3, d'IgG et du complément (Figure 36). Les auteurs supposent que le stress oxydant, à la fois généré par la présence d'HbS mais aussi par l'infection par *P. falciparum*, favoriserait la formation d'agrégats de Bande 3, sites antigéniques reconnus par des auto-anticorps et le complément C3, facilitant l'opsonisation par les macrophages spléniques et ainsi l'élimination des GRs les présentant.

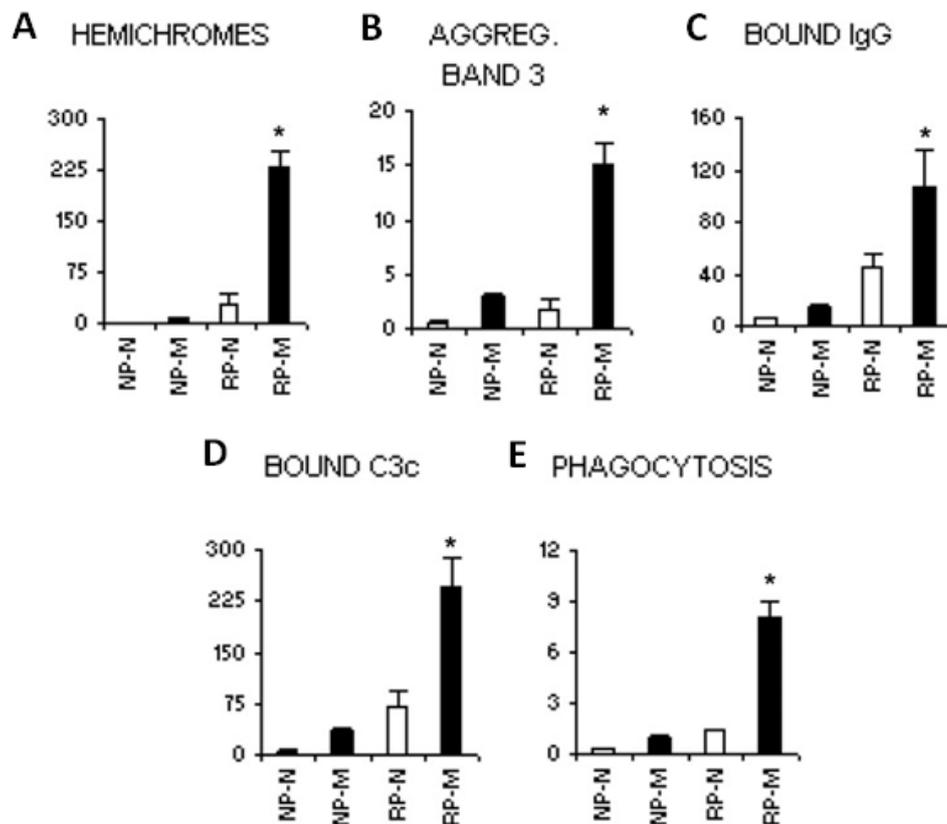


Figure 37. **Taux de liaison des hémichromes, des IgG, du complément à la membrane érythrocytaire, de la Bande 3 agrégée, et de la phagocytose des globules rouges selon le génotype d'hémoglobine.** Les GRs HbAS infectés par des rings présentent un taux significativement plus important d'hémichromes liés à la membrane (A), ainsi qu'un niveau de Bande 3 agrégée plus élevé (B). Ces mêmes GRs présentent plus d'IgG autologues (C), et de fragments C3c du complément (D) liés à la membrane, associés à un taux de phagocytose plus important (E). NP : GRs Non Parasités. RP: GRs Parasité par des Rings. N: GR Normal (HbAA). M: GR Muté (HbAS). (Adapté de Ayi et al., 2004<sup>271</sup>).

Enfin, les GRs HbAS infectés par des rings semblent être plus efficacement éliminés par phagocytose suite à l'exposition de PS. Une étude avait montré que les GRs HbSS de souris présentaient des taux plus élevés de PS<sup>280</sup>. De plus, les GRs HbAS infectés par des rings présenteraient une plus forte exposition de PS à leur surface, associée à un taux plus important de phagocytose par les macrophages<sup>281</sup>.

### 1.5.8. Rôle de l'immunité dans la protection conférée par l'hémoglobine S

L'immunité semble participer à la protection conférée par le trait drépanocytaire contre le paludisme. Les macrophages présentant une activité de phagocytose plus importante face aux GRs HbAS infectés par des rings, et les hématies HbAS infectées cytoadhérant moins, ces érythrocytes sont probablement mieux éliminés par la rate, et donc mieux exposés au système immunitaire pour le développement d'une immunité protectrice. Une étude a observé des taux plus faibles de cellules dendritiques myéloïdes périphériques et de monocytes dans le système périphérique chez les enfants HbAS, suggérant un recrutement plus important de ces cellules dans la rate <sup>282</sup>.

Plusieurs études observent que la protection conférée par le trait drépanocytaire est plus importante chez les enfants de 10 ans que chez les enfants plus jeunes, suggérant que la protection contre le paludisme résulte en partie de mécanismes liés à l'immunité adaptative <sup>283,284</sup>.

Cependant, les résultats concernant le rôle de l'immunité adaptative dans la protection conférée par le trait drépanocytaire contre le paludisme sont controversés. Alors que plusieurs études décrivent des taux plus importants d'IgG anti-*Pf*EMP1 chez les sujets HbAS au Gabon <sup>285</sup>, et dans les zones de faible transmission palustre (mais pas dans les zones où la transmission est forte) au Burkina Faso <sup>286</sup>, d'autres n'observent pas de différence de quantité de ces anticorps chez les individus porteurs du trait drépanocytaire <sup>287</sup>. De même, une étude a montré que les niveaux d'IgG2 et d'IgG4 anti-AMA1 étaient plus élevés chez les individus HbAS <sup>288</sup>. Mais d'autres travaux ont mesuré des taux similaires ou plus faibles d'anticorps contre différents antigènes parasitaires connus, RESA, MSP1, MSP2 et EBA-175 chez des enfants HbAA et HbAS <sup>289</sup>. D'autres travaux ont mesuré des niveaux d'IgG1 et 3 contre MSP2 et d'IgG1 contre RESA plus faibles chez les enfants HbAS au Sénégal <sup>290</sup>. Une autre étude a mesuré une augmentation de la réponse anticorps chez les enfants HbAS contre les antigènes AMA1, EBA175, MSP1, MSP2, MSP3, CSP, mais seulement dans les régions où la transmission de paludisme est faible au Burkina Faso <sup>286</sup>. Une étude sur micropuce protéique a permis de tester la réponse immune de sujets HbAA et HbAS pour 491 antigènes, et n'a pas observé de différence significative selon le génotype d'Hb <sup>287</sup>.

Il est très probable que la protection conférée par le trait drépanocytaire contre le paludisme résulte d'une combinaison de mécanismes complexes <sup>291-293</sup>, presque tous représentés dans la Figure 38.

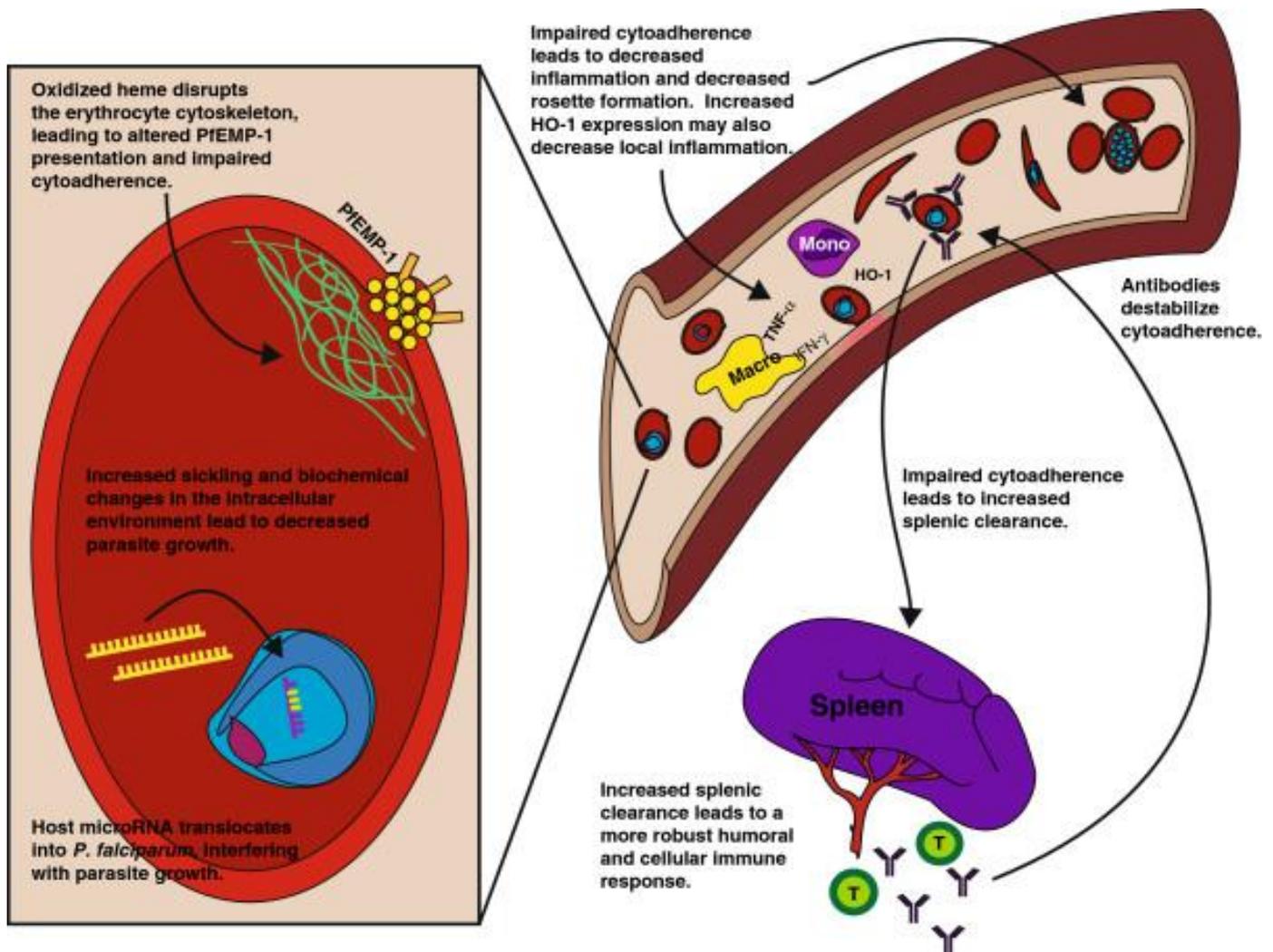


Figure 38. Schéma représentant les différents mécanismes de protection conférés par le trait drépanocytaire contre le paludisme. Certains miRNAs enrichis dans les GRs HbAS sont transloqués chez *Plasmodium*, et s'intègrent dans les ARNm, inhibant leur traduction et perturbant potentiellement la croissance parasitaire. Le stress oxydant généré par l'HbS altère la mise en place du système d'export des protéines parasitaires, et la présentation de PfEMP1 au sein des knobs, associé à une réduction de la cytoadhérence et donc à une meilleure élimination des iGRs par la rate. Le phénomène de rosetting est plus faible pour les iGRs HbAS, limitant l'obstruction des microvaisseaux. De plus, l'HbS génère des hémichromes qui se lie à la Bande 3, entraînant son agrégation dans la membrane et générant des auto-antigènes reconnus par le complément et les IgG autologues. Ainsi, les GRs HbAS infectés par des rings sont plus efficacement éliminés par phagocytose, permettant une meilleure présentation des antigènes parasitaires stimulant la mise en place d'une immunité adaptative, potentiellement à l'origine de la production d'anticorps pouvant inhiber la cytoadhérence des iGRs aux récepteurs endothéliaux. Enfin, l'hème libre résultant de l'instabilité de l'HbS induit la production d'HO-1, qui inhibe la réponse inflammatoire associée au paludisme sévère (Gong *et al.*, 2013<sup>291</sup>).

### 1.5.9. Mécanismes de résistance conférés par d'autres désordres érythrocytaires

Le déficit en G6PD et l' $\alpha$ -thalassémie confèrent aussi une résistance contre le paludisme à *P. falciparum*. N'étant pas le principal sujet de cette thèse, ces mécanismes seront brièvement évoqués.

Des études ont décrit que l' $\alpha$ -thalassémie protégeait contre l'anémie sévère causée par le paludisme sévère, à la fois sous forme hétérozygote et homozygote<sup>219,294</sup>. De plus, une étude a observé que les porteurs d' $\alpha$ -thalassémie homozygotes et hétérozygotes étaient moins susceptibles de développer une forme sévère de paludisme<sup>255</sup>, bien qu'une autre n'ait pas observé de protection contre le paludisme cérébral par le portage d' $\alpha$ -thalassémie sous forme hétérozygote<sup>219</sup>. Toutefois, la protection de l' $\alpha$ -thalassémie contre le paludisme simple est controversée<sup>255,295,296</sup>. Des études ont décrit une plus faible cytoadhérence des iGRs porteurs d' $\alpha$ -thalassémie, associée à une présentation anormale de PfEMP1<sup>297</sup>. Une étude a observé que la croissance de *P. falciparum* était altérée dans les GRs porteurs du trait  $\alpha$ -thalassémique, à forte concentration d'oxygène<sup>298</sup>.

La protection conférée par le déficit en G6PD est également controversée. Certains travaux n'établissent aucun lien entre le déficit en G6PD et le paludisme<sup>299,300</sup>, alors que d'autres études observent des parasitemies plus faibles chez les individus atteints de ce déficit<sup>301,302, 303</sup>. La plupart des études accorde une protection contre le paludisme pour les femmes hétérozygotes et les hommes hémizygotés pour le déficit en G6PD<sup>238,304</sup>. La protection conférée par ce déficit chez les femmes homozygotes est moins décrite, car ce phénotype est plus rare, mais elle est probablement similaire à celle des hommes hémizygotés<sup>238</sup>. Les mécanismes de protection ne sont pas encore très bien compris. Une étude a montré que la croissance de *P. falciparum* était plus faible dans les GRs portant le déficit en G6PD de manière homozygote et hétérozygote<sup>305,306</sup>. De plus, les GRs déficients pour la G6PD infectés par des rings de *P. falciparum* seraient plus fortement éliminés par le système immunitaire que les GRs normaux infectés par ces mêmes formes parasitaires<sup>307</sup>. L'augmentation du stress oxydant, suite à l'infection, génère des dommages de la membrane des GRs déficients infectés, entraînant une augmentation de la présentation d'auto-antigènes reconnus par les macrophages spléniques.

# OBJECTIFS DE LA THESE

Cette thèse a été réalisée au sein de l'UMR216 MERIT « Mère et enfant en milieu tropical : pathogènes, système de santé et transition épidémiologique », une unité mixte de recherche entre l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'Université Paris Descartes, dirigée par le Dr. Philippe DELORON (jusqu'à la fin de l'année 2018), devenue l'UMR261 « Mère et enfant en milieu tropical : pathogènes, système de santé et transition épidémiologique » dirigée par le Dr. André GARCIA depuis le 1<sup>er</sup> Janvier 2019.

Ce doctorat est la suite de travaux initiés lors d'un stage de Master 2 que j'ai effectué en 2015, portant sur « l'étude de la modulation, par l'hémoglobine S, de la phosphorylation des protéines du cytosquelette du globule rouge infecté par *Plasmodium falciparum* ».

J'ai réalisé ce doctorat en trois ans et demi sous la direction du Dr. Adrian J.F. LUTY, et sous l'encadrement du Dr. Anaïs MERCKX et du Dr. Florence MIGOT-NABIAS.

## **2.1. Objectifs principaux de la thèse**

Comme exposé dans l'introduction, le paludisme a exercé au cours des siècles des pressions sur le génome humain, ayant entraîné la sélection de polymorphismes capables de diminuer la susceptibilité aux formes les plus sévères de la maladie. L'exemple le plus connu est l'hémoglobine S, associée à la drépanocytose, qui protège contre les formes graves du paludisme<sup>212</sup>. Cette sélection positive de l'HbS résulte de la protection conférée par le trait drépanocytaire, forme sous laquelle l'HbS est portée de manière hétérozygote et asymptomatique, contre le paludisme simple et compliqué à *P. falciparum*<sup>221</sup>. A ce jour, les mécanismes de résistance du génotype HbAS contre le paludisme ne sont pas encore complètement élucidés.

Le paludisme grave résulte de la séquestration des iGRs dans les capillaires profonds. Cette cytoadhérence est notamment due à la présentation des protéines *PfEMP1* à la surface des hématies parasitées, grâce au remodelage de la membrane érythrocytaire par le parasite. Plusieurs études ont décrit une altération de la présentation de *PfEMP1* à la surface des iGRS HbAS, associée à la diminution de la cytoadhérence de ces érythrocytes parasités<sup>226,259,262</sup>.

Les travaux de cette thèse avaient ainsi pour but d'apporter des éléments de compréhension sur l'altération du remodelage de la membrane des GRs HbAS lors de l'infection par *P. falciparum*, à l'origine de la présentation anormale des antigènes parasitaires, dont *PfEMP1*. Cette problématique a été déclinée en deux questions principales :

-Quel est l'impact de l'altération par l'hémoglobine S de la présentation de *PfEMP1* sur la réponse immune anti-palustre ?

-Quels sont les mécanismes à l'origine de l'altération de la présentation des antigènes à la surface du GR HbAS infecté par *P. falciparum* ?

## 2.2. Quel est l'impact de l'altération par l'hémoglobine S de la présentation de PfEMP1 à la surface des globules rouges HbAS sur la réponse immune anti-palustre ?

L'UMR261 disposant de locaux au Bénin et au Ghana, de nombreuses études de terrain ont été réalisées pendant lesquelles de précieux échantillons ont été récoltés. Notamment, la cohorte « Strategies to Prevent Pregnancy-Associated Malaria » (STOPPAM) a été mise en place par l'UMR216 en 2008 au Bénin. Cette cohorte a suivi 1037 femmes au cours de la grossesse et 200 de leurs enfants lors de la première année de vie. L'accès aux prélèvements de la cohorte STOPPAM nous offrait l'opportunité de tester nos hypothèses avec des échantillons de terrain, dans le cadre d'un type de paludisme particulier, celui affectant la femme enceinte. De plus, des chercheurs de l'unité s'étaient déjà intéressés à l'impact de l'HbS pour les femmes de cette cohorte, en collaborant avec l'équipe de Benoît Gamain (Equipe 3, UMR\_S 1134, INTS), sur l'étude des mécanismes de résistance conférés par le trait drépanocytaire dans le cadre du paludisme gestationnel. Marilou Tétard, doctorante, avait déterminé le génotype d'Hb de 636 femmes de cette cohorte. Ses travaux avaient montré que 15,8% de ces femmes étaient HbAS. Nous avons donc collaboré avec Benoît Gamain et Marilou Tétard pour une suite à donner à ce projet.

A ce jour, la protection conférée par le génotype HbAS contre le PAM est peu connue et encore débattue. Plusieurs études ont montré que VAR2CSA était plus faiblement et anormalement présenté à la surface des GRs HbAS, ces iGRs présentant une capacité de cytoadhérence plus faible à la CSA<sup>226,258</sup>. Cependant, certaines études n'ont pas observé d'effet protecteur du trait drépanocytaire contre le PAM<sup>227,228</sup>.

Le PAM est causé par la séquestration des GRs infectés par *P. falciparum* dans le placenta, résultant de l'adhérence de VAR2CSA<sup>61,308,309</sup> à la CSA, au niveau des syncytiotrophoblastes<sup>94,310</sup>. Les femmes acquièrent des anticorps protecteurs anti-VAR2CSA suite à l'exposition des iGRs dans leur placenta au cours des grossesses successives<sup>100,101,311</sup>. Ces anticorps sont capables d'inhiber la cytoadhérence des iGRs exprimant VAR2CSA à la CSA<sup>102</sup>. Leur présence est associée à un meilleur pronostic pour le déroulement de la grossesse<sup>101</sup>. Cependant, à ce jour, la potentielle association entre le trait drépanocytaire et une meilleure réponse immune anti-palustre protectrice est controversée.

Le but de ce premier projet était donc d'étudier **l'impact du portage hétérozygote d'HbS sur la modulation de la réponse anticorps anti-VAR2CSA dans le cadre du PAM.**

Il est en effet possible de formuler l'hypothèse que l'altération de la présentation de VAR2CSA engendre un développement moins efficace de la réponse immune contre cet antigène. Contrairement, la plus faible cytoadhérence des iGRs HbAS pourrait favoriser le passage de ces hématies dans la rate et ainsi permettre une meilleure visibilité des antigènes parasitaires face au système immunitaire, facilitant le développement d'anticorps protecteurs.

D'autres défauts génétiques du GR étant fortement fréquents en Afrique Sub-Saharienne et pouvant conférer une protection contre le paludisme<sup>218,312</sup>, les co-portages du déficit en G6PD et de l' $\alpha$ -thalassémie avec l'HbS ont été évalués et pris en compte dans cette analyse.

Les résultats de ces travaux ont été présentés sous forme d'un poster « Impact of abnormal haemoglobin S on VAR2CSA immune response in pregnancy-associated malaria » au congrès « Molecular Parasitology Meeting » en Septembre 2018 (Woods Hole, Etats-Unis) (Annexe 1) et valorisés sous forme d'un article intitulé « Impact of hemoglobin S trait on cell surface antibody recognition of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in pregnancy-associated malaria », dont le manuscrit révisé a été renvoyé début février 2019 au journal « Open Forum of Infectious Diseases ». Les résultats de ce chapitre seront présentés au travers de cet article, ainsi que dans une partie complémentaire relatant les données non publiées.

Le développement de l'immunité protectrice résulte d'interactions complexes entre les anticorps et les antigènes. Ce premier projet visait à étudier la modulation de la réponse anticorps contre le globule rouge HbAS infecté. Au cours de cette thèse, nous avons aussi étudié les mécanismes de protection à l'échelle cellulaire et moléculaire. Ainsi, le deuxième projet de ce travail portait sur l'altération des antigènes parasitaires présentés à la surface des GRs HbAS.

Le premier projet a été réalisé dans le cadre d'un paludisme particulier associé à un variant de PfEMP1 spécifique. Cependant, la présentation anormale des antigènes, dont PfEMP1, à la surface des iGRs HbAS résulte probablement de modifications de l'agencement des complexes à la membrane, impliquant d'autres protéines parasitaires et érythrocytaires. Ainsi, nous avons choisi d'étudier l'altération du remodelage de la membrane du GR par l'HbS avec une souche parasitaire non sélectionnée pour un phénotype particulier.

### **2.3. Quels sont les mécanismes à l'origine de l'altération de la présentation des antigènes à la surface du globule rouge HbAS infecté par *P. falciparum* ?**

Nous avons parallèlement étudié les mécanismes à l'origine de l'altération du remodelage de la membrane du GR HbAS infecté. Pour cela, nous avons considéré l'impact du stress

oxydant. L'environnement oxydant du GR HbAS pourrait perturber les fonctions et les activités des protéines lors du développement de *P. falciparum*. Notre hypothèse de travail a été la suivante : le stress oxydant exacerbé lors de l'infection par *P. falciparum* de GRs HbAS pourrait perturber la phosphorylation des protéines de la membrane du GR, l'agencement des protéines au sein des complexes membranaires et par conséquent la présentation des antigènes parasitaires à la surface de la cellule hôte. Ce travail s'est donc focalisé sur **l'impact du génotype HbAS, combiné à l'infection par *P. falciparum*, sur le protéome et le phosphoprotéome de la membrane du GR.** Pour cela, nous avons analysé par protéomique la quantité et l'état de phosphorylation des protéines érythrocytaires et parasitaires des GRs HbAA et HbAS infectés par *P. falciparum*. Ces expériences ont été conduites par spectrométrie de masse (ou « Mass Spectrometry » (MS)) par Chiara GUERRERA, Cérina CHHUON et Joanna LIPECKA du PPN.

A partir de nos données de MS, le but de ce projet était aussi d'identifier, dans un second temps, des mécanismes ou des voies de signalisation nécessaires pour le développement optimal de *P. falciparum* dans le GR, afin de mieux caractériser les interactions entre le parasite et sa cellule hôte. J'ai notamment travaillé avec Slim AZOUZI, Thierry PEYRARD et Mahmoud MIDKAR de l'équipe 1 de l'UMR\_S 1134 (INTS).

Dans ce deuxième projet, les co-portages du déficit en G6PD et de l' $\alpha$ -thalassémie avec l'HbS ont aussi été pris en compte, ces anomalies pouvant également conférer une protection contre le paludisme à *P. falciparum* en intervenant également sur l'environnement oxydant au niveau cellulaire.

Les résultats de ces travaux ont été présentés sous forme de posters : « Modulation by abnormal haemoglobins S and C of the phosphorylation of proteins in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes » au congrès « Young Researcher in Life Science » en mai 2016 (Paris) et « Influence of haemoglobin S and C carriage and *Plasmodium falciparum* infection on the phosphorylation of human erythrocyte proteins » au congrès « BioMalPar XIII » en mai 2017 (Heidelberg, Allemagne) (Annexe 1), ainsi que lors de deux présentations orales.

# CHAPITRE 1 :

Modulation, par l'hémoglobine S, de la réponse immune contre le globule rouge infecté par *Plasmodium falciparum* dans le cadre du paludisme gestationnel

### 3.1. Présentation et objectifs du projet

Le but de ce projet était d'étudier l'impact du portage hétérozygote d'HbS sur un potentiel rôle protecteur contre le PAM. Nous nous sommes intéressés à l'influence du génotype HbAS sur la réponse immune anti-VAR2CSA. Pour cela, nous avons sélectionné une sous-cohorte de 159 femmes parmi les femmes de la cohorte STOPPAM, et utilisé leurs plasmas et ADN. Marilou Tétard, lors de son doctorat, a montré que 15,8% des femmes génotypées étaient HbAS<sup>227</sup>. Nous avons utilisé ces données afin d'inclure le maximum de femmes HbAS dans notre étude. Nous avons aussi réalisé des génotypages d'Hb afin d'inclure d'autres femmes HbAS de la cohorte STOPPAM dont le génotype Hb n'était pas connu.

De plus, d'autres anomalies génétiques du GR, comme le déficit en G6PD et l' $\alpha$ -thalassémie, sont fortement fréquents en Afrique Sub-Saharienne et peuvent aussi conférer une protection contre le paludisme<sup>218,312</sup>. En Afrique tropicale, 90% des cas de déficit en G6PD sont dus au variant A<sup>-233</sup>, disposant d'une activité résiduelle de 5 à 10%. La mutation A376G est responsable de la production du variant A. Le variant A376G est fortement retrouvé en Afrique Sub-saharienne<sup>240</sup>. Il dispose encore de 85% d'activité et ne confère donc pas ou peu de symptômes<sup>239</sup>. Le variant A<sup>-</sup> est généré par des mutations additionnelles de la mutation A376G<sup>240</sup>. Les mutations additionnelles les plus fréquemment détectées en Afrique de l'Ouest, et donc considérées dans ce travail au Bénin, sont les mutations G202A et T968C<sup>239</sup>. (Figure 39). Ces mutations sont toujours additionnelles à la mutation A376G et elles s'excluent l'une l'autre<sup>240</sup>. Le variant G6PD A<sup>-</sup>G202A est dominant en Afrique de l'Ouest.

La délétion à l'origine de l' $\alpha$ -thalassémie la plus souvent rencontrée en Afrique Sub-Saharienne est la délétion de 3,7 kb (délétion  $\alpha$ <sup>-3,7</sup>)<sup>313</sup>, qui a donc été retenue dans notre étude.

L'association entre le déficit en G6PD ou l' $\alpha$ -thalassémie et le PAM est peu caractérisée. Alors que certaines études n'ont pas observé de protection conférée par l' $\alpha$ -thalassémie contre le PAM<sup>314</sup>, d'autres en ont décrit une conférée par le portage hétérozygote du déficit en G6PD<sup>315</sup>.

Les co-portages du déficit en G6PD et de l' $\alpha$ -thalassémie avec l'HbS ont été évalués. Pour le génotypage du déficit en G6PD, le variant A (ayant encore 85% d'activité)<sup>239</sup>, dû à la mutation A376G, a premièrement été recherché par « Polymerisation Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism » (PCR-RFLP). Les échantillons positifs pour cette mutation ont ensuite été caractérisés par PCR-RFLP pour les mutations G202A ou

T968C, à l'origine du variant A<sup>-</sup> (disposant de 5 à 10% d'activité résiduelle)<sup>316</sup>. Pour le génotypage de l' $\alpha$ -thalassémie, la délétion  $\alpha$ <sup>-3,7</sup> a été déterminée par PCR multiplexe.

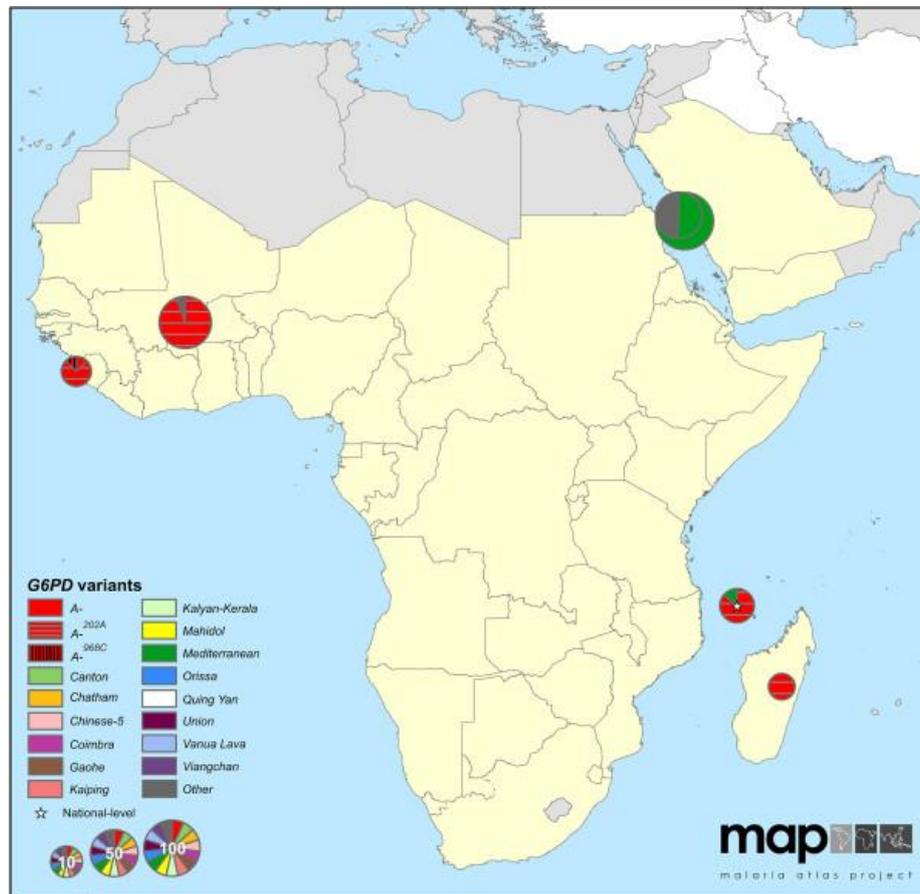


Figure 39. **Distribution des variants G6PD en Afrique.** Le variant G6PD A<sup>-</sup> est le variant le plus fréquent en Afrique tropicale (90% des cas). Le variant A<sup>-</sup> résulte de la combinaison de la mutation 376G avec une mutation additionnelle. Les variants G6PD A<sup>-G202A</sup> et G6PD A<sup>-T968C</sup> sont les variants A<sup>-</sup> les plus fréquents en Afrique de l'Ouest (Howes et al., 2013<sup>239</sup>).

Nous avons ensuite évalué le taux de liaison/reconnaissance, par les anticorps contenus dans les plasmas provenant de femmes HbAA et HbAS, de la surface de GRs HbAA et HbAS infectés par la souche FCR3 de *P. falciparum* exprimant VAR2CSA (préalablement sélectionnée pour la cytoadhérence à la CSA par Marilou Tétard). Ces expériences nous ont permis d'évaluer :

- le taux de liaison des iGRs HbAA en fonction du polymorphisme érythrocytaire des mères (Hb, déficit en G6PD, et  $\alpha$ -thalassémie) (Figure 40A)
- le taux de liaison des iGRs HbAS en fonction du polymorphisme érythrocytaire des mères (Hb, déficit en G6PD, et  $\alpha$ -thalassémie) (Figure 40B)
- le taux de liaison des iGRs HbAA par les plasmas provenant des mères HbAA par rapport à celle des iGRs HbAS par les plasmas provenant des mères HbAS (Figure 40C).

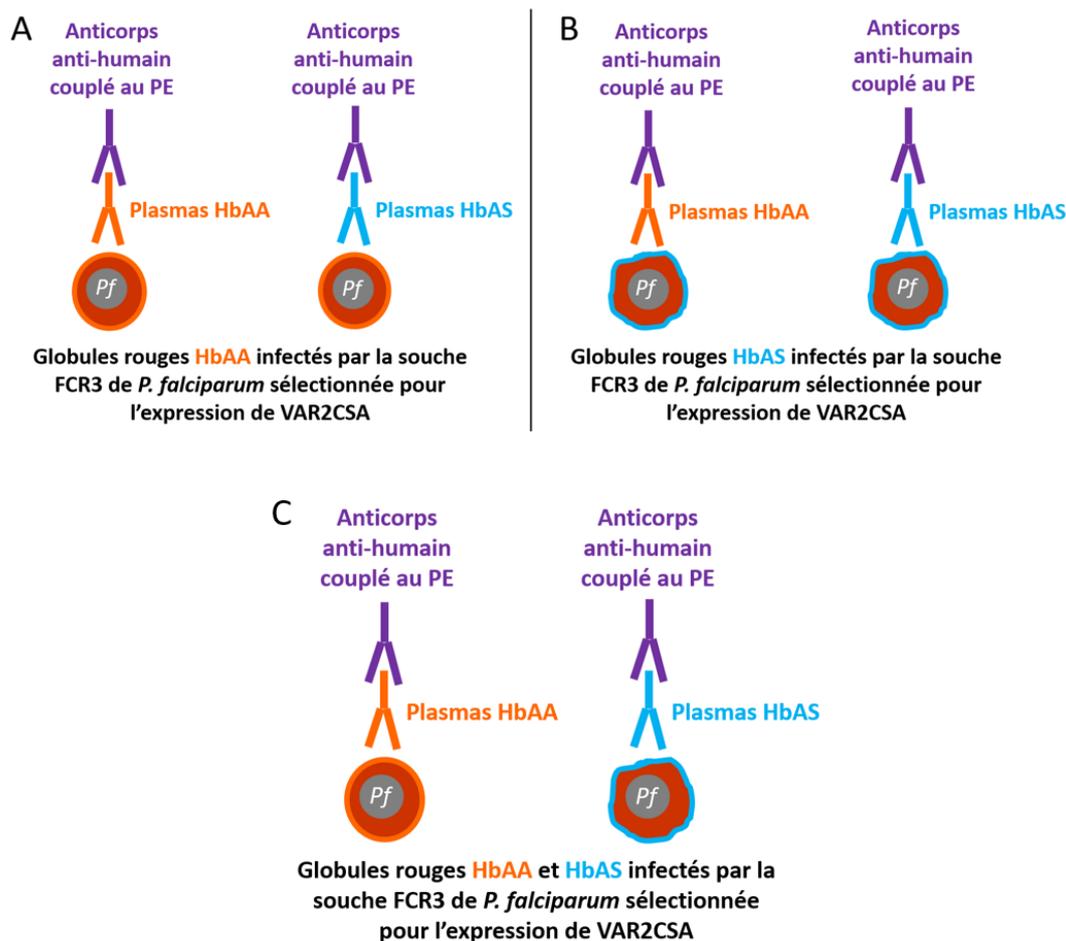


Figure 40. Schéma expérimental des mesures du taux de liaison par les plasmas des globules rouges HbAA et HbAS infectés par cytométrie en flux. Le taux de liaison des iGRs HbAA (A) et des iGRs HbAS (B) a été analysé en fonction du polymorphisme érythrocytaire des mères dont les plasmas sont issus. Le taux de liaison des iGRs HbAA par les plasmas des mères HbAA a été comparé à celui des GRs HbAS infectés par les plasmas des mères HbAS (C).

Nous avons aussi pu comparer, pour un même plasma, son taux de liaison à un iGR HbAA et à un iGR HbAS.

Il était aussi initialement planifié de tester la capacité d'inhibition de cytoadhérence des iGRs HbAA et HbAS à la CSA par les plasmas des femmes HbAA et HbAS. Toutefois, nous n'avons pas pu réaliser ces expériences avec des iGRs HbAS, et donc répondre totalement aux objectifs initialement prévus. En effet, les iGRs HbAS présentent une importante réduction de cytoadhérence à la CSA<sup>226,258</sup>. De plus, nous ne disposons pas de volume de sang HbAS suffisant pour obtenir le nombre nécessaire d'iGRs pour réaliser ces expériences.

Enfin, nous nous sommes intéressés au taux de liaison de VAR2CSA, par la détermination des taux d'anticorps anti-VAR2CSA présents dans les plasmas des femmes de la cohorte STOPPAM, préalablement mesurés dans une étude précédente par la technique « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » (ELISA)<sup>101</sup>.

### 3.2. Matériels et méthodes

#### 3.2.1. Réalisation de la sous-cohorte STOPPAM

Les échantillons utilisés dans cette étude proviennent de la cohorte STOPPAM. Brièvement, le projet STOPPAM a suivi 1037 femmes chaque mois lors de leur grossesse, depuis leur première consultation prénatale (déterminant l'inclusion dans l'étude) jusqu'à l'accouchement. Cette étude a été réalisée au Bénin et en Tanzanie entre 2008 et 2011<sup>104</sup>. Pour ce projet, nous avons utilisé, pour chaque femme, le plasma extrait du sang veineux périphérique collecté à l'accouchement, l'ADN (extrait des cellules mononucléées ou « Peripheral Blood Mononuclear Cells » (PBMC) après décongélation, avec le kit « Blood and Body Fluid Spin Protocol » (*Quiagen*) ou de sang séché par la méthode Chelex) et les gouttes épaisses/frottis sanguins réalisés à l'accouchement.

Nous avons inclus tous les échantillons provenant des femmes HbAS pour lesquels la quantité de plasma disponible était suffisante, afin de réaliser une étude cas-témoins. Nous disposions au total de 159 plasmas. Les femmes HbAS ont été considérées comme les « cas » (n = 52) et les femmes HbAA les « témoins » (n = 107) (1 cas pour 2 témoins). La sélection des femmes a été ajustée en fonction de la gestité (34 femmes primigestes, 25 secondigestes, 100 multigestes), et de l'infection par *P. falciparum* à l'accouchement (basée sur l'examen des gouttes épaisses/frottis sanguins à l'accouchement) (26 femmes infectées and 133 non-infectées) (Tableau 4). En effet, ces deux paramètres ont été décrits comme étant associés positivement à la quantité d'anticorps anti-VAR2CSA<sup>101</sup>.

	Témoïn / Cas	
	HbAA n = 107	HbAS n = 52
<b>Gestité</b>		
<i>Primigeste</i>	23	11
<i>Secondigeste</i>	17	8
<i>Multigeste</i>	67	33
<b>Infection par <i>P. falciparum</i></b>		
<i>Oui</i>	18	8
<i>Non</i>	89	44

Tableau 4. **Caractéristiques des femmes de la cohorte STOPPAM incluses dans l'étude.** Les femmes « cas » sont les femmes HbAS, et les « témoins » sont HbAA. La sélection des femmes a été ajustée en fonction de la gestité et de l'infection par *P. falciparum* à l'accouchement.

### 3.2.2. Vérification du génotype d'hémoglobine par PCR-RFLP

Le génotype HbAS du donneur dont les GRs ont été utilisés dans ce projet a aussi été vérifié par PCR-RFLP. L'ADN a été extrait à partir de la couche leucocytaire après centrifugation du sang et utilisation du kit « Blood and Body Fluid Spin Protocol » (*Quiagen*).

La mutation du 6<sup>ème</sup> codon du gène de la  $\beta$ -globine mène à la formation d'Hbs anormales. La mutation a>t (deuxième base du codon) mène à la production d'HbS et la mutation g>a (première base du même codon) cause celle d'HbC<sup>317</sup> (Figure 40). Les mutations HbS et HbC ont été recherchées par PCR-RFLP, adapté d'une méthode de Badaut *et al.*<sup>318</sup>. Le fragment contenant les potentielles mutations de la  $\beta$ -globine (369 paires de bases (pb)) a premièrement été amplifié par PCR avec les amorces suivantes (*Integrated DNA Technologies (IDT)*) :

HbS/C<sub>F</sub>: 5'-AGTCAGGGCAGAGCCATCTA-3'

HbS/C<sub>R</sub>: 5'-CAGCATCAGGAGTGGACAGA-3'.

Le milieu réactionnel a été préparé comme décrit dans le Tableau 5.

Réactifs de PCR	Concentration finale	Volume ajouté (µL)
Tampon de PCR 5X ( <i>Promega</i> )	1X	5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM ( <i>Promega</i> )	1 mM	1
Amorce HbS/C <sub>F</sub> , 10 µM ( <i>IDT</i> )	0,4 µM	1
Amorce HbS/C <sub>R</sub> , 10 µM ( <i>IDT</i> )	0,4 µM	1
dNTP (2,5 mM chacun) ( <i>Applied Biosystem</i> )	0,2 mM	1.6
GoFlexiTaq Polymérase (5U/µL) ( <i>Promega</i> )	0.65U/échantillon	0,13
ADN	5 ng/µL	
Eau « DNase/RNase free » ( <i>Gibco</i> )		qsp 25 µL final

Tableau 5. **Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification du fragment de 369 pb du gène codant la  $\beta$ -globine.** Méthode adaptée de Badaut *et al.*<sup>318</sup>, et selon les caractéristiques de la Taq Polymérase (GoTaq Flexi, *Promega*).

Les conditions d'amplification ont été les suivantes : dénaturation pendant 5 minutes à 94°C, puis, sur 35 cycles : dénaturation pendant 30 secondes à 94°C, hybridation pendant 30 secondes à 55°C puis élongation pendant 30 secondes à 72°C, et enfin élongation finale de 10 minutes à 72°C. L'ADN amplifié a été visualisé après dépôt et migration à 100 V dans un gel d'agarose 2% en Tris Borate EDTA (TBE) 0,5X, auquel 5 µL de GelRed<sup>TM</sup> (*Finnzymes*) ont été préalablement incorporés, après exposition aux Ultra-Violets (UV).

Le fragment amplifié a été ensuite digéré pendant 2h à 37°C par les enzymes de restriction *Dde* I et *Bse* RI respectivement (*New England Biolabs (NEB)*). Les milieux réactionnels ont été préparés comme présenté dans le Tableau 6.

Réactifs	Digestion par <i>Dde</i> I	Digestion par <i>Bse</i> RI
Tampon 10 X( <i>NEB</i> )	Tampon NEB3 1X (1,3 µL)	Tampon NEB2 1X (1,5 µL)
Enzyme ( <i>NEB</i> )	<i>Dde</i> I 5U (0,5 µL)	<i>Bse</i> RI 5U (1,2 µL)
Produit de PCR	6,2 µL par échantillon	6 µL par échantillon
Eau « DNase/RNase free » ( <i>Gibco</i> )	Qsp 13 µL final (5 µL)	Qsp 15 µL final (6,3 µL)

Tableau 6. Composition des milieux réactionnels pour la digestion enzymatique des fragments préalablement amplifiés par PCR par *Dde* I et *Bse* RI.

Les fragments digérés ont été séparés dans un gel d'agarose 2%. La digestion par *Dde* I et *Bse* RI permet d'obtenir des fragments d'ADN de tailles différentes selon les mutations portées. Le premier site de digestion de *Dde* I est aboli si le gène porte la mutation HbS, et celui de *Bse* RI est aboli par la présence de la mutation HbC (Figure 41). Il a ainsi été possible d'identifier le génotype d'Hb selon la taille des bandes obtenues (Tableau 7).

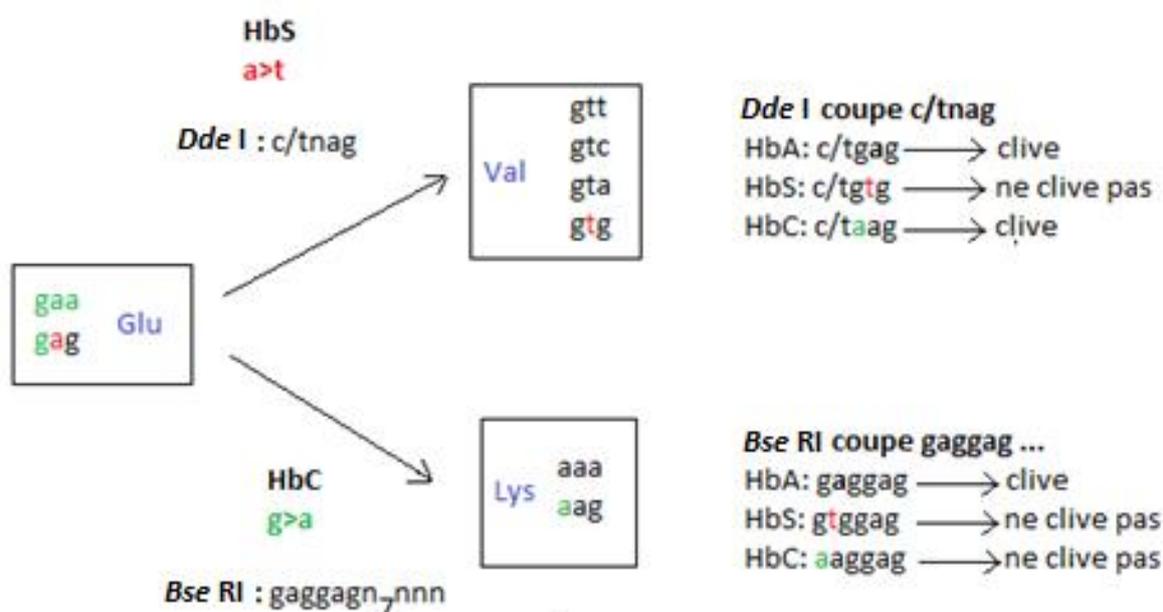


Figure 41. Sites de coupure des enzymes *Dde* I et *Bse* RI au sein du fragment du gène de la  $\beta$ -globine et activité des enzymes en fonction des mutations portées. Deux sites de clivage de *Dde* I sont présents dans le gène de la  $\beta$ -globine, le premier est aboli par la mutation HbS. Le site de coupure de *Bse* RI est aboli par la mutation HbC.

Génotype	Taille des fragments (pb) après digestion par Dde I	Taille des fragments (pb) après digestion par Bse RI
HbAA	201 + 93 + 75	259 + 110
HbAS	294 + 201 + 93 + 75	369 + 259 + 110
HbSS	294 + 75	369
HbAC	201 + 93 + 75	369 + 259 + 110
HbSC	294 + 201 + 93 + 75	369
HbCC	201 + 93 + 75	369

Tableau 7. **Taille des fragments obtenus après digestion enzymatique par Dde I et Bse RI selon les mutations portées.** La mutation HbS abolit le premier site de coupure de Dde I et la mutation HbC abolit le site de coupure de Bse RI. La lecture des profils de tailles des fragments obtenus après digestion permet de déterminer le génotype du donneur selon les mutations identifiées.

### 3.2.3. Détermination du génotype G6PD par PCR-RFLP

Les variants G6PD A and A<sup>-</sup> ont été détectés par PCR-RFLP, par une méthode adaptée de Carter *et al.*<sup>316</sup>. Le variant G6PD A, résultant de la présence de la mutation A376G, a tout d'abord été recherché. Pour cela, un fragment de 585 pb du gène *g6pd* a été amplifié par PCR. Les amorces suivantes ont été utilisées (IDT) :

G6PD<sub>3F</sub> : 5'-CTGCGTTTTCTCCGCCAATC-3'

G6PD<sub>2R</sub> : 5'-AGGGCAACGGCAAGCCTTAC-3'.

Le milieu réactionnel a été préparé comme décrit dans le Tableau 8.

Réactifs de PCR	Concentration finale	Volume ajouté (µL)
Tampon de PCR 5X ( <i>Promega</i> )	1X	5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM ( <i>Promega</i> )	1 mM	1
Amorce G6PD <sub>3F</sub> , 10 µM (IDT)	0,4 µM	1
Amorce G6PD <sub>2R</sub> , 10 µM (IDT)	0,4 µM	1
dNTP (2,5 mM chacun) ( <i>Applied Biosystem</i> )	0,2 mM	1,6
GoFlexiTaq Polymérase (5U/µL) ( <i>Promega</i> )	0,65U/échantillon	0,13
ADN	5 ng/µL	
Eau « DNase/RNase free » ( <i>Gibco</i> )		qsp 25 µL final

Tableau 8. **Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification du fragment de 585 pb du gène codant l'enzyme G6PD.** Méthode adaptée de Carter *et al.*<sup>316</sup>, et selon les caractéristiques de la Taq Polymérase (GoTaq Flexi, *Promega*).

Les conditions d'amplification ont été les suivantes : dénaturation pendant 5 minutes à 94°C, puis, sur 35 cycles : dénaturation pendant 30 secondes à 94°C, hybridation pendant 30

secondes à 59°C puis élongation pendant 36 secondes à 72°C, et enfin élongation finale de 10 minutes à 72°C. L'ADN amplifié a été visualisé après migration dans un gel d'agarose 1,5%.

Le fragment amplifié a ensuite été digéré par *Fok I* (*NEB*) pendant 2h à 37°C. Le milieu réactionnel a été préparé comme présenté dans le Tableau 9.

Réactifs	Concentration finale et volume ajouté (µL)
Tampon Cutsmart10 X ( <i>NEB</i> )	1X (2 µL)
Enzyme Fok I 5000U/ml ( <i>NEB</i> )	5U (1 µL)
Produit de PCR	12 µL par échantillon
Eau « DNase/RNase free » ( <i>Gibco</i> )	Qsp 20 µL final (5 µL)

Tableau 9. Composition du milieu réactionnel pour la digestion enzymatique par *Fok I* du fragment du gène *g6pd* préalablement amplifiés par PCR.

Les fragments d'ADN ont ensuite été visualisés après migration dans un gel d'agarose 2%. La digestion par *Fok I* permet d'obtenir des fragments d'ADN de tailles différentes selon la présence de la mutation A376G. Un site de reconnaissance de *Fok I* est initialement présent, et la mutation A376G en engendre un deuxième (Figure 42). Selon la taille des fragments obtenue après digestion enzymatique, la présence du variant G6PD A a pu être détectée (Tableau 10).

```

5'ctgcgttttctccgccaatcatagttgggtgcatgattttggagagagagctttctccagtgtatttctccagggtcaaaata
tctgaaatctggcctctgtcctaaggcacaggggtcccagcctggggcagtgtctgtgctgcttggcctccctcctct
GGATGtgcagagct(183pb)/gctaagatggggctgaaccagtggtgggacggggacactgacttctgagggcacc
tcctggacctccaggaagacctccctccctggggcagaacacacacggactcaagagaggggctgacatctgtct
gtgtgtctgtctgctgctctccagggcaccagaggagaagctcaagctggaggacttcttggcccgaactcctatgtg
gctggccagtagcatgatgcagcctctaccagcgcctcaacagccacatA/GGATGccctccacc(285pb)/tgggg
tcacaggccaaccgctcttctacctggccttgcctccgacctctacaggccgtcaccagaacattcagagtcctgcat
gagccagatgtaaggcttgccttgcct3'(117pb)

```

Figure 42. Sites de coupure de l'enzyme *Fok I* au sein du fragment amplifié du gène *g6pd* en fonction de la présence de la mutation A376G. En violet sont représentés les sites de reconnaissance de l'enzyme *Fok I*, qui clive la séquence d'acide nucléique 9 bases plus loin. Un site de reconnaissance de *Fok I* est initialement présent dans le fragment de 585 pb. La mutation a>g entraîne la création d'un deuxième site de reconnaissance de *Fok I*.

Sexe	Génotype	Phénotype	Taille des fragments (pb) après digestion par <i>Fok I</i>
Homme	G6PD B	Hémizygote	402 + 183
	G6PD A	Hémizygote muté	285 + 183 + 117
Femme	G6PD BB	Homozygote	402 + 183
	G6PD AB	Hétérozygote mutée	402 + 285 + 183 + 117
	G6PD AA	Homozygote muté	285 + 183 + 117

Tableau 10. Taille des fragments obtenus après digestion enzymatique par *Fok I* selon le génotype G6PD. Un site de reconnaissance de *Fok I* est initialement présent au sein du fragment amplifié. La digestion d'un fragment de génotype G6PD B donnera donc deux fragments. La présence de la mutation A376G engendre l'apparition d'un deuxième site de reconnaissance. Trois fragments seront donc visualisés après digestion enzymatique. Le gène *g6pd* est présent sur le chromosome X. Les hommes sont donc hémizygotés pour ce gène.

Lorsque le variant G6PD A a été identifié, deux autres PCRs ont été réalisées afin de rechercher les potentielles mutations associées, G202A et T968C, à l'origine du variant G6PD A<sup>-</sup>. Les milieux réactionnels étaient les mêmes que celui utilisé pour la mutation G6PD-A376G. Les amorces suivantes ont été utilisées pour détecter la mutation G202A (*IDT*) :

G6PD-G202A<sub>F</sub> : 5'-CCACCACTGCCCCTGTGACCT-3'

G6PD-G202A<sub>R</sub> : 5'-GGCGACACCACCCACCTT-3'.

Pour la mutation T968C, les amorces suivantes ont été utilisées (*IDT*) :

G6PD-T968C<sub>F</sub> : 5'-TCCCTGCACCCCAACTCAAC-3'

G6PD-T968C<sub>R</sub> : 5'-CCAGTTCTGCCTTGCTGGGC-3'.

Les conditions d'amplification étaient similaires à celles utilisées pour la détection de la mutation A376G, à l'exception de la température d'hybridation, qui était de 64°C pour la mutation G202A et de 60°C pour la mutation T968C. Les fragments amplifiés ont été séparés dans un gel d'agarose 1,5%. Le fragment contenant la mutation G202A mesurait 211 pb, et celui comprenant la mutation T968C 283 pb. Ces fragments ont été digérés pendant 2h30 à 37°C par *Nla III* and *Nci I* (*NEB*) (respectivement pour les mutations G202A et T968C) dans un volume total de 25 µl contenant le tampon CutSmart 1X (*NEB*), 5 U d'enzyme par échantillon, et 20 µl de produits de PCR. Les fragments digérés ont été visualisés après migration dans un gel d'agarose 2%. La présence des mutations G202A et T968C engendre un site de coupure pour les enzymes *Nla III* et *Nci I*, respectivement, qui clivent alors les fragments amplifiés en deux. Les mutations G202A et T968C ont été détectées par lecture des profils obtenus après digestion enzymatique (Tableau 11).

Sexe	Génotype	Taille des fragments (pb) après digestion par <i>Nla</i> III	Taille des fragments (pb) après digestion par <i>Nci</i> I
Homme	G6PD A ou B	211	283
	G6PD A <sup>-</sup>	130 + 81	161 + 122
Femme	G6PD BB, AB ou AA	211	283
	G6PD A <sup>-</sup> X	211 + 130 + 81	283 + 161 + 122
	G6PD A <sup>-</sup> A <sup>-</sup>	130 + 81	161 + 122

Tableau 11. Taille des fragments obtenus après digestion par *Nla* III ou *Nci* I selon la présence des mutations G202A ou T968C. Respectivement, les mutations G202A et T968C engendrent un site de coupure pour *Nla* III et *Nci* I. En absence de mutation, ces enzymes ne sont pas actives.

### 3.2.4. Caractérisation du génotype alpha-thalassémie par PCR multiplexe

La délétion  $\alpha^{-3,7}$  a été déterminée par PCR multiplexe, selon une méthode adaptée de Liu *et al.*<sup>319</sup>. Les amorces utilisées étaient les suivantes (IDT) :

$\alpha$ -thal 3,7<sub>F</sub>: 5'-AAGTCCACCCCTTCCTTCCTCACC-3'

$\alpha$ -thal 3,7<sub>R1</sub>: 5'-ATGAGAGAAATGTTCTGGCACCTGCACTTG-3'

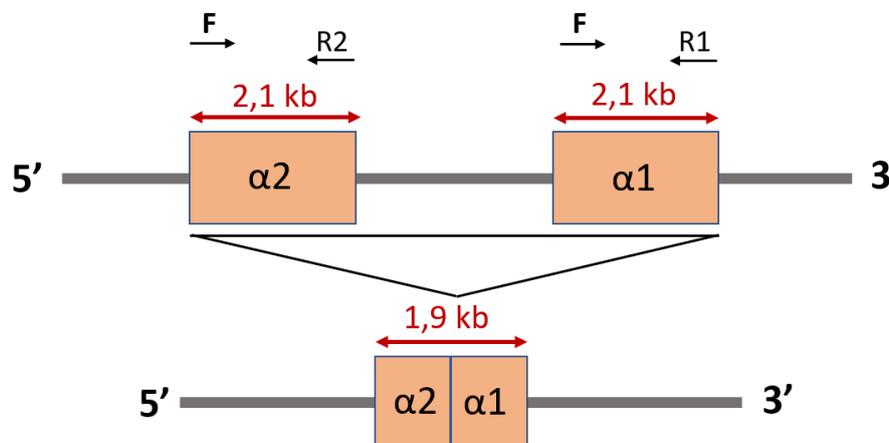
$\alpha$ -thal 3,7<sub>R2</sub>: 5'-TCCATCCCCTCCTCCCGCCCCTGCCTTTTC-3'

Le milieu réactionnel est préparé comme décrit dans le Tableau 12.

Réactifs de PCR	Concentration finale	Volume ajouté ( $\mu$ L)
Tampon de PCR 5X ( <i>Promega</i> )	1X	5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM ( <i>Promega</i> )	2 mM	2
Amorce $\alpha$ -thal 3,7 <sub>F</sub> , 10 $\mu$ M (IDT)	0,8 $\mu$ M	2
Amorce $\alpha$ -thal 3,7 <sub>R1</sub> , 10 $\mu$ M (IDT)	0,3 $\mu$ M	0,75
Amorce $\alpha$ -thal 3,7 <sub>R2</sub> , 10 $\mu$ M (IDT)	0,3 $\mu$ M	0,75
dNTP (2,5 mM chacun) ( <i>Applied Biosystem</i> )	0,2 mM	2
Bétaïne 5M ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	0,75 M	3,75
DMSO 100% ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	5%	1,25
GoFlexiTaq Polymérase (5U/ $\mu$ L) ( <i>Promega</i> )	1,25U/échantillon	0,25
ADN	5 ng/ $\mu$ L	
Eau « DNase/RNase free » ( <i>Gibco</i> )		qsp 25 $\mu$ L final

Tableau 12. Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  codant l' $\alpha$ -globine. Méthode adaptée de Liu *et al.*<sup>319</sup>, et selon les caractéristiques de la Taq Polymérase (GoTaq Flexi, *Promega*).

Les conditions d'amplification ont été les suivantes : dénaturation pendant 5 minutes à 94°C, puis, sur 40 cycles : dénaturation pendant 30 secondes à 94°C, hybridation pendant 30 secondes à 60°C puis élongation pendant 2 minutes 30 secondes à 72°C, et enfin élongation finale de 10 minutes à 72°C. L'ADN amplifié est visualisé dans un gel d'agarose 1,5%. Les gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  ont une forte homologie de séquence. L'amorce  $\alpha$ -thal 3,7<sub>F</sub> s'hybride avec les séquences des deux gènes. L'amorce  $\alpha$ -thal 3,7<sub>R1</sub> s'hybride avec la séquence du gène  $\alpha 1$  alors que l'amorce  $\alpha$ -thal 3,7<sub>R2</sub> s'hybride avec celle du gène  $\alpha 2$ . La taille des fragments des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  amplifiés est ainsi la même : 2,1 kb. Le fragment amplifié du gène hybride  $\alpha 1/\alpha 2$  mesure quant à lui 1,9 kb. La délétion  $\alpha^{-3,7}$  peut donc être déterminée selon la taille des fragments amplifiés (Figure 43).



Génotype	Phénotype	Taille des fragments (kb)
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Homozygote	2,1
$\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$	Hétérozygote muté	1,9 + 2,1
$\alpha^{-3,7}/\alpha^{-3,7}$	Homozygote muté	1,9

Figure 43. **Représentation des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et du gène hybride  $\alpha 1/\alpha 2$  et taille des fragments amplifiés en fonction du génotype.** La délétion de 3,7 kb entraîne la formation d'un gène hybride. Les fragments des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  amplifiés mesurent tous les deux 2,1 kb, alors que la taille du fragment du gène hybride  $\alpha 1/\alpha 2$  amplifié est de 1,9 kb.

### 3.2.5. Culture parasitaire de *P. falciparum*

#### 3.2.5.1. Obtention de sang de porteurs d'hémoglobine anormale

En collaboration avec le service de « Biothérapies » du Dr. Jean-Antoine Ribeil et avec l'aide du Dr. Sandra Manceau (Attachée de Recherche Clinique) à l'hôpital Necker-Enfants Malades, des volontaires, porteurs d'Hb anormale (HbAS), ont donné leur sang après avoir pris connaissance du projet et signé un consentement.

### 3.2.5.2. Conditions de culture de *P. falciparum*

La souche FCR3 de *P. falciparum* a été préalablement sélectionnée pour son phénotype d'adhérence à la CSA et donc pour l'expression de VAR2CSA<sup>320</sup>. Les parasites ont été cultivés selon les protocoles de « Methods in Malaria Research », adaptés ([https://www.beiresources.org/portals/2/MR4/Methods\\_In\\_Malaria\\_Research-6th\\_edition.pdf](https://www.beiresources.org/portals/2/MR4/Methods_In_Malaria_Research-6th_edition.pdf))<sup>321</sup> de Trager et Jensen; en milieu RPAS (milieu « Roswell Park Memorial Institute » (RPMI)-Albumax-Sérum) (RPMI 1640 (*Gibco*) supplémenté avec 25 mM d'acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique (HEPES) (*Gibco*), 2 mM de L-glutamine (*Gibco*), 0.05 mg/ml de gentamicine (*Gibco*), 2% de sérum humain AB et 0.5% d'albumax (*Gibco*)). Les GRs HbAA et HbAS utilisés étaient tous de groupe O. L'hématocrite (volume de GRs par rapport au volume total de culture) a été ajusté à 5%. Les cultures ont été gazées pour reproduire les conditions des capillaires sanguins profonds (5% O<sub>2</sub>, 5,5% CO<sub>2</sub>, 89,5% N<sub>2</sub>)<sup>270</sup> et placées en étuve à 37°C.

### 3.2.5.3. Evaluation de la parasitémie des cultures parasitaires

Le suivi des cultures parasitaires a été réalisé par mesure de leur parasitémie (pourcentage de GR parasités). Pour cela, des frottis sanguins, fixés au méthanol et colorés au Diff-Quick (*Medion Diagnostics*), ont été observés au microscope optique à l'objectif 100x à immersion. La lecture des frottis a permis de déterminer le pourcentage d'iGRs et les formes parasitaires.

### 3.2.5.4. Synchronisation des cultures par sorbitol

Avant d'infecter les GRs HbAS, les cultures ont été synchronisées par traitement au D-sorbitol 5%. Ce sucre provoque la lyse des formes matures, et permet de conserver seulement les GRs parasités par des jeunes trophozoïtes au stade ring.

### 3.2.5.5. Infection des globules rouges HbAS - Synchronisation par MACS

Afin d'infecter les érythrocytes HbAS, une culture de GRs HbAA parasités a été synchronisée par « Magnetic-Activated Cell Sorting » (MACS) (*Miltenyi Biotec*). Les cultures ont été déposées sur une colonne de paille de fer contenue dans un aimant, permettant de retenir, grâce au champ magnétique, les hématies parasitées par des formes matures produisant l'hémozoïne. Après lavage, la colonne a été retirée de l'aimant afin d'éluer les iGRs retenus. Après centrifugation à 1800 rpm pendant 5 minutes à température ambiante (TA), les GRs (infectés à 95%) ont été mis en culture en milieu RPAS avec des GR HbAS.

Ainsi, lorsque les formes matures, isolées par cette technique, ont atteint la fin de leur cycle érythrocytaire, seuls les GRs HbAS ont été infectés par les mérozoïtes nouvellement produits.

### 3.2.6. Mesure du taux de liaison des plasmas à la surface des érythrocytes infectés par cytométrie en flux

Le taux de liaison des iGRs par les plasmas a été mesuré grâce à une méthode adaptée de Tuikue Ndam *et al.*<sup>322</sup>. Les iGRs HbAA et HbAS ont été récoltés par MACS et resuspendus dans du « Phosphate Buffered Saline » (PBS) (*Gibco*)-1% Sérum Albumine Bovine (ou « Bovine Sérum Albumine » (BSA)) (*Roche Diagnostics*). Chaque puits d'une plaque 96 puits a reçu 500 000 iGRs. Après centrifugation (2 minutes à 300g à TA), les iGRs ont été resuspendus avec les plasmas des femmes de notre cohorte (dilués au 1/50<sup>ème</sup> dans du PBS-1% BSA) et mélangés à 1000 rpm pendant 30 secondes. Après 1h d'incubation à TA, les iGRs ont été lavés deux fois avec du PBS-1% BSA. Ensuite, un anticorps anti-IgG humaine couplé à la phyco-érythrine (PE) (*Jackson ImmunoResearch (Interchim)*) (dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du PBS-1% BSA) a été ajouté et mélangé avec les iGRs à 1000 rpm pendant 30 secondes. Après 1h d'incubation à TA et 3 lavages avec du PBS-1% BSA, les iGRs ont été fixés dans du PBS-2% ParaFormaldéhyde (PFA) à l'obscurité à 4°C pendant la nuit. Le jour suivant, les iGRs ont été lavés 2 fois avec du PBS-1% BSA et resuspendus avec du TO-PRO-3 (*ThermoFisher Scientific*) (dilution au 1/10 000<sup>ème</sup> dans du PBS), marqueur d'ADN, juste avant passage en cytométrie en flux (FACS Canto II BD). Parmi les cellules positives pour le marquage au TO-PRO-3 (correspondant aux iGRs), les moyennes d'intensité de fluorescence (ou « Mean Fluorescence Intensity » (MFI)) de la PE, représentant le niveau de fixation des IgG des plasmas à la surface des iGRs, ont été extraites grâce au logiciel « FlowJo ». Toutes les valeurs ont été divisées par la valeur obtenue avec un mélange de plasmas provenant de femmes Européennes enceintes jamais infectées par *P. falciparum* (MFI<sub>0</sub>), afin de normaliser les données entre les différentes plaques.

### 3.2.7. Mesure de l'inhibition de cytoadhérence par des plasmas

Des tests d'inhibition de cytoadhérence ont également été réalisés. Ces tests ont seulement été réalisés avec des iGRs HbAA. L'inhibition de cytoadhérence a été mesurée grâce à une méthode adaptée d'Hempel *et al.*<sup>323</sup>. Des plaques 96 puits ont été adsorbées pendant la nuit à 4°C avec du PBS-1% BSA contenant 1 mg/ml de CSA. Le lendemain, après deux lavages avec du PBS, les plaques ont été saturées avec du PBS-1% BSA pendant 1h à TA. Les iGRs HbAAs ont été récoltés par MACS (*Miltenyi Biotec*) et ont été mis en présence

des plasmas des mères de notre cohorte (dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans du RPMI-2% Sérum de Veau Fœtal (SVF)) pendant 1h à 37°C. Puis 500 000 iGRs ont été ajoutés dans chaque puits des plaques préalablement saturées. Après 1h d'incubation à 37°C, les iGRs non-adhérents ont été éliminés par 2 lavages au PBS (le premier lavage a été réalisé après mélange des plaques pendant 3 secondes à 1000 rpm). Une solution de 3,3',5,5'-TétraMéthylBenzidine (TMB) a ensuite été ajoutée, et les Densités Optiques (DOs) ont été mesurées à 650 nm après mélange des plaques à 1000 rpm pendant 30 secondes. Afin de normaliser les données entre les plaques, toutes les valeurs de DO ont été divisées par la valeur obtenue avec un mélange de plasmas provenant de femmes enceintes qui n'ont jamais souffert de paludisme.

### 3.2.8. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le Dr. Gilles Cottrell et Jacqueline Milet de l'UMR261. Nous avons défini deux groupes pour les génotypes G6PD en fonction du portage du variant associé à l'expression phénotypique du déficit enzymatique. Ainsi, les femmes ont été séparées en deux groupes, le premier, « variant G6PD A<sup>-</sup> », comprenant les femmes G6PD A<sup>B</sup>, A<sup>-</sup>A et A<sup>-</sup>A<sup>-</sup>, et le deuxième groupe, « pas de variant G6PD A<sup>-</sup> », incluant les femmes G6PD BB, AB et AA. Pour l' $\alpha$ -thalassémie, nous avons aussi scindé les femmes en deux groupes selon la présence de la délétion  $\alpha^{-3,7}$ . Nous avons donc considéré un groupe « délétion  $\alpha^{-3,7}$  » comprenant les femmes portant la délétion  $\alpha^{-3,7}$  de manière hétérozygote ( $\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$ ) ou homozygote ( $\alpha^{-3,7}/\alpha^{-3,7}$ ) et un groupe « pas de délétion  $\alpha^{-3,7}$  » incluant les femmes avec des gènes  $\alpha$  normaux ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ). Un test de « chi-deux » ( $\chi^2$ ) a été effectué pour comparer les proportions de portage du variant G6PD A<sup>-</sup> et de la délétion  $\alpha^{-3,7}$  parmi les femmes HbAA et HbAS. Un test exact de Fisher a été réalisé pour analyser les associations entre le portage d'HbS, du variant G6PD A<sup>-</sup> et de la délétion  $\alpha^{-3,7}$ . L'association entre le taux de liaison des iGRs ou la cytoadhérence (variables quantitatives) et les différentes variables explicatives : portage d'HbS vs. HbA (variable binaire), du variant G6PD A<sup>-</sup> ou non (variable binaire), et de la délétion  $\alpha^{-3,7}$  ou non (variable binaire), a été réalisé grâce à un modèle de régression linéaire multivariée. Les analyses ont été ajustées pour la gestité et l'infection à *P. falciparum* à l'accouchement. Une méthode de variance robuste a été utilisée pour déterminer les intervalles de confiance et les *p*-values des coefficients de régression. Un test de Wilcoxon apparié a été réalisé afin de comparer le taux de liaison, pour un même plasma, de la surface de iGRs HbAA et HbAS. L'ensemble des analyses a été conduit avec le logiciel STATA (version 13.1) (STATA Corporation).

### 3.3. Article

Impact of hemoglobin S trait on cell surface antibody recognition of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in pregnancy-associated malaria

Margaux Chauvet <sup>#1, 2</sup>, Marilou Tétard <sup>#3</sup>, Gilles Cottrell <sup>1,4</sup>, Florentin Aussenac <sup>4</sup>, Emeline Brossier <sup>1</sup>, Luc Denoyel <sup>1</sup>, Marion Hanny <sup>1</sup>, Murielle Lohezic <sup>1, 2</sup>, Jacqueline Milet <sup>1</sup>, Nicaise Tuikue Ndam <sup>1,2, 5</sup>, Damien Pineau <sup>1</sup>, Jocelyne Roman <sup>1</sup>, Adrian J. F. Luty <sup>1,2, 4</sup>, Benoît Gamain <sup>3</sup>, Florence Migot-Nabias <sup>#1,2</sup>, Anaïs Merckx <sup>#1,2</sup>.

#### **Affiliations**

<sup>1</sup> MERIT, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.;

<sup>2</sup> Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, 75006, France

<sup>3</sup> UMR\_S1134, Université Sorbonne Paris Cité, Université Paris Diderot, Inserm, INTS, Unité Biologie Intégrée du Globule Rouge, Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France

<sup>4</sup> Centre d'Etude et de Recherche pour le Paludisme associé à la Grossesse et à l'Enfance, Faculté des Sciences de Santé, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin ;

<sup>5</sup> Department of Parasitology, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, College of Health Sciences, University of Ghana, P. O. Box LG 581, Legon, Ghana.

Correspondence: Anaïs Merckx, UMR216 MERIT, IRD - Université Paris Descartes, [anais.merckx@parisdescartes.fr](mailto:anais.merckx@parisdescartes.fr).

Running Title : HbS and anti-Var2CSA antibodies binding

<sup>#</sup>contributed equally.

The authors declare no competing financial interests.

This work was supported by the Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France, reference ANR-11-LABX-0051, that is funded by the program Investissements d'avenir of the French National Research Agency, reference ANR-11-IDEX-0005-02.

Presented in part: 29<sup>th</sup> Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, USA, September 2018.

Word count of the abstract: 178

Word count of the text: 3465

## Abstract

Sickle-cell trait (HbAS) confers partial protection against malaria by reducing the adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to host receptors, but little is known about its potential protection against placental malaria. Using flow cytometry we assessed the recognition of HbAA and HbAS VAR2CSA-expressing infected erythrocytes, by plasma from 159 Beninese pregnant women with either HbAA (normal) or HbAS. Using multivariate linear models adjusted for gravidity, parasite infection at delivery, G6PD-deficiency and  $\alpha$ -thalassemia carriage, we observed significantly reduced cell surface antibody binding of HbAS infected erythrocytes by plasma from HbAS compared to HbAA women ( $p < 10^{-3}$ ). The difference in cell surface antibody binding was only observed when infected erythrocytes and plasma were associated according to the same hemoglobin genotype. Similar levels of VAR2CSA-specific antibody were measured by ELISA in the two groups, suggesting that the altered interaction between VAR2CSA and HbAS women's antibodies could reflect abnormal display of VAR2CSA on HbAS erythrocytes. Our data stress the need for assessments of erythrocyte disorders such as the sickle cell trait in a population group when studying immunological responses to *P. falciparum*.

Key words: Pregnancy-associated malaria, hemoglobin S, VAR2CSA, cell surface antibody binding.

## Background

Each year, in sub-Saharan Africa, more than 30 million women are exposed to the risk of developing pregnancy-associated malaria (PAM) [1]. PAM is a major cause of maternal and fetal anemia, fetal growth restriction, preterm birth and low birth weight (LBW) [2]. PAM is caused by the adhesion and the sequestration of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells (iRBCs) in placental intervillous spaces [3]. Adhesion of iRBCs in the placenta is mediated by a single *var* gene, VAR2CSA [4–6], the PfEMP1 variant that interacts with chondroitin sulfate A (CSA) on syncytiotrophoblasts [7,8].

Primigravid women are the most susceptible to PAM because they lack specific protective immunity. Indeed, previous studies have shown that the level of VAR2CSA-specific antibodies increases with gravidity [9–11], and that the presence of these antibodies in the placenta is related to better pregnancy outcomes [12,13]. These antibodies inhibit the binding of iRBCs to CSA [14]. Women with higher plasma binding inhibition ability at delivery are less susceptible to PAM and to give birth to a LBW baby [11]. The genetic background of mothers may have an impact on the ability of surface-expressed VAR2CSA to mediate interaction with endothelial receptors.

Hemoglobin (Hb) S, responsible for sickle cell disease, results from a genetic mutation (Glu6Val) (rs334) at the sixth position within the  $\beta$ -globin chain (*HBB*, chromosome 11) of normal Hb (HbA) [15]. HbS is highly prevalent in human populations living in malaria endemic areas. The highest frequencies of HbS are observed in sub-Saharan Africa, the Middle East, and India, up to 18% [16], because of the protection afforded by HbS heterozygous carriage (HbAS, sickle cell trait) against severe *P. falciparum* malaria-related symptoms and death, without serious hematological disadvantage [16]. HbAS is indeed associated with a 90% reduced risk of severe malaria [17].

It has been shown that HbAS iRBCs display lower amounts of VAR2CSA which are aberrantly presented as they are anchored in enlarged and dispersed knobs, correlating with reduced cytoadherence capacity to CSA [18,19]. However little is known about the potential protection of HbS against PAM. Some studies have reported that there was no significant interaction between sickle cell trait and *P. falciparum* infection during pregnancy [20,21].

Other red blood cell (RBC) disorders, such as glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and  $\alpha$ -thalassemia, coexist in populations affected by *P. falciparum* malaria and by abnormal Hb, and they also confer protection against malaria [22,23]. G6PD deficiency results from different mutations in the *G6PD* gene [24]. Normal G6PD activity is ensured by the G6PD B enzyme proteoform. An A376G mutation (rs1050829) is responsible for the G6PD A variant, associated with a minimal loss in enzyme activity (about 85% of residual activity) [25]. An additional mutation (mainly G202A or T968C in sub-Saharan populations) is responsible for the G6PD A<sup>-</sup> variant associated with enzyme deficiency (between 5 and 10% of residual activity in homo- or hemizygotes) [26]. Alpha-thalassemia results from one or several deletions of the alpha gene(s) (*HBA1* and *HBA2*) located in the  $\alpha$ -globin cluster on chromosome 16 [27]. The most common deletion encountered in sub-Saharan Africa is a deletion of 3.7 Kb ( $\alpha$ <sup>-3.7</sup> deletion) resulting in an  $\alpha$ 1-2 globin hybrid gene and an  $\alpha$ -globin synthesis defect [28]. The heterozygous carriage of this deletion ( $\alpha$ <sup>-3.7</sup> thalassemia trait) is not

or only slightly symptomatic but homozygous deletion can cause hematological alterations or be lethal.

In order to analyze the influence of HbS heterozygous carriage in the cell surface antibody binding during pregnancy, we assessed the ability of Beninese pregnant women's plasma to recognize HbAS and HbAA VAR2CSA-expressing iRBCs. With HbAA iRBCs, the cell surface antibody binding did not change according to maternal HbS carriage, but when iRBCs and plasma were associated according to the same Hb genotype, we observed significantly lower cell surface antibody binding by plasma from HbAS compared to HbAA women. We were able to show that the level of cell surface antibody binding was associated with the anti-VAR2CSA antibody levels in these plasmas, although we did not observe a significant difference between these antibody levels in HbAA compared with HbAS women.

## **Methods**

### Ethics statement

The study was approved by the Comité Consultatif de Déontologie et d'Éthique of the Institut de Recherche pour le Développement (IRD, France) and the Comité d'Éthique de la Faculté des Sciences de la Santé (Université d'Abomey Calavi, Benin) (FSS 026/2007/CE/FSS/UAC). All study procedures were performed in accordance with the institutional policies, guidelines and regulations pertaining to research involving human subjects. Written informed consent was obtained for all participants.

### Study site and population

The STOPPAM study, conducted in Benin between 2008 and 2011, enrolled 1037 pregnant women early in pregnancy and followed them every month until delivery [13]. Recent data identified 15.8% of women in the cohort as carriers of the HbAS genotype [20]. In the present work, for each woman, we considered some of the data and samples collected during the STOPPAM study, such as peripheral venous blood collected at delivery (plasma was purified from these samples) and thick and thin blood smears prepared in order to detect *P. falciparum* infection. Here, we included as many samples as possible from the STOPPAM cohort according to the availability of plasma for our study. We thus performed a case-control study with 159 plasmas collected at delivery. The cases and controls were matched (1 case for 2 controls) according to the gravidity and *P. falciparum* placental infection, as both are known

to increase anti-*P. falciparum* antibody levels [11] (34 primigravidae, 25 secundigravidae, 100 multigravidae all distributing equivalently into 26 infected and 133 non-infected mothers). Cases comprised women with abnormal HbS (52 HbAS) and controls were women with normal erythrocytes (107 HbAA).

#### Blood samples for erythrocyte use

Human HbAA erythrocytes were supplied from the “Etablissement Français du Sang”. After informed written consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki, HbAS RBCs were obtained from voluntary donors. RBCs were separated from plasma and leucocytes and stored at 4°C before use. All HbAA and HbAS RBCs came from blood group O donors.

#### Plasmodium falciparum-infected erythrocytes culture

*P. falciparum* FCR3 parasites expressing VAR2CSA (selected for their CSA (*Sigma-Aldrich, France*) adhesion phenotype [29]), were grown in vitro in human HbAA and HbAS RBCs according to adapted procedures from “Methods in Malaria Research” ([https://www.beiresources.org/portals/2/MR4/Methods\\_In\\_Malaria\\_Research-6th\\_edition.pdf](https://www.beiresources.org/portals/2/MR4/Methods_In_Malaria_Research-6th_edition.pdf)) adapted from Trager and Jensen [30]. Briefly, HbAA iRBCs were cultured in RPAS (RPMI-Albumax-Serum) medium (RPMI 1640 medium (*Gibco*) supplemented with 25 mM HEPES (*Gibco*), 2 mM L-glutamine (*Gibco*), 0.05 mg/ml gentamicin (*Gibco*), 2% AB human serum and 0.5% Albumax (*Gibco*)). Cultures were maintained at 5% hematocrit in a gas mixture of 5% O<sub>2</sub>, 5.5% CO<sub>2</sub> and 89.5% N<sub>2</sub> and incubated at 37°C. HbAS RBCs were infected through co-culture with late trophozoite and schizont-infected HbAA erythrocytes obtained after MACS selection (*Miltenyi Biotec, France*). HbAA and HbAS infected red blood cells were cultured in the same medium described above.

#### Cell surface antibody binding of *P. falciparum* iRBCs by plasmas using flow cytometry

Cell surface antibody binding of iRBCs by plasma was conducted using a method adapted from Tuikue Ndam *et al.* [31]. IRBCs collected after MACS (*Miltenyi Biotec*) were resuspended in PBS (*Gibco*)-1% BSA (*Roche Diagnostics, France*) and distributed in 96-well plates (500 000 iRBCs per well). After centrifugation (300g for 2 min at room temperature), iRBCs were resuspended in PBS-1% BSA containing plasma (diluted 1:50) and mixed at 1000 rpm for 30 sec. After 1h incubation at room temperature, the cells were washed twice with PBS-1% BSA. Then, anti-human IgG antibody phyco-erythrin (PE) - conjugated (*Jackson ImmunoResearch (Interchim), France*) (dilution 1:100 in PBS 1% BSA) was added

and mixed with the cells at 1000 rpm for 30 sec. After 1h incubation at room temperature and 3 washes with PBS-1% BSA, the cells were resuspended in PBS-2% paraformaldehyde and kept in darkness at 4°C overnight. The following day, the iRBCs were washed 2 times with PBS-1% BSA and resuspended with TO-PRO-3 (*ThermoFisher Scientific*) (dilution 1:10 000 in PBS) just before acquisition and analysis by flow cytometry (FACS Canto II BD). Using FlowJo software, the geometric values of PE fluorescence (gated according to TO-PRO-3 fluorescence) were used to characterize the level of cell surface antibody binding of iRBCs. To normalize data between plates, each value was divided by the value obtained by the one of a pool of plasmas derived from European pregnant women who had never been infected by *P. falciparum*.

#### Molecular determination of the G6PD deficiency and the $\alpha$ -thalassemia 3.7 deletion

For each woman, DNA was extracted primarily from the blood leucocyte fraction (*Qiagen, France*). When leucocytes were not available, DNA was extracted by the Chelex method [32] from blood spotted and dried onto Whatman 3 paper. G6PD A and A<sup>-</sup> variants were detected using Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragments Length Polymorphisms (PCR-RFLP), with a method adapted from Carter *et al.* [26], and according to the GoTaqFlexi DNA Polymerase (*Promega, France*) requirements. For G6PD A determination, *Fok I* (*New England Biolabs, France*) digestion was realized after PCR amplification. When G6PD A variant was identified, the additional mutations G6PD-G202A and G6PD-T968C were sought by PCR-RFLP, using the restriction enzymes *Nla III* and *Nci I* (*New England Biolabs*), respectively.

The gene deletion of 3.7 kb was detected by multiplex PCR with a method adapted from Liu *et al.* [33], and according to the GoTaqFlexi DNA Polymerase (*Promega*) requirements.

#### Statistical analysis

A chi-squared test was used to compare the proportions of G6PD A<sup>-</sup> variant and  $\alpha$ <sup>-3.7</sup> deletion carriers among HbAA and HbAS women. Fisher's exact test was performed to analyze the associations between carriage of HbS, G6PD A<sup>-</sup> variant and  $\alpha$ <sup>-3.7</sup> deletion. Multivariate linear regression models were used to analyze the associations between the cell surface antibody binding of iRBCs (quantitative dependent variable) and different explanatory variables of interest: maternal genotypes (binary variable HbS vs HbA), G6PD A<sup>-</sup> variant (binary variable), and  $\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7</sup> deletion carriage (binary variable). Our analyses were adjusted for gravidity and placental *P. falciparum* infection at delivery, and the robust variance method

was used to derive the confidence interval and  $p$ -values of the regression coefficients. The analyses were carried out with STATA software version 13.1 (*STATA Corporation, USA*). The significance of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the  $\chi^2$  goodness-of-fit test.

## Results

### Characterization of HbS, G6PD and $\alpha$ -thalassemia maternal genotypes

Of the 1037 women from the STOPPAM study [13], 635 were already genotyped for HbS carriage [20]. From these 635, we selected 159 individuals to constitute our sub-cohort for the case-control study.

We were then able to determine both G6PD and  $\alpha$ -thalassemia genotypes for 79 HbAA and 37 HbAS women (Supplementary Table 1). Globally, 26.7% and 51.7% of women from our population group carried, respectively, the A<sup>-</sup> variant responsible for G6PD deficiency or the  $\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7</sup> deletion. For the G6PD A<sup>-</sup> variant, only the additional mutation G6PD-G202A was found. No statistically significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed for any polymorphism: G6PD A and A<sup>-</sup> variants (chi-squared test,  $\chi^2 = 2.98$ ,  $p = 0.57$ , based on 10 000 permutations) and  $\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7</sup> deletion (chi-squared test,  $\chi^2 = 0.11$ ,  $p = 0.66$ ,  $df = 1$ ). HbS was not tested because of lethality and therefore absence of HbSS individuals. The G6PD A<sup>-</sup> variant and  $\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7</sup> deletion were equally distributed between HbAA and HbAS women (chi-squared test, both  $p > 0.53$ ,  $n = 116$ ). We defined two groups for G6PD according to the enzyme deficiency resulting from the presence or absence of the variant A<sup>-</sup>. The “G6PD A<sup>-</sup> variant” group includes the women carrying the G6PD A<sup>-</sup> variant in either homozygous or heterozygous forms (A<sup>-</sup>B, A<sup>-</sup>A and A<sup>-</sup>A<sup>-</sup> genotypes), the 2<sup>nd</sup> one BB, AB and AA genotypes women. Regarding  $\alpha$ -thalassemia, we also separated women into two groups according to the presence of the  $\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7</sup> deletion. Therefore, we considered an “ $\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7</sup> deletion” group including women with the  $\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7</sup> deletion in either homozygous ( $\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7}/ $\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7</sup>) or heterozygous forms ( $\alpha\alpha/\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7</sup>) and a “no  $\alpha$ -thalassemia<sup>-3.7</sup> deletion” group comprising women with normal  $\alpha$  genes ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ). We checked whether certain combinations of genetic variants were more frequently observed than expected in our sample with a chi-squared test. Since *G6PD*, *HBB* and *HBA1/HBA2* are located on 3 different chromosomes, we would expect these RBC disorders to be independent of each other. We first compared the proportions of women carrying none, one or both RBC disorders amongst the HbAA and HbAS groups, but we did not see any significant differences between the different groups (Table 1). We then tested the</sup>

association between the inheritance of HbS, G6PD deficiency and  $\alpha$ -thalassemia genotypes in our cohort (data not shown). We only noticed a significant link between  $\alpha$ -thalassemia and HbS genotypes (Fisher's exact test,  $p = 0.007$ ,  $n = 116$ ) consisting of more  $\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$  genotypes and less  $\alpha^{-3.7}/\alpha^{-3.7}$  genotypes in the HbAS compared to the HbAA group.

*The cell surface antibody binding of HbAA or HbAS iRBCs does not change according to maternal genotypes*

We determined the level of cell surface antibody binding of normal HbAA and HbAS *P. falciparum*-iRBCs, and analyzed the impact of Hb, G6PD deficiency or  $\alpha$ -thalassemia maternal genotypes. Using a multivariate analysis, we did not observe a statistically significant difference for the cell surface antibody binding of HbAA iRBCs according to the RBC genotypes of the mothers from whom plasmas were obtained (multivariable linear regression,  $n = 111$ ) (Table 2). We repeated the experiment, using HbAS iRBCs. As was the case for HbAA iRBCs, we did not observe any significant difference in the cell surface antibody binding of HbAS iRBCs according to the RBC genotypes of the mothers from whom plasmas were obtained (multivariable linear regression,  $n = 110$ ) (Table 2).

Separately, we assessed the difference in cell surface antibody binding to HbAA and to HbAS iRBCs for each individual plasma sample. Our results showed that binding to HbAA iRBC was higher than to HbAS iRBC (Wilcoxon paired-test,  $p < 10^{-3}$ ,  $n = 140$ , data not shown).

*Cell surface antibody binding of iRBCs is lower for HbAS mothers when matching iRBCs to plasmas from mothers with the same Hb genotype*

To get closer to in vivo biological conditions, we matched iRBCs to plasma samples from mothers with the same Hb genotype. Thus, we compared the cell surface antibody binding to HbAA iRBCs of plasma from HbAA mothers and similarly the cell surface antibody binding to HbAS iRBCs of plasma from HbAS mothers. We observed significantly lower cell surface antibody binding by plasma from HbAS mothers (multivariable linear regression,  $p < 10^{-3}$ ,  $n = 111$ ) (Figure 1). G6PD A<sup>-</sup> variant and  $\alpha^{-3.7}$  deletion carriages were also included in the multivariate analysis as covariates but did not impact this observation (Table 3). All subsequent tests were conducted considering cell surface antibody binding when iRBCs and plasmas were matched by Hb genotype.

*The cell surface antibody binding of iRBCs is associated with the anti-VAR2CSA antibody level*

VAR2CSA is the antigen involved in the cytoadherence of iRBCs to CSA, causing their sequestration in the placenta, and is a promising placental malaria vaccine candidate [34]. The cell surface antibody binding of VAR2CSA-expressing iRBCs that we assessed could plausibly reflect multiple antibody-antigen interactions. Previous work measured the anti-VAR2CSA antibody levels for all plasma samples of the STOPPAM cohort taken at delivery. Briefly, levels of anti-VAR2CSA antibodies were determined in plasma samples (at dilution 1:100) using an ELISA assay targeting 0.5µg/mL of full-length ectodomain of VAR2CSA[11,35]. We used these data to test the association of the iRBCs cell surface antibody binding and the corresponding antibody levels, when RBC and plasma Hb genotypes were matched (Table 4). We observed a significant positive association between the anti-VAR2CSA antibody levels and the iRBCs cell surface antibody binding (multivariable linear regression,  $p < 10^{-3}$ ,  $n = 140$ ). We then assessed the association between this antibody level and maternal Hb genotype, but found no significant difference in the level of anti-VAR2CSA antibodies between HbAA and HbAS women (multivariable linear regression,  $n = 114$ ) (Figure 2). In addition, these antibody levels did not vary according to G6PD A<sup>-</sup> variant or  $\alpha$ <sup>3.7</sup> deletion carriage (Table 5).

## **Discussion**

It is well known that hemoglobin S heterozygous carriage affords relative protection against severe forms of malaria, but whether the HbAS genotype also confers a selective protective advantage against PAM remains to be determined. Here, using plasma samples from a cohort of Beninese pregnant women, we assessed the impact of maternal HbAS genotype on the cell surface antibody binding of plasma antibodies to iRBCs during PAM. Our findings are consistent with previous studies, showing a significant increase in the level of surface recognition of iRBCs by plasma as a function of gravidity, independently of maternal genotypes [11]. However we observed significantly lower cell surface antibody binding of iRBCs by plasma from HbAS mothers than by plasmas from HbAA mothers when iRBCs and plasmas were matched according to Hb genotype. This lower cell surface antibody binding suggests modifications in the interactions between antigens and antibodies and could be explained by two main hypotheses: (i) HbAS women have a lower amount of antibodies recognizing the different antigens present on the iRBC surface, (ii) HbAS iRBCs display

lower amounts of the recognized antigens and/or abnormally presented forms of these antigens, altering the capacity for antibody-mediated recognition. In previous work we measured the level of anti-VAR2CSA antibody in women in the STOPPAM cohort [11], offering us a way to test the first hypothesis. As VAR2CSA is the parasite ligand involved in the cytoadherence of iRBCs to CSA in PAM, and as women develop anti-VAR2CSA antibodies during successive pregnancies, it is plausible to imagine that the cell surface antibody binding of VAR2CSA is a major component of the overall cell surface antibody binding of iRBCs. To confirm this hypothesis, we first tested the association of the cell surface binding with the level of anti-VAR2CSA antibodies, and revealed a positive association between these two factors. The levels of the antibodies measured by ELISA were nevertheless not significantly different between HbAA and HbAS mothers. Cell surface antibody binding for each individual sample was, however, shown by paired analyses to be significantly higher to HbAA compared with HbAS iRBC. All these results suggest that the lower level of cell surface antibody binding of iRBCs by plasma from HbAS women, when RBC and plasma Hb genotypes were matched, is not due to lower amounts of antibodies recognizing VAR2CSA. Thus, our findings suggest that the expression of VAR2CSA is decreased and/or abnormal on HbAS iRBCs. Previous studies have documented lower levels of display of VAR2CSA [18] or *PfEMP1* at the HbAS iRBC surface. These studies also highlighted the abnormally-shaped, heterogeneously-distributed knobs on HbAS RBCs [36]. Here, we cannot exclude the possibility that the cell surface antibody binding of other iRBC surface antigens may account for the lower total surface recognition of iRBCs by plasma of HbAS mothers, but the study by Chan and colleagues suggests that it is indeed *PfEMP1* on iRBCs that is the principal target of anti-VSA antibodies [37]. However, we could not exclude the possibility that the IgG affinity for the recognized antigens at the iRBC surface may be stronger for HbAA women.

Immunity during pregnancy, notably antibody-mediated recognition of VAR2CSA expressing iRBCs, has been investigated in previous studies [11,38]. This study is nevertheless the first to investigate the impact of abnormal hemoglobin S in the development of humoral immunity to malaria during pregnancy. It is also important to note that over half of our study group carried the  $\alpha^{-3.7}$  deletion, in line with what has been previously found in neighboring Togo [39]. Similarly, over a quarter of investigated women presented the A<sup>-</sup> variant responsible for G6PD deficiency, consistent with already observed values in locations from coastal West Africa [40]. The G6PD A<sup>-</sup> variant and  $\alpha^{-3.7}$  deletion were equally distributed between HbAA and HbAS women. Only 35.4% and 37.8%, respectively, carried neither the

G6PD A<sup>-</sup> variant nor the  $\alpha^{-3.7}$  deletion. Furthermore, we observed a significant link between  $\alpha$ -thalassemia and HbS genotypes, with more  $\alpha\alpha/\alpha^{-3.7}$  genotypes and less  $\alpha^{-3.7}/\alpha^{-3.7}$  genotypes among the HbAS compared to the HbAA women. Malaria-protective effects of the combination of both polymorphisms have been studied, and a negative epistasis between sickle cell trait and heterozygous  $\alpha$ -thalassemia carriage in relation to protection against malaria has already been described [41,42]. However according to our findings it is important to match plasma and erythrocyte genotypes. To characterize the influence of G6PD deficiency and  $\alpha$ -thalassemia, which do not show here any impact on cell surface antibody binding of HbAS erythrocytes, it would be necessary to study first these genetic defects separately, and to consider their co-carriage with HbS thereafter, matching ideally in each experiment the plasma and the erythrocyte genotypes to better reproduce in vivo conditions, as we did here with HbAS iRBCs.

Our results highlight the importance of taking into account the Hb genotype of the mothers from whom plasmas are derived, and of the erythrocytes used for the in vitro assay of cell surface antibody binding, as RBC disorders could influence the export and/or the presentation of antigens.

### **Acknowledgments**

We thank the voluntary blood donors for their participation to this project; and the Universities Paris Diderot and Paris Descartes for the doctoral scholarships awarded to Marilou Tétard and Margaux Chauvet. This study was part of the STOPPAM collaborative project. We are grateful to the women who participated in the study.

### **Author Contribution Statement**

Conceived and designed the project: B.G., A.J.F.L., A.M. & F.M.N. Performed the experiments: M.C., M.L, A.M., M.T., & N.T.N. Performed the analysis: M.C., G.C., A.M., F.M.N. & J.M. Performed the genotyping: F.A., E.B., M.C., L.D, M.H., A.M., F.M.N & D.P. Wrote the paper: M.C., A.J.F.L., A.M., F.M.N & M.T. All authors reviewed the manuscript before submission.

## References

1. WHO. World Malaria Report [Internet]. Geneva, World Health Organization; 2018. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/>
2. Rogerson SJ, Desai M, Mayor A, Sicuri E, Taylor SM, Eijk AM van. Burden, pathology, and costs of malaria in pregnancy: new developments for an old problem. *Lancet Infect Dis.* **2018**; 18(4):e107–e118.
3. Andrews KT, Lanzer M. Maternal malaria: Plasmodium falciparum sequestration in the placenta. *Parasitol Res.* **2002**; 88(8):715–723.
4. Salanti A, Dahlbäck M, Turner L, et al. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med.* **2004**; 200(9):1197–1203.
5. Viebig NK, Gamain B, Scheidig C, et al. A single member of the Plasmodium falciparum var multigene family determines cytoadhesion to the placental receptor chondroitin sulphate A. *EMBO Rep.* **2005**; 6(8):775–781.
6. Viebig NK, Nunes MC, Scherf A, Gamain B. The human placental derived BeWo cell line: a useful model for selecting Plasmodium falciparum CSA-binding parasites. *Exp Parasitol.* **2006**; 112(2):121–125.
7. Fried M, Duffy PE. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science.* **1996**; 272(5267):1502–1504.
8. Srivastava A, Gangnard S, Round A, et al. Full-length extracellular region of the var2CSA variant of PfEMP1 is required for specific, high-affinity binding to CSA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010**; 107(11):4884–4889.
9. Duffy PE. Plasmodium in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. *Parasitology.* **2007**; 134(Pt 13):1877–1881.
10. O’Neil-Dunne I, Achur RN, Agbor-Enoh ST, et al. Gravidity-dependent production of antibodies that inhibit binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy. *Infect Immun.* **2001**; 69(12):7487–7492.
11. Ndam NT, Denoëud-Ndam L, Doritchamou J, et al. Protective Antibodies against Placental Malaria and Poor Outcomes during Pregnancy, Benin. *Emerg Infect Dis.* **2015**; 21(5):813–823.

12. Tuikue Ndam NG, Salanti A, Le-Hesran J-Y, et al. Dynamics of anti-*VAR2CSA* immunoglobulin G response in a cohort of senegalese pregnant women. *J Infect Dis.* **2006**; 193(5):713–720.
13. Huynh B-T, Fievet N, Gbaguidi G, et al. Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. *Am J Trop Med Hyg.* **2011**; 85(2):214–220.
14. Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE. Maternal antibodies block malaria. *Nature.* **1998**; 395(6705):851–852.
15. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol.* **1998**; 11(1):1–51.
16. Piel FB, Patil AP, Howes RE, et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun.* **2010**; 1:104.
17. Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, et al. Sickle cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. *J Infect Dis.* **2005**; 192(1):178–186.
18. Cyrklaff M, Srismith S, Nyboer B, et al. Oxidative insult can induce malaria-protective trait of sickle and fetal erythrocytes. *Nat Commun.* **2016**; 7:13401.
19. Kilian N, Srismith S, Dittmer M, et al. Hemoglobin S and C affect protein export in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biol Open.* **2015**; 4(3):400–410.
20. Tétard M, Milet J, Dechavanne S, et al. Heterozygous HbAC but not HbAS is associated with higher newborn birthweight among women with pregnancy-associated malaria. *Sci Rep [Internet].* **2017**; 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5431107/>
21. Patel JC, Mwapasa V, Kalilani L, et al. Absence of Association between Sickle Trait Hemoglobin and Placental Malaria Outcomes. *Am J Trop Med Hyg.* **2016**; 94(5):1002–1007.
22. Mbanefo EC, Ahmed AM, Titouna A, et al. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* **2017**; 7:45963.
23. Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* **2012**; 12(6):457–468.
24. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet Lond Engl.* **2008**; 371(9606):64–74.

25. Howes RE, Dewi M, Piel FB, et al. Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. *Malar J.* **2013**; 12:418.
26. Carter N, Pamba A, Duparc S, Waitumbi JN. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria patients from six African countries enrolled in two randomized anti-malarial clinical trials. *Malar J.* **2011**; 10:241.
27. Piel FB, Weatherall DJ. The  $\alpha$ -thalassemias. *N Engl J Med.* **2014**; 371(20):1908–1916.
28. Medeiros Alcoforado GH de, Bezerra CM, Araújo Moura Lemos TM, et al. Prevalence of  $\alpha$ -thalassemia 3.7 kb deletion in the adult population of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genet Mol Biol.* **2012**; 35(3):594–598.
29. Pouvelle B, Meyer P, Robert C, Bardel L, Gysin J. Chondroitin-4-sulfate impairs in vitro and in vivo cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Med Camb Mass.* **1997**; 3(8):508–518.
30. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* **1976**; 193(4254):673–675.
31. Tuikue Ndam NG, Fievet N, Bertin G, Cottrell G, Gaye A, Deloron P. Variable adhesion abilities and overlapping antigenic properties in placental *Plasmodium falciparum* isolates. *J Infect Dis.* **2004**; 190(11):2001–2009.
32. Wooden J, Kyes S, Sibley CH. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today Pers Ed.* **1993**; 9(8):303–305.
33. Liu YT, Old JM, Miles K, Fisher CA, Weatherall DJ, Clegg JB. Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. *Br J Haematol.* **2000**; 108(2):295–299.
34. Chêne A, Houard S, Nielsen MA, et al. Clinical development of placental malaria vaccines and immunoassays harmonization: a workshop report. *Malar J.* **2016**; 15:476.
35. Guitard J, Cottrell G, Magnouha NM, et al. Differential evolution of anti-VAR2CSA-IgG3 in primigravidae and multigravidae pregnant women infected by *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* **2008**; 7:10.
36. Cholera R, Brittain NJ, Gillrie MR, et al. Impaired cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008**; 105(3):991–996.
37. Chan J-A, Howell KB, Reiling L, et al. Targets of antibodies against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in malaria immunity. *J Clin Invest.* **2012**; 122(9):3227–3238.

38. Chandrasiri UP, Randall LM, Saad AA, Bashir AM, Rogerson SJ, Adam I. Low Antibody Levels to Pregnancy-specific Malaria Antigens and Heightened Cytokine Responses Associated With Severe Malaria in Pregnancy. *J Infect Dis.* **2014**; 209(9):1408–1417.
39. Segbena AY, Kueviakoe I, Messie AK, Napo-Koura IG, Vovor A, David M. [Hemoglobin anomalies at the university hospital center in Lome, Togo]. *Med Trop Rev Corps Sante Colon.* **2002**; 62(1):51–54.
40. Howes RE, Piel FB, Patil AP, et al. G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map. *PLoS Med.* **2012**; 9(11):e1001339.
41. Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, et al. Negative epistasis between the malaria-protective effects of  $\alpha^+$ -thalassemia and the sickle cell trait. *Nat Genet.* **2005**; 37(11):1253–1257.
42. Mpimbaza A, Walakira A, Ndeezi G, et al. Associations between erythrocyte polymorphisms and risks of uncomplicated and severe malaria in Ugandan children: A case control study. *PloS One.* **2018**; 13(9):e0203229.

### **Figure legends**

**Table 1. Proportion of women carrying G6PD deficiency and/or  $\alpha$ -thalassemia among HbAA and HbAS groups.** Women were separated in 4 groups according to their carriage of G6PD A<sup>-</sup> variant and of the  $\alpha^{-3.7}$  deletion. *p*-value based on a chi-squared test to analyze the distribution of women according to their G6PD A<sup>-</sup> variant and  $\alpha^{-3.7}$  deletion carriages among HbAA and HbAS groups.

**Table 2. Factors tested for the association with the cell surface antibody binding of HbAA iRBCs or HbAS iRBCs using a linear multivariate regression.** Cell surface antibody binding fluorescent intensities (MFI) were normalized to the value (MFI<sub>0</sub>) obtained by a pool of plasmas derived from European pregnant women. Covariates included in linear multivariate model regression were maternal genotypes: “HbS carriage”, “G6PD A<sup>-</sup> variant carriage” and “ $\alpha^{-3.7}$  deletion carriage”, as well as “multigravidity” and “infection at delivery”. A positive regression coefficient shows a positive association with the factor and a negative regression coefficient shows a negative association.

**Table 3. Factors tested for the association with the cell surface antibody binding of iRBCs (when iRBCs and plasmas are matched by HbS genotype) using a linear multivariate regression.** Cell surface antibody binding fluorescent intensities (MFI) were normalized to the value ( $MFI_0$ ) obtained by a pool of plasmas derived from European pregnant women. Covariates included in the linear multivariate model regression were maternal genotypes: “HbS carriage”, “G6PD A<sup>-</sup> variant carriage” and “ $\alpha$ <sup>-3.7</sup> deletion carriage”, as well as “multigravidity” and “infection at delivery”. A positive regression coefficient shows a positive association with the factor and a negative regression coefficient shows a negative association.

**Table 4. Association between the iRBCs surface cell surface antibody binding (when iRBCs and plasmas are matched by Hb genotype) and the level of anti-VAR2CSA antibody using a linear multivariate regression.** Cell surface antibody binding fluorescent intensities (MFI) were normalized to the value ( $MFI_0$ ) obtained by a pool of plasmas derived from European pregnant women. Covariates included in linear multivariate model regression were “the anti-VAR2CSA antibody levels” and maternal “HbS carriage”, as well as “multigravidity” and “infection at delivery”. A positive regression coefficient shows a positive association with the factor and a negative regression coefficient shows a negative association.

**Table 5. Factors tested for the association with the anti-VAR2CSA antibody level using linear multivariate regression.** Covariates included in linear multivariate model regression were maternal genotypes: “HbS carriage”, “G6PD A<sup>-</sup> variant carriage” and “ $\alpha$ <sup>-3.7</sup> deletion carriage”, , as well as “multigravidity” and “infection at delivery”.. A positive regression coefficient shows a positive association with the factor and a negative regression coefficient shows a negative association.

**Figure 1. Association between cell surface antibody binding and maternal Hb genotype when iRBCs and plasmas are matched by Hb genotype.** Cell surface antibody binding fluorescent intensities (MFI) were normalized to the value (MFI<sub>0</sub>) obtained by a pool of plasmas derived from European pregnant women. *p*-value based on a multivariate linear regression to determine the association between cell surface antibody binding and maternal Hb genotype (HbAA or HbAS), adjusted for gravidity, malaria infection, G6PD A<sup>-</sup> variant and  $\alpha^{-3.7}$  deletion carriage (n = 111). Box-whisker plots illustrate medians with 75<sup>th</sup> & 25<sup>th</sup> percentiles (boxes) and 90<sup>th</sup> & 10<sup>th</sup> percentiles (whiskers).

**Figure 2. Association between the level of anti-VAR2CSA antibody and maternal Hb genotype.** The antibody levels data come from a previously published work. The antibody levels were measured by ELISA [11] and values were converted to arbitrary units [35]. *p*-value based on a multivariate linear regression to determine the association between the level of anti-VAR2CSA antibody and maternal Hb genotype (HbAA or HbAS), adjusted for gravidity, malaria infection, G6PD A<sup>-</sup> variant and  $\alpha^{-3.7}$  deletion carriage (n = 114). Box-whisker plots illustrate medians with 75<sup>th</sup> & 25<sup>th</sup> percentiles (boxes) and 90<sup>th</sup> & 10<sup>th</sup> percentiles (whiskers).

### Tables and figures

**Table 1**

<b>Combined RBC genetic defects</b>	<b>HbAA</b>	<b>HbAS</b>	<b><i>p</i>-value</b>
<b>n (%)</b>	<b><i>n</i> = 79</b>	<b><i>n</i> = 37</b>	
<b>No G6PDA<sup>-</sup> variant and no <math>\alpha^{-3.7}</math> deletion</b>	28 (35.4%)	14 (37.8%)	0.96
<b>Only G6PD A<sup>-</sup> variant</b>	10 (12.7%)	4 (10.8%)	0.99
<b>Only <math>\alpha^{-3.7}</math> deletion</b>	28 (35.4%)	15 (40.6%)	0.66
<b>Both G6PD A<sup>-</sup> variant and <math>\alpha^{-3.7}</math> deletion</b>	13 (16.5%)	4 (10.8%)	0.60

Table 2

	Covariates	Coefficient	95% CI	<i>p</i> -value
<b>Cell surface binding (MFI/MFI<sub>0</sub>) of HbAA iRBCs</b> <i>n</i> = 111 ( <i>n</i> <sub>HbAA</sub> = 75; <i>n</i> <sub>HbAS</sub> = 36)	<b>HbS carriage</b>	0.04	-1.68;1.76	0.96
	<b>G6PD A<sup>-</sup> variant carriage</b>	-0.08	-1.91;1.76	0.93
	<b>α<sup>-3.7</sup> deletion carriage</b>	-0.24	-1.84;1.36	0.77
	<b>Multigravidity</b>	4.48	3.04;5.92	<10 <sup>-3</sup>
	<b>Infection at delivery</b>	1.76	-0.67;4.19	0.15
<b>Cell surface binding (MFI/MFI<sub>0</sub>) of HbAS iRBCs</b> <i>n</i> = 110 ( <i>n</i> <sub>HbAA</sub> = 74; <i>n</i> <sub>HbAS</sub> = 36)	<b>HbS carriage</b>	-0.05	-0.36;0.26	0.74
	<b>G6PD A<sup>-</sup> variant carriage</b>	-0.16	-0.43;0.12	0.27
	<b>α<sup>-3.7</sup> deletion carriage</b>	0.02	-0.26;0.30	0.88
	<b>Multigravidity</b>	0.75	0.48;1.03	<10 <sup>-3</sup>
	<b>Infection at delivery</b>	0.49	0.03;0.94	0.04

Table 3.

Cell surface binding of iRBCs (MFI/MFI <sub>0</sub> )			
<i>n</i> = 111 ( <i>n</i> <sub>HbAA</sub> = 75; <i>n</i> <sub>HbAS</sub> = 36)			
Covariates	Coefficient	95% CI	<i>p</i> -value
<b>HbS carriage</b>	-3.25	-4.28;-2.22	<10 <sup>-3</sup>
<b>G6PD A<sup>-</sup> variant carriage</b>	0.30	--1.35;1.96	0.72
<b>α<sup>-3.7</sup> deletion carriage</b>	-0.23	-1.57;1.11	0.74
<b>Multigravidity</b>	3.32	2.12;4.52	<10 <sup>-3</sup>
<b>Infection at delivery</b>	1.99	-0.07;4.04	0.06

Table 4

Covariates	Cell surface binding of iRBCs (MFI/MFI <sub>0</sub> )		
	Coefficient	95 % CI	<i>p</i> -value
Anti-VAR2CSA antibody levels (A.U.)	0.05	0.03;0.7	<10 <sup>-3</sup>
HbS carriage	-3.67	-4.62;-2.73	<10 <sup>-3</sup>
Multigravidity	3.05	2.02;4.09	<10 <sup>-3</sup>
Infection at delivery	1.19	-0.37;2.75	0.13

Table 5

Covariates	Anti-VAR2CSA antibody levels (A.U.)		
	<i>n</i> = 114 ( <i>n</i> <sub>HbAA</sub> = 78; <i>n</i> <sub>HbAS</sub> = 36)		
Covariates	Coefficient	95% CI	<i>p</i> -value
HbS carriage	-4.15	-17.62;9.31	0.54
G6PD A <sup>-</sup> variant carriage	-6.04	-19.47;7.39	0.37
$\alpha$ <sup>-3.7</sup> deletion carriage	-1.09	-13.09;10.92	0.86
Multigravidity	11.09	-2.81;25	0.12
Infection at delivery	3.95	-10.94;18.83	0.60

Figure 1

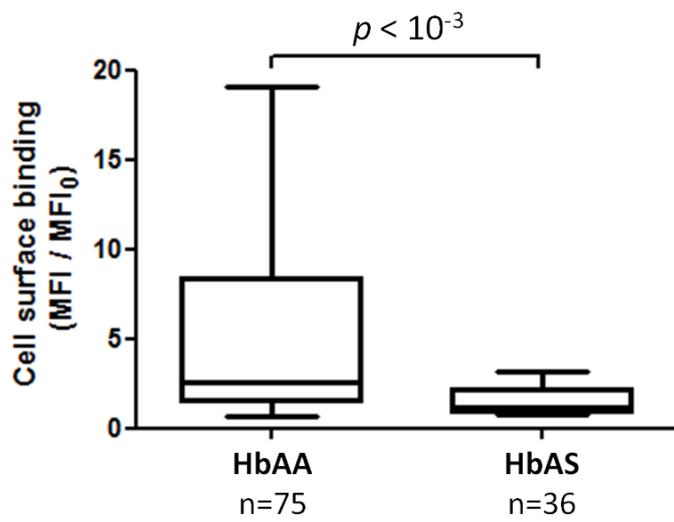
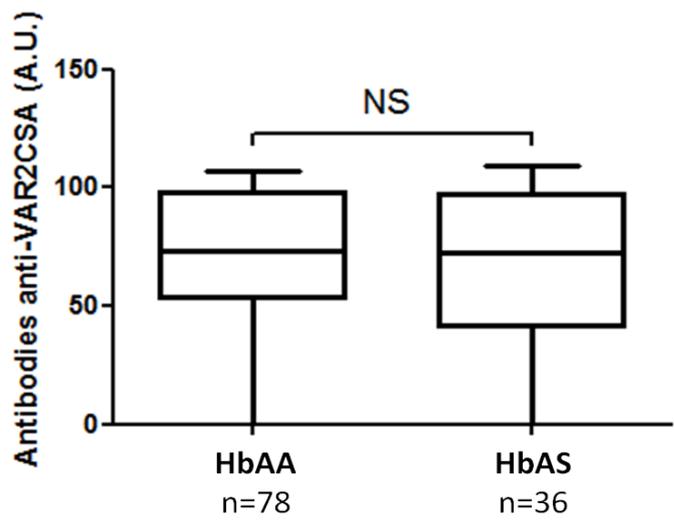


Figure 2



### 3.4. Résultats non inclus dans l'article

#### 3.4.1. Résultats des génotypages

##### 3.4.1.1. Vérification du génotype du donneur HbAS

Le génotype Hb du donneur HbAS a été vérifié (Figure 44). Nous avons aussi déterminé ses génotypes G6PD (Figure 45) et  $\alpha$ -thalassémie (Figure 46).

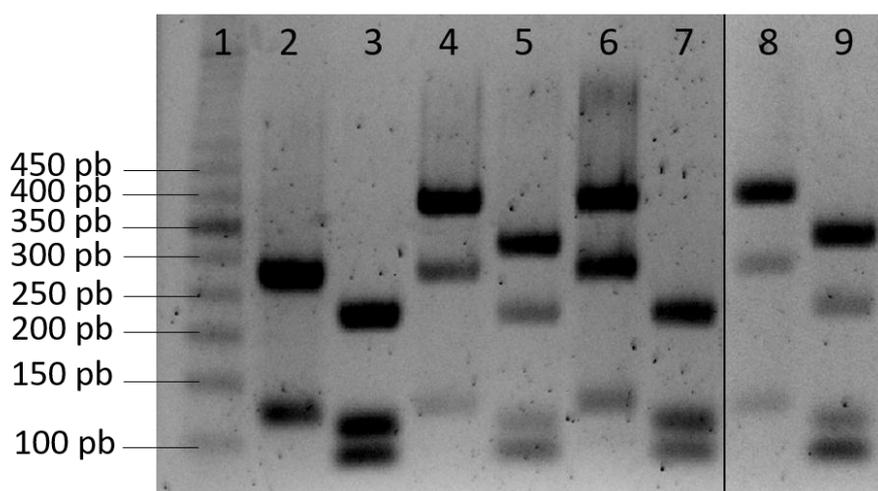


Figure 44. **Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique des fragments de 369 pb du gène de la  $\beta$ -globine pour la détermination du génotype d'hémoglobine du donneur HbAS.** Les fragments amplifiés puis digérés ont été séparés sur gel d'agarose 2%. L'ADN de témoins HbAA (pistes 2 et 3), HbAS (pistes 4 et 5) et HbAC (pistes 6 et 7) ont été utilisés pour comparer leur profil à celui du donneur HbAS (piste 8 et 9) après digestion par *Bse* RI (pistes 2, 4, 6 et 8) et *Dde* I (pistes 3, 5, 7 et 9). La taille des fragments a été déterminée grâce au marqueur de taille 50 pb (*Invitrogen*) (piste 1).

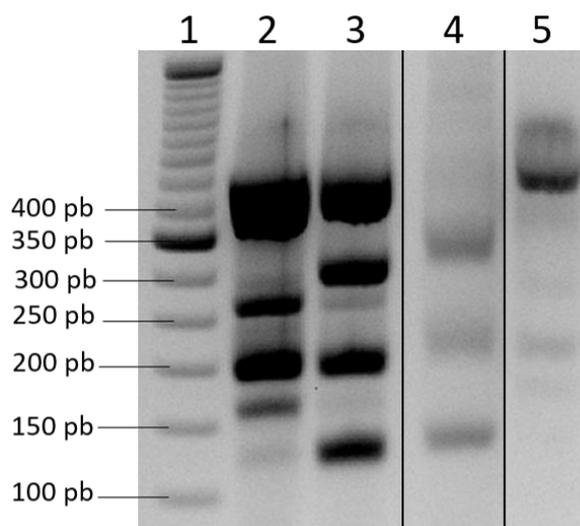


Figure 45. **Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique du fragment de 585 pb du gène *g6pd* pour la détermination du génotype G6PD du donneur HbAS.** Les fragments amplifiés puis digérés par *Fok* I ont été séparés sur gel d'agarose 2%. Les profils de témoins G6PD BB (piste 2), G6PD AB (piste 3) et G6PD AA (piste 4) ont été comparés à celui du donneur HbAS (piste 5). La taille des fragments a été déterminée grâce au marqueur de taille 50 pb (*Invitrogen*) (piste 1).

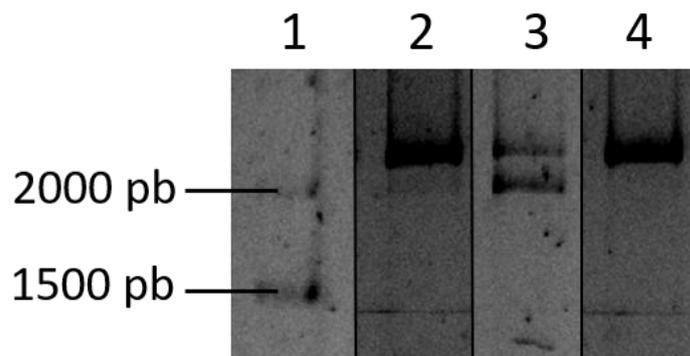


Figure 46. **Profil de bandes obtenues après amplification par PCR multiplexe des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour la détermination du génotype alpha-thalassémie du donneur HbAS.** Les fragments amplifiés ont été séparés sur gel d'agarose 1,5%. L'ADN de témoins  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  (piste 2) et  $\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$  (piste 3) a été utilisé pour comparer leur profil à celui du donneur HbAS (piste 4). La taille des fragments a été déterminée par comparaison au marqueur de taille 1 kb+ (*Invitrogen*) (piste 1).

Après comparaison avec les profils des témoins, nous avons pu vérifier que le donneur était bien HbAS, et qu'il n'était pas co-porteur de l'HbC, ni d'un variant de l'enzyme G6PD ou encore de la délétion de 3,7 kb associée à l' $\alpha$ -thalassémie.

#### 3.4.1.2. Génotypage HbS/C, G6PD et alpha-thalassémie des femmes de la cohorte

##### a. Génotypage HbS/C

Afin d'inclure un maximum de femmes HbAS dans notre étude, nous avons essayé de déterminer le génotype Hb des femmes de la cohorte STOPPAM pour lesquelles ce génotype n'était pas connu. Ces génotypages ont été réalisés à partir d'ADN extrait par la méthode Chelex, dont la qualité était mauvaise. Les profils obtenus étaient donc plus difficiles à interpréter. Un exemple de gel est montré en Figure 47.

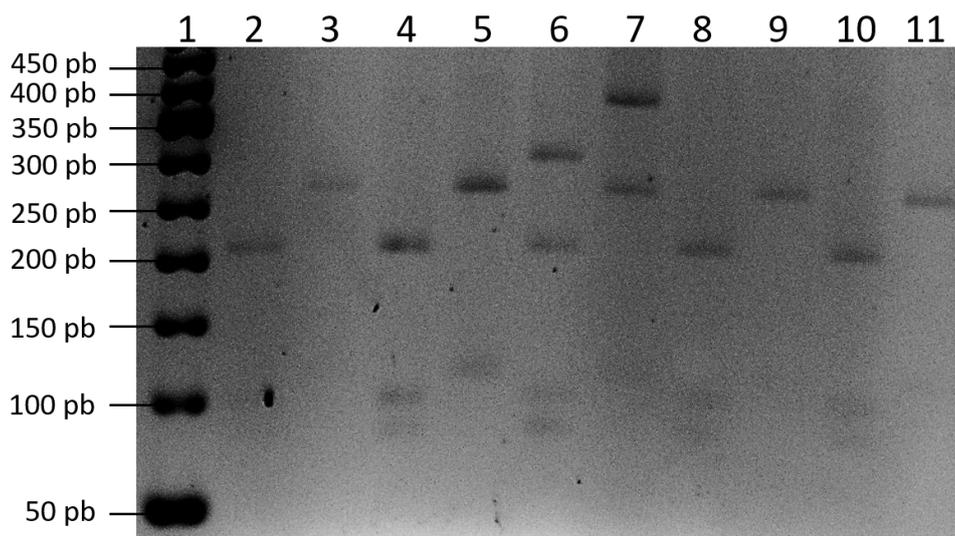


Figure 47. **Profil de bandes obtenues après digestion des fragments de 369 pb du gène de la  $\beta$ -globine pour la détermination du génotype d'hémoglobine des femmes de la cohorte STOPPAM.** Les fragments amplifiés puis digérés par *Dde* I (pistes 2, 4, 6, 8 et 10) et *Bse* RI (pistes 3, 5, 7, 9 et 11) ont été séparés sur gel d'agarose 2%. La taille des fragments a été déterminée par comparaison au marqueur de taille 50 pb (*Invitrogen*) (piste 1).

Les femmes des pistes 2/3, 4/5, 8/9 et 10/11 sont HbAA, et celle des pistes 6/7 est HbAS.

#### b. Génotypage G6PD

L'ensemble des femmes de la sous-cohorte a été génotypé pour leur statut G6PD (Figures 48 et 49) et  $\alpha$ -thalassémie (Figure 50).

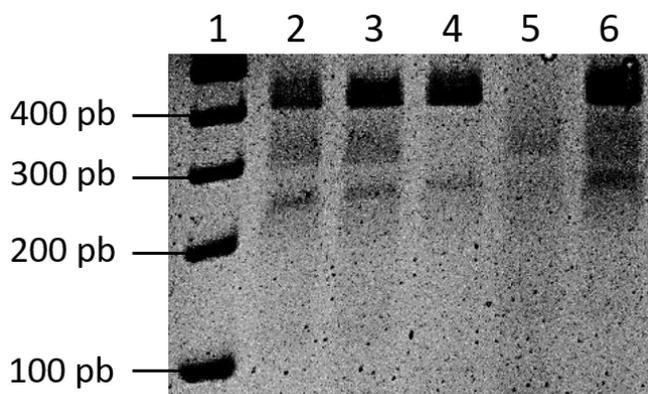


Figure 48. **Profil de bandes obtenues après digestion du fragment de 585 pb du gène *g6pd* pour la détermination du génotype G6PD des femmes de la cohorte STOPPAM.** Les fragments amplifiés puis digérés par *Fok* I ont été séparés sur gel d'agarose 2%. La taille des fragments a été déterminée par comparaison au marqueur de taille 100 pb (*Invitrogen*) (piste 1).

Les femmes des pistes 2, 3 et 6 sont G6PD AB, celle de la piste 4 G6PD BB et celle de la piste 5 G6PD AA. Les femmes G6PD AB ou AA ont par la suite été génotypées pour les mutations additionnelles G202A et T968C (Figure 49).

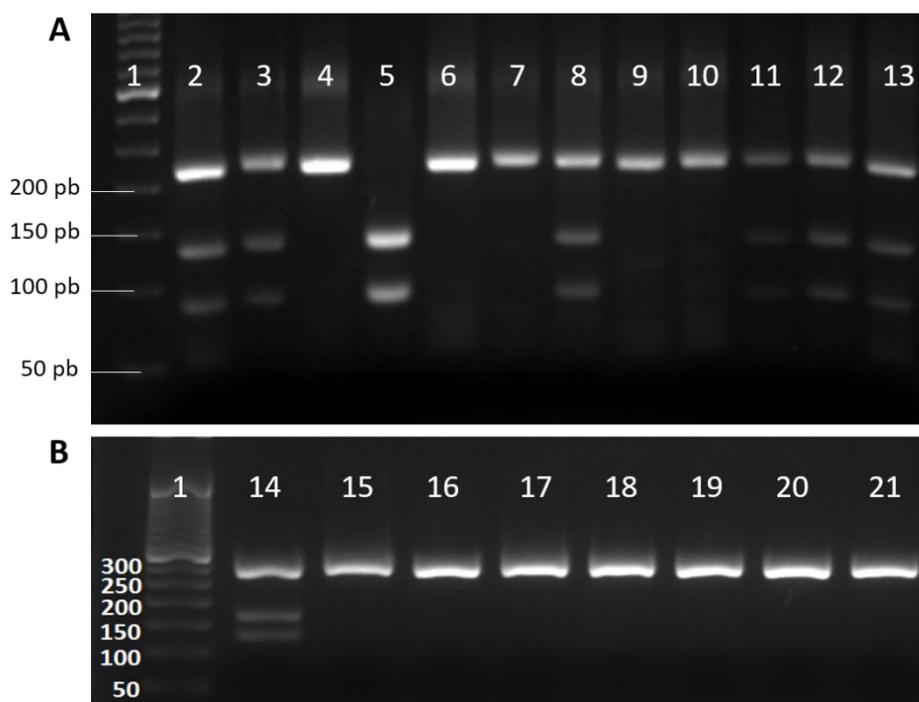


Figure 49. **Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique pour la recherche des mutations G202A (A) et T968C (B) pour les femmes de la cohorte STOPPAM.** Les fragments amplifiés puis digérés par *Nla* III (A) et *Nci* I (B) ont été séparés sur gel d'agarose 2%. La taille des fragments a été déterminée par comparaison au marqueur de taille 100 pb (*Invitrogen*) (piste 1).

Les femmes des pistes 2, 3, 8, 11, 12 et 13 sont porteuses de la mutation G202A de manière hétérozygote, celle de la piste 5 de manière homozygote et celles des pistes 4, 6, 7, 9 et 10 ne la présentent pas. Un ADN témoin porteur de la mutation T968C de manière hétérozygote a été utilisé en piste 14. Les femmes des pistes 15 à 21 ne portent pas la mutation T968C. Tous les variants A<sup>-</sup> détectés dans notre cohorte étaient dus à la mutation additionnelle G202A.

### c. Génotypage alpha-thalassémie

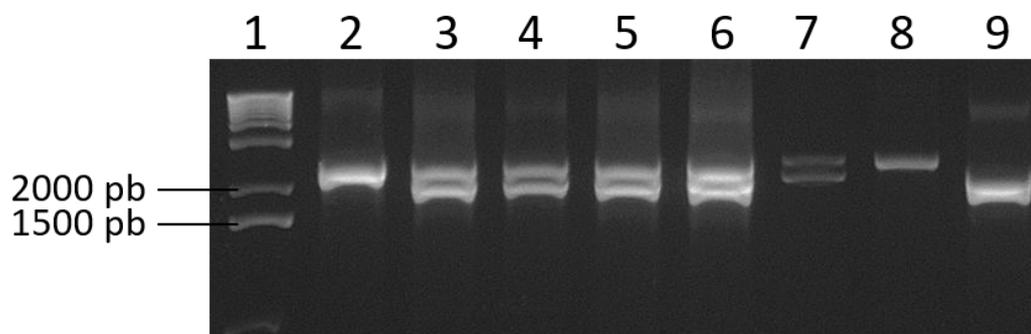


Figure 50. **Profil de bandes obtenues après amplification par PCR multiplexe des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour la détermination du génotype alpha-thalassémie des femmes de la cohorte STOPPAM.** Les fragments amplifiés ont été séparés sur gel d'agarose 1,5%. La taille des fragments a été déterminée par comparaison au marqueur de taille 1 kb+ (*Invitrogen*) (piste 1).

Les femmes des pistes 2 et 8 sont  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ , celles des pistes 3, 4, 5, 6, et 7 sont  $\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$  et celle de la piste 9 est  $\alpha^{-3,7}/\alpha^{-3,7}$ .

### 3.4.2. Les anticorps d'un même plasma ont une reconnaissance plus importante des antigènes de la surface de globules rouges HbAA que HbAS infectés

Comme le taux de liaison des iGRs HbAA est significativement plus important que celui des iGRs HbAS, nous avons voulu évaluer le taux de reconnaissance, pour un même plasma, d'un iGR HbAA et d'un iGR HbAS, en réalisant un test de Wilcoxon apparié (Figure 51).

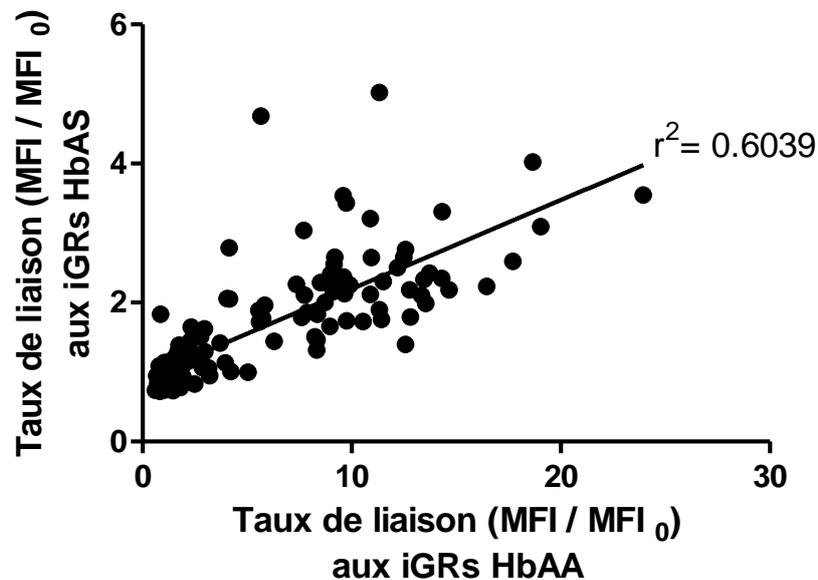


Figure 51. Comparaison du taux de liaison des érythrocytes HbAA et HbAS infectés pour un même plasma. Cette comparaison a été réalisée grâce à un test apparié de Wilcoxon ( $p$ -value  $<10^{-3}$ ,  $n = 140$ ).

Ce test montre que, dans notre sous-cohorte, les iGRs HbAS sont significativement plus faiblement liés par les anticorps d'un même plasma que les iGRs HbAA ( $p$ -value  $<10^{-3}$ ,  $n = 140$ ).

### 3.4.3. Etude de l'inhibition, par les plasmas, de la cytoadhérence à la CSA des érythrocytes HbAA et HbAS infectés selon le polymorphisme érythrocytaire des mères

Nous avons comparé la capacité d'inhibition de cytoadhérence des iGRs HbAA (et non des iGRs HbAS) à la CSA des plasmas de femmes HbAA à celle des plasmas de femmes HbAS.

Nous avons utilisé un modèle de régression linéaire multivarié pour tester l'association entre la cytoadhérence (résultant de l'inhibition de celle-ci par les plasmas) et le

polymorphisme érythrocytaire de la mère (portage d'HbS, du variant G6PD A<sup>-</sup> et de la délétion  $\alpha^{-3,7}$ ) ainsi que la gestité (Tableau 13).

Variables	Cytoadhérence		
	Coefficient	<i>p</i> -value	95% intervalle de confiance
Portage d'HbS	0,008	0,932	-0,172 ; 0,187
Portage du variant G6PD A <sup>-</sup>	-0,034	0,725	-0,227 ; 0,159
Portage de la délétion $\alpha^{-3,7}$	-0,035	0,690	-0,208 ; 0,138
Secondigestité	-0,192	0,190	-0,480 ; 0,096
Multigestité	-0,277	0,005	-0,467 ; -0,088

Tableau 13. **Association entre la cytoadhérence à la CSA des globules rouges HbAA infectés et les différentes variables d'intérêt.** Les *p*-values ont été déterminées grâce à un modèle de régression linéaire multivarié pour l'association entre la cytoadhérence et les différentes variables d'intérêt (portage d'HbS, du variant G6PD A<sup>-</sup>, de la délétion  $\alpha^{-3,7}$  ou gestité) (*n* = 111). Un coefficient de régression positif est associé à une association positive, et un coefficient de régression négatif montre une association négative entre les variables.

Nous n'avons pas observé d'association significative entre les valeurs de cytoadhérence et les portages d'HbS (Figure 52A), du variant G6PD A<sup>-</sup> (Figure 52C) ou de la délétion  $\alpha^{-3,7}$  (Figure 52D).

En revanche, comme préalablement démontré dans des études précédentes<sup>101</sup>, nous avons observé une association significative entre les valeurs de cytoadhérence et la gestité. (Figure 52B). Les coefficients concernant l'association entre la cytoadhérence et la gestité sont négatifs, ce qui signifie que la cytoadhérence diminue lorsque la gestité des femmes dont sont issus les plasmas augmente. Autrement dit, la capacité d'inhibition de cytoadhérence des femmes augmente avec leur taux de gestité.

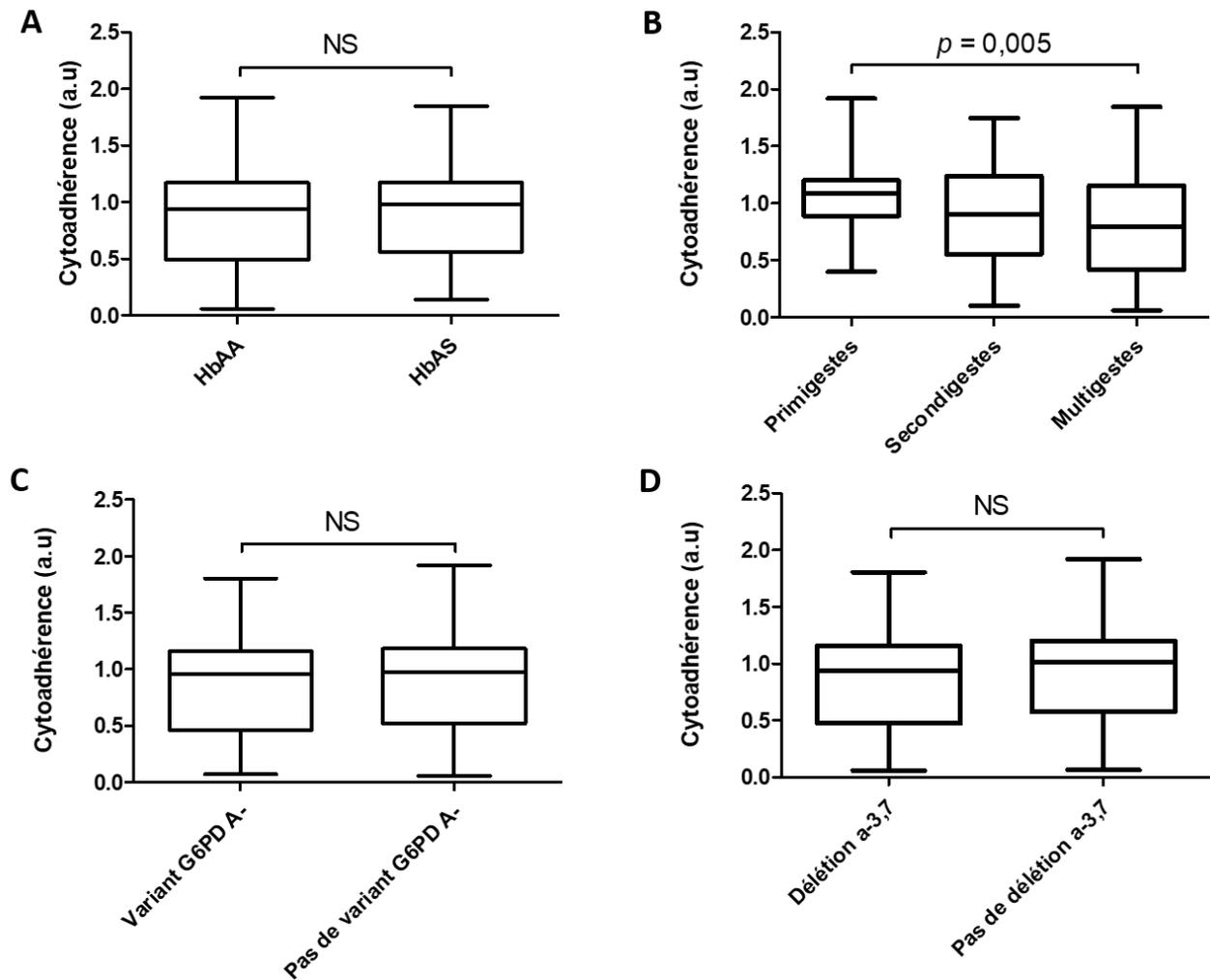


Figure 52. Association entre la cytoadhérence à la CSA des globules rouges HbAA infectés et les différents variables d'intérêt. Les  $p$ -values ont été déterminées grâce à un modèle de régression linéaire multivarié. Les différentes variables d'intérêt utilisées sont le génotype HbS des mères (A), la gestité (B), le portage du variant G6PD A<sup>-</sup> (C) et le portage de la délétion  $\alpha$ <sup>-3,7</sup> (D) (n = 111).

### 3.5. Discussion

Dans le cadre du développement d'un vaccin dirigé contre VAR2CSA afin de prévenir le PAM, la réponse immune anti-VAR2CSA et la capacité inhibitrice de cytoadhérence des anticorps sont aujourd'hui largement étudiées<sup>101,324</sup>. Mais peu d'études s'intéressent aux facteurs génétiques des femmes pouvant influencer cette réponse immune. De plus, bien que la protection conférée par le portage d'HbS contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum* soit connue, peu d'études se focalisent sur l'impact du génotype HbAS dans le cadre du PAM. Une étude récente a montré que les femmes HbAS préalablement immunisées présentent moins de manifestations cliniques en cas de ré-infections que les femmes HbAA préalablement immunisées. Bien que dans le cadre du paludisme simple, cette donnée suggère que le trait drépanocytaire est associé au développement d'une immunité protectrice plus efficace<sup>325</sup>. De plus, une étude précédente a montré que les individus HbAS présentaient un taux de reconnaissance plus important des iGRs que les sujets HbAA<sup>326</sup>.

Nous avons observé un taux de liaison des iGRs HbAS par les plasmas provenant des mères HbAS significativement plus faible que celui des iGRs HbAA par les plasmas des mères HbAA. Cette différence a été observée seulement lorsque les iGRs et les plasmas étaient associés sur le génotype d'Hb de la mère. Nos résultats sont cohérents avec ceux des études précédentes, montrant une augmentation significative du niveau de liaison de la surface des iGRs avec la gestité<sup>101</sup>. Mais contrairement à notre étude, les études précédentes portant sur la réponse immunitaire anti-VAR2CSA s'étaient limitées à l'utilisation d'iGRs HbAA. Ici, nos résultats soulignent l'importance de prendre en compte le génotype Hb des mères dont proviennent les plasmas, et des GRs utilisés pour les expériences réalisées *in vitro*, car la présence d'HbS semble altérer la présentation des antigènes à la surface du iGR.

Nous avons évalué les portages du déficit en G6PD et de l' $\alpha$ -thalassémie avec l'HbS pour notre groupe d'étude. Respectivement, 26,7% et 51,7% des femmes étaient porteuses du variant G6PD A<sup>-</sup> ou de la délétion  $\alpha$ <sup>-3,7</sup>. De plus, 35,4% des femmes HbAA et 37,8% des HbAS de notre étude n'étaient pas porteuses du variant G6PD A<sup>-</sup> ni de la délétion  $\alpha$ <sup>-3,7</sup>. Ceci signifie que le portage d'HbS est majoritairement associé aux co-portages d'autres anomalies génétiques du GR, qui peuvent également conférer une protection contre le paludisme. Cependant, nous avons montré dans ce travail qu'il est important, pour étudier l'influence d'un génotype sur le taux de liaison des plasmas à la surface de iGRs, d'associer les plasmas et les GRs utilisés selon ce même génotype. Ainsi, pour étudier l'impact du déficit en G6PD et de l' $\alpha$ -thalassémie, qui n'ont pas d'influence sur le taux de liaison des iGRs HbAS ici, il

serait nécessaire d'étudier premièrement l'impact de ces deux désordres génétiques séparément, comme nous l'avons fait pour l'HbS. Puis dans un deuxième temps il faudrait rechercher l'influence de ces défauts génétiques co-portés avec l'HbS, en associant les plasmas et les génotypes des érythrocytes infectés. Ces manipulations nécessiteraient donc d'obtenir des GRs HbAA et HbAS porteurs du déficit en G6PD et d' $\alpha$ -thalassémie.

Nous avons observé une capacité d'inhibition de cytoadhérence significativement plus forte pour les plasmas provenant de femmes multigestes par rapport aux femmes primigestes. Ces résultats confirment les données de la littérature<sup>101,102</sup>. Par contre, nous n'avons pas observé de différence significative entre la capacité d'inhibition de cytoadhérence d'iGRs HbAA par les plasmas HbAA et par les plasmas HbAS. Mais ces expériences n'ont été réalisées qu'avec des GRs HbAA. Nous n'avons donc pas pu comparer la capacité d'inhibition de cytoadhérence des iGRs HbAA par les plasmas HbAA à la capacité d'inhibition de cytoadhérence des iGRs HbAS par les plasmas HbAS. Pour réellement étudier l'impact du portage hétérozygote d'HbS sur la capacité d'inhibition de cytoadhérence des anticorps, ces manipulations devraient être réalisées avec des iGRs HbAS, comme nous l'avons fait pour les expériences de reconnaissance immune de la surface érythrocytaire. Cependant, nous avons rencontré plusieurs difficultés pour l'obtention d'iGRs HbAS :

- nous devons trouver un donneur HbAS, n'étant pas porteur du variant G6PD A<sup>-</sup> ni de la délétion  $\alpha$ <sup>-3,7</sup>, et de groupe O, afin d'éviter la reconnaissance des antigènes du groupe sanguin par les plasmas de groupe non AB;

- une fois le donneur prélevé, nous ne disposions pas d'un volume suffisant pour obtenir le nombre d'iGRs nécessaire pour réaliser l'expérience.

Initialement, nous avons aussi prévu de tester l'impact du portage hétérozygote d'HbC sur le taux de liaison des iGRs, et sur la capacité d'inhibition de cytoadhérence des anticorps. En effet, le génotype HbAC confère aussi une protection contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum*<sup>327</sup>, et plusieurs études ont montré un rôle protecteur de ce génotype contre le PAM<sup>226,227</sup>. De plus, Marilou Tétard a identifié 8,8% de femmes HbAC parmi les femmes de la cohorte STOPPAM qu'elle a génotypées<sup>227</sup>, donc nous disposions de plasmas provenant de femmes HbAC. Cependant, nous n'avons jamais trouvé de donneur HbAC n'étant pas porteur du variant G6PD A<sup>-</sup> ni de la délétion  $\alpha$ <sup>-3,7</sup>, et de groupe sanguin O pour réaliser ces expériences.

Le plus faible taux de liaison des iGRs HbAS par les plasmas de femmes HbAS suggère une altération des interactions entre les antigènes et les anticorps. Cette altération pourrait être expliquée par deux hypothèses principales :

-les iGRs HbAS ont une présentation plus faible et/ou anormale des antigènes reconnus par les anticorps des plasmas. De plus, plusieurs études ont montré que les *PfEMP1*<sup>259</sup>, et notamment VAR2CSA<sup>226</sup>, sont anormalement présentés à la surface des iGRs HbAS.

-les femmes HbAS ont un taux plus faible d'anticorps liant les différents antigènes à la surface des iGRs. Plusieurs arguments nous permettent de supposer que le taux de liaison de VAR2CSA est un composant majeur du taux de liaison global des iGRs : (i) VAR2CSA<sup>61,308,309</sup> est le ligand parasite impliqué dans la cytoadhérence des iGRs à la CSA dans le PAM ; (ii) les femmes développent des anticorps anti-VAR2CSA lors de leurs grossesses successives<sup>101,311</sup> ; (iii) Chan *et al.* suggèrent que *PfEMP1* est la cible principale des anticorps anti-VSA<sup>328</sup> ; (iiii) nous avons pu démontrer que le taux de liaison était significativement associée au niveau d'anticorps anti-VAR2CSA. Considérant que le taux de liaison de VAR2CSA représente une part importante du taux de liaison global des iGRs, nous avons donc comparé les taux des anticorps anti-VAR2CSA (mesurés chez les femmes de la cohorte STOPPAM par ELISA dans une étude précédente<sup>101</sup>) entre les femmes HbAA et HbAS. Ces niveaux d'anticorps n'étaient significativement pas différents entre les mères HbAA et HbAS, suggérant que le taux de liaison plus faible des iGRs HbAS par les plasmas HbAS n'est pas dû à un taux moins important d'anticorps reconnaissant VAR2CSA.

Plusieurs études s'étant intéressées au taux d'anticorps anti-*PfEMP1* chez les sujets HbAA et HbAS présentaient des résultats controversés. Ici, nos résultats indiquent que les femmes de notre sous-cohorte ne présentent pas de différence de taux d'anticorps anti-VAR2CSA. Mais nos données suggèrent aussi une altération de la présentation de VAR2CSA à la surface des iGRs HbAS. Il est possible d'imaginer que les anticorps anti-VAR2CSA confèrent une protection plus efficace chez les individus HbAS, car bien que leur niveau soit similaire à ceux des femmes HbAA, ces anticorps ciblent VAR2CSA qui est anormalement présenté à la surface des iGRs HbAS.

L'hypothèse suivante peut donc être formulée : VAR2CSA/*PfEMP1*, ainsi que d'autres antigènes potentiels, sont plus faiblement et/ou anormalement présentés à la surface des iGRs HbAS. Le deuxième projet de cette thèse porte sur l'étude du protéome et du phosphoprotéome de la membrane des GRs HbAA et HbAS infectés par *P. falciparum*. Ainsi, l'impact du portage de l'HbS sur la modulation de la présentation des antigènes à la surface des iGRs a pu être investigué dans cet autre projet. Les résultats de cet autre travail sont décrits dans le deuxième chapitre de ce manuscrit.

## CHAPITRE 2 :

Modulation, par l'hémoglobine S, du  
protéome et du phosphoprotéome de la  
membrane du globule rouge infecté par  
*Plasmodium falciparum*

#### 4.1. Présentation et objectifs du projet

J'ai débuté ce projet avec mon stage de Master 2 portant sur « l'étude de la modulation, par l'HbS, de la phosphorylation des protéines du cytosquelette érythrocytaire », que j'ai continué lors de mon doctorat. En 2017, nous avons soumis en vain nos résultats au journal *Scientific Reports*, qui a notamment estimé que nous disposions d'un nombre insuffisant d'échantillons. Entre temps, nous avons optimisé notre stratégie expérimentale, nous permettant de produire des échantillons en plus grande quantité et de meilleure qualité. Nous avons donc décidé de reprendre les expériences en 2018, afin de produire des données plus robustes. Aujourd'hui, ce projet est presque achevé, et l'article « *Plasmodium falciparum* infection combined with hemoglobin S carriage modifies the proteome and the phosphoproteome of erythrocyte and parasite proteins », est en préparation.

Comme énoncé dans l'introduction, *P. falciparum* modifie fortement sa cellule hôte lors de son développement intra-érythrocytaire. Notamment, le parasite remodèle la membrane de l'hématie afin d'y exposer PfEMP1 dans les knobs, permettant la cytoadhérence du iGR dans les capillaires profonds. La formation des knobs résulte de la mise en place du complexe de cytoadhérence, dans lequel des protéines parasitaires interagissent avec des protéines du cytosquelette et de la membrane du GR<sup>329</sup>. Plusieurs études ont démontré que PfEMP1 était anormalement présenté à la surface des hématies HbAS, en lien avec une réduction de la cytoadhérence de ces hématies parasitées<sup>226,259,262</sup>.

Des anomalies de protéines membranaires érythrocytaires ont été observées dans des atteintes du GR et sont souvent associés à une augmentation du stress oxydant sur ces protéines ou à des perturbations des voies de signalisation intracellulaires tel que l'équilibre kinase/phosphatase<sup>330,331</sup>. Le phosphoprotéome du complexe ankyrine et de la membrane érythrocytaire<sup>332,333</sup> est affecté dans les GRs HbSS. L'altération de la phosphorylation des protéines squelettiques pourrait affecter la déformabilité membranaire, augmenter la fragilité et la rigidité du GR<sup>332</sup>. Plusieurs composants des complexes membranaires sont régulés par la phosphorylation de sérines, thréonines et tyrosines, tels que la Bande 3, l'ankyrine, la spectrine et la protéine 4.1<sup>141,330,334</sup>.

De nombreux mécanismes sont régulés par la phosphorylation lors de la croissance parasitaire<sup>137</sup>, et comme démontré dans l'introduction de cette thèse, la phosphorylation de protéines du squelette membranaire du GR a un rôle régulateur dans la dynamique de la membrane érythrocytaire<sup>330</sup>. En effet, les GRs ne possèdent plus de noyau et donc de régulation génétique, et la régulation des fonctions érythrocytaires s'effectue majoritairement

par les modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation.

Le développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum* induit la modification de l'activité de plusieurs protéines. *P. falciparum* exporte des protéines kinases dans le cytoplasme et au niveau de la membrane du GR, telle qu'une protéine kinase dépendante du calcium<sup>335</sup>. Par contre, *P. falciparum* n'exprime aucune tyrosine kinase classique, seulement des tyrosine kinase-like<sup>336</sup>. Le parasite utilise aussi les kinases du GR afin d'induire des phosphorylations de protéines de la cellule hôte (membranaires et cytosquelettiques) et de ses propres protéines<sup>337</sup>. De plus, les Ser/Thr- kinases érythrocytaires (telles que les caséine kinases (CK) et protéines kinases A (PKA) et C (PKC)) sont activées par la croissance parasitaire<sup>137</sup>, et agissent à la fois sur les protéines parasitaires<sup>338</sup> et érythrocytaires<sup>339</sup>. La maturation du parasite induit ainsi une augmentation des phosphorylations de résidus sérine, thréonine et tyrosine au sein de nombreuses protéines<sup>137</sup>. Egalement des travaux ont montré que l'altération de l'équilibre kinases/phosphatases pourrait influencer la cytoadhérence des iGRs aux récepteurs endothéliaux<sup>340</sup>, l'activité de canaux membranaires<sup>341</sup> et les propriétés mécaniques de la membrane du iGR<sup>342</sup>.

Ainsi, nous avons étudié l'impact du stress oxydant lors de l'infection par *P. falciparum* de GRs HbAS et HbAA sur l'état de phosphorylation des protéines du cytosquelette et de la membrane du GR, ainsi que sur les protéines parasitaires.

L'objectif de ce travail était d'évaluer si l'HbS modulait la quantité de protéines de la membrane des GR et leur phosphorylation, et quels étaient les protéines affectées et les résidus incriminés (Figure 53). Pour cela, nous avons infecté par la souche 3D7 de *P. falciparum* des GRs HbAA et HbAS. Après avoir évalué la réplique parasitaire au sein de ces deux types d'hématies, avec l'aide de Célia DECHAVANNE (UMR 261-MERIT) et Sébastien DECHAVANNE (Equipe 1-UMR\_S 1134 (INTS)), nous avons réalisé des cultures en gros volume afin de récolter des culots érythrocytaires dont la parasitémie était ajustée à 45%. Par lyse douce des GRs récoltés, nous avons obtenu des « ghosts », correspondants aux membranes érythrocytaires auxquelles le cytosquelette est encore attaché. Nous également aussi récupéré les parasites. Tous ces échantillons ont été analysés en spectrométrie de masse (ou « Mass Spectrometry » (MS)) par Chiara GUERRERA, Cérina CHHUON et Joanna LIPECKA du PPN, et en Western-Blot. Nous avons réalisé une analyse comparative et quantitative de la phosphorylation et de la quantité des protéines parasitaires et humaines dans la membrane du GR HbAA et HbAS infecté et non infecté. La plupart des études antérieures s'étant intéressées au phosphoprotéome des GRs infectés par *P. falciparum* étaient en effet que des analyses qualitatives<sup>343</sup>.

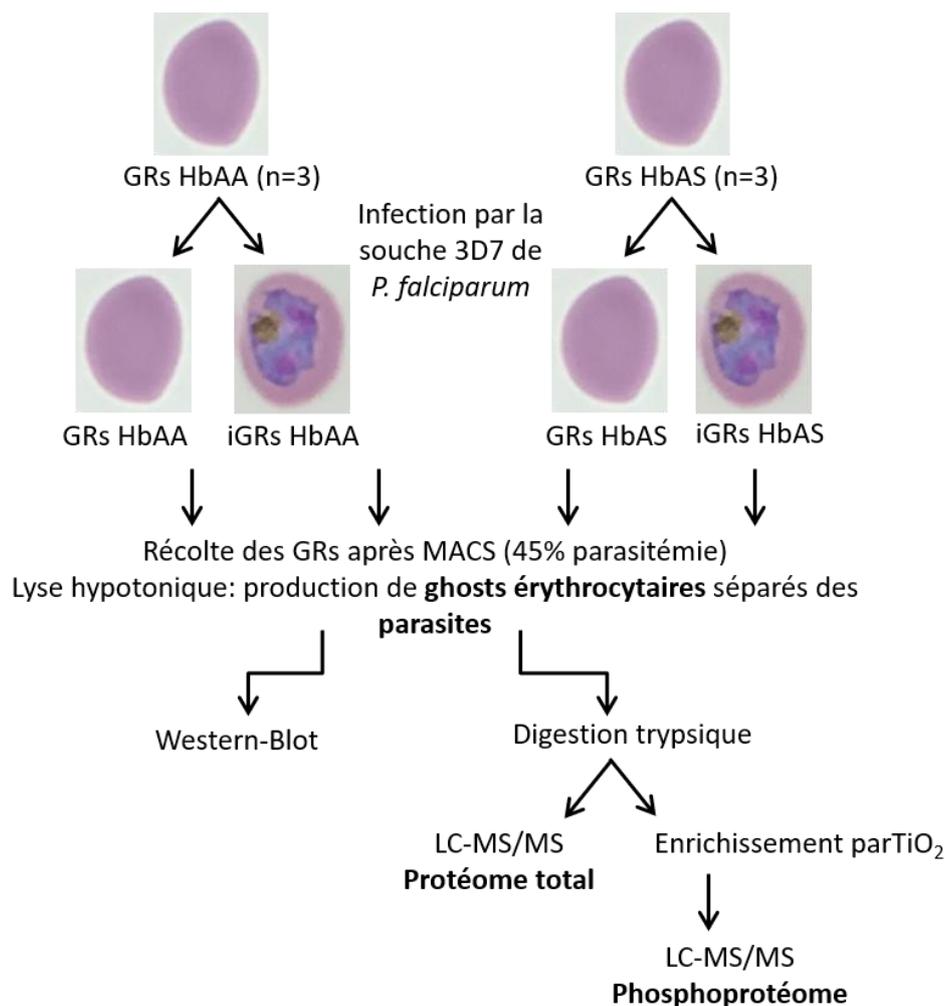


Figure 53. **Schéma expérimental de l'étude du protéome et du phosphoprotéome de la membrane du globule rouge HbAA et HbAS infecté par *P. falciparum*.** Les globules rouges (GRs) de 3 donneurs HbAA et 3 donneurs HbAS ont été infectés par *P. falciparum*. Les ghosts et les parasites ont été obtenus après lyse hypotonique des GRs infectés (iGR), puis analysés en protéomique. Le protéome et le phosphoprotéome de la membrane de ces GRs ont été réalisés par MS.

Ainsi, nous avons pu dresser une liste des protéines de la membrane des GRs dont la quantité et la phosphorylation étaient modulées par l'infection et le génotype HbAS. A partir de ces données, l'objectif était également ensuite d'identifier des mécanismes ou des voies de signalisation nécessaires pour le développement optimal de *P. falciparum* dans le GR. Ce projet avait pour but de mieux caractériser les interactions entre le parasite et sa cellule hôte.

J'ai également collaboré avec Slim AZOUZI, Thierry PEYRARD et Mahmoud MIDKAR de l'équipe 1 de l'UMR\_S 1134 (INTS), dont les recherches s'intéressent aux antigènes du groupe sanguin. Ensemble, nous avons étudié le rôle de protéines ou phosphoprotéines décrites dans nos analyses de MS pour le développement de *P. falciparum*.

## 4.2. Matériels et méthodes

### 4.2.1. Vérification du portage d'anomalies érythrocytaires

Les génotypes d'Hb et de G6PD de tous les donneurs ont été vérifiés par PCR-RFLP selon les mêmes procédures que celles décrites dans le chapitre 1 (pages 99-104). De même, le génotype d' $\alpha$ -thalassémie a été déterminé par PCR multiplexe comme décrit dans le chapitre 1 (pages 104-105).

### 4.2.2. Culture parasitaire de *P. falciparum*

#### 4.2.2.1. Obtention de sang de porteurs d'hémoglobine anormale

Les GRs HbAA et HbAS ont été obtenus, comme pour le projet décrit dans le chapitre 1. Les donneurs ont signé un consentement, en accord avec la déclaration d'Helsinki, et ont été prélevés dans le service de « Biothérapies » à l'hôpital Necker. Les érythrocytes de sept donneurs HbAA (HbAA<sub>1</sub> à HbAA<sub>7</sub>) et de trois donneurs HbAS (HbAS<sub>1</sub> à HbAS<sub>3</sub>) ont été utilisés pour réaliser l'ensemble des expériences présentées dans ce chapitre. Le sexe des individus n'était pas connu pour les donneurs HbAA<sub>6</sub> et HbAA<sub>7</sub>.

Les GRs ont été séparés du plasma après 3 séries de lavages avec du RPMI 1640 après centrifugation à 1500 rpm à TA pendant 5 min. Pour réaliser les études de protéomique et de phosphoprotéomique, nous avons utilisé les GRs de 3 donneurs HbAA et de 3 donneurs HbAS. Les cultures de parasites ont été effectuées en trois fois, en couplant un donneur HbAA avec un donneur HbAS pour chaque expérience (HbAA<sub>1</sub> avec HbAS<sub>1</sub>, HbAA<sub>2</sub> avec HbAS<sub>2</sub>, et HbAA<sub>3</sub> avec HbAS<sub>3</sub>). Les échantillons de ghosts et de parasites ont été réalisés à partir des GRs infectés et non infectés collectés. L'état de phosphorylation des protéines érythrocytaires peut varier selon le temps écoulé après le prélèvement sanguin<sup>344</sup>. Ainsi, pour chaque expérience, les donneurs HbAA et HbAS ont été prélevés le même jour, et le sang traité simultanément pour l'ensemble des procédures. Le schéma expérimental exposé dans la Figure 54 a été appliqué pour toutes les préparations de ghosts et de protéines parasitaires pour l'analyse en MS.

L'ADN a été extrait à partir des leucocytes présents dans le plasma, et utilisé pour les génotypes des différents désordres érythrocytaires.

#### 4.2.2.2. Culture de *P. falciparum* dans les globules rouges HbAA et HbAS

L'infection des GRs HbAS et la culture de *P. falciparum* dans les GRs HbAA et HbAS se sont déroulées comme décrit dans le chapitre 1 pages 105-107.

Lorsque les GRs HbAA et HbAS ont été infectés par *P. falciparum*, les GRs non infectés des donneurs ont été conservés dans les mêmes conditions que les iGRs (en flasque à 5% d'hématocrite en milieu RPAS, à 37°C et dans les conditions atmosphériques des capillaires profonds). Les milieux de culture des GRs infectés et non infectés ont été changés tous les jours. Les cultures ont été diluées en fonction des parasitémies, afin que celles-ci ne dépassent pas 5%. Les iGRs HbAA et HbAS ont été récoltés par MACS après 3 cycles de développement parasite, lorsque les parasites étaient majoritairement aux stades trophozoïtes matures et/ou schizontes, mais avant que les parasites atteignent le stade schizonte âgé ou rosace car une déphosphorylation massive se produit à ce stade de développement<sup>137</sup>. La parasitémie des iGRs collectés par MACS a été ajustée à 45% grâce aux GRs non infectés provenant des mêmes donneurs. Les GRs non-infectés ont aussi été récoltés pour la production de ghosts (Figure 54).

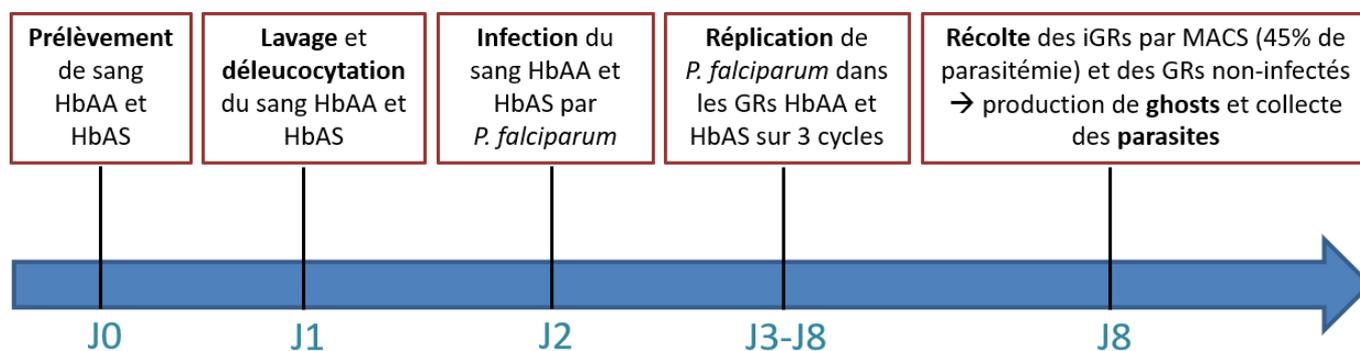


Figure 54. **Procédure de culture de *P. falciparum* dans les globules rouges HbAA et HbAS pour l'analyse en protéomique et en phosphoprotéomique.** Les GRs de 3 donneurs HbAA et 3 donneurs HbAS ont été utilisés. Les échantillons ont été préparés en 3 fois. A chaque expérience, les GRs HbAA et HbAS ont été prélevés le même jour, déleucocytés le lendemain, et infectés le jour suivant par *P. falciparum*. La récolte des GRs HbAA et HbAS infectés et non infectés s'est effectuée après 3 cycles de multiplication, et lorsque les parasites étaient au stade trophozoïtes matures/schizontes.

#### 4.2.2.3. Suivi de la croissance parasite par cytométrie en flux

Le suivi de parasitémie, en plus de la lecture des frottis sanguins, a été réalisé par cytométrie en flux, selon une méthode adaptée de Grimberg *et al.*<sup>345</sup>. Cette technique permet de déterminer la parasitémie et les stades parasites en marquant l'ADN au Hoechst (HO) (1 µg/ml dans du PBS) et l'ARN au Thiazole Orange (TO). Ici, nous avons utilisé la solution « BD Retic-Count<sup>TM</sup> » (*BD Bioscience*) (contenant 10 µg/ml de TO dans du PBS-0,1%

d'azide de sodium). Seuls les GRs parasités contiennent de l'ADN. La parasitémie correspond donc au pourcentage de cellules positives pour le marquage HO. Le double marquage HO-TO permet de distinguer les différents stades parasitaires. Les rings contiennent seulement de l'ADN. La quantité d'ADN détectée à ce stade peut varier selon le nombre de rings présents dans les GRs. Au stade jeune trophozoïte, les parasites commencent à activer leur métabolisme et à accumuler de l'ARN, mais ils ne répliquent pas encore leur ADN. Après 24h, les parasites aux stades trophozoïtes matures commencent à répliquer leur ADN. Les quantités d'ADN et d'ARN continuent d'augmenter lorsque les parasites atteignent le stade schizonte. Enfin, à la fin du cycle intra-érythrocytaire, la synthèse d'ADN s'arrête. Les parasites sont au stade rosace, prêt à lyser le globule rouge pour libérer les nouveaux mérozoïtes. Les iGRs présentent alors le marquage HO maximal (Figure 55).

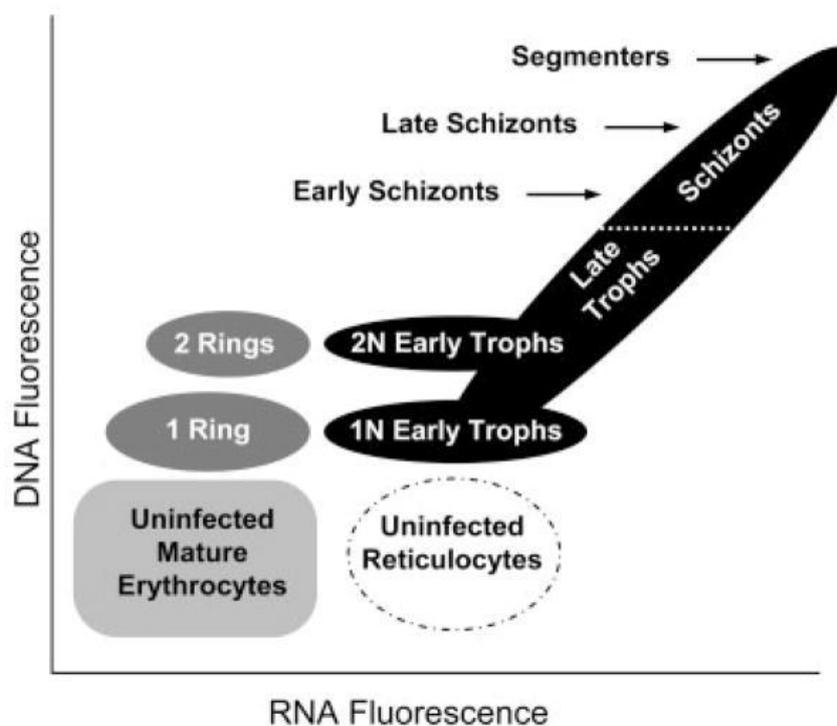


Figure 55. **Représentation théorique des différents stades du cycle intra-érythrocytaire de *P. falciparum* selon leur marquage HO-TO.** Les GRs non infectés (« uninfected erythrocytes ») ne sont pas marqués par le HO. Le double marquage HO-TO permet de différencier les stades parasitaires. Au stade ring, les parasites possèdent de l'ADN, mais leur métabolisme n'est pas encore actif. Ils sont donc positifs pour le marquage HO mais négatifs pour le marquage TO. Le marquage HO peut varier en intensité selon le nombre de parasites dans les GRs. Les jeunes trophozoïtes (« Early Trophs ») commencent à synthétiser de l'ARN, dont la quantité augmente. Aux stades trophozoïtes matures (« Late Trophs ») et schizontes (« Schizonts »), les parasites répliquent leur ADN dont la quantité augmente de 7 à 24 fois. Lorsque les parasites ont terminé leur répllication d'ADN, ils sont au stade rosace (« Segmenters ») (Grimberg *et al.*, 2008<sup>345</sup>).

Afin de réaliser ces marquages, 100 µl de culture resuspendue ont été prélevés lors des changements de milieu, puis centrifugés à 1500 rpm pendant 5 min à TA. Le culot

érythrocytaire a été resuspendu dans 200 µl de PBS-PFA 1%. Après 30 min d'incubation à TA et centrifugation à 1500 rpm pendant 5 min à TA, les GRs ont été resuspendus dans du PBS, puis disposés en plaque 96 puits (10<sup>11</sup> GRs par puits). La plaque a été centrifugée à 1500 rpm pendant 5 min à TA. Puis les GRs ont été marqués au HO (1µg/ml dans du PBS), au TO (5 µg/ml dans du PBS) ou par la combinaison HO-TO. Chaque mesure a été réalisée en duplicat. Après 45 min d'incubation à 37°C dans l'obscurité, les plaques ont été analysées en cytométrie en flux (FACS Canto II BD). Les moyennes de fluorescence des populations positives pour le marquage HO, représentant la parasitémie totale, ont été extraites grâce au logiciel FlowJo. Une culture de iGRs asynchrone a été utilisée pour déterminer les populations des différents stades parasitaires. Ainsi, les proportions des différents stades parasitaires pour chaque condition testée ont pu être mesurées.

#### 4.2.3. Préparation des extraits membranaires de globules rouges infectés par *P. falciparum*

##### 4.2.3.1. Préparation des ghosts érythrocytaires

Les ghosts érythrocytaires (correspondant aux membranes et aux cytosquelettes érythrocytaires) des GRs infectés et non infectés HbAA et HbAS ont été obtenus par lyse hypotonique à 4°C selon un protocole adapté d'Azouzi *et al.*<sup>346</sup>. Les GRs ont été lavés 3 fois avec du PBS par centrifugation à 1500 rpm à TA pendant 5 min. Les culots érythrocytaires ont ensuite été resuspendus dans 10 volumes de tampon de lyse (5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (*Sigma-Aldrich*), 0,35 mM ÉthylèneDiamineTétraAcétique EDTA (*Sigma-Aldrich*), pH 8 avec des inhibiteurs de protéases (*Roche Diagnostics*) et de phosphatases (*Sigma-Aldrich*)). Après 5 min d'incubation à 4°C, les solutions ont été centrifugées à 15 000 rpm pendant 20 min à 4°C. Pour les échantillons infectés, les membranes et les parasites ont été séparés. Les membranes et les parasites ont ensuite été lavés avec le tampon de lyse jusqu'à obtention d'un surnageant translucide ne contenant plus d'Hb. Les culots secs de ghosts et de parasites ont ensuite été conservés à -80°C.

##### 4.2.3.2. Préparation des lysats érythrocytaires

Les ghosts et les parasites ont été lysés par le tampon d'extraction suivant : 1% NP40 (*Sigma-Aldrich*), 1% Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) (*Fluka*), 30 mM Tris pH 8 (*Sigma-Aldrich*), 1 mM EDTA, pH 8 avec des inhibiteurs de protéases (*Roche Diagnostics*) et de phosphatases (*Sigma-Aldrich*). Une étape supplémentaire de sonication a été réalisée pour l'obtention de lysats des protéines parasitaires. Les concentrations protéiques ont ensuite été

déterminées par dosage colorimétrique basé sur l'acide bicinchoninique (ou Bi-Cinchoninic Assay (BCA)) (Micro BCA™ Protein Assay Kit, *ThermoFischer Scientific*), en mesurant l'absorbance à 562 nm. Les lysats parasitaires ont été conservés à -80°C.

#### 4.2.4. Etude protéomique des lysats par Western-Blot

20 µg de lysats mélangés avec du tampon de charge 5X (1,25 mM sucrose, 20% SDS, 250 mM Tris-HCl, 25% β-mercaptoéthanol, 1% bleu de bromophénol blue, pH 6,8) ont été chauffés à 70°C pendant 10 min puis déposés sur gel de polyacrylamide gradient 4-12% (*Life technologies*). Cinq µL de marqueur de poids moléculaire (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa*) ont aussi été déposés. Les protéines ont été séparées en SDS-PAGE en conditions réductrices dans du tampon MOPS (*Life Technologies*) à 150V.

Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose grâce au kit Transblot (Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit, *BioRad*). Après transfert, la membrane a été saturée dans du « Tris Buffered Saline » (TBS)-BSA 5% pendant 45 min sous agitation à 37°C. Puis la membrane a été incubée avec les anticorps primaires (anticorps anti-Bande 3 monoclonal 1/20 000 (souris) (*Sigma-Aldrich*), anticorps anti-pY<sup>21</sup> Bande 3 polyclonal 1/1000 (*Abcam*), anticorps anti-pY<sup>359</sup> Bande 3 polyclonal 1/1000 (*Abcam*), anticorps anti-p55 (lapin) (anticorps préparé à l'INTS) 1/10 000) dilués dans du TBS-BSA 5% sur la nuit à 4°C sous agitation (sauf pour l'anticorps anti-Bande 3 pour lequel l'incubation a été réalisée à TA pendant 1h). Le lendemain, après 3 lavages avec du TBS–Tween 20 0,5% pendant 10 min à TA sous agitation, la membrane a été incubée avec les anticorps secondaires appropriés conjugués à la « Horse Raddish Peroxydase » (HRP) (anticorps anti-lapin polyclonal (chèvre) 1/5000 (*Jackson ImmunoResearch (Interchim)*), anticorps anti-souris polyclonal (chèvre) 1/5000 (*Jackson ImmunoResearch (Interchim)*) dilués dans du TBS–BSA 5%. Après 3 lavages avec du TBS–Tween 20 0,5% pendant 10 min à TA sous agitation, la membrane a été révélée grâce au kit « ElectroChemiLuminescence (ECL) Plus Western blotting detection system » (*Amersham Bioscience*).

#### 4.2.5. Etude des protéines par spectrométrie de masse

La préparation des échantillons pour leur analyse en MS a été réalisée en utilisant la méthode « Filter Aided Sample Preparation » (FASP) de Lipecka *et al.*<sup>347</sup>. Pour chaque condition analysée, 100 µg de protéines de ghosts érythrocytaires ou de protéines parasitaires ont été utilisées. Brièvement, les protéines ont premièrement été solubilisées dans du SDS 2%

pH 7,5 pendant 5 min à 95°C, puis les ponts disulfures ont été réduits par du Dithiothréitol (DTT) 0,1M (*Sigma-Aldrich*) pendant 1h à 60°C. Ensuite, les protéines ont été digérées par la trypsine en chambre humide à 37°C pendant 18h.

10% des peptides obtenus ont été conservés pour l'étude protéomique des échantillons, et le reste utilisé pour la phosphoprotéomique. Les protéines digérées ont été déposées sur chromatographie d'affinité de Dioxyde de Titane (TiO<sub>2</sub>), permettant de retenir les peptides phosphorylés sur les Ser, Thr et Tyr (3 mg/200 µL, Titansphere PHOS-TiO (*GL Sciences Inc*)).

Les phosphopeptides ont été analysés par MS selon une méthode de Meijer *et al*<sup>348</sup>. Les peptides et les phosphopeptides ont premièrement été séparés par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC) (0,075 mm ID, Acclaim PepMap 100, C18, 2 µm) (*Thermo Scientific*) puis analysés en ligne sur un spectromètre de masse nanoRSLC (Rapid Separation Liquid Chromatography) - Q Exactive Plus (RSLC Ultimate 3000) (*Thermo Scientific*). Avec une source électrospray, les analytes ont été chargés puis libérés en phase gazeuse. Les ions ont ensuite été accélérés par une différence de potentiel puis séparés sous vide selon leur rapport masse/charge (m/z) dans un analyseur de type Orbitrap (spectre MS). Les ions correspondant aux différents peptides ont été détectés, isolés et fragmentés par la cellule de collision. Ces fragments sont aussi séparés sous vide selon leur rapport m/z afin d'identifier la séquence de chaque peptide et de quantifier les protéines correspondantes.

L'identification et la quantification des protéines ont été réalisées avec le logiciel MaxQuant (version 1.5.8.3). Les peptides ont été comparés aux bases de données Swissprot et PlasmoDB 8.1 pour l'identification de protéines humaines et parasitaires. Le « False Discovery Rate » (FDR) (taux de faux positif) a été ajusté à 1%. Les scores ont été calculés comme précédemment décrit<sup>349</sup>. Nous avons réalisé une quantification sans marquage ou « Label-Free Quantification » (LFQ). Les protéines ont été quantifiées selon l'algorithme de Max-Quant « Label-Free » en utilisant les intensités LFQ. La quantification des protéines a été réalisée avec au moins un peptide par protéine. Les phosphopeptides ont été quantifiés selon l'intensité détectée.

L'analyse statistique et bioinformatique a été réalisée avec le logiciel Perseus (version 1.6.0.7)<sup>351</sup>. Pour la comparaison statistique du protéome des ghosts, nous avons séparé les échantillons en 4 groupes : niHbAA, iHbAA, niHbAS, iHbAS (ni: non infectés et i: infectés). Chaque groupe contient 3 réplicats biologiques (correspondant aux trois donneurs HbAA et HbAS différents). Chaque échantillon a été analysé en triplicat technique. Pour l'analyse du protéome de ghosts total, les intensités LFQ des protéines ont été transformées en

$\log_2$ . Les protéines humaines et parasitaires ont été séparées afin de sélectionner les protéines érythrocytaires. Des données ont été imputées pour les valeurs manquantes (car se situant en dessous du seuil de détection) en créant une distribution gaussienne afin de simuler les valeurs de faible signal. Un test ANOVA a été réalisé ( $p$ -value  $<0.01$ ,  $S0=0.1$ ).

Pour l'analyse de phosphopeptides, après avoir transformé les intensités en  $\log_2$ , les phosphopeptides ont été séparés selon l'origine des protéines correspondantes, humaines ou parasitaires. Seuls les phosphosites dont la probabilité de localisation était au moins de 0,75 ont été retenus. Des valeurs ont été imputées aux données manquantes comme pour l'analyse protéomique. Pour les phosphosites des protéines érythrocytaires, un test ANOVA a été réalisé pour comparer les 4 groupes : niHbAA, iHbAA, niHbAS, iHbAS ( $p$ -value  $<0.05$ ,  $S0=0.1$ ). Pour évaluer simultanément l'influence du génotype HbAS et de l'infection, nous avons effectué un test ANOVA double ( $p$ -value d'interaction  $<0.05$ ).

Pour les phosphosites des protéines parasitaires, un test- $t$  de Student a été réalisé pour comparer les groupes iHbAA et iHbAS (FDR  $<0.05$ ,  $S0=0.5$ ).

### 4.3. Résultats

#### 4.3.1. Génotypages d'hémoglobine, G6PD et alpha-thalassémie des donneurs

Nous avons vérifié le génotype d'Hb des donneurs (Figure 56). Les donneurs contrôles sont bien HbAA et les donneurs porteurs d'Hb anormale sont bien HbAS.

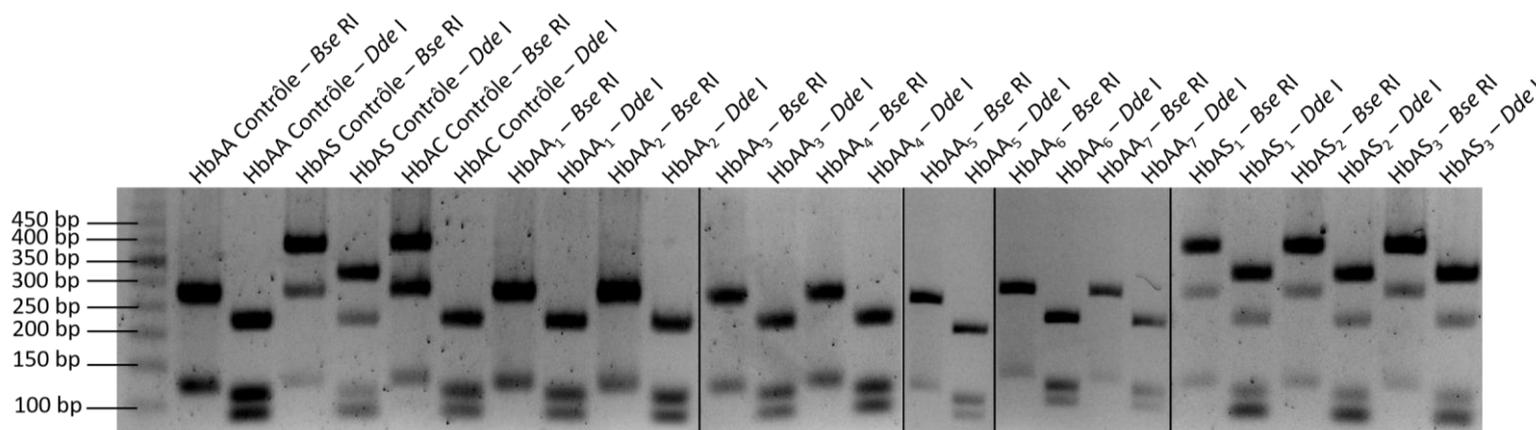


Figure 56. **Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique des fragments de 369 pb du gène de la  $\beta$ -globine pour la vérification du génotype d'hémoglobine des donneurs.** Les fragments amplifiés puis digérés ont été séparés sur gel d'agarose 2%. L'ADN de témoins HbAA (pistes 2 et 3), HbAS (pistes 4 et 5) et HbAC (pistes 6 et 7) ont été utilisés pour comparer leur profil à celui des donneurs HbAA (pistes 8 à 21) et HbAS (piste 22 à 27) après digestion par *Bse* RI et *Dde* I. La taille des fragments a été déterminée grâce au marqueur de taille 50 pb (*Invitrogen*) (piste 1).

Nous avons aussi déterminé le génotype G6PD (Figure 57 et 58) et  $\alpha$ -thalassémie des donneurs (Figure 59). Les donneurs HbAA sont tous G6PD B (pour les femmes) ou BB (pour les hommes), ainsi que le donneur HbAS<sub>1</sub> (G6PD B). Par contre le donneur HbAS<sub>2</sub> est G6PD AA et le donneur HbAS<sub>3</sub> G6PD AB (Figure 57).

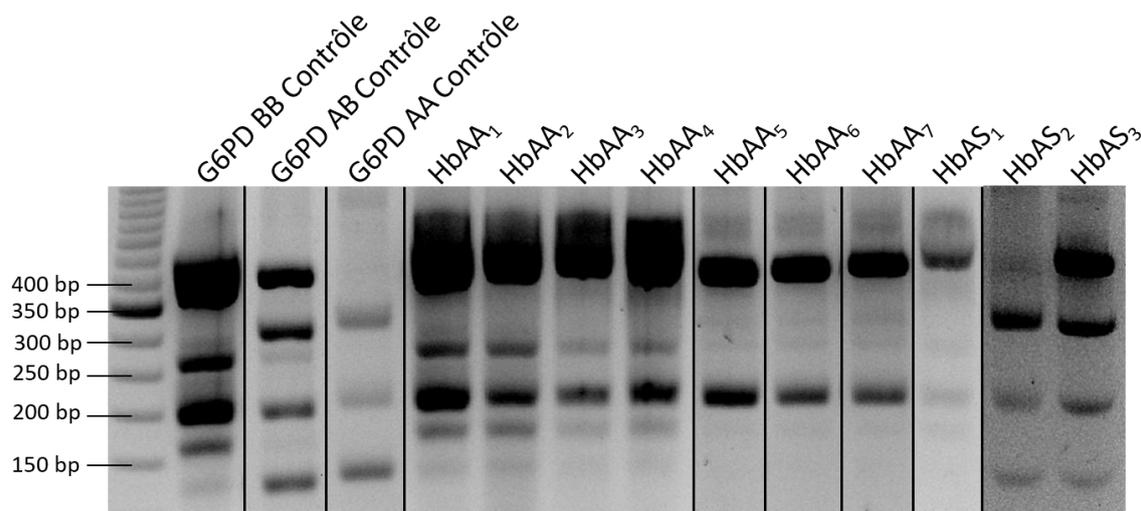


Figure 57. Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique des fragments de 585 pb du gène *g6pd* pour la détermination du génotype G6PD des donneurs. Les fragments amplifiés puis digérés par *Fok I* ont été séparés sur gel d'agarose 2%. Les profils de témoins G6PD BB (piste 2), G6PD AB (piste 3) et G6PD AA (piste 4) ont été comparés à celui des donneurs HbAA (pistes 5 à 11) et des donneurs HbAS (pistes 12 à 14). La taille des fragments a été déterminée grâce au marqueur de taille 50 pb (*Invitrogen*) (piste 1).

Les donneurs HbAS<sub>2</sub> et HbAS<sub>3</sub> ont ensuite été génotypés pour les mutations additionnelles G202A et T968C à l'origine du variant A<sup>-</sup> (Figure 58).

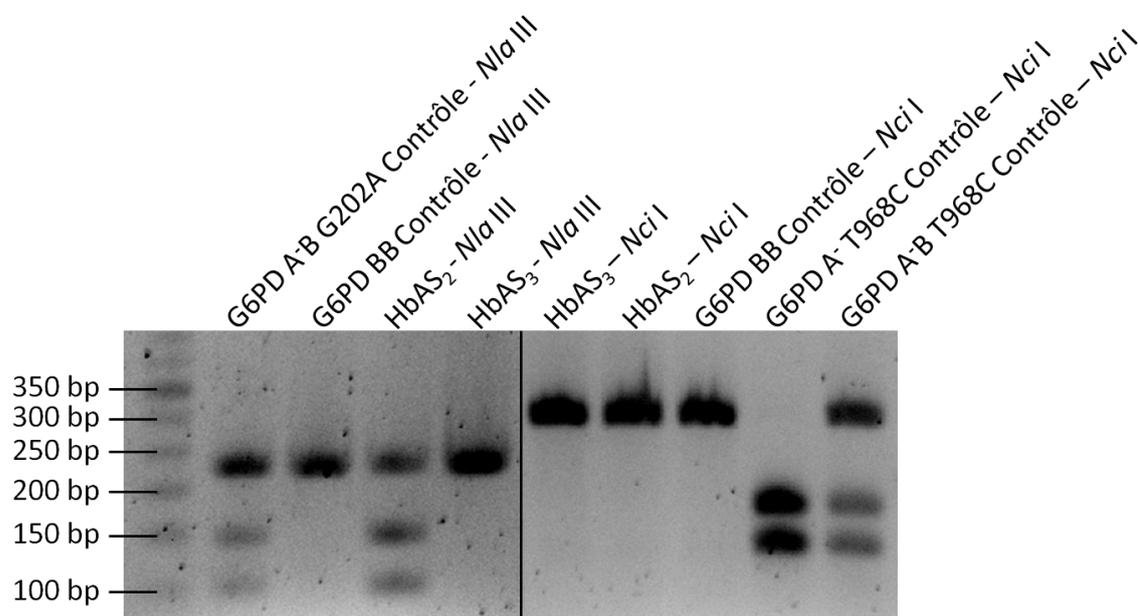


Figure 58. Profil de bandes obtenues après digestion enzymatique pour la recherche des mutations G202A (A) et T968C (B) pour les donneurs HbAS<sub>2</sub> et HbAS<sub>3</sub>. Les fragments amplifiés puis digérés par *Nla III* (pistes 2 à 5) et *Nci I* (pistes 6 à 10) ont été séparés sur gel d'agarose 2%. La taille des fragments a été déterminée grâce au marqueur de taille 100 pb (*Invitrogen*) (piste 1).

Le donneur HbAS<sub>2</sub> est porteur hétérozygote de la mutation G202A. Il est donc G6PD A<sup>-</sup> A. Le donneur HbAS<sub>3</sub> ne porte ni la mutation G202 ni T968C. Il est donc G6PD AB.

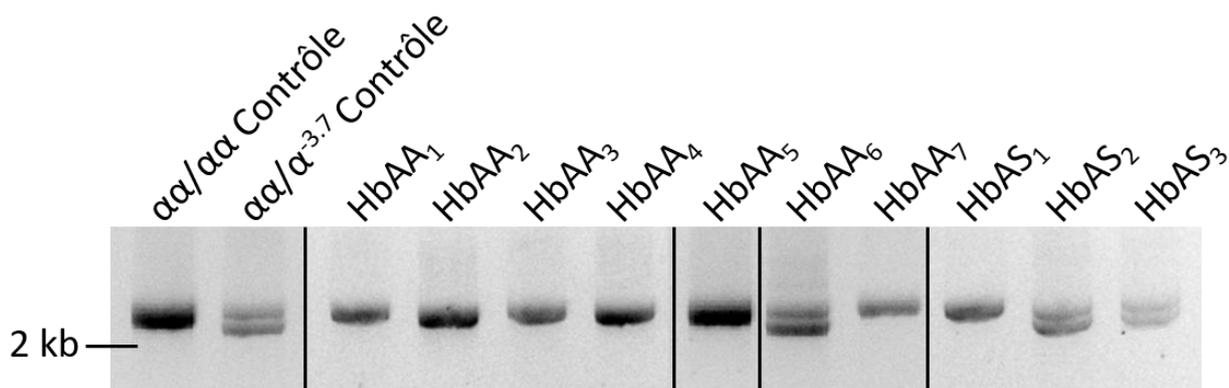


Figure 59. Profil de bandes obtenues après amplification par PCR multiplexe des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour la détermination du génotype alpha-thalassémie des donneurs. Les fragments amplifiés ont été séparés sur gel d'agarose 1,5%. L'ADN de témoins  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$  (piste 1) et  $\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$  (piste 2) a été utilisé pour comparer leur profil à celui des donneurs HbAA (pistes 3 à 9) HbAS (piste 10 à 12). La taille des fragments a été déterminée par comparaison au marqueur de taille 1 kb+ (*Invitrogen*).

Pour l' $\alpha$ -thalassémie, les donneurs HbAA<sub>1</sub>, HbAA<sub>2</sub>, HbAA<sub>3</sub>, HbAA<sub>4</sub>, HbAA<sub>5</sub>, HbAA<sub>7</sub> et le donneur HbAS<sub>1</sub> sont  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ . Les donneurs HbAA<sub>6</sub>, HbAS<sub>2</sub> et HbAS<sub>3</sub> sont  $\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$ .

Les différents génotypes des donneurs sont résumés dans le Tableau 14.

	HbAA <sub>1</sub>	HbAA <sub>2</sub>	HbAA <sub>3</sub>	HbAA <sub>4</sub>	HbAA <sub>5</sub>	HbAA <sub>6</sub>	HbAA <sub>7</sub>	HbAS <sub>1</sub>	HbAS <sub>2</sub>	HbAS <sub>3</sub>
<b>G6PD</b>	BB	B	BB	B	B	B ou BB	B ou BB	B	A <sup>-</sup> A	AB
<b><math>\alpha</math>-thalassémie</b>	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$	$\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$
<b>Sexe</b>	F	M	F	M	M	?	?	M	F	F

Tableau 14. Génotypes G6PD et alpha-thalassémie des donneurs HbAA et HbAS. Le sexe, féminin (F) ou masculin (M) des donneurs a été indiqué. Lorsque celui-ci était inconnu, il a été noté « ? ». Le gène codant l'enzyme G6PD est porté par un chromosome sexuel. Ne connaissant pas le sexe des donneurs HbAA<sub>6</sub> et HbAA<sub>7</sub>, il n'a pas été possible de déterminer s'ils étaient G6PD B ou BB.

#### 4.3.2. Comparaison de la croissance de *P. falciparum* dans les hématies HbAA et HbAS

Lors d'expériences préliminaires, nous avons suivi le développement de *P. falciparum* dans les GRs HbAA et HbAS. La lecture des frottis semblait indiquer un léger retard de croissance des parasites au sein des érythrocytes HbAS.

Ainsi, nous avons comparé la croissance de la souche 3D7 de *P. falciparum* dans les GRs HbAA et HbAS sur 3 cycles par cytométrie en flux. La réplication parasitaire a été suivie en mesurant le pourcentage de cellules positives pour le marquage HO, nous permettant d'évaluer la parasitémie. Nous avons infecté à J0 simultanément les GRs provenant de deux donneurs HbAA (HbAA<sub>5</sub> and HbAA<sub>6</sub>) et de deux donneurs HbAS (HbAS<sub>1</sub> and HbAS<sub>2</sub>). La parasitémie à J0 a été mesurée pour chaque condition. Toutes les mesures de parasitémies réalisées au cours des 3 cycles ont été rapportées par rapport à celle établie à J0, afin de

normaliser les différences initiales. Enfin, chaque valeur a été multipliée par le taux de dilution de la culture (au moment de la mesure), afin d'établir un taux de multiplication parasitaire. Les taux de multiplication de *P. falciparum* dans les GRs HbAA et HbAS ont été comparés sur 3 cycles (Figure 60).

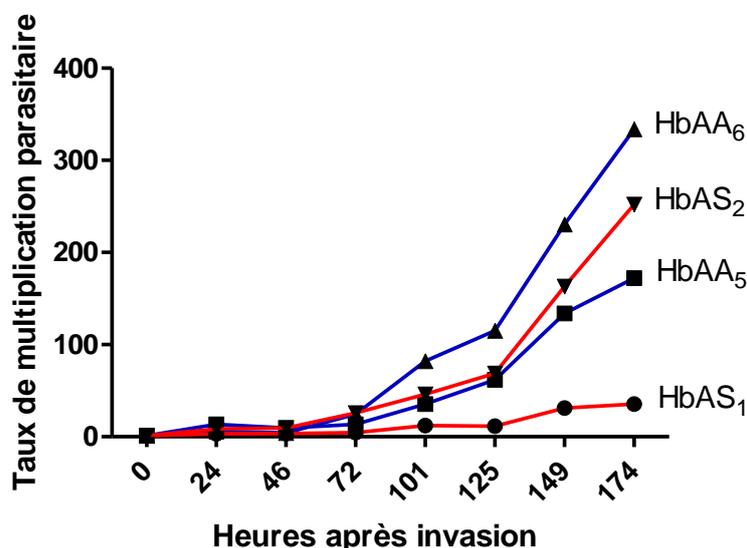


Figure 60. Taux de réplication de *P. falciparum* dans les globules rouges HbAA et HbAS au cours de trois cycles de développement intra-érythrocytaire. A J0, les GRs provenant de deux donneurs HbAA (courbes bleues) et deux donneurs HbAS (courbes rouges) ont été infectés par la souche 3D7 de *P. falciparum* après MACS. Les parasitémies de chaque culture ont été déterminées par mesure du pourcentage de cellules positives pour le marquage HO. Les taux de réplication correspondent à la valeur de parasitémie rapportée à celle évaluée à J0, le tout multiplié par le taux de dilution de la culture au moment de la mesure.

Les parasites se sont bien multipliés dans les GRs des donneurs HbAA<sub>5</sub>, HbAA<sub>6</sub> et HbAS<sub>2</sub>, mais présentent un plus faible taux de réplication dans les hématies du donneur HbAS<sub>1</sub>. Etant limités par le nombre d'échantillons, nous n'avons pas pu conclure sur l'effet du génotype HbAS sur la croissance de *P. falciparum*. De plus, des différences sont aussi observées au sein du groupe HbAA, résultant probablement de la variation inter-individuelle.

Nous avons aussi comparé les proportions des différents stades parasitaires au cours de cette étude. Nous n'avons pas observé de différence lors des deux premiers cycles de développement entre les parasites se développant dans des hématies HbAA ou HbAS (Figure 61A et B). Mais à 125h (troisième cycle), un léger retard de développement des parasites semble être détecté dans les hématies HbAS. En effet, dans les érythrocytes HbAA, 50% des parasites sont des rings ou des jeunes trophozoïtes, et près de 40% sont des trophozoïtes matures. Par contre, la majorité des parasites sont des rings ou des jeunes trophozoïtes dans les GRs HbAS (Figure 61C). Ainsi, *P. falciparum* semble présenter un retard de croissance dans les GRs HbAS à partir du troisième cycle de développement.

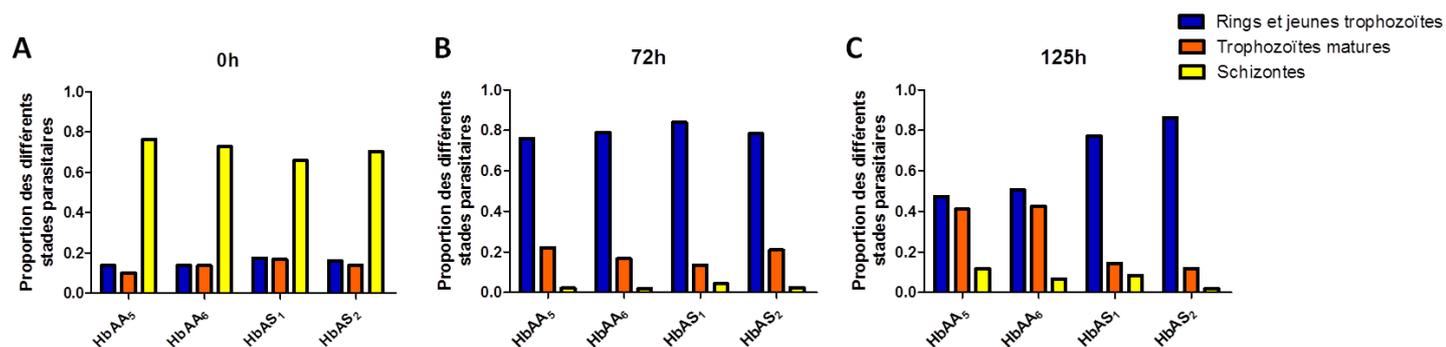


Figure 61. **Proportions des différents stades parasitaires dans les érythrocytes HbAA et HbAS au cours de trois cycles de développement intra-érythrocytaire.** A J0, les GRs provenant de deux donneurs HbAA et deux donneurs HbAS ont été infectés par la souche 3D7 de *P. falciparum*. Les différents stades parasitaires ont été déterminés en cytométrie en flux en fonction du double marquage HO et TO. A 0h, les parasites, collectés après MACS, sont majoritairement des schizontes (A). A 72h, au début du deuxième cycle de développement, les parasites sont principalement des rings ou des jeunes trophozoïtes (B). A 125h, lors du troisième cycle, les parasites sont majoritairement des rings et des jeunes trophozoïtes dans les GRs HbAS RBCs, mais aussi des trophozoïtes matures dans les érythrocytes HbAA (C).

Nous avons effectué nos expériences de protéomique et de phosphoprotéomique après 3 cycles de développement intra-érythrocytaire, moment à partir duquel nous avons observé une différence de développement parasite dans les GRs HbAS par rapport aux GRs HbAA en cytométrie en flux. Ayant également observé ce retard de croissance dans les érythrocytes HbAS lors du suivi sur frottis parasitaires, nous avons collecté les iGRs HbAA 2 à 4 heures avant les iGRs HbAS, afin de réaliser les expériences avec des parasites de stades équivalents.

#### 4.3.3. Protéome et phosphoprotéome de la membrane des érythrocytes en fonction de l'infection par *P. falciparum* et du portage hétérozygote de l'HbS

En collaboration avec le PPN, nous avons établi le protéome et le phosphoprotéome des protéines érythrocytaires et parasitaires de la membrane du GR HbAA et HbAS infecté. Pour ces expériences, nous disposons de 3 donneurs HbAA (HbAA<sub>1</sub>, HbAA<sub>2</sub> et HbAA<sub>3</sub>) et de 3 donneurs HbAS (HbAS<sub>1</sub>, HbAS<sub>2</sub>, et HbAS<sub>3</sub>), répartis en 4 groupes : niHbAA, iHbAA, niHbAS, iHbAS. La quantité des protéines et les intensités de phosphorylation ont été comparées entre ces différents groupes pour chaque analyse.

Par souci d'homogénéité d'écriture, les différents profils ont été appelés « groupes » (traduction de « cluster »), bien que certains ne comprennent qu'une seule protéine ou qu'un seul site.

L'analyse protéomique a identifié 1438 protéines au total, dont 910 d'origine humaine (65%) et 528 parasitaires (35%).

#### 4.3.3.1. Protéome des protéines érythrocytaires de la membrane du globule rouge HbAA et HbAS non infecté et infecté par *P. falciparum*

En effectuant un test ANOVA, nous avons observé des différences significatives concernant la quantité de 35 protéines érythrocytaires ( $p$ -value <0,05). Ces protéines peuvent être séparées en 6 groupes selon leur profil de variation dans les différents échantillons (Figure 62).

Deux groupes sont composés de protéines dont la quantité varie selon l'infection. Le groupe 6 inclut 12 protéines qui sont plus fortement détectées dans les échantillons infectés :

- « Heat shock cognate 71 kDa protein »
- « Nuclear transport factor 2 »
- « Glutathione S-transferase omega-1 »
- « Lactoylglutathione lyase »
- « Triosephosphate isomerase »
- « Peroxiredoxin-6 »
- « Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog »
- « Carbonic anhydrase »
- « Protein deglycase DJ-1 »
- « BolA-like protein 2 »
- « Chloride intracellular channel protein 1 »
- « Acylphosphatase-1 »

Le groupe 3 comprend 16 protéines qui sont plus fortement retrouvées dans les membranes non infectées :

- « Rab GDP dissociation inhibitor  $\beta$  »
- « Peptidyl-propyl cis-trans isomerase FKBP3 »
- « Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 »
- « Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic, N-terminally processed »
- « Mitogen-activated protein kinase 1 »
- « Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5 »
- « Ribosome maturation protein SBDS »
- « IST1 homolog »
- « Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 »
- « Dynamin-2 »
- « Polypyrimidine tract-binding protein 1 »
- « Fructosamine-3-kinase »

- « Arginase-1 »
- « Charged multivesicular body protein 1b »
- « Charged multivesicular body protein 2a »
- « Synaptobrevin homolog YKT6 »

Deux autres groupes comprennent des protéines dont la quantité change selon le statut d'Hb. Le groupe 1 est composé de la protéine « Lysophospholipid acyltransferase 5 » qui est plus fortement détectée dans les ghosts HbAS. Le groupe 4 inclut 3 protéines qui sont moins détectées dans les ghosts HbAS :

- « ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 1 »
- « Atypical chemokine receptor 1 » (aussi connu sous le nom d'antigène Duffy)
- « Basal cell adhesion molecule ».

Enfin, les deux derniers groupes sont composés de 3 protéines dont la quantité varie à la fois en fonction de l'infection à *P. falciparum* et du portage hétérozygote d'HbS. Le groupe 2 est composé de la protéine « Protein lin-7 homolog C ; Protein lin-7 homolog A » qui est moins fortement détectée dans les ghosts des GRs HbAA non infectés. Le groupe 5 contient deux protéines qui sont plus fortement détectées dans les échantillons HbAA infectés :

- « Heme-binding protein 1 » (HEBP1)
- « UPF0687 protein C20orf27 »

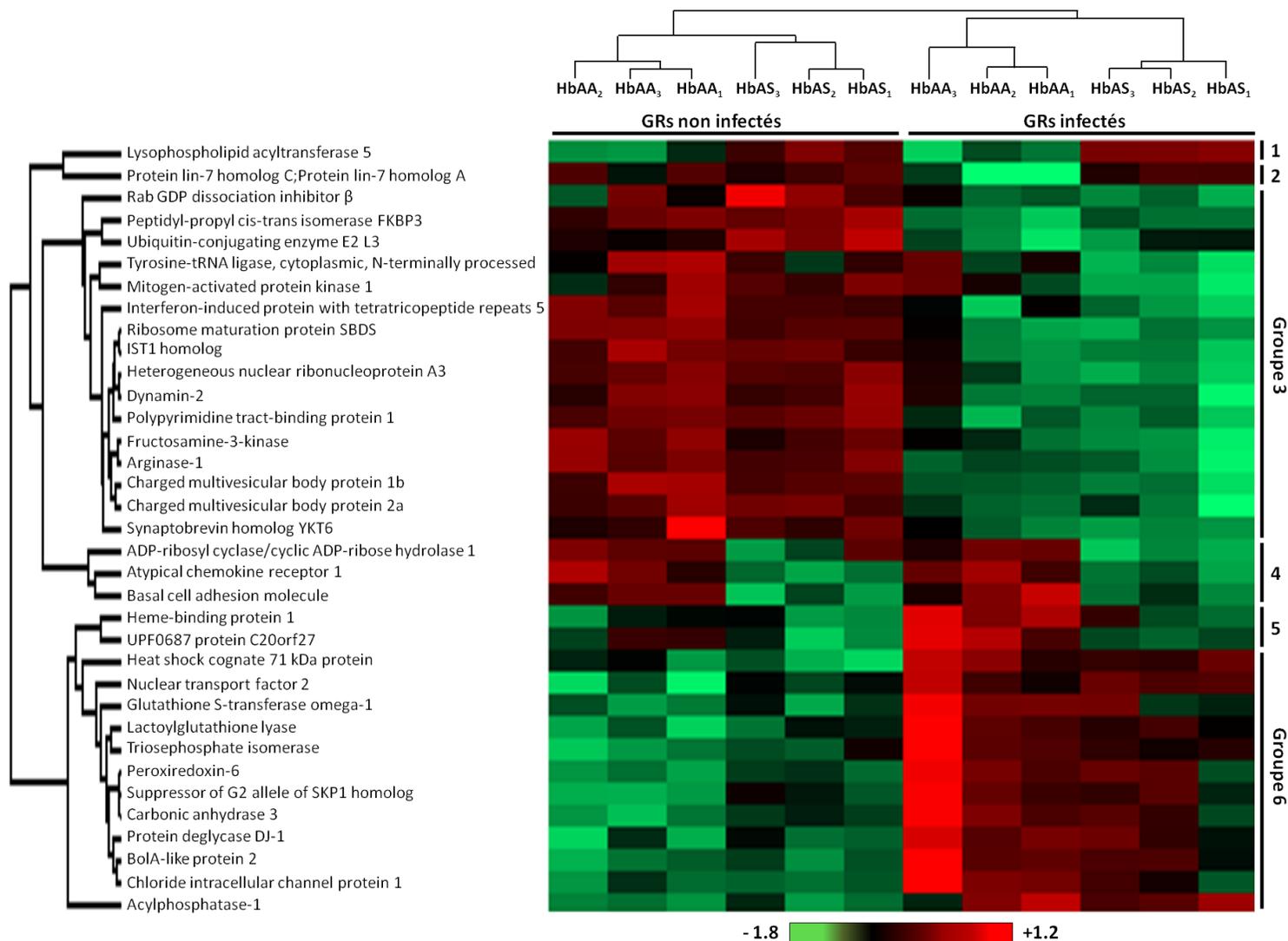


Figure 62. **Carte de chaleur des protéines érythrocytaires différemment détectées en fonction de l’infection et/ou du génotype HbAS.** 6 échantillons HbAA (ghosts HbAA<sub>1</sub>, HbAA<sub>2</sub> et HbAA<sub>3</sub> non infectés et infectés) et 6 échantillons HbAS (ghosts HbAS<sub>1</sub>, HbAS<sub>2</sub> et HbAS<sub>3</sub> non infectés et infectés) ont été analysés selon la quantité de protéines humaines détectées (Test ANOVA,  $p$ -value <0,01). Les échantillons sont présentés horizontalement (colonnes) et les protéines verticalement (rangées). Les protéines représentées en rouge sont plus abondamment détectées et les protéines en vert sont retrouvées en plus faible quantité dans les échantillons. Le code couleur représente le taux d’intensité de variation du Z score exprimé en log<sub>2</sub>. Les protéines ont été regroupées en fonction de leur profil de variation de quantité.

#### 4.3.3.2. Phosphoprotéome des protéines érythrocytaires de la membrane du globule rouge HbAA et HbAS non infecté et infecté par *P. falciparum*

Grâce à un test ANOVA, nous avons observé des différences significatives de l'intensité de phosphorylation pour plusieurs protéines érythrocytaires en fonction de l'infection par *P. falciparum* et/ou du génotype HbAS ( $p$ -value <0,05). Nous avons ainsi identifié 58 sites différenciellement phosphorylés, correspondant à 33 protéines distinctes (Figure 63). La plupart des phosphosites identifiés sont des sérines (44 sérines, 13 thréonines et 1 tyrosine). Parmi ces phosphosites, 50 avaient déjà été décrits, les 8 autres étant identifiés pour la première fois dans ce travail. Ces 8 sites correspondent à 6 nouvelles phosphoprotéines. Pour chaque phosphosite, nous nous sommes assurés que la variation de sa phosphorylation n'était pas due à une différence de quantité de la protéine correspondante grâce à la matrice et aux résultats obtenus lors de l'étude du protéome global.

Ces phosphosites peuvent être répartis en 7 groupes selon leur profil de variation de phosphorylation dans les différents échantillons. Le groupe 2 est composé de 15 phosphosites plus fortement phosphorylés dans les échantillons infectés :

- S<sup>2</sup> de « Protein lifeguard 3 »
- S<sup>595</sup> et T<sup>599</sup> de « Zinc finger protein 750 »
- T<sup>63</sup> de « Small VCP/p97-interacting protein »
- S<sup>726</sup> et T<sup>724</sup> de l'adducine  $\alpha$
- S<sup>713</sup> et T<sup>711</sup> de l'adducine  $\beta$
- S<sup>693</sup> et T<sup>691</sup> de l'adducine  $\gamma$
- S<sup>1301</sup> de la spectrine  $\beta$
- T<sup>238</sup> de GLUT1
- S<sup>849</sup> de la protéine 4.1
- S<sup>629</sup> de la phospholipase D1
- S<sup>2</sup> de l'anhydrase carbonique 2.

Ce groupe comprend 5 sites qui ont déjà été décrits comme « spécifiques de l'infection » dans une méta-analyse d'études de phosphoprotéomique de GRs infectés par *P. falciparum*<sup>343</sup> (S<sup>726</sup> et T<sup>724</sup> de l'adducine  $\alpha$ , S<sup>1301</sup> de la spectrine  $\beta$ , T<sup>238</sup> de GLUT1 et S<sup>849</sup> de la protéine 4.1), validant notre approche analytique.

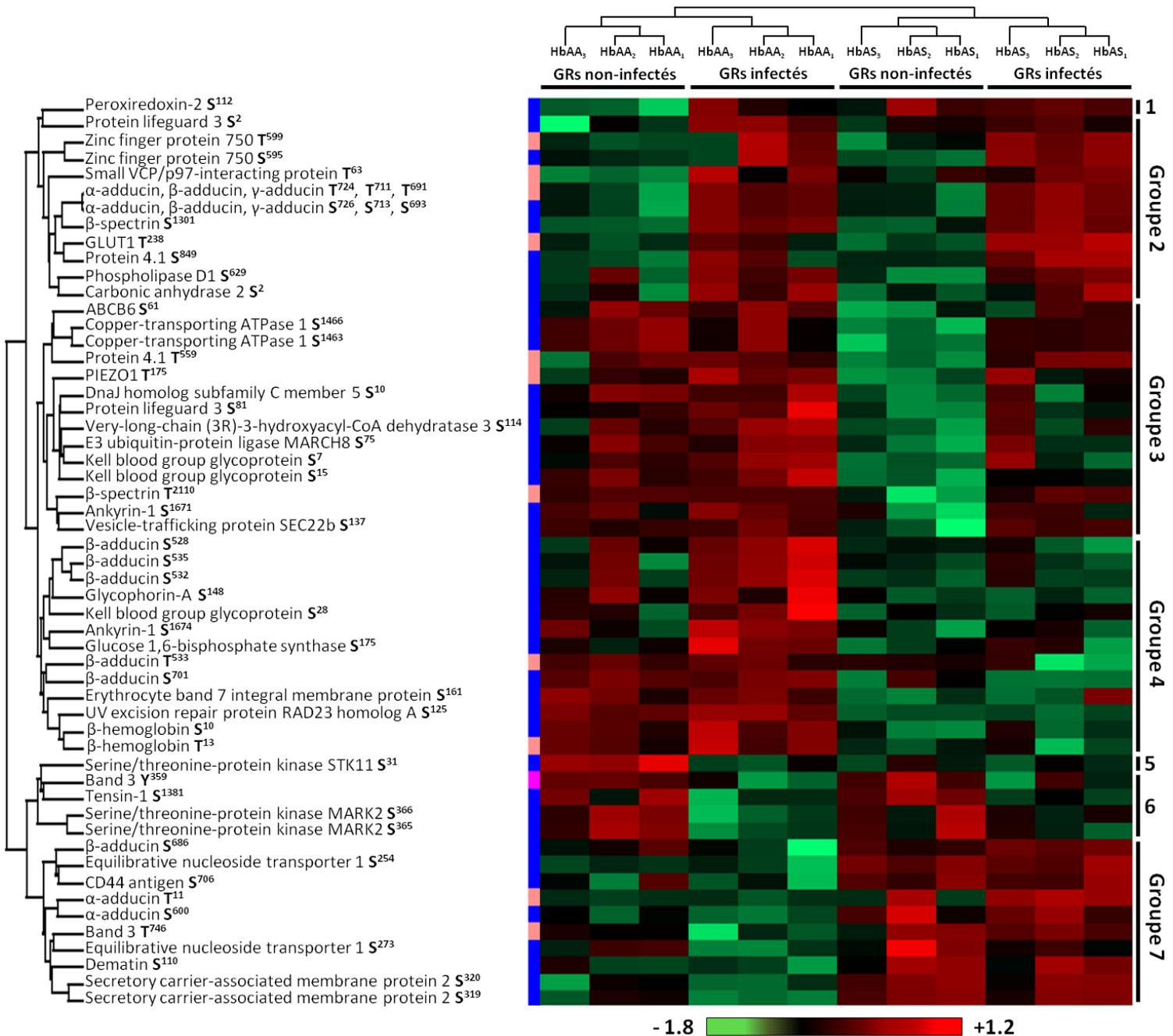


Figure 63. Sites différentiellement phosphorylés des protéines humaines en fonction de l'infection par *P. falciparum* et/ou du génotype HbAS. 6 échantillons HbAA (ghosts HbAA<sub>1</sub>, HbAA<sub>2</sub> et HbAA<sub>3</sub> non-infectés et infectés) et 6 échantillons HbAS (ghosts HbAS<sub>1</sub>, HbAS<sub>2</sub> et HbAS<sub>3</sub> non infectés et infectés) ont été analysés selon le taux de phosphorylation de protéines érythrocytaires (Test ANOVA,  $p$ -value <0,05). Les échantillons sont présentés horizontalement (colonnes) et les protéines verticalement (rangées). Les sites sont spécifiés à côté des protéines correspondantes. Les sites représentés en rouge sont plus fortement phosphorylés et les sites en vert le sont plus faiblement dans les échantillons. Le code couleur représente le taux d'intensité de variation du Z score exprimé en log<sub>2</sub>. Les sites ont été regroupés en fonction de leur profil de variation de phosphorylation. A gauche, les thréonines (T) sont colorées en beige, les sérines (S) en bleu et les tyrosines (Y) en rose.

Le groupe 6 est composé de 4 sites présentant une plus faible phosphorylation suite à l'infection :

- Y<sup>359</sup> de la protéine Bande 3
- S<sup>1381</sup> de la tensine-1
- S<sup>365</sup> et S<sup>366</sup> de la sérine/thréonine-protéine kinase MARK2.

Ces résultats complètent les données précédentes en quantifiant les intensités de phosphorylation. La diminution de l'intensité de phosphorylation n'avait pas été détectée dans les études précédentes qui ont analysé dans certains cas seulement des érythrocytes infectés.

Cette analyse a aussi caractérisé deux groupes contenant des phosphosites dont le statut de phosphorylation dépendait du statut d'Hb. Le groupe 4 comprend des sites dont la phosphorylation est plus importante dans les ghosts HbAA :

- S<sup>528</sup>, S<sup>532</sup> et S<sup>535</sup> de l'adducine  $\beta$
- S<sup>148</sup> de la glycophorine A
- S<sup>28</sup> de Kell
- S<sup>1674</sup> de l'ankeyrine
- S<sup>175</sup> de la glucose 1,6-bisphosphate synthase
- T<sup>533</sup> et S<sup>701</sup> de l'adducine  $\beta$
- S<sup>161</sup> de la protéine « Erythrocyte band 7 integral membrane protein » (stomatine)
- S<sup>125</sup> de « UV excision repair protein RAD23 homolog A »
- S<sup>10</sup> et T<sup>13</sup> de l'hémoglobine  $\beta$ .

Le groupe 7 contient des sites plus fortement phosphorylés dans les ghosts HbAS :

- S<sup>686</sup> de l'adducine  $\beta$
- S<sup>254</sup> et S<sup>273</sup> de « Equilibrative Nucleoside Transporter 1 » (ENT1)
- S<sup>706</sup> de CD44
- T<sup>11</sup> et S<sup>600</sup> de l'adducine  $\alpha$
- T<sup>746</sup> de la Bande 3
- S<sup>110</sup> de la dématine
- S<sup>319</sup> et S<sup>320</sup> de « Secretory carrier-associated membrane protein 2 ».

Trois groupes incluent des protéines dont la phosphorylation est modifiée en fonction de la combinaison de l'infection et du génotype HbAS. Le groupe 5 comprend un site qui est

plus fortement phosphorylé dans les ghosts HbAA non infectés : la S<sup>31</sup> de la sérine/thréonine protéin kinase STK11.

Le groupe 3 contient des sites plus faiblement phosphorylés dans les échantillons HbAS non infectés :

- S<sup>61</sup> de « ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial » (ABCB6)
- S<sup>1463</sup> et S<sup>1466</sup> de « Copper-transporting ATPase 1 »
- T<sup>559</sup> de la protéine 4.1
- T<sup>175</sup> de PIEZO1
- S<sup>10</sup> de « DnaJ homolog subfamily C member 5 »
- S<sup>81</sup> de « Protein lifeguard 3 »
- S<sup>114</sup> de « Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA hydratase 3 »
- S<sup>75</sup> de « E3 ubiquitin-protein ligase MARCH8 »
- S<sup>7</sup> et S<sup>15</sup> de Kell
- T<sup>2110</sup> de la spectrine  $\beta$
- S<sup>1671</sup> de l'ankyrine
- S<sup>137</sup> de « Vesicle-trafficking protein SEC22b ».

Enfin, le groupe 1 contient un site qui est plus fortement phosphorylé dans les échantillons HbAS et dans les ghosts HbAA infectés, la S<sup>112</sup> de la peroxirédoxine-2. Cette protéine protège les cellules du stress oxydant, et sa fonction peut être régulée par la phosphorylation<sup>352</sup>. Comme l'infection à *P. falciparum* et l'HbS génèrent toutes les deux du stress oxydant, ce résultat peut en être la conséquence.

Nous avons ensuite réalisé un test ANOVA double pour visualiser les phosphosites différenciellement phosphorylés en fonction à la fois de l'infection par *P. falciparum* et du génotype HbAS (*p*-value d'interaction <0,05). Nous avons exclu des résultats un phosphosite pour lequel la *p*-value d'interaction était inférieure à 0,05, mais qui ne ressortait pas lors de l'analyse ANOVA simple (selon l'infection ou le génotype HbAS). Six phosphosites ont été identifiés, correspondant à 5 phosphoprotéines distinctes (Figure 64). Les sites peuvent être regroupés en 5 groupes en fonction de leur profil de variation dans les différents échantillons. Le premier comprend la S<sup>31</sup> de la sérine/thréonine-protéine kinase STK11 qui est plus fortement phosphorylée dans les échantillons HbAA non infectés ; le deuxième la T<sup>2110</sup> de la spectrine  $\beta$  qui est moins phosphorylée dans les échantillons HbAS non infectés. Le cinquième groupe comprend deux sites, les S<sup>1463</sup> et S<sup>1466</sup> de « Copper-transporting ATPase 1 »

qui sont aussi plus fortement phosphorylées dans tous les échantillons infectés ainsi que dans les échantillons HbAA non infectés. Bien que les phosphosites des groupes 2 et 5 présentent les mêmes profils, ils ont été séparés car les variations d'intensité de phosphorylation sont moins élevées dans le groupe 5. Le troisième groupe contient la S<sup>528</sup> de l'adducine  $\beta$  qui est plus fortement phosphorylée dans les ghosts HbAA infectés. Enfin, le quatrième groupe inclut la T<sup>238</sup> de GLUT1, dont la phosphorylation augmente avec l'infection, cette augmentation étant plus importante dans les échantillons HbAS.

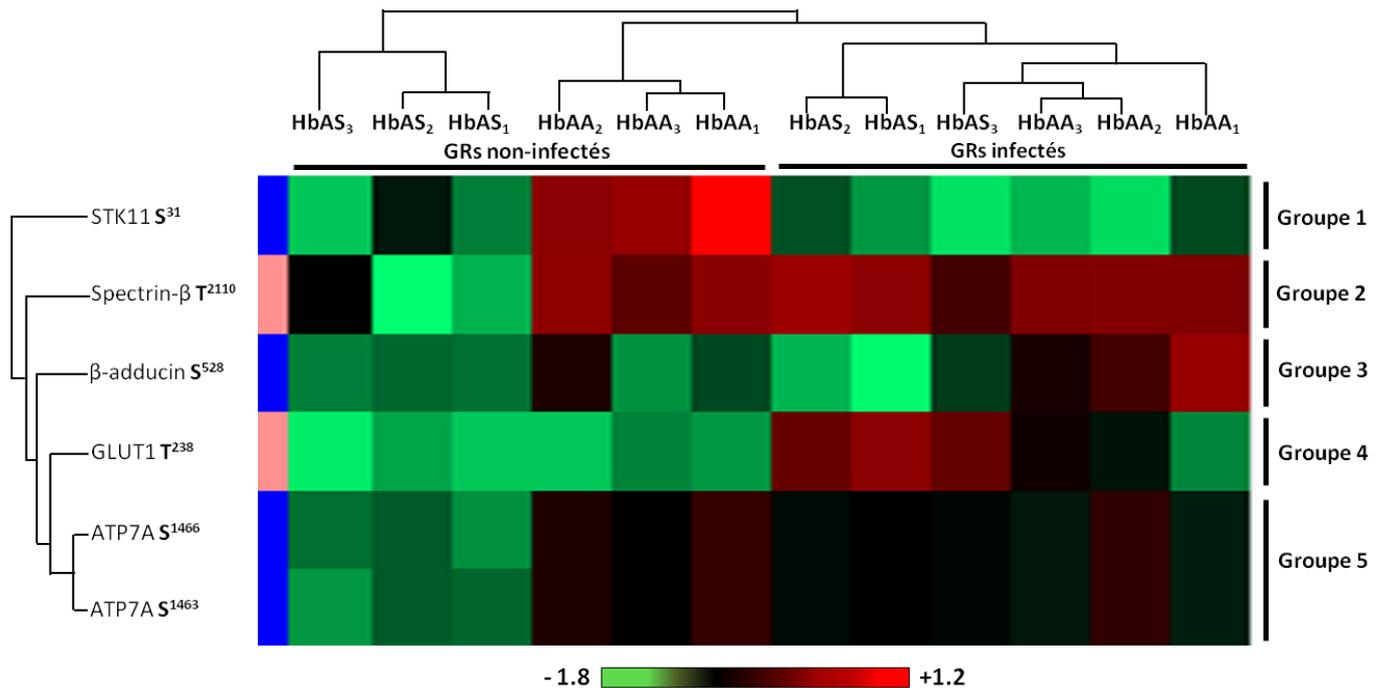


Figure 64. Sites différenciellement phosphorylés des protéines humaines en fonction de la combinaison de l'infection par *P. falciparum* et du génotype HbAS. 6 échantillons HbAA (ghosts HbAA<sub>1</sub>, HbAA<sub>2</sub> et HbAA<sub>3</sub> non-infectés et infectés) et 6 échantillons HbAS (ghosts HbAS<sub>1</sub>, HbAS<sub>2</sub> et HbAS<sub>3</sub> non infectés et infectés) ont été analysés selon le taux de phosphorylation des protéines érythrocytaires (Test ANOVA double, *p*-value d'interaction <0,05). Les échantillons sont présentés horizontalement (colonnes) et les protéines verticalement (rangées). Les sites sont spécifiés à côté des protéines correspondantes. Les sites représentés en rouge sont plus fortement phosphorylés et les sites en vert sont plus faiblement dans les échantillons. Le code couleur représente le taux d'intensité de variation du Z score exprimé en log<sub>2</sub>. Les sites ont été regroupés en fonction de leur profil de variation de phosphorylation. A gauche, les thréonines (T) sont colorées en beige et les sérines (S) en bleu.

#### 4.3.3.3. Protéome et phosphoprotéome des protéines parasitaires de la membrane du globule rouge HbAA et HbAS infecté par *P. falciparum*

Nous avons analysé le protéome et le phosphoprotéome concernant les protéines parasitaires des ghosts selon le génotype Hb du globule rouge dans lequel *P. falciparum* s'était développé. L'analyse protéomique n'a pas révélé de différence significative dans la quantité des protéines parasitaires présentes à la membrane du GR. Cependant, l'analyse de

phosphoprotéomique a identifié 25 phosphosites différentiellement phosphorylés en fonction du statut d'Hb, correspondant à 14 phosphoprotéines différentes (Test-*t* de Student, *p*-value <0,05) (Figure 65). Nous avons réparti ces phosphosites en deux groupes en fonction de leur profil de variation de phosphorylation dans les échantillons. Le premier groupe inclut des sites plus fortement phosphorylés dans les parasites qui se sont développés dans les GRs HbAS :

- S<sup>386</sup>, S<sup>172</sup>, S<sup>382</sup> et S<sup>168</sup> de « Ring-infected erythrocyte surface antigen » (RESA)
- T<sup>1469</sup> de MAL13P1.380 (conserved *Plasmodium* protein, unknown function)
- S<sup>752</sup> de PFI0345w (GTPase-activating protein, putative)
- T<sup>3068</sup> et T<sup>2547</sup> de « Antigen 332, DBL-like protein »
- S<sup>92</sup> de PFL0555c (conserved *Plasmodium* protein, unknown function)
- T<sup>454</sup>, T<sup>457</sup>, T<sup>479</sup>, T<sup>473</sup>, T<sup>448</sup>, T<sup>451</sup>, et T<sup>467</sup> de « Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen » (MESA).

Le deuxième groupe est composé de sites, exclusivement des sérines, qui sont plus phosphorylés dans les parasites qui se sont développés dans les GRs HbAA :

- S<sup>1483</sup> de PFE1485w, protéine dont la fonction n'est pas identifiée, mais qui pourrait participer à des fonctions motrices de la cellule car elle présente des signatures moléculaires de liaison de l'actine, la calmoduline et l'ATP ;
- S<sup>1688</sup> de PF07\_0016, protéine membranaire conservée dans le genre *Plasmodium* ;
- S<sup>2532</sup> de PFL1930w, protéine dont la fonction n'est pas identifiée, mais qui pourrait participer à des fonctions motrices de la cellule car elle présente des signatures moléculaires de liaison de l'actine, la calmoduline et l'ATP ;
- S<sup>91</sup> de PF11\_0233, protéine dont la fonction n'est pas identifiée, mais elle présente des signatures moléculaires de liaison de l'ADN et de l'ATP ;
- S<sup>189</sup> de MAL8P1.29, protéine dont la fonction n'est pas identifiée ;
- S<sup>984</sup> de PF14\_0343, protéine dont la fonction n'est pas identifiée ;
- S<sup>16</sup> de PFF0535c (« transcription elongation factor SPT5, putative ») ;
- S<sup>31</sup> de « Rhomboid protease 1 » (ROM1).

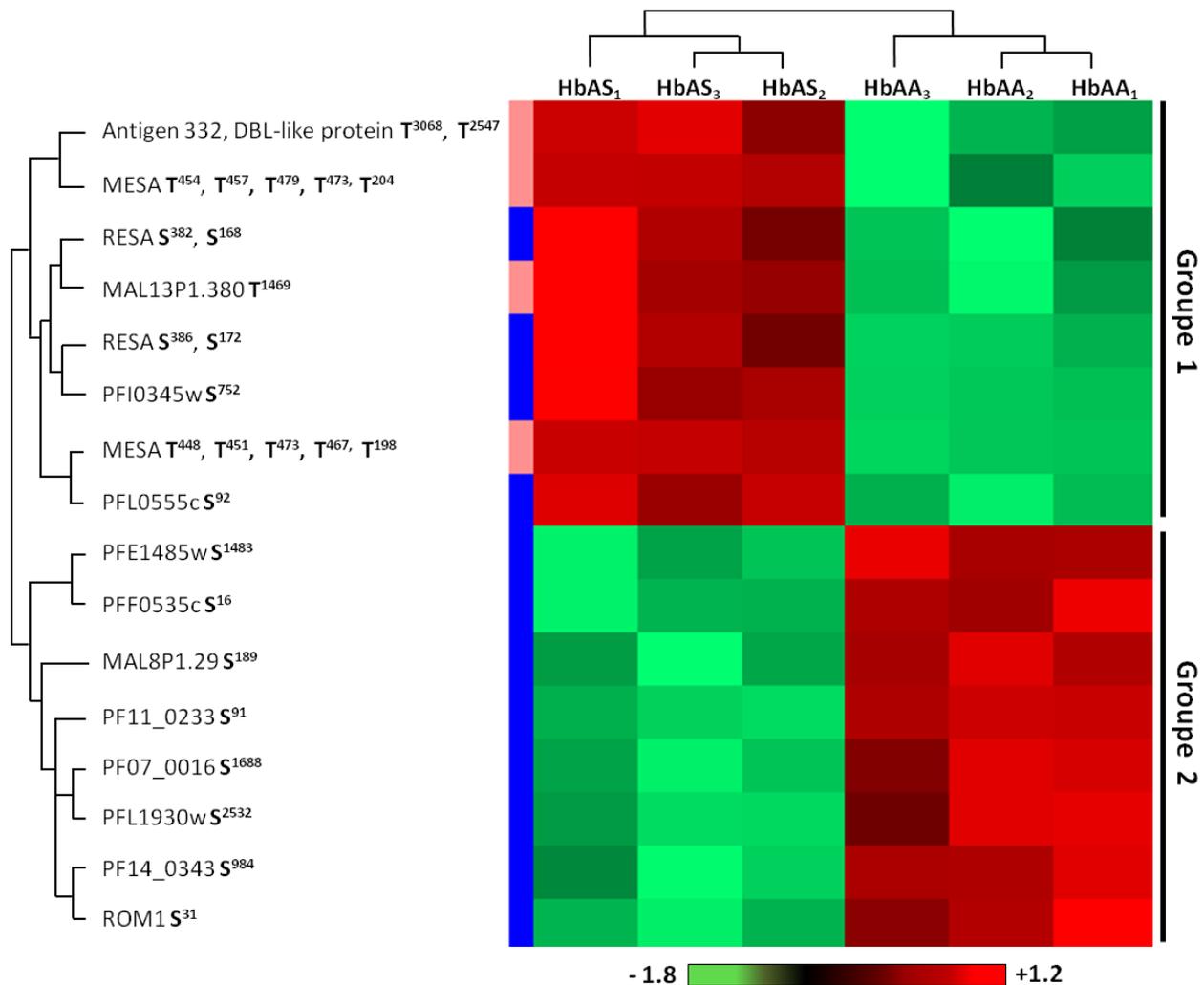


Figure 65. **Sites différenciellement phosphorylés des protéines parasitaires en fonction du génotype d'hémoglobine de la cellule hôte.** Les extraits parasitaires de 3 donneurs HbAA (ghosts HbAA<sub>1</sub>, HbAA<sub>2</sub> et HbAA<sub>3</sub> infectés) et 3 HbAS (ghosts HbAS<sub>1</sub>, HbAS<sub>2</sub>, et HbAS<sub>3</sub> infectés) ont été analysés selon le taux de phosphorylation de protéines de *Plasmodium* (Test-*t* de Student, *p*-value <0,05). Les échantillons sont présentés horizontalement (colonnes) et les protéines verticalement (rangées). Les sites sont spécifiés à côté des protéines correspondantes. Les sites représentés en rouge sont plus fortement phosphorylés et les sites en vert le sont plus faiblement dans les échantillons. Le code couleur représente le taux d'intensité de variation du Z score exprimé en log<sub>2</sub>. Les sites ont été regroupés en fonction de leur profil de variation de phosphorylation. A gauche, les thréonines (T) sont colorées en beige et les sérines (S) en bleu.

#### 4.3.4. Modulation de la phosphorylation de tyrosines de la Bande 3 selon l'infection et le génotype HbAS

Parmi les 499 phosphosites identifiés, nous avons détecté 413 sérines, 81 thréonines et seulement 4 tyrosines. L'enrichissement par TiO<sub>2</sub> a la même affinité pour ces trois acides aminés, mais la proportion de phosphosites détectée est corrélée à la fréquence de ces sites dans la cellule. La phosphorylation de tyrosines est moins représentée et il serait nécessaire de réaliser des étapes supplémentaires ou des approches alternatives pour enrichir les fractions analysées en phosphopeptides contenant des phospho-tyrosines.

Pour cette raison, nous avons étudié la phosphorylation de tyrosines des ghosts par Western-Blot. La protéine Bande 3 est la cible principale des tyrosine kinases érythrocytaires<sup>141</sup>, et l'augmentation de sa phosphorylation de tyrosine due au stress oxydant a été décrite dans des études précédentes<sup>137,141</sup>. La protéine Bande 3 est connue pour être phosphorylée sur différents résidus Y, dont les Y<sup>21</sup> et Y<sup>359</sup> en présence de stress oxydant<sup>138,139</sup> par différentes kinases, dont les kinases érythrocytaires Syk et Lyn (pour les Y<sup>21</sup> et Y<sup>359</sup>, respectivement). Nous avons donc utilisé des anticorps anti-pY<sup>21</sup> et anti-pY<sup>359</sup> de la Bande 3. Pour chaque expérience, les intensités de phosphorylation ont été normalisées par rapport à la quantité des protéines Bande 3 et p55 (contrôle de charge) détectées en Western-Blot. Pour chaque donneur, afin de visualiser le taux de variation de la phosphorylation avec l'infection, l'intensité de phosphorylation de la condition infectée a été divisée par l'intensité de phosphorylation de la condition non infectée. La phosphorylation de la Y<sup>21</sup> de la Bande 3 augmente avec l'infection par *P. falciparum* dans les GRs HbAA et dans les GRs HbAS du donneur HbAS<sub>2</sub>. Par contre, cette phosphorylation n'augmente que très peu dans les hématies infectées du donneur HbAS<sub>1</sub> (Figure 66A).

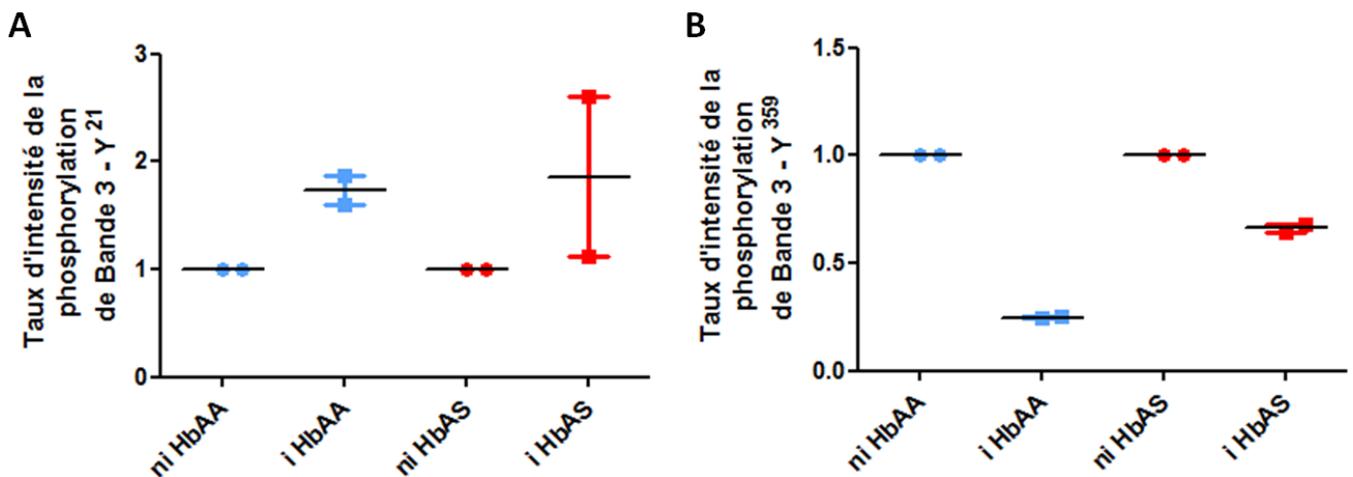


Figure 66. **Différences de la phosphorylation de la Y<sup>21</sup> (A) et de la Y<sup>359</sup> (B) de Bande 3 selon l'infection par *P. falciparum* et le génotype HbAS.** Des gels gradient 4-12% ont été chargés avec 20 µg/puits d'extraits protéiques de ghosts. Après la séparation des lysats protéiques par SDS-PAGE et transfert sur nitrocellulose, la phosphorylation de tyrosine (Y) a été analysée en utilisant des anticorps anti-Y<sup>21</sup> (A) et anti-Y<sup>359</sup> (B) de la Bande 3. Les intensités de phosphorylation ont été normalisées par rapport à la quantité des protéines Bande 3 et p55 (contrôle de charge) détectées en Western-Blot. Pour chaque donneur, afin de visualiser la variation d'intensité de la phosphorylation avec l'infection, l'intensité de phosphorylation de la condition infectée a été divisée par l'intensité de phosphorylation de la condition non infectée. Les taux d'intensité des échantillons HbAA sont représentés en bleu et ceux des échantillons HbAS en rouge. Les cercles représentent les ghosts non infectés et les carrés les ghosts infectés. i: infecté. ni: non infecté.

Ce résultat ne nous a pas permis de conclure sur l'impact du génotype HbAS sur la phosphorylation de la Y<sup>21</sup> lors de l'infection. Nous avons aussi observé que la phosphorylation de la Y<sup>359</sup> de la Bande 3 diminuait avec l'infection (Figure 66B). Ce résultat confirme le profil observé pour le même phosphosite en MS (Figure 63). Toutefois, la diminution de phosphorylation de la Y<sup>359</sup> de la Bande 3 semble moins marquée dans les GRs HbAS que dans les GRs HbAA.

Ces Western-Blot n'ont été réalisés qu'une seule fois, et constituent donc des résultats préliminaires qui doivent être reproduits.

#### 4.3.5. Croissance de *P. falciparum* dans les globules rouges Lu-CAM et ENT1 null

Enfin, nous avons voulu tester la croissance de *P. falciparum* dans des GRs mutés pour des protéines présentant des variations de quantité ou de phosphorylation en MS. L'analyse protéomique a montré que les ghosts HbAS semblaient contenir moins de protéine « Lutheran-Basal Cell Adhesion Molecule » (Lu-BCAM), une molécule d'adhésion à la laminine<sup>353</sup> (Figure 62). De plus, l'analyse en phosphoprotéomique a montré que la protéine ENT1 était plus fortement phosphorylée sur les S<sup>254</sup> et S<sup>273</sup> dans les ghosts HbAS (Figure 63). ENT1 est un transporteur de nucléoside localisé dans la membrane érythrocytaire, dont l'activité peut être liée à sa phosphorylation<sup>354</sup>.

Nos collaborateurs de l'INTS et du Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins (CNRGS) ont inclus dans leur cohorte de donneurs de GRs des personnes étant Lu-BCAM null et ENT1 null. Ces deux phénotypes sont très rares (quelques individus connus dans le monde). Toutefois, nous avons eu l'opportunité d'utiliser des GRs Lu-BCAM et ENT1 null afin de tester la répllication parasitaire dans ces différents érythrocytes mutés. Mais nous n'avons pas observé de différence de croissance de *P. falciparum* dans les GRs Lu-BCAM (Figure 67A) ou ENT1 null (Figure 67B) par rapport à celle dans les GRs HbAA. Ces résultats suggèrent que l'absence des protéines Lu-BCAM et ENT-1 n'est pas délétère pour l'invasion et la croissance intra-érythrocytaire de *P. falciparum*.

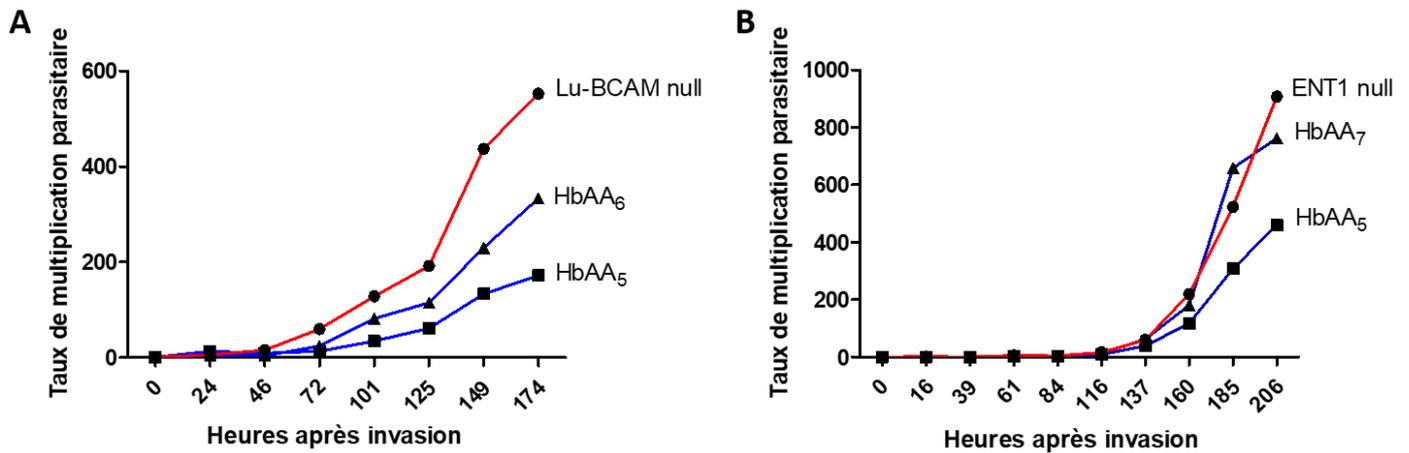


Figure 67. Croissance de la souche 3D7 de *P. falciparum* dans des globules rouges Lu-BCAM (A) et ENT1 null (B). La croissance *in vitro* de *P. falciparum* dans des érythrocytes provenant d'un donneur Lu-BCAM null (courbe rouge) a été comparée à celle dans des érythrocytes de deux donneurs HbAA (HbAA<sub>5</sub> et HbAA<sub>6</sub>) (courbes bleues) (A). La croissance de *P. falciparum* dans des érythrocytes provenant d'un donneur ENT1 null (courbe rouge) a été comparée à celle dans des érythrocytes de deux donneurs HbAA (HbAA<sub>5</sub> and HbAA<sub>7</sub>) (courbes bleues) (B). L'infection de ces différentes hématies a été réalisée à 0h. Les parasitémies de chaque culture ont été déterminées pendant 3 ou 4 cycles de réplication parasitaire par mesure du pourcentage de cellules positives pour le marquage HO. Les taux de réplication correspondent à la valeur de parasitémie rapportée à celle évaluée à J0, le tout multiplié par le taux de dilution de la culture au moment de la mesure.

#### 4.4. Discussion

Le but de ce projet était de mesurer l'impact de l'HbS sur la régulation protéique et phosphoprotéique des protéines de la membrane du GR infecté par *P. falciparum*. Nous avons considéré l'impact du stress oxydant généré par le portage hétérozygote d'HbS et par l'infection par *P. falciparum*, car celui-ci pourrait perturber l'équilibre kinase/phosphatase<sup>137</sup>. De précédentes études avaient établi le phosphoprotéome de GRs normaux et drépanocytaires<sup>332,333</sup>, ou des érythrocytes HbAA après infection par *P. falciparum*<sup>343</sup>. A notre connaissance, cependant, le phosphoprotéome des GRs HbAS n'avait jamais été étudié auparavant. Cette étude constitue donc la première analyse expérimentale, comparative et quantitative de la phosphorylation des protéines parasites et humaines de la membrane des GRs HbAA et HbAS infectés et non infectés.

Dans un premier temps, nous souhaitions étudier la croissance de la souche 3D7 de *P. falciparum* dans les GRs HbAA et HbAS dans nos conditions de culture. En effet, le développement parasite dans les érythrocytes HbAS peut-être inhibé en fonction du milieu de culture et des conditions atmosphériques, surtout en conditions hypoxiques<sup>267-270</sup>. Nous avons réalisé un suivi de croissance en cytométrie en flux sur plus de trois cycles, avec des GRs provenant de deux donneurs HbAA et de deux donneurs HbAS. Seule la croissance parasite au sein des érythrocytes du donneur HbAS<sub>1</sub> semble être inhibée. Mais nous n'avons pas pu conclure en raison du faible nombre d'échantillons. Par contre, en déterminant les différents stades parasites, nous avons observé un léger retard de maturation des parasites se développant dans les GRs HbAS à partir du 3<sup>ème</sup> cycle de réplication parasite. Nous sommes conscients que ce résultat a été obtenu à partir d'un nombre d'échantillons faible, et nécessiterait d'être renouvelé avec un effectif plus important et d'autres souches parasites. Nous avons cependant décidé de collecter les GRs infectés après 3 cycles de développement pour les analyses de protéomique, moment à partir duquel nous avons observé cette différence.

Dans ce travail, nous avons réalisé simultanément le protéome et le phosphoprotéome des protéines érythrocytaires et parasites. Cela nous a notamment permis de nous assurer que les modifications de phosphorylation identifiées n'étaient pas dues à des différences de quantité des protéines correspondantes.

Concernant les protéines érythrocytaires, nous avons observé des modifications de quantité et de phosphorylation. L'analyse protéomique a révélé un groupe de protéines dont la quantité variait à la fois en fonction de l'infection et du génotype HbAS. La protéine HEBP1 a

particulièrement attiré notre attention. En effet, cette protéine lie les éléments porphyrinogènes libres et facilite l'élimination des produits potentiellement toxiques pour la cellule<sup>355</sup>. A ce jour, aucun lien entre cette protéine et le métabolisme de *P. falciparum* n'a été établi. Toutefois, il est possible d'imaginer que cette protéine pourrait être nécessaire pour la prise en charge de l'hème toxique lors de la croissance de *P. falciparum*, car la quantité de cette protéine détectée au niveau de la membrane augmente dans les GRs HbAA suite à l'infection. La détoxification de l'hème constitue un mécanisme clé pour le développement parasitaire, qui est notamment ciblé dans le développement de traitements contre le paludisme. Toutefois, la quantité d'HEBP1 détectée en MS n'augmente pas dans les ghosts HbAS suite à l'infection. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la formation d'hémozoïne dans les GRs HbAS pourrait être altérée. Nous aurions voulu valider ces résultats par Western-Blot. Toutefois, cette protéine est majoritairement cytoplasmique<sup>355</sup>, et donc trop faiblement présente à la membrane pour être détectée en Western-Blot à partir de nos échantillons de ghosts. Une possibilité serait d'utiliser des anticorps fonctionnant en cytométrie en flux, après perméabilisation de la membrane. Cette expérience nécessitant de retrouver des donneurs HbAS, elle n'a pas pu être réalisée dans le temps imparti pour ce travail.

Nous avons observé que la protéine Lu-BCAM était plus faiblement présente dans les ghosts HbAS. Or des études ont montré que cette protéine était plus fortement présente à la surface des GRs HbSS, et qu'elle jouait un rôle dans l'adhésion de ces érythrocytes à l'endothélium vasculaire dans la pathologie de la drépanocytose<sup>356</sup>. Cependant, il existe une forte variation inter-individuelle concernant le taux d'expression de Lu-BCAM à la surface des GRs HbSS. De plus, pour un même individu drépanocytaire, le taux d'expression de Lu-BCAM diffère selon les hématies.

De plus, nous avons observé que la protéine « Atypical chemokine receptor 1 », qui est l'antigène Duffy, était plus faiblement détectée dans la membrane des GRs HbAS. Or, Duffy est un récepteur pour *Plasmodium vivax*. Ainsi, le groupe sanguin Duffy null confère une protection contre le paludisme à *P. vivax*<sup>357,358</sup>. A ce jour, la protection conférée par ce groupe sanguin contre le paludisme à *P. falciparum* n'est pas démontrée. Une étude récente a reporté un cas clinique d'un patient drépanocytaire pour lequel cette pathologie ne conférerait pas de protection contre le paludisme à *P. vivax*<sup>359</sup>. Cependant, il a été observé une association plus fréquente de l'HbS avec le groupe sanguin Duffy null, cette combinaison étant potentiellement sélectionnée dans les zones où le paludisme à *P. falciparum* et *P. vivax*

sont tous les deux fréquents<sup>360</sup>. Néanmoins, le groupe sanguin Duffy null est très fréquent en Afrique, zone dont étaient originaires les trois donneurs HbAS<sup>361</sup>.

Parmi les phosphoprotéines érythrocytaires, nous avons identifié des protéines appartenant à 4 groupes principaux: (i) des protéines du complexe ankyrine (ankyrine, Bande 3, spectrine  $\beta$ , stomatine, et glycophorine A); (ii) des protéines du complexe jonctionnel d'actine (protéine 4.1, dématine, adducine  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , CD44, et Kell); (iii) des transporteurs (GLUT1, ENT1, PIEZO1, Secretory carrier-associated membrane protein 2, ABCB6 et Bande 3); (iiii) et des kinases (Sérine/thréonine-protéine kinase MARK2, Sérine/thréonine-protéine kinase STK11). Ces modifications de fonctions pourraient impacter la structure et la stabilité membranaire du GR infecté. En effet, la phosphorylation de la spectrine  $\beta$  par la caséine kinase 1, associée à la membrane, mène à une diminution de la stabilité mécanique membranaire<sup>362</sup>. La phosphorylation de la dématine par la protéine kinase parasitaire, FIKK<sup>363</sup>, ou une PKA, semble quant à elle perturber sa fonction, interférant avec sa liaison à la spectrine et l'actine<sup>364</sup>. Et enfin, la phosphorylation de la protéine 4.1, observée suite à l'infection dans de précédentes études<sup>365</sup>, inhibe sa capacité à promouvoir l'interaction entre l'actine et la spectrine, ce qui diminue ici encore la stabilité membranaire<sup>366</sup> et pourrait participer à la modification des propriétés membranaires induites par le parasite.

Ces modifications pourraient aussi modifier les fonctions des transporteurs érythrocytaires de la membrane plasmique. Lors de son développement intra-érythrocytaire, *P. falciparum* utilise certains de ces transporteurs pour son métabolisme<sup>367</sup>. Dans notre étude, nous avons montré que la protéine ABCB6 était plus faiblement phosphorylée dans les GRs HbAS non infectés. Or, une étude a récemment montré que les GRs déficients pour ABCB6 étaient résistants à l'invasion par *P. falciparum*<sup>368</sup>.

Le test ANOVA double a permis de mettre en évidence les sites dont la phosphorylation variait selon la combinaison de l'infection et du génotype HbAS. Toutefois, aucun anticorps correspondant à ces phosphosites n'existe dans le commerce. Nous n'avons donc pas pu valider ces différences par Western-Blot.

L'ensemble des modifications identifiées pourraient ainsi être impliquées dans la régulation du développement de *P. falciparum*, et dans celle des interactions moléculaires dans les complexes protéiques membranaires, tel que le complexe de cytoadhérence qui est essentiel pour les formes sévères de paludisme.

Concernant les protéines parasitaires, bien que le protéome global ne semble pas affecté, l'analyse a révélé des différences de phosphorylation de sérines et thréonines pour certaines

protéines parasitaires en fonction du génotype d'Hb du GR dans lequel le parasite s'était développé. Notamment, les protéines RESA, MESA et *Pf332* sont plus fortement phosphorylées dans les parasites qui se sont développés dans les GRs HbAS. RESA, aussi connue sous le nom de *Pf155*, est une protéine impliquée dans l'invasion parasitaire des GRs<sup>369</sup>, qui est exprimée dès le stade ring, où elle joue un rôle majeur dans la réduction de la déformabilité membranaire<sup>370</sup>. En effet, après l'invasion, RESA est phosphorylée et se lie près du site d'auto-association en dimère de la spectrine  $\beta$ <sup>371-375</sup>. Cette liaison stabilise les tétramères de spectrine, en prévenant la dissociation des dimères nécessaire à l'invasion des GR, renforçant la membrane érythrocytaire et prévenant d'autres événements d'invasion<sup>373</sup>.

MESA est une phosphoprotéine associée au squelette érythrocytaire, synthétisée au stade ring âgé jusqu'à la fin du cycle intra-érythrocytaire<sup>376</sup>. MESA interagit avec la protéine 4.1<sup>377,378</sup>, au niveau d'une région impliquée dans la formation du complexe ternaire entre les protéines p55, GPC et 4.1<sup>379</sup>. MESA entre en compétition avec p55 pour la liaison de la protéine 4.1, et pourrait ainsi moduler la liaison de p55 avec la protéine 4.1, et impacter la stabilité du squelette membranaire du iGR<sup>377</sup>. La liaison de MESA à la protéine 4.1 est cruciale pour la survie du parasite au sein du GR<sup>159,380</sup>, ainsi que pour la localisation correcte de MESA au niveau du squelette érythrocytaire<sup>381</sup>.

Enfin, *Pf332* est une protéine périphérique résidente des MCs<sup>383</sup>. Au stade schizonte, *Pf332* est associée au cytosquelette érythrocytaire<sup>383</sup>, où elle se lie à l'actine<sup>133</sup>. De plus, *Pf332* joue un rôle dans la diminution de la rigidité membranaire, pour le trafic de *PfEMP1* et pour l'adhésion des iGRs<sup>134</sup>. En effet, les GRs infectés par des parasites déficients pour cette protéine sont plus rigides, expriment moins *PfEMP1* et présentent moins d'adhérence à CD36. Par contre, la protéine « Rhomboid protease 1 » (ROM1) est plus faiblement phosphorylée dans les parasites s'étant développés au sein des GRs HbAS. ROM1 est une protéine jouant un rôle dans la formation de la PV<sup>384</sup>. Elle est aussi capable de cliver la protéine AMA1, et des adhésines lors de l'invasion parasitaire. Il est surprenant de retrouver des protéines comme ROM1 et RESA dans cette analyse, car ces protéines ont un rôle lors de l'invasion, et nous avons considéré les stades trophozoïtes matures/jeunes schizontes. Toutefois, ces protéines sont sécrétées par les mérozoïtes lors de l'invasion, mais leur synthèse débute aux stades matures du cycle précédent. En effet, des ARNs de ROM1 et de RESA sont détectés dans le GR infecté aux stades matures (RESA, PlasmoDB n° : PF3D7\_0102200, ROM1, PlasmoDB n° : PF3D7\_1114100).

Les sites plus fortement ou plus faiblement phosphorylés des protéines parasitaires ne sont pas décrits dans la littérature. Cependant, les protéines correspondantes jouent un rôle

dans le remodelage du cytosquelette et de la membrane du iGR, afin d'en modifier les propriétés de rigidité et d'adhérence. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la cytoadhérence et le remodelage altéré de la membrane des iGRs HbAS<sup>226,259,262</sup> pourraient être liés à l'altération de la phosphorylation de ces protéines. De plus, ces résultats suggèrent que la présence d'HbS est aussi capable de moduler les fonctions parasitaires. Il est aussi possible de formuler l'hypothèse que le parasite est capable de s'adapter à l'environnement différent de ces GRs anormaux par le biais de ces phosphorylations.

La confirmation des différences de phosphorylation des protéines identifiées dans cette étude nécessiterait le développement de nouveaux outils tels que des anticorps contre des phosphosites spécifiques, comme l'ont fait Bouyer *et al.* avec un anticorps commercial anti-phosphoS<sup>726</sup> de l'adducine  $\alpha$ <sup>343</sup>. Ceci permettrait de mieux comprendre les conséquences des altérations de phosphorylation au niveau d'interactions cruciales dans le complexe de cytoadhérence, et d'identifier les fonctions protéiques nécessaires au développement de *P. falciparum*.

Le parasite n'exprime pas de tyrosine kinase classique, mais seulement des protéines tyrosine kinase-like<sup>336</sup>. De nombreuses études ont montré l'importance de l'équilibre entre les activités tyrosine kinases et tyrosine phosphatases au cours du cycle parasitaire<sup>122,137,173</sup>. Le cdB3 (domaine cytoplasmique de la Bande 3) joue un rôle crucial pour l'organisation et la structure de la membrane érythrocytaire, et constitue la cible principale des tyrosine kinases érythrocytaires<sup>141</sup>. Nous avons donc choisi la protéine Bande 3 pour étudier les potentielles différences de phosphorylation de Y par l'infection et le génotype HbAS. Nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de la Y<sup>21</sup> de la Bande 3 avec l'infection pour deux donneurs HbAA et un des deux donneurs HbAS. Par contre, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de la Y<sup>359</sup> de la Bande 3 suite à l'infection pour ces mêmes donneurs.

Ces Western-Blot n'ont été réalisés qu'une seule fois et doivent donc être reproduits, ainsi qu'avec un nombre de donneurs plus important afin de s'affranchir de toute variation inter-individuelle. Cependant, bien que non détectée en MS, la réduction de la phosphorylation de la Y<sup>359</sup> de la Bande 3 semble plus faible chez les donneurs HbAS. Cette plus forte phosphorylation dans les iGR HbAS que HbAA à la fin du cycle pourrait réguler les interactions de la Bande 3 avec d'autres protéines de la membrane du GR. En effet, la Y<sup>359</sup> appartient au domaine de liaison de la protéine 4.1 de la Bande 3<sup>106</sup>.

Cependant, le stress oxydant résultant de la présence d'HbS pourrait aussi être exacerbé par d'autres défauts génétiques, comme le déficit en G6PD et/ou l' $\alpha$ -thalassémie. Lorsque

nous nous sommes intéressés à ces génotypes pour nos donneurs, nous avons observé que le donneur HbAS<sub>2</sub> était G6PD A<sup>-</sup>A (avec la mutation G202) et que le donneur HbAS<sub>3</sub> était G6PD AB. Nous avons aussi observé que les donneurs HbAS<sub>2</sub>, HbAS<sub>3</sub> et HbAA<sub>6</sub> étaient hétérozygotes pour la délétion  $\alpha^{-3,7}$ . Ces résultats ne sont pas surprenants pour les donneurs HbAS car ces défauts génétiques co-existent dans des régions et dans des populations affectées par l'HbS, et peuvent aussi conférer une protection contre le paludisme<sup>218,312</sup>. Par contre, nous avons été surpris du génotype  $\alpha$ -thalassémie du donneur HbAA<sub>6</sub>. En effet, le sang provenant de l'EFS, la probabilité qu'un donneur porteur d'une anomalie soit prélevé était faible. Les expériences étant réalisées directement après les prélèvements sanguins, nous avons génotypé les donneurs une fois les résultats obtenus. Or les hématies du donneur HbAA<sub>6</sub> ont été utilisées pour les suivis de croissance parasitaire au sein des GRs HbAA, HbAS et Lu-BCAM null. Il serait idéal de reproduire cette expérience avec un autre donneur HbAA n'étant pas porteur de la délétion  $\alpha^{-3,7}$ , mais il nous sera très difficile d'obtenir à nouveau des érythrocytes de ces génotypes. Nous pouvons tout de même observer que la croissance parasitaire ne semble pas être différente dans les hématies du donneur HbAA<sub>6</sub> par rapport à celle observée dans les GR de l'autre donneur HbAA contrôle (HbAA<sub>5</sub>) dans nos expériences.

Le co-portage de l' $\alpha$ -thalassémie avec l'HbS est associé à un phénomène d'épistasie négative. En effet, des études rapportent que la protection conférée par le trait drépanocytaire contre le paludisme diminue en cas de co-portage avec l' $\alpha$ -thalassémie<sup>255,256</sup>. Les donneurs HbAS<sub>2</sub> et HbAS<sub>3</sub> étant  $\alpha\alpha/\alpha^{-3,7}$ , nous avons voulu savoir si cela impactait les résultats. Notamment, nous avons observé que lors du suivi de croissance de *P. falciparum* dans les GRs HbAA et HbAS, seule la croissance du donneur HbAS<sub>1</sub> était altérée. Ce donneur était  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ . Par contre, dans les GRs du donneur HbAS<sub>2</sub>, étant aussi porteur de la délétion  $\alpha^{-3,7}$  de manière hétérozygote, *P. falciparum* avait une croissance similaire à celle des donneurs HbAA. Le phénomène d'épistasie négative pourrait ainsi expliquer cette différence de croissance dans les GRs des deux donneurs HbAS. Mais une fois de plus, le faible effectif d'échantillons ne nous permet pas de conclure. De même, si nous considérons les expériences de Western-Blot, nous observons que la phosphorylation de la Y<sup>21</sup> de Bande 3 augmente chez les donneurs HbAA et le donneur HbAS<sub>2</sub> avec l'infection. Cette phosphorylation augmente beaucoup plus faiblement pour le donneur HbAS<sub>1</sub> suite à l'infection. Il est possible que la différence du niveau d'augmentation de la phosphorylation de la Y<sup>21</sup> de Bande 3 entre les deux donneurs HbAS s'explique par un phénomène d'épistasie négative avec le co-portage de la délétion  $\alpha^{-3,7}$  pour le donneur HbAS<sub>2</sub>, dont l'augmentation de phosphorylation est similaire

à celle des donneurs HbAA. Ainsi, on peut supposer que la présence d'HbS seule induise une altération de l'augmentation de la phosphorylation de la Y<sup>21</sup> de Bande 3 suite à l'infection. Or, des études précédentes ont montré que l'augmentation de la phosphorylation de ce résidu était associée à la diminution de l'affinité de la Bande 3 pour l'ankyrine, et ainsi à la diminution de son attachement au cytosquelette érythrocytaire<sup>141</sup>. De plus, une étude récente suppose que la phosphorylation de Bande 3 par Syk est associée à la déstabilisation de la membrane du GR, permettant la sortie des mérozoïtes formés à la fin du cycle intra-érythrocytaire<sup>173,174</sup>. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la phosphorylation de la Y<sup>21</sup> de Bande 3 pourrait être inhibée dans les iGRs HbAS, associée à une inhibition de la sortie des mérozoïtes à la fin du cycle. Ce phénomène pourrait être associé à une altération de la croissance parasitaire, comme nous l'avons observé pour le donneur HbAS<sub>1</sub>. Toutefois, nos résultats ne permettent pas d'affirmer ces hypothèses, compte tenu du nombre d'échantillons. Cependant, ils suggèrent que la phosphorylation de la Bande 3 pourrait participer aux mécanismes de protection conférée par le trait drépanocytaire contre le paludisme à *P. falciparum*.

Pour conclure, ce travail, bien qu'exploratoire, a permis d'identifier plusieurs mécanismes potentiellement impliqués dans la protection conférée par le génotype HbAS contre le paludisme :

- Moins bonne détoxification de l'hème toxique généré par la digestion de l'Hb lors de la croissance parasitaire dans les GRs HbAS ;
- Altération du remodelage de la membrane érythrocytaire par le parasite dans les GRs HbAS, ce qui pourrait expliquer la plus faible cytoadhérence des érythrocytes HbAS parasités. Cette hypothèse pourrait être investiguée en réalisant des expériences d'immunoprécipitation contre des protéines clés érythrocytaires et parasitaires, et l'étude de ces complexes par Western-Blot et par MS (afin d'identifier quantitativement les différents partenaires et leur taux de phosphorylation) ;
- Altération de la fonction des transporteurs de la membrane des GRs HbAS, dont la régulation est nécessaire pour le développement optimal de *P. falciparum*. Notamment, nos données de MS montrent que le transporteur ENT1 présente une phosphorylation plus importante au niveau de deux sérines dans les GRs HbAS. Nous avons néanmoins testé l'importance de cette protéine pour la croissance de *P. falciparum* dans des GRs ENT1 null, et n'avons pas observé de différence par rapport au développement du parasite dans des hématies HbAA. Ces résultats suggèrent que la protéine ENT1 humaine n'est pas nécessaire à la croissance intra-érythrocytaire de *P. falciparum*.

Bien que les expériences réalisées avec des GRs déficients pour deux protéines identifiées dans nos analyses de MS n'aient pas été concluantes, elles démontrent la démarche expérimentale que nous souhaitons développer avec ce projet. De plus, ces expériences nous ont permis de tester la croissance de *P. falciparum* au sein de GRs dont le phénotype est extrêmement rare. Les analyses de protéomique et de phosphoprotéomique avec des GRs HbAS nous ont permis d'identifier de potentielles protéines ou voies de signalisations qui pourraient être nécessaires pour la croissance de *P. falciparum*, dont le rôle pourrait être investigué comme nous l'avons fait pour Lu-BCAM et ENT1.

Afin de mieux caractériser les protéines clés pour le développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum*, nous aimerions étudier le développement au sein de GR 4.1 et 4.2 null provenant aussi du CNRGS. La protéine 4.1 appartient au complexe jonctionnel d'actine et la protéine 4.2 au complexe ankyrine, qui sont les deux complexes majeurs liant la membrane au cytosquelette érythrocytaire. Ainsi, il serait possible d'étudier l'importance de ces deux complexes pour le développement de *P. falciparum*, afin de mieux comprendre l'interaction du parasite avec le cytosquelette érythrocytaire.

Ces deux complexes jouent un rôle crucial pour la structure de la membrane du GR. En effet, des défauts affectant les protéines du complexe ankyrine sont à l'origine de la Sphérocytose Hériditaire (HS), alors que des anomalies des protéines du complexe jonctionnel d'actine causent l'Elliptocytose Hériditaire (HE)<sup>385</sup>. Cependant, le lien entre ces différentes anomalies et l'infection par *P. falciparum* est très peu étudié. Parallèlement à ces expériences, il serait intéressant d'étudier le développement parasitaire au sein de GRs provenant de patients atteints d'HS ou d'HE. Ces pathologies étant causées par diverses mutations, il serait possible de tester dans un premier temps la croissance de *P. falciparum* dans ces différents érythrocytes, afin de sélectionner les GRs dans lesquels le parasite présente un défaut de développement. Avec ces hématies, les interactions entre les protéines parasitaires et érythrocytaires pourraient être étudiées par des approches biochimiques (immunoprécipitation, étude des complexes formés à la membrane du iGR, analyses protéomique et phosphoprotéomique). Enfin, il serait intéressant de tester l'implication des mutations identifiées (pouvant être des résidus spécifiques mutés ou différenciellement phosphorylés, des sites d'ancrage, ou des domaines mutés/délétés). Pour cela, il serait possible de générer *in vitro* des GRs portant ces mutations. Brièvement, ces érythrocytes mutés seraient générés à partir de progéniteurs hématopoïétiques<sup>386</sup>. Des cellules CD34<sup>+</sup> seraient infectées par un lentivirus codant pour la protéine mutée, alors que la production de la protéine normale serait interrompue par des shRNAs. Ainsi, le développement de

*P. falciparum* dans ces érythrocytes mutés pourrait être étudié. Mais ici encore, de telles expériences ne seraient réalisables que pour certaines protéines du GR, dont la mutation ou la délétion ne serait pas préjudiciable au bon déroulement de l'hématopoïèse.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Près de la moitié de la population mondiale est aujourd'hui exposée au risque de paludisme. Le paludisme à *P. falciparum* est celui entraînant la plus forte mortalité. A ce jour, il n'existe toujours pas de vaccin totalement efficace protégeant l'ensemble des populations exposées au paludisme, et des résistances du parasite aux traitements actuellement utilisés émergent. Il est donc nécessaire de continuer à développer des stratégies de lutte contre cette pathologie, notamment par l'élaboration de nouveaux traitements et vaccins. Pour ce faire, il est indispensable de comprendre la biologie et le fonctionnement du parasite. Au cours de l'infection chez l'Homme, *P. falciparum* se développe dans les érythrocytes et cause les symptômes du paludisme. Lors de cette phase intra-érythrocytaire, le parasite interagit avec sa cellule hôte afin de se répliquer à l'abri du système immunitaire. Cependant, certains désordres génétiques du GR sont fortement fréquents en zone d'endémie palustre, résultant de la protection qu'ils confèrent contre le paludisme. Notamment, l'HbS confère au porteur hétérozygote une probabilité moindre de développer des symptômes de paludisme grave à *P. falciparum*. La présence d'HbS engendre un stress oxydant, et ainsi un environnement délétère au développement du parasite au sein du GR. Les GRs HbAS constituent ainsi un modèle pertinent pour étudier les interactions du parasite avec l'hématie, permettant de mieux appréhender les mécanismes clés pour le développement de *P. falciparum*.

Le but de cette thèse était de mieux caractériser les mécanismes de résistance du trait drépanocytaire face au paludisme. A ce jour, ces mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés. Notamment, ces travaux ont été réalisés afin d'étudier les mécanismes à l'origine de la présentation anormale des antigènes parasitaires à la surface du GR HbAS infecté (chapitre 2) et les conséquences de ces altérations sur la réponse immune dans le cadre du paludisme gestationnel (chapitre 1).

Le premier volet de cette thèse portait sur la modulation par l'HbS de la réponse immune anti-palustre dans le cadre du paludisme gestationnel. Le PAM cause 10 000 morts maternelles et 200 000 morts néonatales chaque année<sup>92</sup>. L'UMR261 conduit des études afin d'explorer les facteurs affectant les femmes lors de leur grossesse en zone tropicale. Ainsi, nous avons eu l'opportunité d'étudier les mécanismes de résistance dans le cadre du paludisme gestationnel, en utilisant des échantillons de terrain provenant de la cohorte STOPPAM réalisée en 2007-2010 au Bénin.

Pour ce projet, nous souhaitons voir si le portage hétérozygote d'HbS était associé à une réponse immune protectrice dans le cadre du PAM. En effet, la littérature rapporte une altération de la présentation de VAR2CSA à la surface des iGRs. Ainsi, il est possible

d'imaginer que ce phénomène engendre un développement moins efficace de la réponse immune contre VAR2CSA. Il est aussi possible que la plus faible cytoadhérence des iGRs HbAS favorise le passage de ces hématies parasitées dans la rate et ainsi une meilleure visibilité pour le développement d'anticorps protecteurs.

Nous avons comparé les taux de reconnaissance des plasmas provenant de femmes HbAA et HbAS pour la surface des GRs HbAA et HbAS infectés par un parasite exprimant VAR2CSA. Nous avons montré que le taux des IgG liées à la surface des iGRs était significativement plus faible pour les plasmas HbAS, lorsque le génotype Hb était associé à celui des mères dont les plasmas étaient issus. De plus, en supposant que VAR2CSA est la principale cible des anticorps présents dans les plasmas, nous n'avons pas observé de différence entre les taux d'anticorps anti-VAR2CSA mesurés chez les femmes HbAA et HbAS. Ces résultats suggèrent que le plus faible taux de liaison des plasmas des mères HbAS à la surface des iGRs HbAS est dû à une présentation anormale de VAR2CSA. Des études ont montré que l'export des protéines parasitaires est retardé et plus faible pour certaines protéines parasitaires<sup>258</sup>, et que la dynamique d'export est altérée dans les iGRs HbAS<sup>226</sup>. Or, Cyrklaff *et al.* ont mesuré des taux similaires d'ARNm de *var2csa* dans des iGRs HbAA et HbAS, associés à une reconnaissance plus faible de VAR2CSA par un anticorps spécifique à la surface des iGRs HbAS<sup>226</sup>.

Ainsi, cette présentation anormale pourrait être expliquée par un taux d'expression plus faible de VAR2CSA résultant d'une altération:

- de la traduction des ARNm de *var2csa*
- et /ou de l'export des protéines VAR2CSA

Cette présentation anormale pourrait aussi résulter de la modification de la mise en place du complexe de cytoadhérence exposant VAR2CSA à la surface du GR. La modification des interactions entre les protéines parasitaires et érythrocytaires pourrait altérer l'ancrage de VAR2CSA dans les knobs, cachant ou modifiant des épitopes normalement reconnus par les anticorps.

Nos résultats ne nous permettent pas de conclure à ce sujet. Il serait intéressant d'étudier les zones d'interaction entre VAR2CSA (présentée à la surface de iGR HbAA et HbAS) et les anticorps anti-VAR2CSA par cryotomographie électronique par exemple. Il serait aussi intéressant de déterminer par protéomique quantitative la quantité de VAR2CSA présente dans les membranes des iGRs HbAA et HbAS. La comparaison de ces expériences pourrait nous apporter des éléments de compréhension sur le plus faible taux de reconnaissance des iGRs HbAS par les plasmas issus des mères HbAS.

Nos résultats ne suggèrent pas de modulation de la quantité d'anticorps anti-VAR2CSA par le génotype HbAS. Cependant, il est possible d'imaginer que les femmes HbAS soient mieux protégées, car l'altération de la cytoadhérence des iGRs les rend plus détectables par le système immunitaire que les iGRs HbAA. Ainsi, malgré la présentation anormale de VAR2CSA, l'exposition plus fréquente de cet antigène permettrait le développement d'une immunité similaire à celle mesurée chez les femmes HbAA. Cette immunité serait plus efficace face à des GRs présentant anormalement VAR2CSA à leur surface.

Ainsi, il serait intéressant de mieux caractériser les mécanismes expliquant l'altération de la présentation de VAR2CSA à la surface des iGRs. Il serait intéressant d'étudier la formation du complexe de cytoadhérence comprenant VAR2CSA à la surface du GR HbAS infecté. Pour cela, des expériences d'immunoprécipitation après ou sans étape de « cross-linking » pourraient être réalisées à partir de GRs HbAA et HbAS infectés par des parasites exprimant VAR2CSA. Un anticorps anti-VAR2CSA serait utilisé, afin d'identifier par MS les différentes protéines érythrocytaires et parasitaires associées.

C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à la modulation par l'HbS, du remodelage de la membrane du globule rouge infecté. Ces expériences ont été réalisées dans le deuxième projet de cette thèse avec des érythrocytes HbAA et HbAS infectés par la souche 3D7 de *P. falciparum*. L'HbS et l'infection par *P. falciparum* génèrent toutes les deux du stress oxydant, qui pourrait altérer l'équilibre kinase/phosphatase. Ainsi, l'état de phosphorylation des protéines de la membrane du GR pourrait être altéré suite à l'infection de GRs HbAS. La phosphorylation est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions et dans les interactions protéiques. Ainsi, le but de ce travail, qui était un projet exploratoire, était de déterminer l'influence du génotype HbAS sur le protéome et le phosphoprotéome de la membrane des GR infectés par *P. falciparum*.

Les résultats de ce projet ont été soumis pour publication en 2017, mais malheureusement refusés après lecture des rapporteurs par manque d'échantillons. Ceci nous a donné l'opportunité d'améliorer la technicité et la robustesse de ce projet. En effet, les ghosts avaient été réalisés à partir de deux donneurs d'Hb anormale, un donneur HbAS et un donneur HbAC (nous pensions initialement que ce dernier était HbAS au moment des expériences). De plus, nous avons réalisé nos ghosts à partir de culots érythrocytaires congelés. Or, lors de la décongélation, les GRs, fragiles, sont susceptibles de lyser. Bien que nous réalisions par la suite une lyse hypotonique pour récupérer les membranes de nos échantillons, la lyse lors de la décongélation est plus brutale, et génère des fragments de membrane plus petits, dont les

plus courts ne sont pas culotés lors des centrifugations. Ainsi, nous avons probablement perdu une partie du matériel lors de cette première réalisation. Lors de la reprise du projet, nous avons réalisé les ghosts directement après récolte sans congeler les culots érythrocytaires. Aussi, lors des premières expériences, nous avons préparé les ghosts à partir de culture dont la parasitémie était comprise entre 3 et 5%. Lors de la reproduction des manipulations, nous avons fait des cultures en gros volume (jusqu'à 15-20 ml de sang), que nous avons passé en MACS, afin d'enrichir en GRs parasités. Nous avons ainsi réussi à réaliser pour tous nos donneurs des culots érythrocytaires à 45% de parasitémie, bien que le volume récolté final était très faible (250  $\mu$ l au maximum). Enfin, nous n'avons pas tenu compte du temps après prélèvement pour la préparation de nos échantillons lors de nos premières expériences. Nous avons réalisé les échantillons dès réception de sang, sans forcément associer un donneur HbAA avec un donneur HbAS, ne nous donnant pas de point de comparaison. Or, une étude à récemment montré que la phosphorylation des protéines érythrocytaires pouvait être modifiée avec le vieillissement du globule rouge, même à 4°C<sup>344</sup>. Pour les échantillons non infectés, nous avons conservé le sang des donneurs à 4°C, entraînant probablement une différence de vitesse de vieillissement de ces érythrocytes par rapport aux GRs en culture à 37°C. Ainsi, nous avons conservé tous les globules rouges à 37°C et dans des conditions identiques de culture lors de la reprise des expériences. Les différentes procédures appliquées lors des expériences ont été reproduites selon la même temporalité avec les GRs provenant des donneurs différents HbAA et HbAS.

Ainsi, la reprise des expériences en 2018 nous a permis d'améliorer notre démarche expérimentale et d'obtenir des résultats plus robustes et de meilleure qualité. Par une approche quantitative et comparative, nous avons observé des différences de quantité et de phosphorylation des protéines érythrocytaires et parasitaires de la membrane du GR HbAA et HbAS infecté. Le profil des protéines concernées suggère l'altération du remodelage de la membrane du GR infecté, des fonctions des transporteurs, et de la détoxification de l'hème dans les GRs HbAS infectés.

Dans notre étude, bien que la souche parasitée ne présente pas de phénotype de cytoadhérence, nous n'avons pas détecté de différence de quantité de *PfEMP1* dans notre analyse protéomique selon le statut d'Hb. Cette donnée pourrait amener des éléments de réponse aux questions émanant du chapitre 1, à savoir si l'altération de présentation de VAR2CSA était dûe à un taux plus faible de l'expression de cette protéine. Ici, nos résultats suggèrent que le taux d'expression de *PfEMP1* n'est pas altéré par le portage hétérozygote

d'HbS lors de l'infection. Cependant, afin de répondre plus précisément à cette question, l'expérience devrait être reproduite avec des parasites exprimant VAR2CSA.

Le but de ce projet était aussi d'identifier des mécanismes ou des voies parasitaires qui pourraient être ciblés pour limiter le développement de *P. falciparum*. C'est ce que nous avons essayé de faire en infectant des GRs Lu-BCAM et ENT1 null, protéines différenciellement présentes ou phosphorylées dans nos analyses. Les résultats ont montré que l'absence de ces protéines n'était pas délétère à la répllication parasitaire. Ainsi, nous n'avons pas pu amener de réels éléments fonctionnels de réponse à nos questions dans le temps imparti. Toutefois, ces expériences soulignent la démarche expérimentale que nous voulions aborder dans ce projet.

Les résultats de ces deux projets montrent que l'HbS est associée aux modifications des interactions entre le parasite et sa cellule hôte. Ces données soulignent l'importance de prendre en compte les atteintes du GR chez le donneur / le patient lors de l'étude du développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum* (échantillons de terrain et culture *in vitro*).

Nous sommes conscients que ce travail est un projet exploratoire, réalisé à partir de peu d'échantillons, et que les résultats nécessitent d'être reproduits par d'autres techniques et à partir d'un plus grand effectif. Nous avons été limités par le manque de donneurs et la quantité de sang HbAS que nous pouvions prélever, et avons donc décidé d'optimiser les conditions expérimentales, afin de nous assurer de la qualité de nos expériences. Avant et pendant cette thèse, nous avons essayé plusieurs fois de nous associer à des services médicaux traitant des enfants drépanocytaires. Nous voulions sensibiliser leurs parents, porteurs du trait drépanocytaire, à notre projet de recherche. Cependant, malgré nos efforts, ces démarches n'ont jamais été concluantes. Lorsque nous avons décidé de recommencer ces travaux en 2018, nous disposions de 5 donneurs HbAS disponibles et volontaires pour participer à notre projet. Toutefois, l'un d'entre eux ne s'est jamais présenté. Nous avons donc préparé les ghosts en 4 séries, en associant à chaque fois un donneur HbAA et un donneur HbAS. Avant d'envoyer nos échantillons à la plateforme de MS, nous avons déterminé les différents génotypes de nos donneurs. Un de nos donneurs d'Hb anormale s'est révélé être HbAC plutôt que HbAS. Aux vues de la complexité de cette étude et de la plus faible fréquence de l'HbC sous forme hétérozygote, nous avons préféré exclure ce donneur, ainsi que l'échantillon HbAA associé. Cependant, une démarche similaire reste à explorer dans le cadre de l'HbC.

Ainsi, nous avons réalisé les analyses de protéomique à partir de 3 donneurs HbAA et 3 donneurs HbAS.

Afin de pallier cette difficulté, des études pourraient être réalisées sur le terrain dans des pays où la fréquence du génotype HbAS est plus fréquente qu'en France. Certaines études s'intéressant au trait drépanocytaire et le paludisme ont notamment procédé en faisant parvenir du sang d'Afrique. Toutefois, l'acheminement des échantillons était parfois long, avec une utilisation des GRs incompatible avec les objectifs de temporalité visés. L'UMR261 dispose d'implantations de laboratoire à Cotonou, au Bénin et à Accra, au Ghana. Il serait donc intéressant de réaliser des études dans l'une de ces implantations. Cette démarche permettrait d'augmenter le nombre d'échantillons et ainsi la force statistique des travaux effectués. Notamment, le Centre de Prise en charge Médicale Intégrée du Nourrisson et de la Femme Enceinte atteints de Drépanocytose (CPMI-NFED) se situe à Cotonou au Bénin. La protection conférée par le trait drépanocytaire dans le cadre du PAM pourrait ainsi être étudiée sur le terrain. Il faudrait dans un premier temps mettre en place le projet, et recruter des médecins disponibles et volontaires pour participer à ces travaux de recherche. Il faudrait par la suite trouver et fidéliser des donneurs de groupe O, et déterminer leurs génotypes pour d'autres anomalies érythrocytaires (G6PD et  $\alpha$ -thalassémie). En effet, dans notre premier projet, nous avons évalué les co-portages de l' $\alpha$ -thalassémie et du déficit en G6PD associé à l'HbS, dans notre groupe de femmes sélectionnées exemptes du portage d'HbC (comme énoncé précédemment, faute d'obtention de GRs HbAC de groupe sanguin O, nous n'avons pas pu explorer l'impact de l'HbC dans le cadre du paludisme gestationnel). Nous avons pu constater, dans notre sous-cohorte, que 26,7% et 51,7% des femmes étaient porteuses du variant G6PD A<sup>-</sup> ou de la délétion  $\alpha$ <sup>-3,7</sup>, respectivement. Seulement 35,4% des femmes HbAA et 37,8% des HbAS n'étaient pas porteuses du variant G6PD A<sup>-</sup> ni de la délétion  $\alpha$ <sup>-3,7</sup>. Dans le deuxième projet de cette thèse, seul le donneur HbAS<sub>1</sub> n'était pas co-porteur de ces autres anomalies érythrocytaires, montrant une fois de plus que les mutations à l'origine du déficit en G6PD et de l' $\alpha$ -thalassémie sont souvent co-portées avec celle de l'HbS. La plupart des études épidémiologiques se sont intéressées à l'impact d'un seul désordre génétique sur la protection contre le paludisme. Cependant, il semble qu'en zones de forte endémie palustre, les individus sont souvent porteurs de plusieurs désordres érythrocytaires. Or, la combinaison de plusieurs anomalies érythrocytaires pourrait modifier la protection conférée contre le paludisme. C'est notamment ce que suggèrent plusieurs études décrivant un phénomène d'épistasie négative de l' $\alpha$ -thalassémie sur la protection conférée par le trait drépanocytaire

contre le paludisme<sup>255,256</sup>. Ces interactions pourraient expliquer certaines contradictions entre plusieurs études.

Dans nos travaux, notre effectif était trop faible pour distinguer nos résultats en fonction du génotype du GR en prenant en compte l'Hb, le déficit en G6PD et l' $\alpha$ -thalassémie. Cependant, des études réalisées sur le terrain permettraient d'augmenter le nombre d'échantillons. Ainsi, il serait possible de considérer chaque anomalie érythrocytaire séparément, puis simultanément par rapport à la problématique considérée. Quelques études se sont déjà intéressées à l'effet de la combinaison de plusieurs anomalies sur la protection contre le paludisme. Notamment, une étude réalisée chez les enfants au Mali a montré que la combinaison du variant G6PD A<sup>-</sup> et du trait drépanocytaire ne semblait pas augmenter la protection conférée par chacune de ces mutations séparément. Les résultats de cette étude suggèrent même que chez les filles, le portage hétérozygote du variant G6PD A<sup>-</sup> et de l'HbS pourrait causer un phénomène d'épistasie négative par rapport à la protection contre le paludisme sévère<sup>387</sup>. De plus, une étude a montré que la réduction de la cytoadhérence des iGRs HbAS était inversée par le co-portage de l' $\alpha$ -thalassémie<sup>261</sup>.

A ce jour, la protection conférée par le trait drépanocytaire est l'exemple le plus connu. Mais de nombreux autres désordres érythrocytaires sont sélectionnés par le paludisme dans le monde, et constituent des modèles permettant de mieux comprendre le fonctionnement et le développement de *Plasmodium*.

L'HbC résulte de la mutation du même codon du gène de la  $\beta$ -globine que l'HbS. Cette autre Hb anormale cause l'hémoglobinose C sous forme homozygote. L'allèle HbC est surtout fréquent en Afrique de l'Ouest, son épïcêtre étant le Burkina-Faso. Les phénotypes HbAC et HbCC sont tous les deux associés à une protection contre le paludisme à *P. falciparum*<sup>229</sup>. Cependant, la sévérité de l'hémoglobinose C est moindre que celle de la drépanocytose. Ainsi, l'HbC conférant aussi une protection relative contre le paludisme, des études suggèrent que l'HbC pourrait, à terme, devenir plus prévalente et remplacer l'HbS dans les zones de forte endémie palustre<sup>229</sup>. Notamment, des fréquences plus faibles de l'allèle HbS sont observées en Afrique de l'Ouest et résultent probablement de la forte prévalence de l'HbC<sup>212</sup>.

Des polymorphismes génétiques sont aussi associés à des susceptibilités plus faibles de développer des formes graves de paludisme. Une étude a montré que le groupe O était associé à des formes moins sévères de paludisme à *P. falciparum* que les autres antigènes du groupe sanguin<sup>388</sup>. Des études ont montré des déficits érythrocytaires pour la protéine ABCB6 ou pour le récepteur 1 du complément, ainsi que des mutations de l'ankyrine, qui protègent

également contre le paludisme<sup>368,389,390</sup>. Une autre enzymoglobinopathie, le déficit en pyruvate kinase, semble conférer une protection contre le paludisme à *P. falciparum*<sup>391</sup>.

Des anomalies de protéines du cytosquelette érythrocytaire génèrent aussi des désordres protégeant contre le paludisme. C'est le cas de l'HE, résultant des défauts des protéines du complexe jonctionnel d'actine, de la HS, liée à des anomalies affectant les protéines du complexe ankyrine<sup>385,392</sup>, mais aussi de l'Ovalocytose d'Asie du Sud-Est (ou « Southeast Asian Ovalocytosis » (SAO)). La SAO est fortement fréquente dans la région Pacifique Ouest, pouvant toucher plus de 35% des individus dans certaines régions<sup>393,394</sup>. Elle résulte de la délétion de 27 pb dans le domaine cytoplasmique de la Bande 3<sup>395</sup>. Les individus atteints de SAO sont presque exclusivement hétérozygotes pour cette mutation, la forme homozygote étant probablement létale (quelques cas ont été décrits mais la pathologie est alors extrêmement sévère). Plusieurs études ont montré que la SAO protégeait fortement contre le paludisme cérébral<sup>393,396</sup>. En effet, dans ces études, aucun sujet atteint de SAO ne souffrait de cette complication du paludisme.

Bien que toutes ces anomalies génétiques résultent de mutations pouvant causer des symptômes et des pathologies, elles offrent aussi un avantage sélectif en zone de forte endémie palustre sous forme hétérozygote. La pression engendrée par l'apparition de résistance des parasites aux traitements du paludisme amène aujourd'hui la communauté scientifique à réfléchir à de nouveaux moyens de lutte contre cette maladie.

L'ensemble de ces données montrent que le trait drépanocytaire et les autres anomalies du GR constituent des modèles uniques pour mieux appréhender les interactions entre le parasite et sa cellule hôte, offrant la possibilité de découvrir des nouvelles cibles thérapeutiques ou vaccinales afin de lutter contre le paludisme.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. White, N. J. *et al.* Malaria. *Lancet Lond. Engl.* **383**, 723–735 (2014).
2. WHO | World malaria report 2018. WHO Available at:  
<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/>. (Accessed: 21st November 2018)
3. Dimopoulos, G., Kafatos, F. C., Waters, A. P. & Sinden, R. E. Malaria parasites and the anopheles mosquito. *Chem. Immunol.* **80**, 27–49 (2002).
4. Sinka, M. E. *et al.* A global map of dominant malaria vectors. *Parasit. Vectors* **5**, 69 (2012).
5. Lehmann, T. & Diabate, A. The molecular forms of *Anopheles gambiae*: A phenotypic perspective. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **8**, 737–746 (2008).
6. World Malaria Report 2016 - 9789241511711-eng.pdf. Available at:  
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf>. (Accessed: 4th September 2017)
7. Killeen, G. F. Characterizing, controlling and eliminating residual malaria transmission. *Malar. J.* **13**, 330 (2014).
8. Dondorp, A. M. *et al.* The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **47**, 151–157 (2008).
9. de Koning-Ward, T. F., Dixon, M. W. A., Tilley, L. & Gilson, P. R. Plasmodium species: master renovators of their host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 494–507 (2016).
10. Sabbatani, S., Fiorino, S. & Manfredi, R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* **14**, 299–309 (2010).
11. Gething, P. W. *et al.* A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malar. J.* **10**, 378 (2011).
12. Gething, P. W. *et al.* A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1814 (2012).

13. Gueirard, P. *et al.* Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18640–18645 (2010).
14. Bousema, T. & Drakeley, C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 377–410 (2011).
15. White, N. J. Why Do Some Primate Malaria Relapse? *Trends Parasitol.* **32**, 918–920 (2016).
16. Rossati, A. *et al.* Climate, environment and transmission of malaria. *Infez. Med. Riv. Period. Ezologia Epidemiol. Diagn. Clin. E Ter. Delle Patol. Infett.* **24**, 93–104 (2016).
17. WHO | Universal access to malaria diagnostic testing – An operational manual. *WHO* Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241502092/en/>. (Accessed: 4th September 2017)
18. TDR | Microscopy for the detection, identification and quantification of malaria parasites on stained thick and thin blood films in research settings. *WHO* Available at: [http://www.who.int/tdr/publications/microscopy\\_detec\\_ident\\_quantif/en/](http://www.who.int/tdr/publications/microscopy_detec_ident_quantif/en/). (Accessed: 4th September 2017)
19. WHO | Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 7 (2015-2016). *WHO* Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/978924151268/en/>. (Accessed: 4th September 2017)
20. Abba, K. *et al.* Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated non-falciparum or *Plasmodium vivax* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD011431 (2014). doi:10.1002/14651858.CD011431
21. D’Acromont, V. *et al.* Reduction of anti-malarial consumption after rapid diagnostic tests implementation in Dar es Salaam: a before-after and cluster randomized controlled study. *Malar. J.* **10**, 107 (2011).

22. Terms of reference of the Evidence Review Group (ERG) on diagnosis of *Plasmodium falciparum* in low transmission areas - tor-erg-diagnostics-low-transmission-settings.pdf.
23. Okell, L. C. *et al.* Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat. Commun.* **3**, 1237 (2012).
24. Okell, L. C., Ghani, A. C., Lyons, E. & Drakeley, C. J. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect. Dis.* **200**, 1509–1517 (2009).
25. Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S. & Brown, K. N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**, 283–292 (1993).
26. Kumar, S., Kumari, R. & Pandey, R. New insight-guided approaches to detect, cure, prevent and eliminate malaria. *Protoplasma* **252**, 717–753 (2015).
27. Kluska, M., Marciniuk-Kluska, A., Prukała, D. & Prukała, W. Analytics of Quinine and its Derivatives. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **46**, 139–145 (2016).
28. Foley, M. & Tilley, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol. Ther.* **79**, 55–87 (1998).
29. Ashley, E. A., Recht, J. & White, N. J. Primaquine: the risks and the benefits. *Malar. J.* **13**, 418 (2014).
30. Dembélé, L. *et al.* Persistence and activation of malaria hypnozoites in long-term primary hepatocyte cultures. *Nat. Med.* **20**, 307–312 (2014).
31. 219-224 SYMP Les modes d'action des antipaludiques. Intérêt de l'association atovaquone-proguanil (Touze).pdf. Available at: [http://www.jle.com/fr/MedSanteTrop/2002/62.3/219-224%20SYMP%20Les%20modes%20d%E2%80%99action%20des%20antipaludiques.%20Int%C3%A9r%C3%AAt%20de%20l%E2%80%99association%20atovaquone-proguanil%20\(Touze\).pdf](http://www.jle.com/fr/MedSanteTrop/2002/62.3/219-224%20SYMP%20Les%20modes%20d%E2%80%99action%20des%20antipaludiques.%20Int%C3%A9r%C3%AAt%20de%20l%E2%80%99association%20atovaquone-proguanil%20(Touze).pdf). (Accessed: 11th September 2017)

32. Vaidya, A. B., Lashgari, M. S., Pologe, L. G. & Morrisey, J. Structural features of Plasmodium cytochrome b that may underlie susceptibility to 8-aminoquinolines and hydroxynaphthoquinones. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**, 33–42 (1993).
33. Ansari, M. T. *et al.* Malaria and artemisinin derivatives: an updated review. *Mini Rev. Med. Chem.* **13**, 1879–1902 (2013).
34. Global Partnership to Roll Back Malaria, World Health Organization & UNICEF. *World malaria report 2005*. (World Health Organization : UNICEF, 2005).
35. Olliaro, P. L. & Taylor, W. R. Developing artemisinin based drug combinations for the treatment of drug resistant falciparum malaria: A review. *J. Postgrad. Med.* **50**, 40–44 (2004).
36. OMS | Traitement préventif intermittent du paludisme (TPI) pour les femmes enceintes. *WHO* Available at: [http://www.who.int/malaria/areas/preventive\\_therapies/pregnancy/fr/](http://www.who.int/malaria/areas/preventive_therapies/pregnancy/fr/). (Accessed: 11th September 2017)
37. Mpogoro, F. J. *et al.* Uptake of intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine for malaria during pregnancy and pregnancy outcomes: a cross-sectional study in Geita district, North-Western Tanzania. *Malar. J.* **13**, 455 (2014).
38. Almond, D. *et al.* Provider and user acceptability of intermittent screening and treatment for the control of malaria in pregnancy in Malawi. *Malar. J.* **15**, 574 (2016).
39. OMS | Traitement préventif intermittent chez les nourrissons (TPIIn). *WHO* Available at: [http://www.who.int/malaria/areas/preventive\\_therapies/infants/fr/](http://www.who.int/malaria/areas/preventive_therapies/infants/fr/). (Accessed: 11th September 2017)
40. WHO | Seasonal malaria chemoprevention with sulfadoxine-pyrimethamine plus amodiaquine in children: A field guide. *WHO* Available at: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241504737/en/>. (Accessed: 12th February 2019)
41. Checkley, A. M. & Hill, D. R. Prevention of malaria in long-term travelers. *Trends Parasitol.* **23**, 462–465 (2007).

42. Ouattara, A. *et al.* Designing malaria vaccines to circumvent antigen variability. *Vaccine* **33**, 7506–7512 (2015).
43. WHO | Malaria vaccine technology roadmap. *WHO* Available at: [http://www.who.int/immunization/topics/malaria/vaccine\\_roadmap/en/](http://www.who.int/immunization/topics/malaria/vaccine_roadmap/en/). (Accessed: 12th September 2017)
44. Ouattara, A. & Laurens, M. B. Vaccines against malaria. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **60**, 930–936 (2015).
45. Riley, E. M. & Stewart, V. A. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nat. Med.* **19**, 168–178 (2013).
46. Olotu, A. *et al.* Four-year efficacy of RTS,S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1111–1120 (2013).
47. RTS,S Clinical Trials Partnership *et al.* First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1863–1875 (2011).
48. Heppner, D. G. *et al.* Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* **23**, 2243–2250 (2005).
49. Bejon, P. *et al.* Extended follow-up following a phase 2b randomized trial of the candidate malaria vaccines FP9 ME-TRAP and MVA ME-TRAP among children in Kenya. *PLoS One* **2**, e707 (2007).
50. Ewer, K. J. *et al.* Protective CD8+ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nat. Commun.* **4**, 2836 (2013).
51. Seder, R. A. *et al.* Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science* **341**, 1359–1365 (2013).
52. Mikolajczak, S. A. *et al.* A next-generation genetically attenuated Plasmodium falciparum parasite created by triple gene deletion. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **22**, 1707–1715 (2014).

53. Dutta, S. *et al.* Overcoming antigenic diversity by enhancing the immunogenicity of conserved epitopes on the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1. *PLoS Pathog.* **9**, e1003840 (2013).
54. Thera, M. A. *et al.* A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1004–1013 (2011).
55. Thera, M. A. & Plowe, C. V. Vaccines for malaria: how close are we? *Annu. Rev. Med.* **63**, 345–357 (2012).
56. Srinivasan, P. *et al.* Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 10311–10316 (2014).
57. Matuschewski, K. & Mueller, A.-K. Vaccines against malaria - an update. *FEBS J.* **274**, 4680–4687 (2007).
58. Malkin, E. M. *et al.* Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* **23**, 3131–3138 (2005).
59. Wu, Y. *et al.* Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PloS One* **3**, e2636 (2008).
60. Da, D. F. *et al.* Anti-Pfs25 human plasma reduces transmission of *Plasmodium falciparum* isolates that have diverse genetic backgrounds. *Infect. Immun.* **81**, 1984–1989 (2013).
61. Salanti, A. *et al.* Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J. Exp. Med.* **200**, 1197–1203 (2004).
62. Srivastava, A., Durocher, Y. & Gamain, B. Expressing full-length functional PfEMP1 proteins in the HEK293 expression system. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **923**, 307–319 (2013).
63. Gbédandé, K. *et al.* Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PAMVAC: Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese primigravidae. *Vaccine* **35**, 3474–3481 (2017).

64. Mordmüller, B. *et al.* First-in-human, randomized, double-blind clinical trial of differentially adjuvanted PAMVAC, a vaccine candidate to prevent pregnancy-associated malaria. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* (2019). doi:10.1093/cid/ciy1140
65. Chêne, A. *et al.* Clinical development of placental malaria vaccines and immunoassays harmonization: a workshop report. *Malar. J.* **15**, 476 (2016).
66. Phillips-Howard, P. A. *et al.* Efficacy of permethrin-treated bed nets in the prevention of mortality in young children in an area of high perennial malaria transmission in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**, 23–29 (2003).
67. OMS | Paludisme: informations aux voyageurs. *WHO* Available at: <http://www.who.int/malaria/travellers/fr/>. (Accessed: 11th September 2017)
68. Mulamba, C. *et al.* Widespread pyrethroid and DDT resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in East Africa is driven by metabolic resistance mechanisms. *PLoS One* **9**, e110058 (2014).
69. Ayimba, E. *et al.* Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Exp. Immunol.* **166**, 218–226 (2011).
70. Spillman, N. J., Beck, J. R. & Goldberg, D. E. Protein export into malaria parasite-infected erythrocytes: mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 813–841 (2015).
71. Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E. & Cowman, A. F. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* **306**, 1930–1933 (2004).
72. Heiber, A. *et al.* Identification of new PNEPs indicates a substantial non-PEXEL exportome and underpins common features in *Plasmodium falciparum* protein export. *PLoS Pathog.* **9**, e1003546 (2013).

73. Lanzer, M., Wickert, H., Krohne, G., Vincensini, L. & Braun Breton, C. Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Int. J. Parasitol.* **36**, 23–36 (2006).
74. Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Balu, B., Adams, J. H. & Haldar, K. Maurer's clefts of Plasmodium falciparum are secretory organelles that concentrate virulence protein reporters for delivery to the host erythrocyte. *Blood* **111**, 2418–2426 (2008).
75. McMillan, P. J. *et al.* Spatial and temporal mapping of the PfEMP1 export pathway in Plasmodium falciparum. *Cell. Microbiol.* **15**, 1401–1418 (2013).
76. Spielmann, T. & Gilberger, T.-W. Critical Steps in Protein Export of Plasmodium falciparum Blood Stages. *Trends Parasitol.* **31**, 514–525 (2015).
77. Nagao, E., Kaneko, O. & Dvorak, J. A. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: qualitative and quantitative analyses of parasite-induced knobs by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **130**, 34–44 (2000).
78. Tibúrcio, M., Sauerwein, R., Lavazec, C. & Alano, P. Erythrocyte remodeling by Plasmodium falciparum gametocytes in the human host interplay. *Trends Parasitol.* **31**, 270–278 (2015).
79. Cranston, H. A. *et al.* Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability. *Science* **223**, 400–403 (1984).
80. Duez, J. *et al.* Mechanical clearance of red blood cells by the human spleen: Potential therapeutic applications of a biomimetic RBC filtration method. *Transfus. Clin. Biol. J. Soc. Francaise Transfus. Sang.* **22**, 151–157 (2015).
81. Taylor, H. M., Kyes, S. A. & Newbold, C. I. Var gene diversity in Plasmodium falciparum is generated by frequent recombination events. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**, 391–397 (2000).
82. Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X. & Wellems, T. E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat. Med.* **19**, 156–167 (2013).

83. Smith, J. D., Subramanian, G., Gamain, B., Baruch, D. I. & Miller, L. H. Classification of adhesive domains in the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**, 293–310 (2000).
84. Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. & Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**, 673–679 (2002).
85. Ochola, L. B. *et al.* Specific receptor usage in Plasmodium falciparum cytoadherence is associated with disease outcome. *PLoS One* **6**, e14741 (2011).
86. Aird, W. C., Mosnier, L. O. & Fairhurst, R. M. Plasmodium falciparum picks (on) EPCR. *Blood* **123**, 163–167 (2014).
87. Dondorp, A. M. *et al.* Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. *J. Infect. Dis.* **197**, 79–84 (2008).
88. Francischetti, I. M. B., Seydel, K. B. & Monteiro, R. Q. Blood Coagulation, Inflammation and Malaria. *Microcirc. N. Y. N 1994* **15**, 81–107 (2008).
89. 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.* **98**, 1805–1810 (2001).
90. Adams, Y., Kuhnrae, P., Higgins, M. K., Ghumra, A. & Rowe, J. A. Rosetting Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind to human brain microvascular endothelial cells in vitro, demonstrating a dual adhesion phenotype mediated by distinct P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains. *Infect. Immun.* **82**, 949–959 (2014).
91. WHO | World Malaria Report 2015. WHO Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>. (Accessed: 19th February 2019)
92. Schantz-Dunn, J. & Nour, N. M. Malaria and pregnancy: a global health perspective. *Rev. Obstet. Gynecol.* **2**, 186–192 (2009).

93. Andrews, K. T. & Lanzer, M. Maternal malaria: Plasmodium falciparum sequestration in the placenta. *Parasitol. Res.* **88**, 715–723 (2002).
94. Fried, M. & Duffy, P. E. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* **272**, 1502–1504 (1996).
95. Ouédraogo, S. *et al.* Maternal anemia in pregnancy: assessing the effect of routine preventive measures in a malaria-endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **88**, 292–300 (2013).
96. Rogawski, E. T. *et al.* The effects of malaria and intermittent preventive treatment during pregnancy on fetal anemia in Malawi. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **55**, 1096–1102 (2012).
97. Briand, V. *et al.* Fetal Growth Restriction Is Associated With Malaria in Pregnancy: A Prospective Longitudinal Study in Benin. *J. Infect. Dis.* **214**, 417–425 (2016).
98. McGregor, I. A. Seroepidemiological studies of malaria in The Gambia, West Africa. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **65 Suppl 2**, 79–87 (1985).
99. Steketee, R. W., Nahlen, B. L., Parise, M. E. & Menendez, C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**, 28–35 (2001).
100. Duffy, P. E. Plasmodium in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. *Parasitology* **134**, 1877–1881 (2007).
101. Ndam, N. T. *et al.* Protective Antibodies against Placental Malaria and Poor Outcomes during Pregnancy, Benin. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 813–823 (2015).
102. Fried, M., Nosten, F., Brockman, A., Brabin, B. J. & Duffy, P. E. Maternal antibodies block malaria. *Nature* **395**, 851–852 (1998).
103. Tuikue Ndam, N. G. *et al.* Dynamics of anti-VAR2CSA immunoglobulin G response in a cohort of senegalese pregnant women. *J. Infect. Dis.* **193**, 713–720 (2006).
104. Huynh, B.-T. *et al.* Influence of the timing of malaria infection during pregnancy on birth weight and on maternal anemia in Benin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**, 214–220 (2011).

105. Brolin, K. J. M., Persson, K. E. M., Wahlgren, M., Rogerson, S. J. & Chen, Q. Differential recognition of *P. falciparum* VAR2CSA domains by naturally acquired antibodies in pregnant women from a malaria endemic area. *PLoS One* **5**, e9230 (2010).
106. Lux, S. E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood* **127**, 187–199 (2016).
107. Salomao, M. *et al.* Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8026–8031 (2008).
108. Reithmeier, R. A. F. *et al.* Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochim. Biophys. Acta* **1858**, 1507–1532 (2016).
109. van den Akker, E., Satchwell, T. J., Williamson, R. C. & Toye, A. M. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. *Blood Cells. Mol. Dis.* **45**, 1–8 (2010).
110. Anong, W. A. *et al.* Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. *Blood* **114**, 1904–1912 (2009).
111. Khan, A. A. *et al.* Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. *J. Biol. Chem.* **283**, 14600–14609 (2008).
112. Han, B. G., Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N. & Jap, B. K. Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 871–875 (2000).
113. Koch, M. & Baum, J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte – towards a reassessment of the host cell contribution. *Cell. Microbiol.* **18**, 319–329 (2016).
114. Paul, A. S., Egan, E. S. & Duraisingh, M. T. Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. *Curr. Opin. Hematol.* **22**, 220–226 (2015).
115. Tham, W.-H., Healer, J. & Cowman, A. F. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* **28**, 23–30 (2012).

116. Koch, M. *et al.* Plasmodium falciparum erythrocyte-binding antigen 175 triggers a biophysical change in the red blood cell that facilitates invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 4225–4230 (2017).
117. Crosnier, C. *et al.* Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *Nature* **480**, 534–537 (2011).
118. Aniweh, Y. *et al.* P. falciparum RH5-Basigin interaction induces changes in the cytoskeleton of the host RBC. *Cell. Microbiol.* **19**, (2017).
119. Zuccala, E. S. & Baum, J. Cytoskeletal and membrane remodelling during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Br. J. Haematol.* **154**, 680–689 (2011).
120. Braun Breton, C. & Pereira da Silva, L. H. Malaria proteases and red blood cell invasion. *Parasitol. Today Pers. Ed* **9**, 92–96 (1993).
121. Roggwiler, E., Bétouille, M. E., Blisnick, T. & Braun Breton, C. A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum. *Mol. Biochem. Parasitol.* **82**, 13–24 (1996).
122. Fernandez-Pol, S. *et al.* A bacterial phosphatase-like enzyme of the malaria parasite Plasmodium falciparum possesses tyrosine phosphatase activity and is implicated in the regulation of band 3 dynamics during parasite invasion. *Eukaryot. Cell* **12**, 1179–1191 (2013).
123. Hiller, N. L. *et al.* A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* **306**, 1934–1937 (2004).
124. Hanssen, E. *et al.* Electron tomography of the Maurer's cleft organelles of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes reveals novel structural features. *Mol. Microbiol.* **67**, 703–718 (2008).
125. Pachlatko, E. *et al.* MAHRP2, an exported protein of Plasmodium falciparum, is an essential component of Maurer's cleft tethers. *Mol. Microbiol.* **77**, 1136–1152 (2010).

126. Cyrklaff, M. *et al.* Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Science* **334**, 1283–1286 (2011).
127. Kilian, N. *et al.* Haemoglobin S and C affect the motion of Maurer's clefts in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell. Microbiol.* **15**, 1111–1126 (2013).
128. Rug, M. *et al.* Export of virulence proteins by malaria-infected erythrocytes involves remodeling of host actin cytoskeleton. *Blood* **124**, 3459–3468 (2014).
129. Blisnick, T. *et al.* Pfsbp1, a Maurer's cleft Plasmodium falciparum protein, is associated with the erythrocyte skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**, 107–121 (2000).
130. Kats, L. M. *et al.* Interactions between Plasmodium falciparum skeleton-binding protein 1 and the membrane skeleton of malaria-infected red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 1619–1628 (2015).
131. Hodder, A. N. *et al.* Analysis of structure and function of the giant protein Pf332 in Plasmodium falciparum. *Mol. Microbiol.* **71**, 48–65 (2009).
132. Nilsson, S., Angeletti, D., Wahlgren, M., Chen, Q. & Moll, K. Plasmodium falciparum antigen 332 is a resident peripheral membrane protein of Maurer's clefts. *PLoS One* **7**, e46980 (2012).
133. Waller, K. L. *et al.* Interaction of the exported malaria protein Pf332 with the red blood cell membrane skeleton. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 861–871 (2010).
134. Glenister, F. K. *et al.* Functional alteration of red blood cells by a megadalton protein of Plasmodium falciparum. *Blood* **113**, 919–928 (2009).
135. Cooke, B. M., Mohandas, N. & Coppel, R. L. The malaria-infected red blood cell: structural and functional changes. *Adv. Parasitol.* **50**, 1–86 (2001).
136. Parker, P. D., Tilley, L. & Klonis, N. Plasmodium falciparum induces reorganization of host membrane proteins during intraerythrocytic growth. *Blood* **103**, 2404–2406 (2004).
137. Pantaleo, A. *et al.* Analysis of changes in tyrosine and serine phosphorylation of red cell membrane proteins induced by P. falciparum growth. *Proteomics* **10**, 3469–3479 (2010).

138. Pantaleo, A. *et al.* Band 3 Erythrocyte Membrane Protein Acts as Redox Stress Sensor Leading to Its Phosphorylation by p (72) Syk. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 6051093 (2016).
139. Merciris, P., Hardy-Dessources, M. D. & Giraud, F. Deoxygenation of sickle cells stimulates Syk tyrosine kinase and inhibits a membrane tyrosine phosphatase. *Blood* **98**, 3121–3127 (2001).
140. Brunati, A. M. *et al.* Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes: identification of primary and secondary phosphorylation sites. *Blood* **96**, 1550–1557 (2000).
141. Ferru, E. *et al.* Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood* **117**, 5998–6006 (2011).
142. McPherson, R. A., Sawyer, W. H. & Tilley, L. Rotational diffusion of the erythrocyte integral membrane protein band 3: effect of hemichrome binding. *Biochemistry (Mosc.)* **31**, 512–518 (1992).
143. Turrini, F. *et al.* Binding of naturally occurring antibodies to oxidatively and nonoxidatively modified erythrocyte band 3. *Biochim. Biophys. Acta* **1190**, 297–303 (1994).
144. Giribaldi, G., Ulliers, D., Mannu, F., Arese, P. & Turrini, F. 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 (2001).
145. Turrini, F., Giribaldi, G., Carta, F., Mannu, F. & Arese, P. Mechanisms of band 3 oxidation and clustering in the phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* **8**, 300–303 (2003).
146. Pantaleo, A. *et al.* New antimalarial indolone-N-oxides, generating radical species, destabilize the host cell membrane at early stages of Plasmodium falciparum growth: role of band 3 tyrosine phosphorylation. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 527–536 (2012).
147. Maier, A. G., Cooke, B. M., Cowman, A. F. & Tilley, L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 341–354 (2009).

148. Rug, M., Prescott, S. W., Fernandez, K. M., Cooke, B. M. & Cowman, A. F. The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood* **108**, 370–378 (2006).
149. Voigt, S. *et al.* The cytoadherence ligand *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) binds to the *P. falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) by electrostatic interactions. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**, 423–428 (2000).
150. Waller, K. L., Nunomura, W., Cooke, B. M., Mohandas, N. & Coppel, R. L. Mapping the domains of the cytoadherence ligand *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) that bind to the knob-associated histidine-rich protein (KAHRP). *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**, 125–129 (2002).
151. Weng, H. *et al.* Interaction of *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) with erythrocyte ankyrin R is required for its attachment to the erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 185–192 (2014).
152. Pei, X. *et al.* Structural and functional studies of interaction between *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* **280**, 31166–31171 (2005).
153. Oh, S. S. *et al.* *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **108**, 237–247 (2000).
154. Kilejian, A. Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4650–4653 (1979).
155. Crabb, B. S. *et al.* Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* **89**, 287–296 (1997).

156. Kilejian, A., Rashid, M. A., Aikawa, M., Aji, T. & Yang, Y. F. Selective association of a fragment of the knob protein with spectrin, actin and the red cell membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **44**, 175–181 (1991).
157. Lustigman, S., Anders, R. F., Brown, G. V. & Coppel, R. L. The mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of *Plasmodium falciparum* associates with the erythrocyte membrane skeletal protein, band 4.1. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 261–270 (1990).
158. Coppel, R. L. Repeat structures in a *Plasmodium falciparum* protein (MESA) that binds human erythrocyte protein 4.1. *Mol. Biochem. Parasitol.* **50**, 335–347 (1992).
159. Magowan, C. *et al.* Role of the *Plasmodium falciparum* mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA/PfEMP-2) in malarial infection of erythrocytes. *Blood* **86**, 3196–3204 (1995).
160. Waller, K. L. *et al.* Interactions of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 with the red blood cell membrane skeleton. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2145–2156 (2007).
161. Waterkeyn, J. G. *et al.* Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. *EMBO J.* **19**, 2813–2823 (2000).
162. Glenister, F. K., Coppel, R. L., Cowman, A. F., Mohandas, N. & Cooke, B. M. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood* **99**, 1060–1063 (2002).
163. Shi, H. *et al.* Life cycle-dependent cytoskeletal modifications in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *PLoS One* **8**, e61170 (2013).
164. Glushakova, S. *et al.* New stages in the program of malaria parasite egress imaged in normal and sickle erythrocytes. *Curr. Biol. CB* **20**, 1117–1121 (2010).
165. Millholland, M. G. *et al.* The malaria parasite progressively dismantles the host erythrocyte cytoskeleton for efficient egress. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **10**, M111.010678 (2011).

166. Dhawan, S., Dua, M., Chishti, A. H. & Hanspal, M. Ankyrin peptide blocks falcipain-2-mediated malaria parasite release from red blood cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 30180–30186 (2003).
167. Dua, M., Raphael, P., Sijwali, P. S., Rosenthal, P. J. & Hanspal, M. Recombinant falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane ankyrin and protein 4.1. *Mol. Biochem. Parasitol.* **116**, 95–99 (2001).
168. Hanspal, M., Dua, M., Takakuwa, Y., Chishti, A. H. & Mizuno, A. Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. *Blood* **100**, 1048–1054 (2002).
169. Le Bonniec, S. *et al.* Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from the Plasmodium falciparum food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. *J. Biol. Chem.* **274**, 14218–14223 (1999).
170. Chandramohanadas, R. *et al.* Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells. *Science* **324**, 794–797 (2009).
171. Herrera, S. *et al.* A conserved region of the MSP-1 surface protein of Plasmodium falciparum contains a recognition sequence for erythrocyte spectrin. *EMBO J.* **12**, 1607–1614 (1993).
172. Das, S. *et al.* Processing of Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein MSP1 Activates a Spectrin-Binding Function Enabling Parasite Egress from RBCs. *Cell Host Microbe* **18**, 433–444 (2015).
173. Kesely, K. R., Pantaleo, A., Turrini, F. M., Olupot-Olupot, P. & Low, P. S. Inhibition of an Erythrocyte Tyrosine Kinase with Imatinib Prevents Plasmodium falciparum Egress and Terminates Parasitemia. *PLoS One* **11**, e0164895 (2016).
174. Pantaleo, A. *et al.* Syk inhibitors interfere with erythrocyte membrane modification during P falciparum growth and suppress parasite egress. *Blood* **130**, 1031–1040 (2017).
175. Paoli, M., Liddington, R., Tame, J., Wilkinson, A. & Dodson, G. Crystal structure of T state haemoglobin with oxygen bound at all four haems. *J. Mol. Biol.* **256**, 775–792 (1996).

176. Thom, C. S., Dickson, C. F., Gell, D. A. & Weiss, M. J. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, a011858 (2013).
177. Bunn, H. F. Subunit assembly of hemoglobin: an important determinant of hematologic phenotype. *Blood* **69**, 1–6 (1987).
178. Murphy, J. R. Hemoglobin CC disease: rheological properties of erythrocytes and abnormalities in cell water. *J. Clin. Invest.* **47**, 1483–1495 (1968).
179. Renaudier, P. [Sickle cell pathophysiology]. *Transfus. Clin. Biol. J. Soc. Française Transfus. Sang.* **21**, 178–181 (2014).
180. Ingram, V. M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* **178**, 792–794 (1956).
181. Bunn, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* **337**, 762–769 (1997).
182. Edelstein, S. J., Telford, J. N. & Crepeau, R. H. Structure of fibers of sickle cell hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 1104–1107 (1973).
183. 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**, 230–235 (2014).
184. Odièvre, M.-H., Verger, E., Silva-Pinto, A. C. & Elion, J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J. Med. Res.* **134**, 532–537 (2011).
185. Rivera, A., Jarolim, P. & Brugnara, C. Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes. *Blood* **99**, 357–603 (2002).
186. Merciris, P. & Giraud, F. How do sickle cells become dehydrated? *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc.* **2**, 200–205 (2001).
187. Ballas, S. K. Pathophysiology and principles of management of the many faces of the acute vaso-occlusive crisis in patients with sickle cell disease. *Eur. J. Haematol.* **95**, 113–123 (2015).
188. Manwani, D. & Frenette, P. S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood* **122**, 3892–3898 (2013).

189. Kato, G. J., Gladwin, M. T. & Steinberg, M. H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* **21**, 37–47 (2007).
190. Carrell, R. W., Winterbourn, C. C. & Rachmilewitz, E. A. Activated oxygen and haemolysis. *Br. J. Haematol.* **30**, 259–264 (1975).
191. Giulivi, C., Hochstein, P. & Davies, K. J. Hydrogen peroxide production by red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 123–129 (1994).
192. Winterbourn, C. C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. *Semin. Hematol.* **27**, 41–50 (1990).
193. Freeman, B. A. & Crapo, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **47**, 412–426 (1982).
194. Perrone, S., Tataranno, M. L., Stazzoni, G., Del Vecchio, A. & Buonocore, G. Oxidative injury in neonatal erythrocytes. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med. Off. J. Eur. Assoc. Perinat. Med. Fed. Asia Ocean. Perinat. Soc. Int. Soc. Perinat. Obstet.* **25**, 104–108 (2012).
195. Stuart, M. J. & Nagel, R. L. Sickle-cell disease. *Lancet Lond. Engl.* **364**, 1343–1360 (2004).
196. Banerjee, T. & Kuypers, F. A. Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. *Br. J. Haematol.* **124**, 391–402 (2004).
197. Silva, D. G. H., Belini Junior, E., de Almeida, E. A. & Bonini-Domingos, C. R. Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 1101–1109 (2013).
198. Hebbel, R. P., Eaton, J. W., Balasingam, M. & Steinberg, M. H. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **70**, 1253–1259 (1982).
199. Rice-Evans, C., Omorphos, S. C. & Baysal, E. Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem. J.* **237**, 265–269 (1986).
200. Aslan, M., Thornley-Brown, D. & Freeman, B. A. Reactive species in sickle cell disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 375–391 (2000).

201. Chaves, M. A. F., Leonart, M. S. S. & do Nascimento, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. *Hematol. Amst. Neth.* **13**, 187–192 (2008).
202. Reid, M., Badaloo, A., Forrester, T. & Jahoor, F. In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**, E73-79 (2006).
203. Morris, C. R. *et al.* Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood* **111**, 402–410 (2008).
204. Nagababu, E., Fabry, M. E., Nagel, R. L. & Rifkind, J. M. Heme degradation and oxidative stress in murine models for hemoglobinopathies: thalassemia, sickle cell disease and hemoglobin C disease. *Blood Cells. Mol. Dis.* **41**, 60–66 (2008).
205. Low, P. S. Role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in initiating red cell removal. *Adv. Exp. Med. Biol.* **307**, 173–183 (1991).
206. Lang, F., Lang, K. S., Lang, P. A., Huber, S. M. & Wieder, T. Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1183–1192 (2006).
207. Nagababu, E. & Rifkind, J. M. Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 839–845 (2000).
208. Nagababu, E. & Rifkind, J. M. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 592–596 (1998).
209. Nagababu, E. & Rifkind, J. M. Heme degradation by reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 967–978 (2004).
210. Azar, S. & Wong, T. E. Sickle Cell Disease: A Brief Update. *Med. Clin. North Am.* **101**, 375–393 (2017).
211. Ashorobi, D. & Bhatt, R. Sickle Cell Trait. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2018).
212. Piel, F. B. *et al.* Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat. Commun.* **1**, 104 (2010).

213. Modell, B. & Darlison, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull. World Health Organ.* **86**, 480–487 (2008).
214. Haldane, J. Disease and evolution. *Ric. Sci.* **19**, 68–76 (1949).
215. 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.* **48**, 312–318 (1954).
216. Allison, A. C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br. Med. J.* **1**, 290–294 (1954).
217. Elguero, E. *et al.* Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 7051–7054 (2015).
218. Taylor, S. M., Parobek, C. M. & Fairhurst, R. M. Impact of haemoglobinopathies on the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **12**, 457–468 (2012).
219. May, J. *et al.* Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. *JAMA* **297**, 2220–2226 (2007).
220. Aidoo, M. *et al.* Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet Lond. Engl.* **359**, 1311–1312 (2002).
221. Williams, T. N. *et al.* Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases. *J. Infect. Dis.* **192**, 178–186 (2005).
222. Migot-Nabias, F. *et al.* Red blood cell polymorphisms in relation to Plasmodium falciparum asymptomatic parasite densities and morbidity in Senegal. *Microbes Infect.* **8**, 2352–2358 (2006).
223. Clark, T. D. *et al.* Factors determining the heterogeneity of malaria incidence in children in Kampala, Uganda. *J. Infect. Dis.* **198**, 393–400 (2008).
224. Kreuels, B. *et al.* Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth. *Blood* **115**, 4551–4558 (2010).

225. Danquah, I., Ziniel, P., Eggelte, T. A., Ehrhardt, S. & Mockenhaupt, F. P. Influence of haemoglobins S and C on predominantly asymptomatic Plasmodium infections in northern Ghana. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **104**, 713–719 (2010).
226. Cyrklaff, M. *et al.* Oxidative insult can induce malaria-protective trait of sickle and fetal erythrocytes. *Nat. Commun.* **7**, 13401 (2016).
227. Tétard, M. *et al.* Heterozygous HbAC but not HbAS is associated with higher newborn birthweight among women with pregnancy-associated malaria. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
228. Patel, J. C. *et al.* Absence of Association between Sickle Trait Hemoglobin and Placental Malaria Outcomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **94**, 1002–1007 (2016).
229. Modiano, D. *et al.* Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. *Nature* **414**, 305–308 (2001).
230. 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* **106**, 368–371 (2005).
231. Chotivanich, K. *et al.* Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe P falciparum malaria. *Blood* **100**, 1172–1176 (2002).
232. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2491315/>. (Accessed: 22nd June 2018)
233. Cappellini, M. D. & Fiorelli, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet Lond. Engl.* **371**, 64–74 (2008).
234. Mason, P. J., Bautista, J. M. & Gilsanz, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev.* **21**, 267–283 (2007).
235. Manganelli, G., Masullo, U., Passarelli, S. & Filosa, S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: disadvantages and possible benefits. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* **13**, 73–82 (2013).

236. Francis, R. O. *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in transfusion medicine: the unknown risks. *Vox Sang.* **105**, 271–282 (2013).
237. Minucci, A. *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the 'old' and update of the new mutations. *Blood Cells. Mol. Dis.* **48**, 154–165 (2012).
238. Ruwende, C. & Hill, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **76**, 581–588 (1998).
239. Howes, R. E. *et al.* Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. *Malar. J.* **12**, 418 (2013).
240. De Araujo, C. *et al.* The role of the G6PD A<sub>Eth376G/968C</sub> allele in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the seerer population of Senegal. *Haematologica* **91**, 262–263 (2006).
241. Peters, A. L. & Van Noorden, C. J. F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **57**, 1003–1011 (2009).
242. Wells, T. N. C., Burrows, J. N. & Baird, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol.* **26**, 145–151 (2010).
243. Graves, P. M., Gelband, H. & Garner, P. Primaquine for reducing *Plasmodium falciparum* transmission. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD008152 (2012).  
doi:10.1002/14651858.CD008152.pub2
244. Luzzatto, L. & Seneca, E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with ongoing clinical implications. *Br. J. Haematol.* **164**, 469–480 (2014).
245. Harteveld, C. L. & Higgs, D. R. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 13 (2010).
246. Muncie, H. L. & Campbell, J. Alpha and beta thalassemia. *Am. Fam. Physician* **80**, 339–344 (2009).
247. Higgs, D. R. *et al.* A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood* **73**, 1081–1104 (1989).

248. Piel, F. B. & Weatherall, D. J. The  $\alpha$ -thalassemias. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1908–1916 (2014).
249. Weatherall, D. J., Clegg, J. B. & Boon, W. H. The haemoglobin constitution of infants with the haemoglobin Bart's hydrops foetalis syndrome. *Br. J. Haematol.* **18**, 357–367 (1970).
250. Galanello, R. & Cao, A. Gene test review. Alpha-thalassemia. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **13**, 83–88 (2011).
251. Chui, D. H. K., Fucharoen, S. & Chan, V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood* **101**, 791–800 (2003).
252. Zeinali, S., Fallah, M.-S. & Bagherian, H. Heterogeneity of hemoglobin h disease in childhood. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2070–2071; author reply 2071 (2011).
253. Higgs, D. R. The Molecular Basis of  $\alpha$ -Thalassemia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, (2013).
254. Flint, J. *et al.* High frequencies of alpha-thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature* **321**, 744–750 (1986).
255. Williams, T. N. *et al.* Negative epistasis between the malaria-protective effects of  $\alpha^+$ -thalassemia and the sickle cell trait. *Nat. Genet.* **37**, 1253–1257 (2005).
256. Penman, B. S., Habib, S., Kanchan, K. & Gupta, S. Negative epistasis between  $\alpha^+$  thalassaemia and sickle cell trait can explain interpopulation variation in South Asia. *Evol. Int. J. Org. Evol.* **65**, 3625–3632 (2011).
257. Cyrklaff, M. *et al.* Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Science* **334**, 1283–1286 (2011).
258. Kilian, N. *et al.* Hemoglobin S and C affect protein export in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Biol. Open* **4**, 400–410 (2015).
259. Cholera, R. *et al.* Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 991–996 (2008).
260. Beaudry, J. T. *et al.* Ex-vivo cytoadherence phenotypes of Plasmodium falciparum strains from Malian children with hemoglobins A, S, and C. *PloS One* **9**, e92185 (2014).

261. Opi, D. H. *et al.* Mechanistic Studies of the Negative Epistatic Malaria-protective Interaction Between Sickle Cell Trait and  $\alpha$ -thalassemia. *EBioMedicine* **1**, 29–36 (2014).
262. Fairhurst, R. M., Bess, C. D. & Krause, M. A. Abnormal PfEMP1/knob display on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing hemoglobin variants: fresh insights into malaria pathogenesis and protection. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **14**, 851–862 (2012).
263. Cholera, R. *et al.* Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 991–996 (2008).
264. Lansche, C. *et al.* The sickle cell trait affects contact dynamics and endothelial cell activation in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Commun. Biol.* **1**, 211 (2018).
265. Carlson, J., Nash, G. B., Gabutti, V., al-Yaman, F. & Wahlgren, M. Natural protection against severe Plasmodium falciparum malaria due to impaired rosette formation. *Blood* **84**, 3909–3914 (1994).
266. Carlson, J. *et al.* Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet Lond. Engl.* **336**, 1457–1460 (1990).
267. Friedman, M. J. Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 1994–1997 (1978).
268. Archer, N. M. *et al.* Resistance to Plasmodium falciparum in sickle cell trait erythrocytes is driven by oxygen-dependent growth inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 7350–7355 (2018).
269. Pasvol, G. The interaction between sickle haemoglobin and the malarial parasite Plasmodium falciparum. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**, 701–705 (1980).
270. Pasvol, G., Weatherall, D. J. & Wilson, R. J. Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against P. falciparum malaria. *Nature* **274**, 701–703 (1978).
271. Ayi, K., Turrini, F., Piga, A. & Arese, P. 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 (2004).

272. Ademolue, T. W., Amodu, O. K. & Awandare, G. A. Sickle cell trait is associated with controlled levels of haem and mild proinflammatory response during acute malaria infection. *Clin. Exp. Immunol.* **188**, 283–292 (2017).
273. Tiffert, T. *et al.* The hydration state of human red blood cells and their susceptibility to invasion by *Plasmodium falciparum*. *Blood* **105**, 4853–4860 (2005).
274. 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**, 187–199 (2012).
275. Contreras-Puentes, N., Rodríguez-Cavallo, E. & Méndez-Cuadro, D. Membrane protein carbonylation of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes under conditions of sickle cell trait and G6PD deficiency. *Mol. Biochem. Parasitol.* **227**, 5–14 (2019).
276. Ferreira, A. *et al.* Sickle hemoglobin confers tolerance to *Plasmodium* infection. *Cell* **145**, 398–409 (2011).
277. Seixas, E. *et al.* Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15837–15842 (2009).
278. Luzzatto, L., Nwachuku-Jarrett, E. S. & Reddy, S. Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 319–321 (1970).
279. Roth, E. F. *et al.* Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* **202**, 650–652 (1978).
280. de Jong, K. *et al.* Short survival of phosphatidylserine-exposing red blood cells in murine sickle cell anemia. *Blood* **98**, 1577–1584 (2001).
281. Lang, P. A. *et al.* Accelerated clearance of *Plasmodium*-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **24**, 415–428 (2009).

282. Urban, B. C. *et al.* Frequencies of peripheral blood myeloid cells in healthy Kenyan children with alpha+ thalassemia and the sickle cell trait. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 578–584 (2006).
283. Williams, T. N. *et al.* An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait. *PLoS Med.* **2**, e128 (2005).
284. Gong, L. *et al.* Evidence for both innate and acquired mechanisms of protection from *Plasmodium falciparum* in children with sickle cell trait. *Blood* **119**, 3808–3814 (2012).
285. Cabrera, G. *et al.* The sickle cell trait is associated with enhanced immunoglobulin G antibody responses to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens. *J. Infect. Dis.* **191**, 1631–1638 (2005).
286. Verra, F. *et al.* Haemoglobin C and S role in acquired immunity against *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One* **2**, e978 (2007).
287. 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**, 1750–1761 (2011).
288. Nasr, A. *et al.* Antibody responses to *P. falciparum* Apical Membrane Antigen 1(AMA-1) in relation to haemoglobin S (HbS), HbC, G6PD and ABO blood groups among Fulani and Masaleit living in Western Sudan. *Acta Trop.* **182**, 115–123 (2018).
289. 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**, e60182 (2013).
290. Sarr, J. B. *et al.* Impact of red blood cell polymorphisms on the antibody response to *Plasmodium falciparum* in Senegal. *Microbes Infect.* **8**, 1260–1268 (2006).
291. Gong, L., Parikh, S., Rosenthal, P. J. & Greenhouse, B. Biochemical and immunological mechanisms by which sickle cell trait protects against malaria. *Malar. J.* **12**, 317 (2013).
292. Bunn, H. F. The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria. *Blood* **121**, 20–25 (2013).

293. Lelliott, P. M., McMorran, B. J., Foote, S. J. & Burgio, G. The influence of host genetics on erythrocytes and malaria infection: is there therapeutic potential? *Malar. J.* **14**, 289 (2015).
294. 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.* **94**, 14736–14741 (1997).
295. Enevold, A. *et al.* Reduced risk of uncomplicated malaria episodes in children with alpha+-thalassemia in northeastern Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **78**, 714–720 (2008).
296. Williams, T. N. *et al.* High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children. *Nature* **383**, 522–525 (1996).
297. Krause, M. A. *et al.*  $\alpha$ -Thalassemia impairs the cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *PLoS One* **7**, e37214 (2012).
298. Friedman, M. J. Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria. *Nature* **280**, 245–247 (1979).
299. Martin, S. K. *et al.* Severe malaria and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency: a reappraisal of the malaria/G-6-P.D. hypothesis. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 524–526 (1979).
300. Kotepui, M., Uthaisar, K., PhunPhuech, B. & Phiwklam, N. Prevalence and hematological indicators of G6PD deficiency in malaria-infected patients. *Infect. Dis. Poverty* **5**, 36 (2016).
301. Oo, M., Tin-Shwe, null, Marlar-Tham, null & O’Sullivan, W. J. Genetic red cell disorders and severity of *falciparum* malaria in Myanmar. *Bull. World Health Organ.* **73**, 659–665 (1995).
302. Guggenmoos-Holzmann, I., Bienzle, U. & Luzzatto, L. *Plasmodium falciparum* malaria and human red cells. II. Red cell genetic traits and resistance against malaria. *Int. J. Epidemiol.* **10**, 16–22 (1981).
303. Allison, A. C. & Clyde, D. F. Malaria in African children with deficient erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Br. Med. J.* **1**, 1346–1349 (1961).
304. Ruwende, C. *et al.* Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* **376**, 246–249 (1995).

305. Roth, E. F., Raventos-Suarez, C., Rinaldi, A. & Nagel, R. L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 298–299 (1983).
306. Miller, J., Golenser, J., Spira, D. T. & Kosower, N. S. *Plasmodium falciparum*: thiol status and growth in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes. *Exp. Parasitol.* **57**, 239–247 (1984).
307. Cappadoro, M. *et al.* Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood* **92**, 2527–2534 (1998).
308. Viebig, N. K. *et al.* A single member of the *Plasmodium falciparum* var multigene family determines cytoadhesion to the placental receptor chondroitin sulphate A. *EMBO Rep.* **6**, 775–781 (2005).
309. Viebig, N. K., Nunes, M. C., Scherf, A. & Gamain, B. The human placental derived BeWo cell line: a useful model for selecting *Plasmodium falciparum* CSA-binding parasites. *Exp. Parasitol.* **112**, 121–125 (2006).
310. Srivastava, A. *et al.* Full-length extracellular region of the var2CSA variant of PfEMP1 is required for specific, high-affinity binding to CSA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4884–4889 (2010).
311. O’Neil-Dunne, I. *et al.* Gravity-dependent production of antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to placental chondroitin sulfate proteoglycan during pregnancy. *Infect. Immun.* **69**, 7487–7492 (2001).
312. Mbanefo, E. C. *et al.* Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **7**, 45963 (2017).
313. Borg, J., Georgitsi, M., Aleporou-Marinou, V., Kollia, P. & Patrinos, G. P. Genetic recombination as a major cause of mutagenesis in the human globin gene clusters. *Clin. Biochem.* **42**, 1839–1850 (2009).

314. O'Donnell, A., Raiko, A., Clegg, J. B., Weatherall, D. J. & Allen, S. J. Alpha+ -thalassaemia and pregnancy in a malaria endemic region of Papua New Guinea. *Br. J. Haematol.* **135**, 235–241 (2006).
315. Mockenhaupt, F. P. *et al.* Reduced prevalence of Plasmodium falciparum infection and of concomitant anaemia in pregnant women with heterozygous G6PD deficiency. *Trop. Med. Int. Health TM IH* **8**, 118–124 (2003).
316. Carter, N., Pamba, A., Duparc, S. & Waitumbi, J. N. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria patients from six African countries enrolled in two randomized anti-malarial clinical trials. *Malar. J.* **10**, 241 (2011).
317. Piel, F. B. *et al.* The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. *Sci. Rep.* **3**, 1671 (2013).
318. Badaut, C. *et al.* Immunoglobulin response to Plasmodium falciparum RESA proteins in uncomplicated and severe malaria. *Malar. J.* **14**, (2015).
319. Liu, Y. T. *et al.* Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. *Br. J. Haematol.* **108**, 295–299 (2000).
320. Pouvelle, B., Meyer, P., Robert, C., Bardel, L. & Gysin, J. Chondroitin-4-sulfate impairs in vitro and in vivo cytoadherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *Mol. Med. Camb. Mass* **3**, 508–518 (1997).
321. Trager, W. & Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673–675 (1976).
322. Tuikue Ndam, N. G. *et al.* Variable adhesion abilities and overlapping antigenic properties in placental Plasmodium falciparum isolates. *J. Infect. Dis.* **190**, 2001–2009 (2004).
323. Hempel, C., Boisen, I. M., Efunshile, A., Kurtzhals, J. A. L. & Staalsø, T. An automated method for determining the cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to immobilized cells. *Malar. J.* **14**, 112 (2015).

324. Chandrasiri, U. P. *et al.* Low Antibody Levels to Pregnancy-specific Malaria Antigens and Heightened Cytokine Responses Associated With Severe Malaria in Pregnancy. *J. Infect. Dis.* **209**, 1408–1417 (2014).
325. Lell, B. *et al.* Impact of Sickle Cell Trait and Naturally Acquired Immunity on Uncomplicated Malaria after Controlled Human Malaria Infection in Adults in Gabon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **98**, 508–515 (2018).
326. Diatta, A.-M. *et al.* Relationship of Binding of Immunoglobulin G to Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes with Parasite Endemicity and Antibody Responses to Conserved Antigen in Immune Individuals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 6–11 (2004).
327. Gonçalves, B. P., Gupta, S. & Penman, B. S. Sickle haemoglobin, haemoglobin C and malaria mortality feedbacks. *Malar. J.* **15**, 26 (2016).
328. Chan, J.-A. *et al.* Targets of antibodies against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in malaria immunity. *J. Clin. Invest.* **122**, 3227–3238 (2012).
329. Watermeyer, J. M. *et al.* A spiral scaffold underlies cytoadherent knobs in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Blood* (2015). doi:10.1182/blood-2015-10-674002
330. Pantaleo, A., De Franceschi, L., Ferru, E., Vono, R. & Turrini, F. Current knowledge about the functional roles of phosphorylative changes of membrane proteins in normal and diseased red cells. *J. Proteomics* **73**, 445–455 (2010).
331. Merciris, P., Hardy-Dessources, M. D., Sauvage, M. & Giraud, F. Involvement of deoxygenation-induced increase in tyrosine kinase activity in sickle cell dehydration. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **436**, 315–322 (1998).
332. George, A. *et al.* Altered phosphorylation of cytoskeleton proteins in sickle red blood cells: the role of protein kinase C, Rac GTPases, and reactive oxygen species. *Blood Cells. Mol. Dis.* **45**, 41–45 (2010).
333. Siciliano, A. *et al.* Deoxygenation affects tyrosine phosphoproteome of red cell membrane from patients with sickle cell disease. *Blood Cells. Mol. Dis.* **44**, 233–242 (2010).

334. Gauthier, E., Guo, X., Mohandas, N. & An, X. Phosphorylation-dependent perturbations of the 4.1R-associated multiprotein complex of the erythrocyte membrane. *Biochemistry (Mosc.)* **50**, 4561–4567 (2011).
335. Zhao, Y., Franklin, R. M. & Kappes, B. Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase phosphorylates proteins of the host erythrocytic membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**, 329–343 (1994).
336. Abdi, A. I., Carvalho, T. G., Wilkes, J. M. & Doerig, C. A secreted Plasmodium falciparum kinase reveals a signature motif for classification of tyrosine kinase-like kinases. *Microbiol. Read. Engl.* **159**, 2533–2547 (2013).
337. Merckx, A., Bouyer, G., Thomas, S. L. Y., Langsley, G. & Egée, S. Anion channels in Plasmodium-falciparum-infected erythrocytes and protein kinase A. *Trends Parasitol.* **25**, 139–144 (2009).
338. Dorin-Semblat, D. *et al.* Malaria Parasite-Infected Erythrocytes Secrete PfCK1, the Plasmodium Homologue of the Pleiotropic Protein Kinase Casein Kinase 1. *PLoS One* **10**, e0139591 (2015).
339. Brandt, G. S. & Bailey, S. Dematin, a human erythrocyte cytoskeletal protein, is a substrate for a recombinant FIKK kinase from Plasmodium falciparum. *Mol. Biochem. Parasitol.* **191**, 20–23 (2013).
340. Hora, R., Bridges, D. J., Craig, A. & Sharma, A. Erythrocytic casein kinase II regulates cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 6260–6269 (2009).
341. Merckx, A. *et al.* Plasmodium falciparum regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog.* **4**, e19 (2008).
342. Nunes, M. C., Okada, M., Scheidig-Benatar, C., Cooke, B. M. & Scherf, A. Plasmodium falciparum FIKK kinase members target distinct components of the erythrocyte membrane. *PLoS One* **5**, e11747 (2010).

343. Bouyer, G. *et al.* Plasmodium falciparum infection induces dynamic changes in the erythrocyte phospho-proteome. *Blood Cells. Mol. Dis.* **58**, 35–44 (2016).
344. Azouzi, S. *et al.* Band 3 phosphorylation induces irreversible alterations of stored red blood cells. *Am. J. Hematol.* **93**, E110–E112 (2018).
345. Grimberg, B. T., Erickson, J. J., Sramkoski, R. M., Jacobberger, J. W. & Zimmerman, P. A. Monitoring Plasmodium falciparum growth and development by UV flow cytometry using an optimized Hoechst-thiazole orange staining strategy. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **73**, 546–554 (2008).
346. Azouzi, S. *et al.* The human Kell blood group binds the erythroid 4.1R protein: new insights into the 4.1R-dependent red cell membrane complex. *Br. J. Haematol.* **171**, 862–871 (2015).
347. Lipecka, J. *et al.* Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics* **16**, 1852–1857 (2016).
348. Meijer, B. M. *et al.* Threonine eliminylation by bacterial phosphothreonine lyases rapidly causes cross-linking of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in live cells. *J. Biol. Chem.* **292**, 7784–7794 (2017).
349. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367–1372 (2008).
350. Cox, J. *et al.* Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **13**, 2513–2526 (2014).
351. Tyanova, S. *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **13**, 731–740 (2016).
352. Rhee, S. G. & Kil, I. S. Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 749–775 (2017).

353. El Nemer, W. *et al.* The Lutheran blood group glycoproteins, the erythroid receptors for laminin, are adhesion molecules. *J. Biol. Chem.* **273**, 16686–16693 (1998).
354. Hughes, S. J., Cravetchi, X., Vilas, G. & Hammond, J. R. Adenosine A1 receptor activation modulates human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) activity via PKC-mediated phosphorylation of serine-281. *Cell. Signal.* **27**, 1008–1018 (2015).
355. Jacob Blackmon, B., Dailey, T. A., Lianchun, X. & Dailey, H. A. Characterization of a human and mouse tetrapyrrole-binding protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **407**, 196–201 (2002).
356. El Nemer, W. *et al.* Role of Lu/BCAM in abnormal adhesion of sickle red blood cells to vascular endothelium. *Transfus. Clin. Biol. J. Soc. Francaise Transfus. Sang.* **15**, 29–33 (2008).
357. Langhi, D. M. & Bordin, J. O. Duffy blood group and malaria. *Hematol. Amst. Neth.* **11**, 389–398 (2006).
358. Taylor, S. M. & Fairhurst, R. M. Malaria parasites and red cell variants: when a house is not a home. *Curr. Opin. Hematol.* **21**, 193–200 (2014).
359. Moiz, B. & Majeed, A. No risk reduction for Plasmodium vivax malaria in sickle cell disease. *Clin. Case Rep.* **6**, 1187–1188 (2018).
360. Gelpi, A. P. & King, M. C. Association of Duffy blood groups with the sickle cell trait. *Hum. Genet.* **32**, 65–68 (1976).
361. Howes, R. E. *et al.* The global distribution of the Duffy blood group. *Nat. Commun.* **2**, 266 (2011).
362. Manno, S., Takakuwa, Y., Nagao, K. & Mohandas, N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta-spectrin phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* **270**, 5659–5665 (1995).
363. Brandt, G. S. & Bailey, S. Dematin, a human erythrocyte cytoskeletal protein, is a substrate for a recombinant FIKK kinase from Plasmodium falciparum. *Mol. Biochem. Parasitol.* **191**, 20–23 (2013).

364. Lalle, M. *et al.* Dematin, a Component of the Erythrocyte Membrane Skeleton, Is Internalized by the Malaria Parasite and Associates with Plasmodium 14-3-3. *J. Biol. Chem.* **286**, 1227–1236 (2011).
365. Chishti, A. H. *et al.* Phosphorylation of protein 4.1 in Plasmodium falciparum-infected human red blood cells. *Blood* **83**, 3339–3345 (1994).
366. Manno, S., Takakuwa, Y. & Mohandas, N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 7581–7587 (2005).
367. Kirk, K. & Lehane, A. M. Membrane transport in the malaria parasite and its host erythrocyte. *Biochem. J.* **457**, 1–18 (2014).
368. Egan, E. S. *et al.* Erythrocytes lacking the Langereis blood group protein ABCB6 are resistant to the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Commun. Biol.* **1**, 45 (2018).
369. Wåhlin, B. *et al.* Involvement of Pf155/RESA and cross-reactive antigens in Plasmodium falciparum merozoite invasion in vitro. *Infect. Immun.* **60**, 443–449 (1992).
370. Mills, J. P. *et al.* Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cells harboring Plasmodium falciparum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 9213–9217 (2007).
371. Foley, M., Tilley, L., Sawyer, W. H. & Anders, R. F. The ring-infected erythrocyte surface antigen of Plasmodium falciparum associates with spectrin in the erythrocyte membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**, 137–147 (1991).
372. Ruangjirachuporn, W. *et al.* Plasmodium falciparum: analysis of the interaction of antigen Pf155/RESA with the erythrocyte membrane. *Exp. Parasitol.* **73**, 62–72 (1991).
373. Pei, X. *et al.* The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of Plasmodium falciparum stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion. *Blood* **110**, 1036–1042 (2007).
374. Foley, M., Corcoran, L., Tilley, L. & Anders, R. Plasmodium falciparum: mapping the membrane-binding domain in the ring-infected erythrocyte surface antigen. *Exp. Parasitol.* **79**, 340–350 (1994).

375. Foley, M., Murray, L. J. & Anders, R. F. The ring-infected erythrocyte surface antigen protein of *Plasmodium falciparum* is phosphorylated upon association with the host cell membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 69–75 (1990).
376. Coppel, R. L., Lustigman, S., Murray, L. & Anders, R. F. MESA is a *Plasmodium falciparum* phosphoprotein associated with the erythrocyte membrane skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **31**, 223–231 (1988).
377. Waller, K. L. *et al.* Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of *Plasmodium falciparum* binds to the 30-kDa domain of protein 4.1 in malaria-infected red blood cells. *Blood* **102**, 1911–1914 (2003).
378. Bennett, B. J., Mohandas, N. & Coppel, R. L. Defining the minimal domain of the *Plasmodium falciparum* protein MESA involved in the interaction with the red cell membrane skeletal protein 4.1. *J. Biol. Chem.* **272**, 15299–15306 (1997).
379. Nunomura, W., Takakuwa, Y., Parra, M., Conboy, J. & Mohandas, N. Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **275**, 24540–24546 (2000).
380. Chishti, A. H., Palek, J., Fisher, D., Maalouf, G. J. & Liu, S. C. Reduced invasion and growth of *Plasmodium falciparum* into elliptocytic red blood cells with a combined deficiency of protein 4.1, glycophorin C, and p55. *Blood* **87**, 3462–3469 (1996).
381. Black, C. G. *et al.* In vivo studies support the role of trafficking and cytoskeletal-binding motifs in the interaction of MESA with the membrane skeleton of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **160**, 143–147 (2008).
382. Nilsson, S., Angeletti, D., Wahlgren, M., Chen, Q. & Moll, K. *Plasmodium falciparum* antigen 332 is a resident peripheral membrane protein of Maurer's clefts. *PLoS One* **7**, e46980 (2012).
383. Hinterberg, K. *et al.* *Plasmodium falciparum*: the Pf332 antigen is secreted from the parasite by a brefeldin A-dependent pathway and is translocated to the erythrocyte membrane via the Maurer's clefts. *Exp. Parasitol.* **79**, 279–291 (1994).

384. Vera, I. M., Beatty, W. L., Sinnis, P. & Kim, K. Plasmodium protease ROM1 is important for proper formation of the parasitophorous vacuole. *PLoS Pathog.* **7**, e1002197 (2011).
385. Mohandas, N. Inherited hemolytic anemia: a possessive beginner's guide. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2018**, 377–381 (2018).
386. Gautier, E.-F. *et al.* Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Rep.* **16**, 1470–1484 (2016).
387. Guindo, A. *et al.* An evaluation of concurrent G6PD (A-) deficiency and sickle cell trait in Malian populations of children with severe or uncomplicated *P. falciparum* malaria. *Am. J. Hematol.* **86**, 795–796 (2011).
388. Rowe, J. A. *et al.* Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17471–17476 (2007).
389. Huang, H. M. *et al.* Ankyrin-1 Gene Exhibits Allelic Heterogeneity in Conferring Protection Against Malaria. *G3 Bethesda Md* **7**, 3133–3144 (2017).
390. 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.* **101**, 272–277 (2004).
391. Ayi, K. *et al.* Pyruvate kinase deficiency and malaria. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1805–1810 (2008).
392. Schulman, S. *et al.* Growth of Plasmodium falciparum in human erythrocytes containing abnormal membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 7339–7343 (1990).
393. Allen, S. J. *et al.* Prevention of cerebral malaria in children in Papua New Guinea by southeast Asian ovalocytosis band 3. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**, 1056–1060 (1999).
394. Rosanas-Urgell, A. *et al.* Reduced risk of Plasmodium vivax malaria in Papua New Guinean children with Southeast Asian ovalocytosis in two cohorts and a case-control study. *PLoS Med.* **9**, e1001305 (2012).

395. Jarolim, P. *et al.* Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 11022–11026 (1991).
396. Genton, B. *et al.* Ovalocytosis and cerebral malaria. *Nature* **378**, 564–565 (1995).

# ANNEXES

## 1. Posters présentés en congrès

- « **Modulation by abnormal haemoglobins S and C of the phosphorylation of proteins in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes** »

Margaux Chauvet, Cerina Chhuon, Joanna Lipecka, Slim Azouzi, Damien Pineau, Jean-Antoine Ribeil, Adrian Luty, Florence Migot-Nabias, Chiara Guerrera, Anaïs Merckx

« Young Researcher in Life Science », Mai 2016 (Paris)

- « **Influence of haemoglobin S and C carriage and *Plasmodium falciparum* infection on the phosphorylation of human erythrocyte proteins** »

Margaux Chauvet, Cerina Chhuon, Slim Azouzi, Joanna Lipecka, Damien Pineau, Margherita Ortalli, Jean-Antoine Ribeil, Caroline Le Van Kim, Lydie Da Costa, Adrian J. F. Luty, Florence Migot-Nabias, Ida C. Guerrera, Anaïs Merckx

« BioMalPar XIII », Mai 2017 (Heidelberg, Allemagne)

- « **Impact of abnormal haemoglobin S on VAR2CSA immune response in pregnancy-associated malaria** »

Margaux Chauvet, Marilou Tétard, Gilles Cottrell, Florentin Aussenac, Emeline Brossier, Luc Denoyel, Marion Hanny, Murielle Lohezic, Nicaise Tiuke Ndam, Damien Pineau, Jocelyne Roman, Adrian J.F. Luty, Benoît Gamain, Florence Migot-Nabias, Anaïs Merckx

« Molecular Parasitology Meeting », Septembre 2018 (Woods Hole, Etats-Unis)



# Modulation by abnormal haemoglobins S and C of the phosphorylation of proteins in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes

Margaux Chauvet<sup>1-3\*</sup>, Cerina Chhuon<sup>4</sup>, Joanna Lipecka<sup>4</sup>, Margherita Ortalli<sup>1-3</sup>, Slim Azouzi<sup>5</sup>, Damien Pineau<sup>1-3</sup>, Jean-Antoine Ribeil<sup>3,6</sup>, Adrian J.F. Luty<sup>1-3</sup>, Florence Migot-Nabias<sup>1-3</sup>, Ida Chiara Guerrero<sup>4</sup>, Anais Merckx<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> IRD UMR216-MERIT, Mère et enfant face aux infections tropicales, Faculté de Pharmacie, Paris, France; <sup>2</sup> COMUE Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Paris, France; <sup>3</sup> Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France; <sup>4</sup> Proteomic Platform Necker (PPN), 3P5, SFR, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris; <sup>5</sup> UMR\_S 1134, INTS Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France; <sup>6</sup> Département de Biothérapies, Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades, Paris, France.  
\* Contact: margaux.chauvet@etu.parisdescartes.fr

## Introduction

Malaria causes around 438,000 deaths every year. Symptoms of the disease are associated with the intra-erythrocytic development of the asexual stages of the causative protozoan parasite species belonging to the genus *Plasmodium*. Amongst the latter, *P. falciparum* is known to export and display proteins at the red blood cell (RBC) surface, a process involving interactions with RBC proteins<sup>1</sup>. This parasite protein export allows the iRBC to cytoadhere with vascular endothelial receptors, and thus the expression of malaria pathogenicity<sup>2</sup>. Heterozygote carriers of the sickle cell (HbS) and haemoglobin C (HbC) alleles are protected against severe malaria symptoms and death<sup>3</sup> (Fig. 1). HbS and HbC are associated with abnormal display of parasite antigens<sup>4</sup> and a consequently reduced cytoadhesive capacity of infected red blood cells (iRBC)<sup>5</sup>. Furthermore, oxidative stress generated by HbS, HbC and plasmodial parasite invasion disrupts the kinase/phosphatase balance in RBC<sup>6</sup>, potentially interfering with the normal molecular interactions between human and parasite proteins. Thus we have investigated the effects of the HbS and HbC variants, and of *P. falciparum* infection, on the phosphorylative states of protein components of the RBC cytoskeleton and membrane, in order to evaluate their impact on interactions between these different proteins.

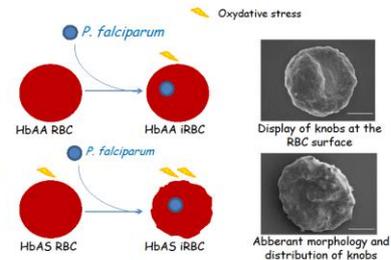


Figure 1. Schematic and tomograph images of HbAA and HbAS RBC infected by *P. falciparum*. HbS leads to oxidative stress in RBC. *P. falciparum* infection also generates oxidative stress.

## Experimental Procedures and Results

### Phospho-proteome analysis

Phosphorylation states of RBC cytoskeletal and membrane proteins were studied by Mass Spectrometry (MS), on ghosts preparation of *P. falciparum* infected and non-infected HbAA, HbAS and HbAC RBC.

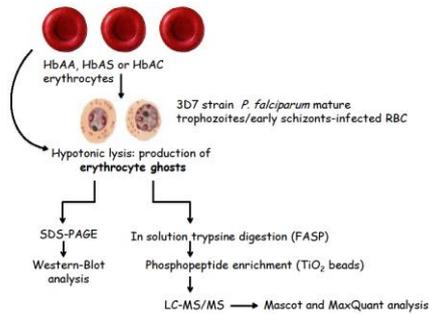


Figure 2. Schematic workflow of HbAA, HbAS and HbAC RBC phospho-proteome experimental procedures.

### HbS/HbC genotype determination

Two digestion sites of *DdeI* and one restriction site of *BseRI* are located on the  $\beta$ -globin gene. The *DdeI* and *BseRI* sites are specifically abolished by the HbS and the HbC mutations, respectively.

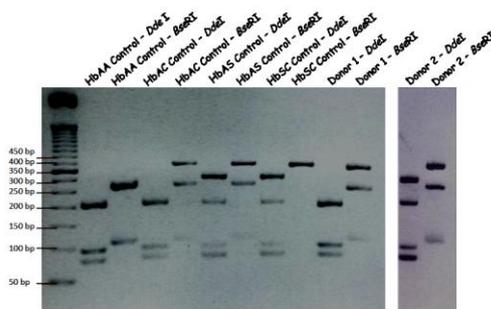
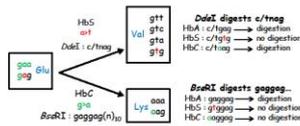


Figure 3. Determination of HbS/HbC genotype profiles by PCR-RFLP. The fragment (from donors' DNA) containing the site of HbS/HbC mutation was amplified by PCR and then digested by the restriction enzymes *DdeI* and *BseRI*.

Donor 1: HbAC

Donor 2: HbAS

### Differential phosphorylation in erythrocyte proteins

28 proteins displaying differential phosphorylation patterns were identified, the majority distributed in 3 clusters:

- proteins more phosphorylated in iRBC (Cluster 1)
- proteins more phosphorylated in non-infected RBC (Cluster 2)
- proteins less phosphorylated in iHbAA RBC but not in iHbAS and iHbAC RBC (Cluster 3)

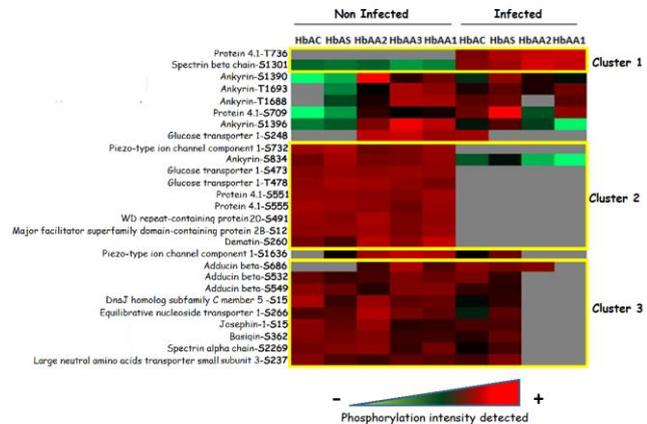


Figure 4. Heat-Map of erythrocyte proteins differentially phosphorylated on specific residues serine or threonine according to the RBC genotype (HbAA, HbAS or HbAC) and the infection by *P. falciparum* (2-ways Anova, t-test p<0.05). In grey are represented proteins for which the phosphopeptide signal was not strong enough to be detected.

## Discussion

- We observe variations of serine and threonine phosphorylation of erythrocyte as a function of HbS and HbC mutations and of infection by *P. falciparum*. However, to limit individual variation and increase the statistical power of our study, we need to consider more samples.
- Western-Blot applied to selected proteins will be realised to validate MS results.
- Effect of others haemoglobinopathies ( $\alpha$ -thalassaemia and  $\alpha$ -thalassaemia) and of blood groups need to be assessed (cf. HbS /  $\alpha$ -thal epistasis).
- Effect of phosphorylation modulation on interaction between cytoadherence complex proteins will be investigated.

## Bibliography

1. Wickham M.E., and al., (2001) *EMBO J.* 20, 5636-49 2. Miller, L. H., and al., (2002) *Nature* 415, 673-9 3. Allison, A. C. (1954). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48, 312-8. 4. Cynkloff, M., and al., (2011) *Science*. 334, 1283-86. 5. Cholera, R and al., (2008) *n. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 991-6. 6. Mercieris, P., and al., (1998) *PLoS. Arch. Eur. J. Physiol.* 436, 315-22



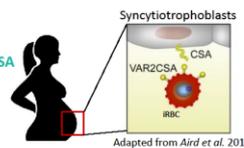
# Impact of haemoglobin S on *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes immune recognition in pregnancy

Margaux Chauvet<sup>1,3</sup>, Marilou Tetard<sup>2,3</sup>, Gilles Cottrell<sup>1,3</sup>, Florentin Aussenac<sup>1,3</sup>, Emeline Brossier<sup>1,3</sup>, Luc Denoyel<sup>1,3</sup>, Marion Hanny<sup>1,3</sup>, Murielle Lohezic<sup>1,3</sup>, Nicaise Tuikeu Ndam<sup>1,3</sup>, Damien Pineau<sup>1,3</sup>, Jocelyne Roman<sup>1,3</sup>, Adrian J.F. Luty<sup>1,3</sup>, Benoît Gamain<sup>2,3</sup>, Florence Migot-Nabias<sup>1,3</sup>, Anaïs Merckx<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> MERIT, IRD, Université Paris 5, Sorbonne Paris Cité, Paris, 75006, France; <sup>2</sup> Université Sorbonne Paris Cité, Université Paris Diderot, INSERM, Unité Biologie Intégrée du Globule Rouge UMR-S1134, Institut National de la Transfusion Sanguine, France; <sup>3</sup>Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France. Contact: margauxchauvet@hotmail.fr

## Introduction

- Adhesion and sequestration of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells (iRBCs) in the placenta causes pregnancy-associated malaria (PAM), resulting from the interaction of VAR2CSA with chondroitin sulfate A (CSA) on the syncytiotrophoblasts<sup>1</sup>.
- Women acquire protective antibodies anti-VAR2CSA that inhibit the binding of iRBCs to CSA during successive pregnancies<sup>2</sup>.
- Haemoglobin (Hb) S, responsible for sickle cell disease, is due to a genetic mutation of the  $\beta$ -globin chain (normal Hb = HbA)<sup>3</sup>.
- HbS is highly prevalent in populations living in malaria endemic areas, resulting from the selection due to the protection afforded by HbS heterozygous carriage (HbAS (sickle cell trait)) against severe *P. falciparum* malaria symptoms and death, the so called "Malaria Hypothesis"<sup>4, 5</sup>.
- HbAS iRBCs present lower amounts of VAR2CSA which are aberrantly displayed, associated with a reduced cytoadhesive capacity to CSA<sup>6</sup>.
- Other RBC disorders coexist in malaria endemic areas and in populations affected by abnormal HbS, such as Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency<sup>7</sup> or  $\alpha$ -thalassaemia<sup>8</sup>. They also afford a protection against malaria.



## Study design

159 Beninese women\*  
107 HbAA and 52 HbAS  
Adjusted for gravidity and for malaria infection

Plasmas collected at delivery

Immune recognition of iRBCs surface antigens by flow cytometry<sup>10</sup>

DNA from blood samples

G6PD deficiency and  $\alpha$ -thalassaemia genotyping by PCR-RFLP<sup>11</sup> and multiplex PCR<sup>12</sup>

\* From the cohort Strategies To Prevent Pregnancy Associated Malaria (STOPPAM) (Benin, 2008-2011)<sup>9</sup>

## Immune recognition of iRBCs surface antigens

### 1. Is there a difference between the recognition of HbAA infected RBCs by plasmas from HbAA or HbAS women?

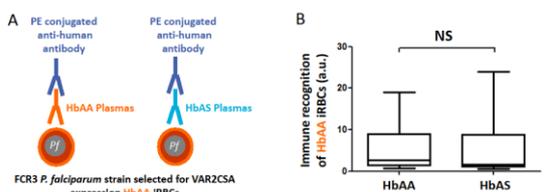


Figure 1. A. Experimental scheme. B. Association between immune recognition of HbAA iRBCs and plasma genotype.  $p$ -value based on a multivariate linear regression to determine the association between immune recognition of HbAA iRBCs and plasma genotype (HbAA or HbAS), adjusted for mother gravidity, malaria infection, G6PD deficiency and  $\alpha$ -thalassaemia carriages (n=111).

### 2. Is there a difference between the recognition of HbAS infected RBCs by plasmas from HbAA or HbAS women?

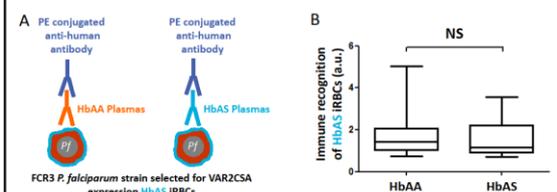


Figure 2. A. Experimental scheme. B. Association between immune recognition of HbAS iRBCs and plasma genotype.  $p$ -value based on a multivariate linear regression to determine the association between immune recognition of HbAS iRBCs and plasma genotype (HbAA or HbAS), adjusted for mother gravidity, malaria infection, G6PD deficiency and  $\alpha$ -thalassaemia carriages (n=110).

### 3. Is there a differential recognition when iRBCs and plasmas are associated according to the same genotype?

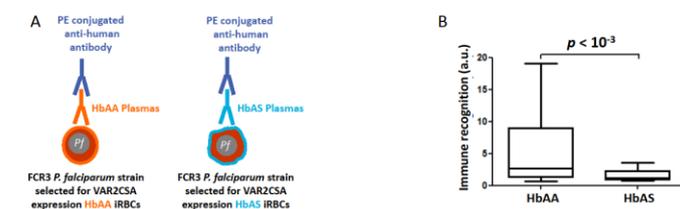


Figure 3. A. Experimental scheme. B. Association between immune recognition and Hb status when infected RBCs and plasmas are associated according to the same genotype.  $p$ -value based on a multivariate linear regression to determine the association between immune recognition and genotype (HbAA or HbAS), adjusted for mother gravidity, malaria infection, G6PD deficiency and  $\alpha$ -thalassaemia carriages (n=111).

→ HbAS plasmas show a lower recognition of iRBCs than HbAA plasmas.

- Is it linked to the level of antibodies recognizing the iRBC?
- Is it linked to an alteration of the display of the antigens, impacting the recognition of iRBCs by the antibodies?

Tuikeu Ndam et al. (2015)<sup>10</sup> measured at delivery the level of antibodies recognizing VAR2CSA full-length for women of the STOPPAM cohort.

### 4. Is the iRBCs surface immune recognition associated with the level of anti-VAR2CSA antibodies?

Variable	iRBCs surface immune recognition		
	Coefficient	Confidence interval (95%)	$p$ value
Anti-VAR2CSA antibodies level	0.04	0.02 - 0.06	< 10 <sup>-3</sup>

Figure 4. Association between the iRBCs surface immune recognition (when iRBCs and plasmas are associated according to the same genotype) and the level of anti-VAR2CSA antibodies.  $p$ -value based on a multivariate linear regression to determine the association between iRBCs surface immune recognition and the level of anti-VAR2CSA antibodies, adjusted for mother genotype (HbAA or HbAS), gravidity, and malaria infection (n=142).

→ The immune recognition is positively associated to the level of anti-VAR2CSA antibodies.

### 5. Is there a differential level of anti-VAR2CSA antibodies between HbAA and HbAS women?

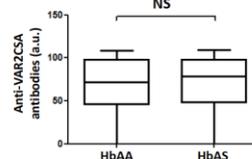


Figure 5. Association between the level of anti-VAR2CSA antibodies and plasma genotype.  $p$ -value based on a multivariate linear regression to determine the association between the level of anti-VAR2CSA antibodies and plasma genotype (HbAA or HbAS), adjusted for mother gravidity, malaria infection, G6PD deficiency and  $\alpha$ -thalassaemia carriages (n=114).

→ The level of anti-VAR2CSA antibodies is not significantly different between HbAA and HbAS women.

## Conclusion

- This study is the first to explore the co-carriage of G6PD deficiency and  $\alpha$ -thalassaemia with HbS (HbC excluded) in malaria immunity during pregnancy.
- In our cohort, G6PD deficiency and  $\alpha$ -thalassaemia carriages were equally distributed among HbAA and HbAS women, and have no influence on the iRBCs immune recognition.
- Infected RBCs immune recognition is lower for HbAS women when iRBCs and plasmas genotype are associated.
- We hypothesize that the lower immune recognition for HbAS women may be due to an abnormal presentation of VAR2CSA and other parasite antigens.

1. Salanti A. et al. (2004) *J. Exp. Med.* 200, 1197-1203. 2. Duffy P. E. (2007) *Parasitology* 134, 1877-1881. 3. Flint J. et al. (1998) *Baillieres Clin. Haematol.* 11, 1-51. 4. Gonçalves B. P. et al. (2016) *Malar J.* 15(1):26. 5. Williams T. N. et al. (2005) *J. Infect. Dis.* 192, 178-186. 6. Cyskoff M. et al. (2016) *Nat. Commun.* 7, 13401. 7. Mbanefo, E. C. et al. (2017) *Sci. Rep.* 7, 45963. 8. Taylor S. M. et al. (2012) *Lancet Infect. Dis.* 12, 457-468. 9. Huynh B.-T. et al. (2011) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 214-220. 10. Tuikeu Ndam N. G. et al. (2015) *J. Infect. Dis.* 190, 2001-2009. 11. Carter N. et al. (2011) *Malar. J.* 10, 241. 12. Liu Y.T. et al. (2000) *Br J Haematol.* 108(2):295-9.

## 2. Présentations orales

- « ***Plasmodium falciparum* infection combined with haemoglobin S or C carriage modifies the phosphorylation of erythrocyte proteins** »

Margaux Chauvet, Cerina Chhuon, Slim Azouzi, Joanna Lipecka, Damien Pineau, Margherita Ortalli, Jean-Antoine Ribeil, Caroline Le Van Kim, Lydie Da Costa, Adrian J. F. Luty, Florence Migot-Nabias, Ida C. Guerrero, Anaïs Merckx  
Retraite du GR-Ex, Octobre 2016, (Roscoff, France).

- « **Differential phosphorylation of human erythrocyte proteins according to haemoglobin S and C carriage upon infection by *Plasmodium falciparum*** »

Margaux Chauvet, Cerina Chhuon, Slim Azouzi, Joanna Lipecka, Damien Pineau, Margherita Ortalli, Jean-Antoine Ribeil, Caroline Le Van Kim, Lydie Da Costa, Adrian J. F. Luty, Florence Migot-Nabias, Ida C. Guerrero, Anaïs Merckx  
Gordon Research Seminar “Red Cells”, Juillet 2017, (NewPort, Etats-Unis)

## 3. Publications

- « **Impact of hemoglobin S trait on immune recognition of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in pregnancy-associated malaria** »

Margaux Chauvet, Marilou Tétard, Gilles Cottrell, Florentin Aussenac, Emeline Brossier, Luc Denoyel, Marion Hanny, Murielle Lohezic, Nicaise Tiuke Ndam, Damien Pineau, Jocelyne Roman, Adrian J.F. Luty, Benoît Gamain, Florence Migot-Nabias, Anaïs Merckx  
Le manuscrit révisé a été renvoyé début février 2019 au journal « Open Forum of Infectious Diseases »

- « ***Plasmodium falciparum* infection combined with hemoglobin S carriage modifies the proteome and the phosphoproteome of erythrocyte and parasite proteins** »

Margaux Chauvet, Cerina Chhuon, Slim Azouzi, Joanna Lipecka, Sébastien Dechavanne, Célia Dechavanne, Murielle Lohezic, Damien Pineau, Margherita Ortalli, Jean-Antoine Ribeil, Sandra Manceau, Caroline Le Van Kim, Lydie Da Costa, Adrian J. F. Luty, Florence Migot-Nabias, Ida C. Guerrero, Anaïs Merckx  
(en préparation)

## ABSTRACT

Malaria is a tropical disease caused by a parasite, *Plasmodium falciparum* that can present in a non-severe form, called mild malaria, or a severe form, especially when it affects pregnant women. The symptoms of malaria are caused by the development of *P. falciparum* in red blood cells (RBCs). During its intra-erythrocytic development, *P. falciparum* modifies the RBC membrane and cytoskeleton through insertion and exposure of parasite-derived proteins on the outer surface. Among the proteins thus exposed, a so-called parasitic adhesin, PfEMP1, mediates binding to endothelial cell surface receptors, resulting in cytoadherence and sequestration of infected RBCs in capillary beds. This cytoadherence permits the infected erythrocytes to avoid splenic clearance.

Malaria has exerted selection pressures on the human genome for millennia and has thus led to the selection of mutations conferring protection against severe forms of the disease. This is the case of hemoglobin S, which is associated with sickle cell disease. Heterozygous carriage of this mutation (sickle cell trait, HbAS) is asymptomatic, and healthy HbAS carriers are protected from severe symptoms of malaria. However, the mechanisms responsible for this protection remain only partially understood. This thesis explored the mechanisms underlying the abnormal presentation of parasite antigens on the surface of infected HbAS erythrocytes and the consequences of these alterations on the immune response in pregnancy-associated malaria.

Malaria during pregnancy is one of the severe forms of malaria, resulting from the cytoadherence of infected RBCs in the placenta. This cytoadherence involves the interaction of a particular PfEMP1, VAR2CSA, with chondroitin sulfate A expressed on syncytiotrophoblasts. The first part of the project dealt with the impact of HbS heterozygous carriage in modulating the anti-VAR2CSA antibody response in the context of gestational malaria. Plasma samples from 159 HbAA and HbAS beninese women, collected at delivery, were used to measure their cell surface binding to VAR2CSA-expressing *P. falciparum* infected HbAA and HbAS RBCs. Cell surface binding of infected HbAS RBCs by plasma from HbAS mothers was significantly lower than the cell surface binding of infected HbAA RBCs by HbAA mothers' plasma. In addition, other genetic diseases affecting RBCs may influence the antibody response to parasitized RBCs. Co-carriage of G6PD deficiency and alpha-thalassemia with HbS were assessed for this study group and were present in, respectively, 26.7% and 51.7% of the women.

The second part of this thesis considered the proteome and phosphoproteome of the infected HbAA and HbAS red cell membranes. Parasitic proteins exposed on the surface of RBCs interact with erythrocyte proteins involved in the anchorage of the cytoskeleton to the erythrocyte membrane. These human proteins belong to the ankyrin and the junctional complexes. The oxidative stress generated by sickle cell trait, and also by parasite invasion, disrupts the kinase / phosphatase balance, leading to modulation of protein phosphorylation. As protein interactions could be regulated by their state of phosphorylation, this modulation may interfere in the correct display of parasite antigens. Thus, protein membrane extracts of infected HbAA and HbAS RBCs were produced and analyzed by mass spectrometry and Western-Blot. This study showed that the sickle cell trait modulated the phosphorylation of erythrocyte proteins of the infected RBCs (mainly membrane transporters and cytoskeletal proteins), but also that of parasite proteins.

The results of these projects show that HbS is associated with changes in the interactions between the parasite and its host cell, stressing the importance of taking into account genetic abnormalities of RBC in studies of *P. falciparum* intra-erythrocytic development.

**Key words :** Malaria, *Plasmodium falciparum*, Red blood cell, Hemoglobin S, Sickle cell trait, Cell surface binding, VAR2CSA.

## RESUME

Le paludisme, maladie tropicale due au parasite *Plasmodium falciparum*, peut survenir sous une forme peu grave, dite simple, ou une forme sévère. Les symptômes du paludisme résultent du développement de *P. falciparum* dans les globules rouges (GR). Lors de son développement intra-érythrocytaire, *P. falciparum* modifie la membrane et le cytosquelette du GR afin d'exposer des protéines parasitaires à la surface de l'hématie. Parmi ces protéines, l'adhésine majeure parasitaire, PfEMP1, se lie aux récepteurs endothéliaux, entraînant la cytoadhérence et la séquestration des GRs infectés (iGRs) dans les capillaires. Cette cytoadhérence permet d'éviter le passage et la clairance splénique des iGRs.

Depuis des siècles, le paludisme a exercé des pressions sur le génome humain, sélectionnant des mutations conférant une protection contre les formes sévères de la maladie. C'est le cas de l'hémoglobine S (HbS), associée à la drépanocytose dont le portage hétérozygote de la mutation causale (trait drépanocytaire, HbAS) est asymptomatique. Les porteurs HbAS sont protégés des symptômes graves du paludisme. Aujourd'hui, les mécanismes responsables de cette protection restent partiellement élucidés. Les travaux de cette thèse ont exploré les mécanismes à l'origine de la présentation anormale des antigènes parasitaires à la surface du GR HbAS infecté et les conséquences de ces altérations sur la réponse immune dans le cadre du paludisme associé à la grossesse.

Le paludisme de la femme enceinte est une des formes sévères du paludisme, due à la cytoadhérence des iGRs dans le placenta, résultant de l'interaction d'un PfEMP1 particulier, VAR2CSA, à la chondroïtine sulfate A des syncytiotrophoblastes. Le premier projet concernait l'impact du trait drépanocytaire sur la modulation de la réponse anticorps anti-VAR2CSA dans le cadre du paludisme gestationnel. Les plasmas de 159 femmes HbAA et HbAS béninoises, collectés à l'accouchement, ont été utilisés pour mesurer leur taux de liaison à des GRs HbAA et HbAS infectés par des parasites exprimant VAR2CSA. Le taux de liaison des iGRs HbAS par les plasmas provenant des mères HbAS était significativement plus faible que celui des iGRs HbAA par les plasmas des mères HbAA. Par ailleurs, d'autres anomalies génétiques affectant le GR peuvent influencer la réponse en anticorps spécifiques aux GRs parasités, et certains co-portages avec l'HbS ont été pris en compte pour ce groupe d'étude. En effet, respectivement, 26,7% et 51,7% des femmes étaient porteuses du déficit en G6PD ou de l'alpha-thalassémie.

Le deuxième projet de cette thèse portait sur le protéome et le phosphoprotéome des membranes de GRs HbAA et HbAS infectés par *P. falciparum*. Les protéines parasitaires exportées dans le cytoplasme et à la surface du GR interagissent avec les protéines érythrocytaires du complexe ankyrine et du complexe jonctionnel d'actine, impliquées dans l'ancrage du cytosquelette à la membrane du GR. Le stress oxydant généré par le trait drépanocytaire et par l'invasion parasitaire perturbe l'équilibre kinase/phosphatase dans la cellule, pouvant entraîner des modulations de la phosphorylation des protéines, interférer dans les interactions protéiques et par conséquent dans la présentation des antigènes parasitaires. Des extraits membranaires de GRs HbAA et HbAS infectés ont été produits et analysés en spectrométrie de masse et en Western-Blot. Cette étude a montré que le trait drépanocytaire modulait la phosphorylation des protéines érythrocytaires de la membrane du GR infecté (transporteurs membranaires et protéines du cytosquelette majoritairement), mais aussi celle de protéines parasitaires.

Les résultats de ces deux projets montrent que l'HbS est associée aux modifications des interactions entre le parasite et sa cellule hôte, soulignant l'importance de prendre en compte les atteintes du GR lors de l'étude du développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum*.

**Mots-clés :** Paludisme, *Plasmodium falciparum*, globule rouge, hémoglobine S, trait drépanocytaire, taux de liaison, VAR2CSA