



HAL
open science

Étude de la clairance parasitaire et érythrocytaire au cours du paludisme grave traité par dérivés de l'artémisinine

Charlotte Chambrion

► **To cite this version:**

Charlotte Chambrion. Étude de la clairance parasitaire et érythrocytaire au cours du paludisme grave traité par dérivés de l'artémisinine. Hématologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5241 . tel-04685753

HAL Id: tel-04685753

<https://theses.hal.science/tel-04685753v1>

Submitted on 3 Sep 2024

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 Cité

École doctorale 561 : Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies

Biologie Intégrée du Globule Rouge (UMR-S 1134)

Étude de la clairance parasitaire et érythrocytaire au cours du paludisme grave traité par dérivés de l'artémisinine

Par Charlotte Chambrion

Thèse de doctorat d'Hématologie

Dirigée par le Pr Pierre Buffet et co-encadrée par le Dr Papa Alioune Ndour

Présentée et soutenue publiquement le 12 septembre 2022

Devant un jury composé de :

Silvie, Olivier	Sorbonne Université	DR	Rapporteur
Maître, Blandine	Université de Strasbourg	CR-HDR	Rapportrice
Lehmann-Che, Jacqueline	Université Paris Cité	PU-PH	Examinatrice
Lavazec, Catherine	Université Paris Cité	DR	Examinatrice
Claessens, Antoine	Université de Montpellier	CR-HDR	Examinateur
Buffet, Pierre	Université Paris Cité	PU-PH	Directeur de thèse
Ndour, Papa Alioune	Université Paris Cité	MCU	Membre invité et co-encadrant

Préambule

Le paludisme affecte l'humanité depuis plus de 50 000 ans et est l'une des maladies infectieuses dont l'indice de mortalité est le plus élevé. C'est aussi la parasitose la plus fréquente au monde avec 241 millions de cas estimés en 2020, l'Afrique Sub-Saharienne comptant 82 % des cas et 95 % des décès mondiaux. Les enfants de moins de 5 ans représentent 77 % des victimes du paludisme en 2020 [1]. Une proportion importante de ces décès résulte directement ou indirectement de l'anémie palustre [2].

L'infection par *Plasmodium falciparum* induit une destruction des globules rouges (GR) infectés et non infectés, ainsi qu'une dysérythropoïèse, qui peut retarder la guérison de l'anémie, voire l'aggraver si l'infection est durable. Dans les zones de forte transmission du paludisme, la majorité des nourrissons et des jeunes enfants sont anémiques. Dans ces régions, l'anémie palustre grave, potentiellement mortelle en l'absence de transfusion sanguine rapide chez les jeunes enfants, est une cause majeure d'admission à l'hôpital, en particulier pendant la saison des pluies durant laquelle la transmission est la plus élevée. L'accès à la transfusion est parfois trop tardif. Le traitement du paludisme peut également provoquer des anémies précoces ou tardives qui, lorsqu'elles ne sont pas correctement prises en charge, peuvent conduire à de graves défaillances d'organes. Lors du paludisme et de son traitement, les GR subissent de multiples altérations. Cependant, la caractérisation des altérations érythrocytaires induisant leur clairance et leur destruction reste imprécise. Une meilleure compréhension de ces mécanismes de clairance (entendue dans cette thèse comme sortie des GR de la circulation) et d'élimination (entendue comme leur destruction définitive)

permettrait de progresser vers une meilleure anticipation et prévention des épisodes anémiques post-thérapeutiques.

Dans le cadre de la surveillance de l'efficacité et de la tolérance de l'artésunate, utilisé en France depuis 2011 sous le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU), mon laboratoire d'accueil avait pu confirmer que le pitting (voir section 1.6.6) était le mécanisme majeur de la clairance des GR infectés (GRi) après un traitement par des dérivés de l'artémisinine. Il avait également contribué à la découverte de l'anémie hémolytique post-artésunate (PADH) et montré que cet effet indésirable très fréquent est associé à la destruction des GR pittés.

Dans un contexte plus général, l'objectif principal de cette thèse était de déterminer les mécanismes de clairance et d'élimination précoce et tardive des GR après traitement du paludisme grave. L'objectif secondaire était d'évaluer l'existence de l'anémie hémolytique post-artémisinine chez les enfants pris en charge à l'Hôpital Robert Debré.

Ce travail, encadré par le Dr Alioune Ndour et supervisé par le Pr Pierre Buffet a été mené en étroite collaboration avec les membres de l'équipe « Biologie Tissulaire du GR » (BioTiGR-Equipe 4) de l'UMR1134 ; l'équipe de la plateforme de protéomique 3P5 à l'institut Cochin ; Nicolas Cénac de l'Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD – Toulouse) pour les analyses lipidomiques ; l'équipe « Physiologie Comparée des Erythrocyte » dirigée par le Dr Stéphane Egée à Roscoff pour les études électrophysiologiques ; et le site Pitié Salpêtrière du Centre National de Référence du Paludisme dirigé par le Dr Marc Thellier. Le travail a bénéficié du protocole commun de recherche clinique du Labex GR-Ex et d'une collaboration étroite avec les hôpitaux franciliens Robert Debré, la Pitié-Salpêtrière, Bichat, le Kremlin Bicêtre, Beaujon, Bégin et Saint-Antoine pour les prélèvements et les rates de patients.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail : **Olivier Silvie, Blandine Maître, Jacqueline Lehmann-Che, Catherine Lavazec, Antoine Claessens.**

Je remercie **Alioune**, qui m'a permis d'évoluer en même temps que ce projet, en me proposant à la fin de mon contrat d'assistante ingénieure de passer le concours de l'école doctorale HOB. Grâce à son encadrement, j'ai appris l'autonomie, la confiance en soi grâce aux responsabilités qu'il m'a confiées et à « forger ma carapace », tout en travaillant ma patience.

Pierre, vous avez su me tendre la main lorsqu'il fallait s'aventurer sur des « pentes glissantes », à la montagne comme au labo. Merci pour votre bienveillance et le temps que vous avez su m'accorder malgré votre emploi du temps hors norme.

Je souhaite également remercier **Yves Colin**, directeur de l'unité 1134, toujours très réactif pour mes demandes de formations, lettres de recommandation et bureau calme à l'approche du déménagement.

Merci à **toute l'unité U1134**, pour votre accueil et votre réceptivité à mon humour particulier.

Merci à **l'ensemble de l'équipe 4**, pour votre soutien sans failles et de ne m'avoir jamais oubliée quand c'était l'heure de déjeuner. Je tiens tout particulièrement à remercier **Aurélié** pour sa disponibilité, sa patience (oui je suis consciente que ma capacité à mettre les deux pieds dans le plat peut être difficile à gérer). Et je tiens à rappeler à tout le monde : si on ne sait pas quelque chose, réfléchir puis lui demander. Par contre si elle ne sait pas, bonne chance ! Merci **Mallorie**, pour tes conseils scientifiques et culinaires (grâce à toi je fais la meilleure bûche crème de marron de tous les temps). **Dhouha**, merci pour les rires partagés dans la détresse, même quand j'ai cassé la poignée du bureau de Alioune 1 semaine après mon arrivée dans l'équipe, mais chuutt. **Sandy**, merci de toujours m'accompagner dans mes déferlements de haine. Je suis heureuse de t'avoir fait découvrir les joies du badminton. **Lucie**, tu seras la prochaine docteure de l'équipe, mais vu tes superbes présentations en journal club, je ne m'inquiète pas pour la soutenance. **Valentine**, je suis très heureuse d'avoir fait ta connaissance lors de la mission au Bénin, d'avoir pu t'accueillir dans notre équipe ensuite, et profiter de tes bons plans street food hété. Merci **Pascal, Aissatou, Mounir, Sissoko, Mario, Camille et le duo de choc Benoit et Geoffroy.**

Je tiens à remercier **tous les chercheurs qui m'ont montré que c'était possible de rester humain** même à ce niveau-là.

À tous les anciens thésards que j'ai vu passer avant moi et ça m'a bien mis la pression : **Benoit, Camille, Sara, Manon, Mahmoud, Ralf, Lucie, Maria, Martina, Kathleen et Samson** (oui vous deux aussi !).

Je remercie évidemment **l'équipe du CNR paludisme, les cliniciens collaborateurs, les patients et leur famille** pour les échantillons sans lesquels ma thèse ne serait pas si complète.

Je remercie la **plateforme 3P5**, en particulier **Emilie-Fleur** pour les expériences de protéomique en spectrométrie de masse et pour l'aide pour les analyses. Merci également à **Nicolas Cénac** d'avoir accepté de collaborer avec moi pour la lipidomique.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de l'équipe béninoise et Nadine pour leur accueil et la confiance qu'ils m'ont accordée lors de ma mission chez eux.

Merci également **l'équipe de Roscoff** pour avoir pris le temps de nous apprendre les joies du Patch clamp. Je pense qu'il est temps de passer en plaque maintenant !

Damien, merci pour tes mises en garde (qui étaient légitimes je le conçois), mais je viens te prouver que je n'ai pas tout perdu durant ma thèse.

C'est pourquoi j'ai gardé le meilleur pour la fin (désolée pour tous ceux qui sont passés avant) : **mes formidables amis, mon extraordinaire famille et mon merveilleux copain.**

C'est un grand honneur pour moi que de vous montrer le fruit de ces 5 années de dur labeur aujourd'hui. Ce travail vous y avez pour la plupart participé de près ou de loin. Vous avez été d'un soutien sans failles.

Maman merci d'avoir fait briller ta magie de réflexologue plantaire sur moi, d'hypnotiseuse sur William, et de maître confiturier sur mes bourrelets.

Morgane, ma grande sœur, mes posters n'auraient jamais été aussi beaux sans toi.

Ma jumelle Clarisse, quelle fierté de présenter avec tes illustrations en congrès ! Le prix du Best talk du GR-Ex je le dois en grande partie à toi. Je suis sûre qu'elles seront aussi appréciées durant la soutenance.

Ma petite **Zoé**, tes petits messages d'encouragement avant mes présentations m'ont gonflée à bloc !

Papa, merci pour tes conseils de pro pour voyager et le « stay strong » si caractéristique.

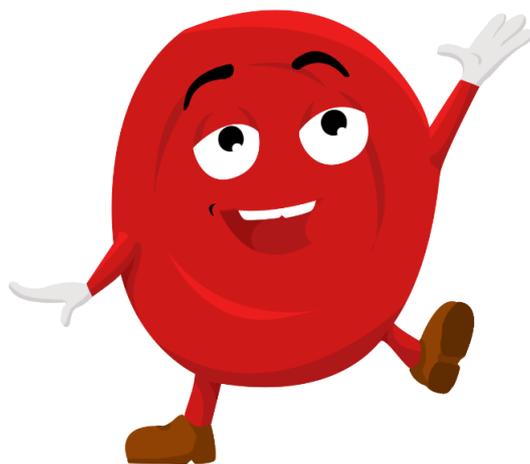
Thomas, merci pour ces bouffes à la maison qui me permettaient de souffler, surtout pendant la rédaction.

Jeanne et les lardons (Claire, Dimitri et Victor), toujours présents pour faire la fête en famille !

À mes amis, que je ne citerai pas parce que si j'en oublie un c'est la « mer noire » (pour rester polie) : merci d'avoir continué les soirées jeux de société, les matchs et tournois de badminton (un grand merci de ne pas m'avoir sacrifiée en simple), les balades et simples soirées pour rire et déconnecter.

William, à la fois mon meilleur ami et mon amour, je ne saurais jamais te remercier assez. Tu as cru en moi et tu m'as donné la force de tenter cette aventure qu'est le doctorat. Tu as su m'écouter et me donner un coup de pied au derrière lorsque la motivation me manquait. Tu n'es pas scientifique, mais tu as su t'impliquer du mieux que tu pouvais dans ce travail, sans parler de toute la partie informatique que tu as gérée avec grande réactivité (on ne parlera pas de Charlotte paniquant devant son ordi et ses logiciels qui plantaient). En vrai je crois que tu m'as sauvée pas mal de fois haha ! Tu as subi cette thèse, mais tu as eu le courage de rester près de moi et de me soutenir, malgré mon caractère pas toujours facile à vivre. Bon je sens que tu commences à avoir la grosse tête donc je m'arrête là pour aujourd'hui !

Bonne lecture à tous !



© Clarisse Chambrion

TABLE DES MATIÈRES

Préambule	2
Remerciements	5
Tables des illustrations	10
Résumé	14
Abstract	16
Introduction	18
1.1. Généralités sur le paludisme	18
1.1.1. Répartition globale	18
1.1.2. Cycle de reproduction et développement de <i>Pf</i>	19
1.1.3. Pathogénicité du paludisme à <i>Pf</i> [6]	21
1.2. Le Globule Rouge	47
1.3.1. Physiologie	47
1.3.2. Erythropoïèse	47
1.3.3. Structure et fonction	48
1.3.4. Les mécanismes d'élimination des GR	58
1.3.5. Le GR au cours de l'infection par <i>Plasmodium falciparum</i>	70
1.3. La rate dans le paludisme	76
1.3.1. Structure de la rate	76
1.3.6. Rôle mécanique [43]	80
1.3.7. Rôle immunologique	82
1.3.8. La rate au cours de l'infection par <i>Plasmodium falciparum</i>	83
1.4. Problématique du travail de thèse	85
1.4.1. Hypothèses de travail	86
1.4.2. Objectifs spécifiques	86
Résultats	88
2.1. Altération des sous populations érythrocytaires et anémie post-traitement dans le paludisme grave	88
2.2. Anémie Hémolytique Post Artemisinine chez l'enfant atteint de paludisme d'importation 97	
2.3. Mécanismes de l'anémie au cours de l'hémolyse retardée post-artémisinine : interactions entre l'hôte, le médicament et le pathogène	108
2.4. Explorations complémentaires	132
2.4.1. Contexte	132
2.4.2. Matériel et Méthode	133
2.4.3. Résultats	136
2.4.4. Résumé	141
Discussion	143
3.1. Synthèse	143

3.2.	Apport de l'étude	151
3.3.	Limites du travail de thèse	152
3.4.	Perspectives	153
	<i>Valorisation</i>	<i>157</i>
4.1.	Publications.....	157
4.1.1.	Articles de thèse	157
4.1.2.	Articles en collaboration	157
4.2.	Communications orales	161
4.2.1.	GR-Ex Talk and poster seminar (Paris, Mars 2020) : Best talk Award	161
4.2.2.	Congrès de l'American Society of Tropical Medicine and Hygiene (en distanciel, Octobre 2020)	162
4.2.3.	Congrès de l'European Red Cell Society (2 présentations) (Milan, Avril 2022)	163
4.3.	Posters	167
4.3.1.	Congrès de la Société Française d'Hématologie (Paris, Mars 2019)	167
4.3.2.	Congrès de l'American Society of Tropical Medicine and Hygiene (Washington, Novembre 2019)	168
4.3.3.	Congrès de la Société Française d'Hématologie (Paris, Septembre 2020)	169
4.3.4.	Congrès de l'American Society of Tropical Medicine and Hygiene (en distanciel, Novembre 2021)	170
	<i>Formations suivies au cours de la thèse</i>	<i>171</i>
	<i>Bibliographie</i>	<i>173</i>

Tables des illustrations

Figure 1 : Incidence du paludisme en 2019	18
Figure 2 : Cycle de Plasmodium falciparum	20
Figure 3 : Exemple de tests de diagnostic rapides négatif (A) et positif (B) à Pf.....	24
Figure 4 : Exemple de détection de formes circulantes de Pf.....	25
Figure 5. Développement des anémies et récupération ultérieure.....	28
Figure 6 : Trois profils typiques d'anémie post-traitement.....	29
Figure 7 : Résumé des mécanismes avérés et potentiels d'anémie au cours de l'infection par P. falciparum.....	32
Figure 8 : Structure moléculaire de l'artémisinine et de ses principaux dérivés	39
Figure 9 : Mécanisme du pitting dans le contexte du traitement du paludisme.	43
Figure 10 : Détection des GRi RESA+ ADN+ et pitted RESA+ ADN-.....	43
Figure 11 : Cinétique de clairance des GRi (cercles pleins) et relargage des GR pitted (cercles vides) chez les voyageurs français en fonction du traitement.	44
Figure 12 : Principales caractéristiques d'un cas typique de PADH..	45
Figure 13 : Prédiction de la PADH chez deux patients atteints de paludisme grave avec hyperparasitémie.	46
Figure 14 : Schéma de l'érythroïèse chez l'adulte.	48
Figure 15: GR discocytaires de sujet sain en microscopie électronique à balayage.	48
Figure 16 : Résumé des différentes morphologies du GR.	50
Figure 17 : Distribution des lipides dans la membrane du GR	51
Figure 18 : Schéma de la membrane érythrocytaire.....	53
Figure 19 : A. Structure du tétramère d'hémoglobine. B. Structure de l'hème.....	54
Figure 20 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine	57
Figure 21 : Les différentes méthodes permettant d'étudier la déformabilité des GR durant l'infection par le paludisme	60
Figure 22 : Modèle résumant l'implication des domaines riches en cholestérol et des domaines riches en sphingomyéline dans la circulation des GR.	62
Figure 23 : Effet de l'osmolarité sur les GR	63
Figure 24 : Courbe typique d'Osmoscan et les paramètres correspondants.....	64
Figure 25 : Mécanismes de l'éryptose.....	66
Figure 26 : Schéma résumé de l'activation du système du complément et de ses inhibiteurs.	68
Figure 27 : Représentation schématique de la membrane d'un GR sains (GR sain) (a) et infecté un stade asexué de Pf (GRi)(b).	72
Figure 28 : Modèle proposé de la régulation des lipides lors de l'infection par Pf.....	75
Figure 29 : Caractéristiques histologiques générales de la rate humaine	77
Figure 30 : Coupe histologique de la pulpe rouge de la rate après coloration à l'acide périodique de Schiff.....	78
Figure 31 : Colorations immunohistochimiques de coupes histologiques spléniques.	80
Figure 32 : Schéma de la microcirculation des GR dans la rate.	82
Figure 33 : Phagocytose des GRi dans les cordons de la pulpe rouge.	84
Figure 34 : Représentation schématique des hypothèses de travail.	86
Figure 35 : Principes de l'analyse des courants enregistrés en patch-clamp.....	136
Figure 36 : Altérations morphologiques des GR et GR pitted.....	137

Figure 37 : Quantification de canaux ioniques par spectrométrie de masse à différents temps post-traitement.	138
Figure 38 : Courbe courant/ potentiel (I/V) de GR infectés.	140
Figure 39 : Conductance des GR pitéés.	141
Figure 40 : Distribution théorique des différentes sous populations de GR liées aux anémies post traitement	144

LISTE DES APREVIATIONS

2,3 DPG :	2,3 diphosphoglycérate
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AQUAMAT :	Artesunate QUinine Artesunate Malaria Treatment
ATU :	Autorisation Temporaire d'Utilisation
CD :	Cluster of Differentiation
CNR :	Centre National de Référence
CR1 :	Complement Receptor 1
CRP :	Complement Regulatory Proteins
CTA :	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
DA :	Dérivé de l'Artémisinine
DTT :	Dithiothréitol
EI :	Elongation Index
ELISA :	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
G6PD :	Glucose-6-Déshydrogénase
GR :	Globule Rouge
GRI :	Globule Rouge infecté
GRni :	Globule Rouge non parasité non pité
Hb :	Hémoglobine
HbS :	Hémoglobine S
HRP2 :	Histidine Rich Protein 2
HU :	Unité Hémostylique
Ig :	Immunoglobuline
iRBC :	infected Red Blood Cell
IV :	Intra Veineux
LAMP :	Loop mediated isothermal amplification assay
LDH :	Lactate Déshydrogénase
LFQ :	Label Free Quantification
MAC :	Complexe d'attaque membranaire C5b-9
NPP :	New Permeation Pathways
NPPB :	5-Nitro-2-(3-Phénylpropylamino) Benzoate
oiRBC :	once infected Red Blood Cell
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
PADH:	Post-Artesunate Delayed Hemolysis
PC :	Phosphatidylcholine
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PE :	Phosphatidyletanolamine
PEXEL :	<i>Plasmodium</i> export element
Pf:	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1 :	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein 1
PI :	Phosphatidylinositol
PO₂ :	Pression en dioxygène

PSAC :	Plasmodium Surface Anion Channel
RAP-2 :	Rhoptry Associated Protein 2
RBC :	Red Blood Cell
RESA :	Ring Erythrocyte Surface Antigen
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
RSA :	Ring stage Survival Assay
RSP-2 :	Ring Surface Protein 2
RT :	Température ambiante
RT-PCR :	Reverse Transcriptase
SEAQUAMAT :	South East Asian QUinine Artesunate MAlaria Trial
SLO :	Streptolysine-O
TDR :	Test de Diagnostic Rapide
UPR :	Unfolded Protein Response
VDAC :	Voltage Dependant Anion Channel
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Résumé

Étude de la clairance parasitaire et érythrocytaire au cours du paludisme grave traité par dérivés de l'artémisinine

Responsable de 600 000 décès annuels, le paludisme est la parasitose ayant l'impact le plus lourd en termes de morbi-mortalité à l'échelle mondiale. Dans le cas des accès palustres symptomatiques, les premiers symptômes débutent 7 à 30 jours après la piqûre infectante. Parmi ces symptômes, l'anémie touche environ 97 % des patients durant leur accès palustre et 56 % des patients atteints de paludisme grave présentent une anémie persistante 1 mois après l'initiation du traitement [3]. L'anémie est une cause de mortalité et de morbidité avec une élimination massive de globules rouges (GR) durant l'infection et après le début du traitement. Recommandés depuis 2010 par l'OMS dans le traitement du paludisme grave, les dérivés de l'artémisinine induisent le « pitting » : il s'agit de l'expulsion du parasite mort du GR hôte sans lyse, lors de son passage à travers les fentes inter-endothéliales de la rate. Le GR pité retourne alors dans la circulation. Malgré leur efficacité prouvée, ces traitements antipaludiques provoquent deux types d'anémie : l'anémie précoce survenant dans les 7 jours après initiation du traitement et l'anémie hémolytique post artésunate (PADH) qui survient après la première semaine de traitement chez l'adulte.

L'objectif général de cette thèse était de comprendre les mécanismes conduisant à l'élimination des GR lors des anémies précoces et tardives post-traitement.

Nous avons ainsi montré que la perte de GR dans l'anémie précoce et tardive après traitement n'était pas due principalement à l'élimination des GR parasités ou pittés mais majoritairement à l'élimination des GR non infectés/non pittés. Nous avons observé des modifications marquées au sein des GR circulants durant l'infection et après traitement, telles qu'une altération de l'équilibre lipidique (augmentation d'environ 1,65 x du ratio cholestérol/phospholipides) ou encore une déformabilité diminuée en ektacytométrie. Les GRi et GR pittés étaient également retenus à plus de 20 % en microsphiltration : une technique permettant de mimer la rétention splénique.

Nous avons aussi montré qu'il y avait une persistance de plus d'une centaine de protéines parasitaires associées aux GR du patient même après l'élimination du parasite. Parmi ces

protéines, RAP1 et RhopH3 sont immunoprécipitées en présence d'anticorps de patients et sont également détectables à la surface du GR durant le suivi post-traitement. Concernant les mécanismes effecteurs de l'élimination des GR durant l'anémie retardée, la perte d'hémoglobine était corrélée à l'augmentation d'anti-phosphatidylsérines pendant la PADH. On observe également une augmentation de la fixation de l'opsonine C4b aux GR ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines régulatrices du complément suggérant leur implication. De même, nous avons montré une érythrophagocytose par opsonisation plus intense pendant la PADH qu'aux autres temps de suivi. Ces résultats combinés suggèrent qu'une altération progressive de certaines sous-populations de GR induit leur élimination par ces différents mécanismes effecteurs de l'hôte. Nos résultats devraient aider à identifier plus spécifiquement les opérateurs de ces anémies ouvrant la voie à une meilleure prédiction et prise en charge de cette complication majeure.

Mots-clés : Globules rouges, *Plasmodium falciparum*, Rate, Anémie, Artemisinine

Abstract

Study of parasite and erythrocyte clearance during severe malaria treated with artemisinin derivatives

Malaria is responsible for 600,000 deaths per year and is the deadliest parasitic disease in the world. In the case of symptomatic malaria attacks, the first symptoms begin 7 to 30 days after the infecting bite. Among these symptoms, anemia affects about 97% of patients during their malaria attack and 56% of patients with severe malaria have persistent anemia 1 month after initiation of treatment [3]. Anemia is a cause of mortality and morbidity with massive elimination of red blood cells (RBCs) during infection and after initiation of treatment. Recommended since 2010 by the WHO for the treatment of severe malaria, artemisinin derivatives induce pitting, which is the expulsion of the dead parasite from the host RBC without lysis, as it passes through the inter-endothelial clefts of the spleen. The pitted RBC then returns to the circulation. Despite their proven efficacy, these antimalarial treatments cause two types of anemia: early anemia occurring within 7 days after initiation of treatment and post-artesunate delayed hemolysis anemia (PADH) occurring after the first week of treatment in adults.

The general objective of this thesis was to understand the mechanisms leading to the elimination of RBCs during early and late post-treatment anemias.

We showed that the loss of RBCs in early and late post-treatment anemia was not mainly due to the elimination of parasitized or pitted RBCs but mainly to the elimination of uninfected/non-pitted RBCs. We observed marked changes in circulating RBCs during infection and after treatment, such as altered lipid balance (approximately 1.65x increase in cholesterol/phospholipid ratio) and decreased deformability in ektacytometry. GRi and pitted GR were also retained at more than 20% in microfiltration: a technique that mimics splenic retention.

We also showed that more than 100 parasite proteins associated with the patient's RBCs persisted even after the parasite was eliminated. Among these proteins, RAP1 and RhopH3 are immunoprecipitated in the presence of patient antibodies and are also detectable on the

RBC surface during post-treatment follow-up. Regarding the effector mechanisms of RBC elimination during delayed anemia, hemoglobin loss correlated with increased anti-phosphatidylserines during PADH. We also observed an increase in the binding of C4b opsonin to RBCs and a decrease in the expression of complement regulatory proteins suggesting their involvement. Similarly, we showed a more intense opsonization erythrophagocytosis during PADH than at other follow-up times. These combined results suggest that a progressive alteration of certain RBC subpopulations induces their elimination by these different host effector mechanisms. Our results should help to identify more specifically the operators of these anemias opening the way to a better prediction and management of this major complication.

Keywords: Red blood cells, *Plasmodium falciparum*, Spleen, Anemia, Artemisinin

Introduction

1.1. Généralités sur le paludisme

1.1.1. Répartition globale

Le paludisme, aussi appelé malaria (« fièvre des marais »), est une maladie causée par l'infection par un parasite protozoaire apicomplexe du genre *Plasmodium*. Il est transmis par la piqûre de diptères hématophages du genre *Anopheles*. À ce jour, plus de 150 espèces de *Plasmodium* ont été décrites, dont 6 infectent l'être humain : *Plasmodium falciparum*, le plus répandu et responsable de la majorité des formes graves, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* et *Plasmodium simium*, ces deux dernières espèces ayant des primates non humains comme réservoirs principaux. La distribution géographique du paludisme suit grossièrement l'aire de répartition des moustiques vecteurs, soit majoritairement dans les zones tropicales et subtropicales où les températures et le degré d'humidité sont élevés (notamment à la saison des pluies durant laquelle le moustique se reproduit) (Figure 1).

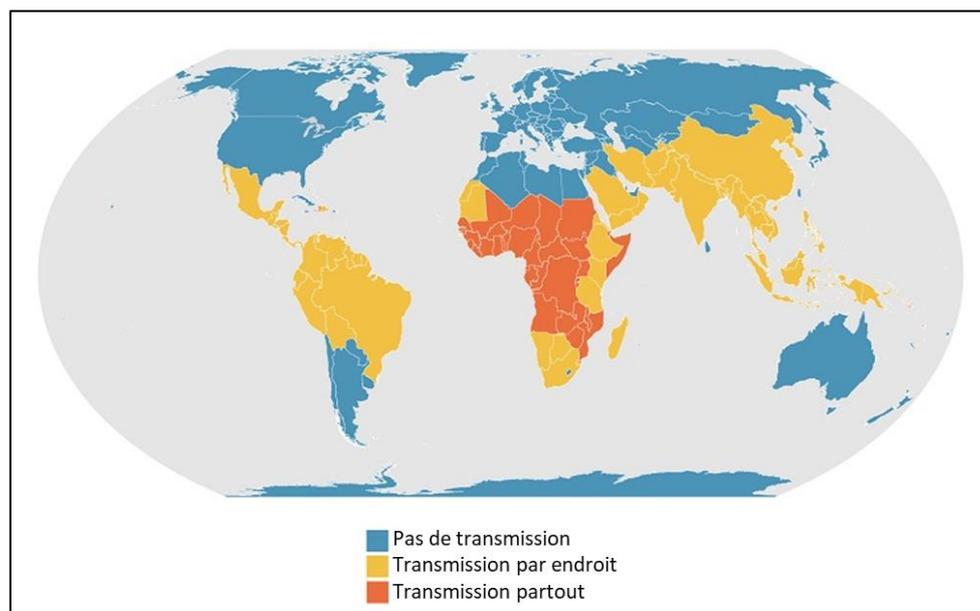


Figure 1 : Incidence du paludisme en 2019 [4]

Le paludisme est un problème majeur de santé publique. Presque la moitié de la population mondiale vit en zone à risque, surtout dans des pays en développement. L'espèce de parasite prédominante est *Plasmodium falciparum* (*Pf*), causant des formes graves potentiellement mortelles. En 2020, il y a eu 241 millions de cas de paludismes dans 87 pays d'endémie palustre, dont 627 000 décès, la majorité des victimes étant les enfants de moins de 5 ans [4] et 93 % des décès étant rapportés en Afrique.

Les personnes les plus vulnérables sont les jeunes enfants, qui n'ont pas encore développé d'immunité contre le paludisme ; les femmes enceintes, qui perdent en partie leur prémunité ; et les voyageurs provenant de zones non endémiques. En France métropolitaine, le Centre National de Référence du Paludisme (CNR) rapporte chaque année entre 2000 et 4000 cas de paludisme d'importation (Réunion nationale du CNR 2021), correspondant à 4000-6000 cas estimés. Cette thèse est focalisée sur le paludisme d'importation à *Pf*.

1.1.2. Cycle de reproduction et développement de *Pf*

Le cycle évolutif de *Pf* implique 2 hôtes : l'anophèle femelle et l'être humain. Lors de son repas sanguin, l'anophèle injecte des sporozoïtes dans le derme de l'hôte humain. S'ensuivent 3 phases de développement : les phases asexuées hépatocytaire et érythrocytaire, et la phase sexuée, amorcée chez l'être humain (gamétocytes), se poursuivant ensuite chez l'Anophèle (Figure 2).

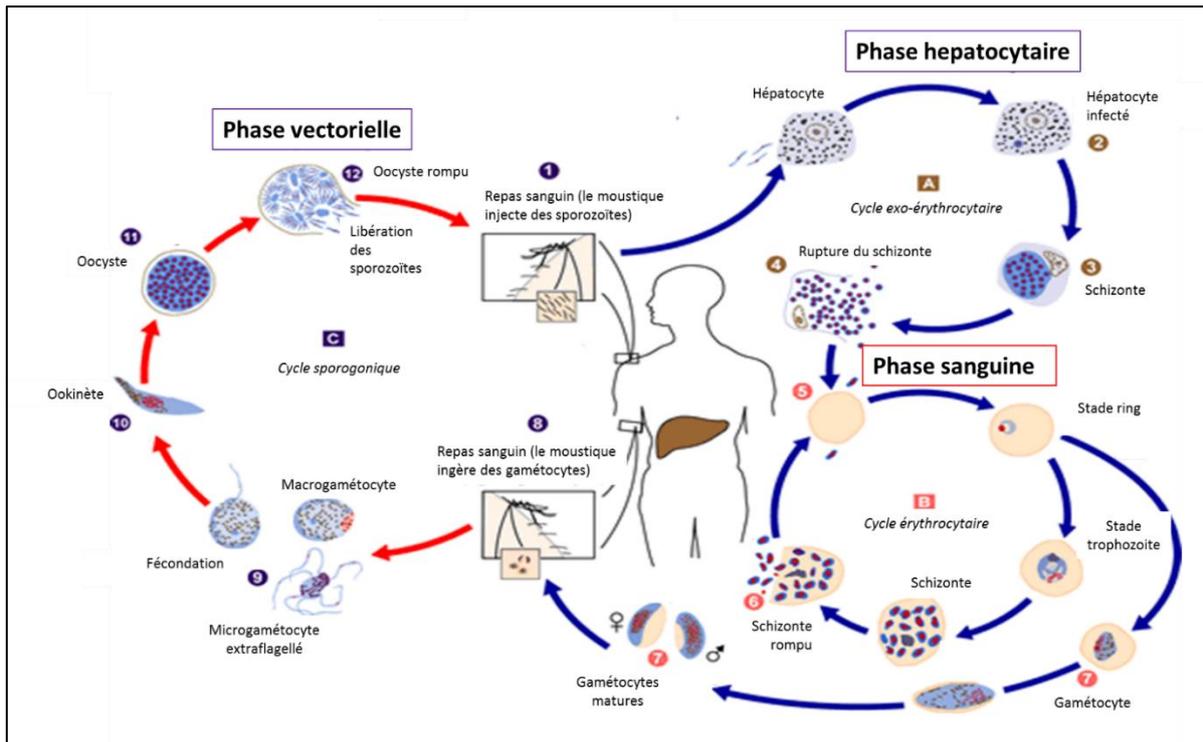


Figure 2 : Cycle de *Plasmodium falciparum* (adapté de [4])

Suite au repas sanguin de l’anophèle (1), les sporozoïtes vont infecter les cellules hépatiques (2). C’est durant cette phase également appelée cycle exo-érythrocytaire (A) que les parasites vont maturer en schizontes hépatiques (2). Les schizontes vont ensuite se rompre et libérer les mérozoïtes (4), qui infecteront les GR pour initier le cycle érythrocytaire (B) (phase sanguine). Cette phase dure environ 48 h et est un enchaînement de réinvasions de mérozoïtes dans des GR après rupture de schizontes (5-6), se répétant jusqu’à la différenciation des parasites en formes sexuées, appelés gamétocytes (7). C’est au cours du cycle érythrocytaire que la pathogénicité de la maladie est observée et que l’on peut diagnostiquer la maladie.

L’anophèle ingère lors de son repas sanguin les gamétocytes mâles et femelles (8). Il y a alors fécondation de microgamétocytes par des macrogamétocytes dans l’estomac du moustique (9). De cette fécondation va naître un ookinète (10), capable de se mouvoir pour envahir le tube digestif du moustique. L’ookinète va alors se différencier en oocyste (11), qui à son tour va se rompre, et libérer les sporozoïtes qui vont gagner les glandes salivaires de l’insecte (12), jusqu’au prochain repas sanguin.

La transmission non vectorielle est rare, mais possible, par voie transplacentaire ou par voie sanguine (partage de seringue, effraction cutanée, ou surtout transfusion sanguine ou greffe).

1.1.3. Pathogénicité du paludisme à *Pf* [6]

Environ 12 à 15 heures après l'invasion du GR par le parasite, ce dernier induit l'apparition de protubérances appelées Knobs à la surface de sa cellule hôte. Ces structures exposent à la surface du GR des protéines de la famille PfEMP1, qui opèrent l'adhérence des GRi aux cellules endothéliales des petits vaisseaux [7]. Les GRi adhèrent aux parois des vaisseaux, mais également entre eux ou bien aux GR non infectés (GRni) (phénomène de rosetting) [8]. Cette adhérence entraîne la séquestration des GR contenant des parasites matures dans les organes, altérant le bon fonctionnement du flux microcirculatoire et de l'endothélium vasculaire [9].

1.1.3.1. *Manifestations cliniques de l'infection par Pf*

1.1.3.1.1. PALUDISME SIMPLE

En France, l'accès palustre simple est la forme observée dans environ 85 % des cas. Les premiers symptômes surviennent au minimum 7 à 30 jours après la piqûre infectante, parfois plusieurs mois plus tard. La fièvre et les frissons sont les principaux symptômes de l'accès palustre, souvent accompagnés de céphalées, myalgies, fatigue et troubles digestifs.

1.1.3.1.2. PALUDISME GRAVE

Un paludisme simple non ou mal pris en charge peut évoluer vers le paludisme grave. Il est caractérisé par une aggravation rapide de l'état du patient, avec troubles de conscience, atteinte pulmonaire, défaillance multiviscérale, associés à la séquestration massive des GR infectés. Le neuropaludisme associe convulsions et troubles de la conscience pouvant aller jusqu'au coma voire la mort si la prise en charge du patient et la mise en œuvre du traitement sont retardées. Une anémie grave, définie chez l'enfant de moins de 5 ans par un taux d'hémoglobine <5g/dl, est la forme prédominante du paludisme grave en zone fortement endémique.

En 2014, l'OMS a défini le paludisme grave lorsque l'accès répond à au moins un des critères de gravité ci-dessous (Tableau 1), en présence de parasites asexués *Pf*.

Perte de conscience :	Glasgow pour le coma <11 chez les adultes ou un score de Blantyre pour le coma <3 chez les enfants
Acidose :	Déficit de base > 8 meq/l ou, s'il n'est pas disponible, bicarbonate de plasma de 15 mM ou lactate de plasma veineux
Hypoglycémie	Glycémie <2,2 mM (<40 mg/dl)
Anémie palustre grave :	Une concentration d'hémoglobine <5 g/dl ou un hémocrite <15 % chez les enfants de moins de 12 ans (<7 g/dl et <20 %, respectivement, chez les adultes) avec un nombre de parasites >10 000/ μ l
Insuffisance rénale (lésion rénale aiguë) :	Créatinine plasmatique ou sérique >265 μ M (3 mg/dl) ou urée sanguine >20 mM
Ictère :	Bilirubine plasmatique ou sérique >50 μ M (3 mg/dl) avec un nombre de parasites >100 000/ μ l
Œdème pulmonaire :	Confirmation radiologique, ou saturation en oxygène <92 % dans l'air ambiant avec une fréquence respiratoire >30/min
Saignements importants :	Y compris les saignements récidivants ou prolongés des gencives, du nez ou des sites de ponction veineuse
Choc :	Le choc compensé est défini comme le remplissage capillaire >3 secondes ou le gradient de température sur la jambe (membre moyen à proximal), ou <80 mmHg chez les adultes présentant des signes d'altération de la perfusion (périphéries froides ou remplissage capillaire prolongé), mais pas d'hypotension. Le choc décompensé est défini comme la pression artérielle systolique <70 mmHg chez les enfants.
Hyperparasitémie :	Parasitémie à <i>Pf</i> >10 %

Tableau 1 : Définition épidémiologique et de recherche du paludisme sévère à *Pf* sévère (selon le rapport de l’OMS 2014)

1.1.3.2. Diagnostic du paludisme

Le diagnostic précoce du paludisme est un élément fondamental de la lutte contre cette maladie. Chez le voyageur, tout état fébrile en retour de zone d’endémie doit faire l’objet d’un test de diagnostic du paludisme. Il est basé sur la détection des parasites durant la phase érythrocytaire, phase symptomatique du paludisme à *Pf*. En effet, les parasites sont alors accessibles par simple prélèvement sanguin. Cependant, puisque les formes matures cytoadhèrent dans les microvaisseaux, seuls les stades anneaux ou « rings » (les plus jeunes formes) de *Pf* circulent. La parasitémie comptée dans le sang périphérique sous-estime donc souvent la charge parasitaire corporelle totale.

1.1.3.2.1. LES TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDE (TDR)

La microscopie optique requiert des lecteurs expérimentés pour un diagnostic fiable du paludisme. Cette contrainte a amené la mise en place de tests rapides basés sur la détection immunochromatographique d’antigènes parasitaires. Ces tests sont sensibles (le seuil de détection est d’environ 50 à 200 parasites par microlitre de sang), peu chers et, contrairement au diagnostic microscopique, ne nécessitent pas d’accès à l’électricité et à un opérateur spécialisé. En fonction du test utilisé, il est possible de détecter à partir d’une goutte de sang capillaire les antigènes palustres soit communs aux principales espèces plasmodiales infectant l’être humain, soit spécifiques d’une espèce, comme l’Histidine Rich Protein 2 (HRP2) pour *Pf* (Figure 3). Cependant, l’émergence de souches de *Pf* dont les gènes *pfhrp2/3* sont mutés ou délétés a été rapporté dans 15 pays selon le dernier rapport de l’OMS, les rendant indétectable par les TDR basés sur la protéine HRP2. L’OMS a recommandé aux pays rapportant plus de 5 % de souches portant ces mutations/délétions d’utiliser d’autres TDR, mais ceux-ci sont généralement moins sensibles et plus coûteux. Enfin, après traitement par dérivés de l’artémisinine, certains antigènes parasitaires restent en circulation pendant plusieurs jours à plusieurs semaines après élimination du parasite [10]. Ces tests rapides de

détection d'antigènes constituent donc une aide au diagnostic, mais la validation par la microscopie optique reste préférable partout où elle est accessible.

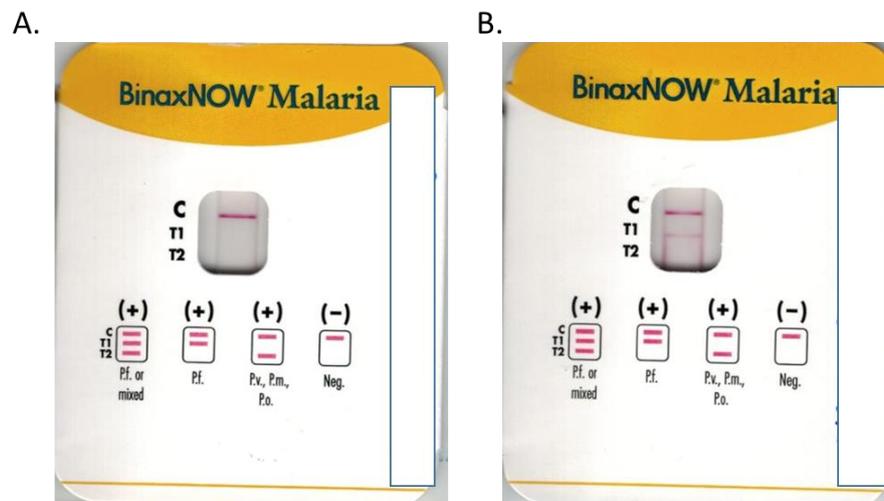


Figure 3 : Exemple de tests de diagnostic rapides négatif (A) et positif (B) à Pf

1.1.3.2.2. IDENTIFICATION PAR MICROSCOPIE (FIGURE 4)

Le diagnostic par microscopie optique est la première méthode utilisée historiquement et reste actuellement la référence. La goutte épaisse et le frottis sanguin peuvent être nécessaires à la validation du diagnostic. La goutte épaisse s'effectue par étalement de sang sur la surface réduite d'une lame. Après séchage, les cellules sont hémolysées par une solution de Giemsa 3 % dans du tampon phosphate à pH 7,2 et à l'aide d'un réactif à base de saponine et de formol. La sensibilité d'un test par goutte épaisse est d'environ 30 parasites/ μ l de sang. Le frottis sanguin est un étalement de GR en monocouche sur l'ensemble de la lame, séché et fixé en méthanol et enfin coloré au May-Grünwald-Giemsa. Cette technique, moins sensible que la goutte épaisse, permet en plus de poser un diagnostic positif, d'estimer avec précision la parasitémie (nombre d'hématies parasitées par rapport au nombre d'hématies totales) et également d'effectuer le diagnostic d'espèce.

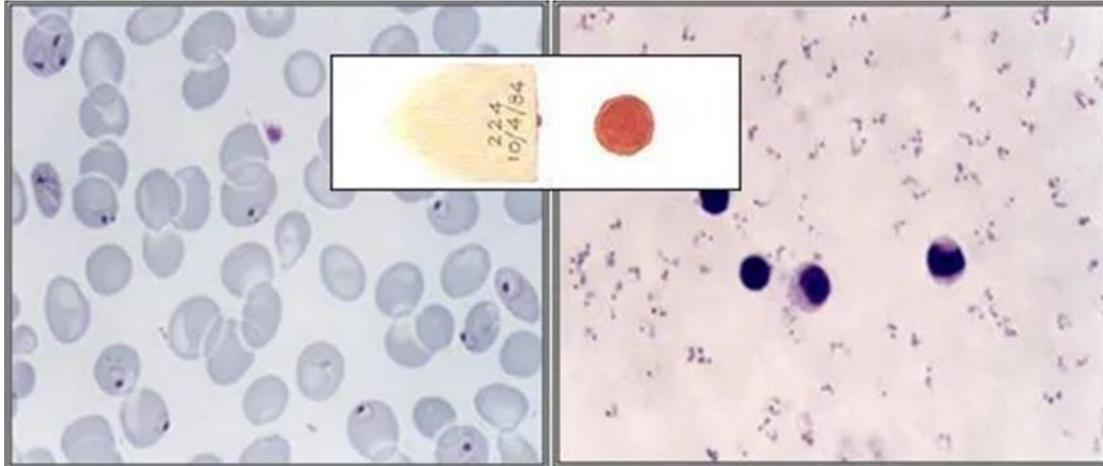


Figure 4 : Exemple de détection de formes circulantes de Pf par goutte épaisse (à droite) et frottis mince (à gauche) et lecture en microscopie optique [11]

1.1.3.2.3. LA DÉTECTION PAR BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Pour augmenter la sensibilité du diagnostic à des parasitémies très faibles, des techniques de détection par amplification de l'ADN (PCR, PCR en temps réel, RT-PCR, Loop-mediated isothermal amplification assay, LAMP) sur échantillons de sang total ou de plasma ont été développées. L'identification de l'espèce plasmodiale, quant à elle, est réalisable grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. Cependant, le coût élevé et la lourdeur de cette technique (tant matérielle qu'en termes de main-d'œuvre) limitent son utilisation.

1.1.3.2.4. LA SÉROLOGIE

La détection des anticorps dans le sérum ou le plasma par la technique ELISA ou Immunofluorescence ne permet pas de différencier une infection de paludisme en cours d'un paludisme antérieur. Elle permet un diagnostic rétrospectif, sans évaluation de la parasitémie d'où l'intérêt en pratique clinique limité. La sérologie est cependant utile au criblage des donneurs de sang.

1.1.3.3. Préventions [1]

Jusqu'à récemment, seules les préventions contre les piqûres de moustiques et contre l'infection étaient possibles et efficaces. Aucun moyen de prévention ne peut constituer une protection absolue contre le paludisme. Il faut donc rester vigilant à l'apparition de fièvre en zone d'endémie et au retour de zone à risque.

1.1.3.3.1. LE VACCIN RTS, S/AS01 [5]

En juillet 2015, le vaccin RTS, S/AS01, mis au point par la Malaria Vaccine Initiative, a reçu un avis favorable de l'agence Européenne des Médicaments, et est désormais recommandé par l'OMS pour la prévention du paludisme chez les enfants vivants dans les régions où la transmission est modérée à forte. Ce vaccin est composé d'une protéine recombinante formant spontanément des pseudo particules virales, les RTS, S. Cette particule virale contient une portion d'une protéine de *Pf*, la circumsporozoïte, fusionnée à l'extrémité amino-terminale de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B. Durant l'essai clinique de phase 3 en Afrique subsaharienne, le vaccin a évité environ 39 % de paludisme après 4 doses chez les enfants âgés de 5 à 17 mois. Il y a également eu en moyenne 29 % de réduction de cas de paludisme grave chez les enfants vaccinés. Les études de phase 4 sont en cours afin de déterminer les balances bénéfice/risque et bénéfice/coût de son utilisation généralisée.

1.1.3.3.2. PROTECTIONS ANTIVECTORIELLES

L'OMS préconise dans les zones d'endémie de dormir sous une moustiquaire imprégnée d'insecticides. La pulvérisation intra-domiciliaire à effet rémanent est également recommandée pour limiter la transmission de la maladie. Elle consiste à pulvériser une à deux fois par an des insecticides sur les murs intérieurs du logement. D'autres méthodes comme les diffuseurs électriques d'insecticide, les moustiquaires grillagées aux fenêtres et aux portes, les répulsifs cutanés et les vêtements imprégnés d'insecticides peuvent être utilisés. Ces mesures peuvent aussi contribuer partiellement à la prévention d'autres infections à transmission vectorielle.

1.1.3.3.3. TRAITEMENTS INTERMITTENTS PRÉVENTIFS, CHIMIOPROPHYLAXIE ET TRAITEMENT ANTITRANSMISSION

Chez la femme enceinte en zone endémique, l'OMS recommande des traitements préventifs intermittents par sulfadoxine-pyriméthamine ou cotrimoxazole en cas de co-infection par le VIH. Des traitements intermittents préventifs sont aussi administrés aux nourrissons en zone fortement endémique, et aux enfants en zones à transmission saisonnière.

Chez le voyageur non immun, la chimioprophylaxie est basée sur l'utilisation d'atovaquone-proguanil, doxycycline ou méfloquine. Elle doit être adaptée aux caractéristiques individuelles du patient et au pays visité.

Le traitement anti-transmission par primaquine monodose en association avec une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine est recommandé en zone de faible transmission ou d'émergence de résistance. L'ivermectine et le bleu de méthylène sont en période d'évaluation dans cette indication.

1.1.3.4. *L'anémie dans le paludisme à Pf*

L'anémie est définie par la baisse sous un seuil défini, variable selon l'âge, le genre et la géographie, du nombre de GR circulants dans le sang, du taux d'hématocrite, ou, plus classiquement désormais, du taux d'hémoglobine circulant. La majorité des études détermine 3 types d'anémies, basées sur la concentration en hémoglobine circulante : l'anémie légère ≤ 11 g/dL, modérée ≤ 8 g/dL et grave ≤ 5 g/dL [2]. Dans cette thèse, je distinguerai aussi différentes anémies observées au cours et au décours du paludisme : celles observées avant traitement, immédiatement après traitement anti-palustre (Figure 5), ou enfin l'anémie hémolytique post-artésunate, généralement plus tardive.

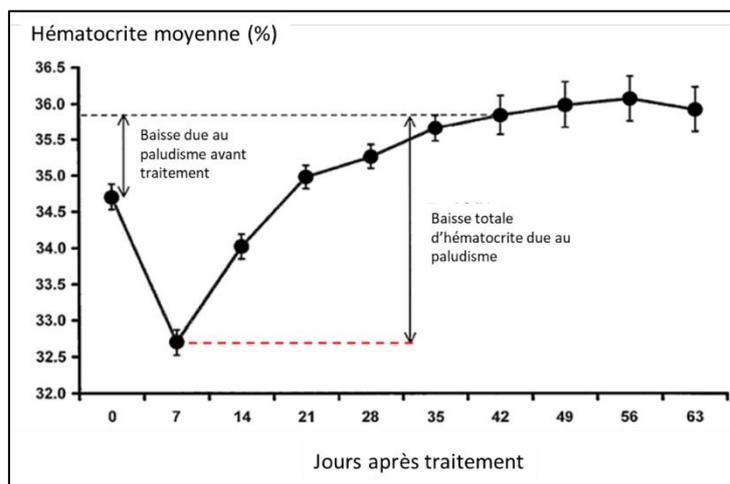


Figure 5. Développement des anémies et récupération ultérieure après traitement antipaludique (méfloquine, halofantrine, dérivés d'arteémisinine ou quinine) chez 4007 patients de la frontière Thaïlande - Myanmar, atteints de paludisme non compliqué (adapté de [12])

Jauréguiberry, Ndour et al ont défini 3 types d'anémie post-traitement selon la variation des marqueurs d'anémie [13]. Le profil « rising » est caractérisé par la diminution du taux d'hémoglobine avec une hémolyse marquée (au vu des LDH et de l'haptoglobine) jusqu'au quatrième jour post-traitement. Le taux de réticulocytes est augmenté ensuite jusqu'à J28 parallèlement au taux d'hémoglobine (Figure 6 A1, B1). Le profil « persistant » est caractérisé par une baisse du taux d'hémoglobine jusqu'à J4, associée à une hémolyse modérée. Au-delà de J8, les taux moyens d'hémoglobines sont augmentés de 5 % par semaine (Figure 6 A2 B2). L'hémolyse persiste jusqu'au 28^{ème} jour post-traitement. Le profil « PADH » (pour Post-Artesunate Delayed Hemolysis) est caractérisé par une première baisse d'hémoglobine jusqu'à J4, puis une stabilisation, et enfin une nouvelle baisse d'au moins 10 % entre J7 et J14, cette baisse s'accompagnant d'une hémolyse récidivante (Figure 6 A3 B3).

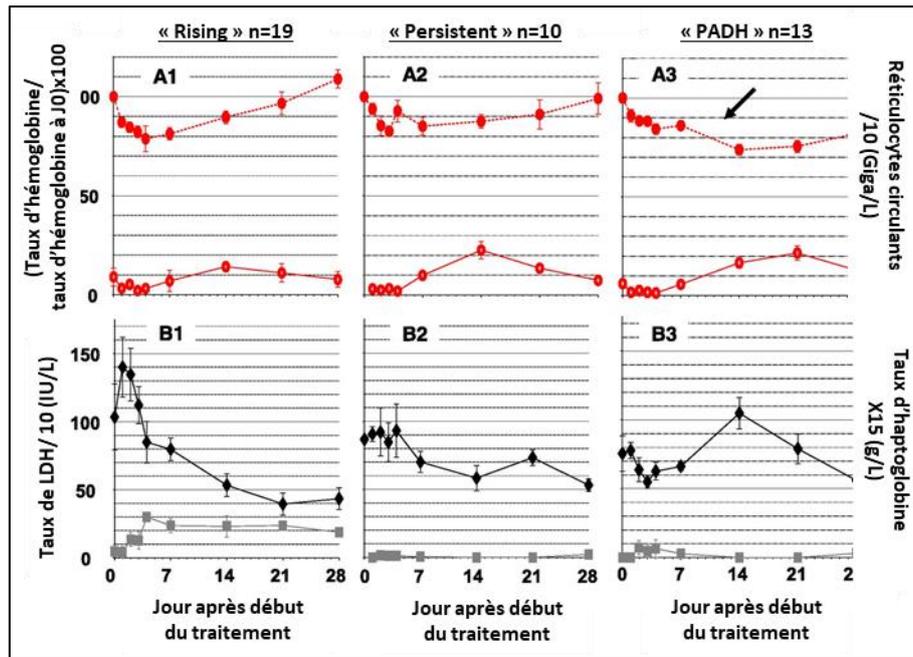


Figure 6 : Trois profils typiques d’anémie post-traitement chez 42 patients non transfusés atteints de paludisme grave, traités par Artésunate et suivis pendant plus de 8 jours (tiré de [13]). (A1-A3). Moyenne et erreur standard de la moyenne (SEM ; barres verticales) du taux d’hémoglobine (cercles rouges pleins) et du taux de réticulocytes par 10 g/L (cercles rouges vides) à J0, au J2 ± 1, J7 ± 2, J14 ± 3, J21 ± 3, et J28 ± 3 dans des sous-groupes de patients classés selon leur profil d’évolution comme (A1) « rising », (A2) « persistant », ou (A3) « PADH ». Au moins 2 échantillons ont été collectés avant et après le jour 8 chez chaque patient. (B1-B3) Moyenne et SEM des (losanges noirs pleins) LDH plasmatiques 10 UI/L et (carrés gris pleins) des taux d’haptoglobine (×15 g/L) dans les mêmes sous-groupes. Le taux d’hémoglobine a été normalisé par rapport au taux d’hémoglobine à J0. La baisse retardée du taux d’hémoglobine chez les patients atteints de PADH est indiquée par une flèche noire.

1.1.3.4.1. ÉPIDÉMIOLOGIE DE L’ANÉMIE PALUSTRE

Au cours de leur cycle érythrocytaire, *P. falciparum* et *P. vivax* induisent une anémie. Une étude menée en Thaïlande a montré que cette dernière touchait environ 97 % des patients durant leur accès palustre et 56 % présentaient toujours une anémie 1 mois après l’initiation du traitement pour paludisme sévère [3]. Quel que soit le niveau de transmission, le paludisme (toutes espèces confondues) contribue de manière importante à l’anémie maternelle pendant la grossesse, et ainsi parfois au retard de croissance intra-utérin [14]. L’anémie grave causée par l’infection à *Pf* est une cause directe de mortalité maternelle dans les milieux à faible niveau de transmission [15].

Dans les zones à forte transmission, la fièvre peut être causée par diverses infections. L'auto-traitement antipaludique est très répandu et favorise le portage parasitaire asymptomatique, qui augmente le risque d'anémie, avec un impact plus important chez les jeunes enfants, en particulier chez les nourrissons [16]. Les nourrissons et les jeunes enfants souffrent d'accès palustres répétés avec une prévalence élevée de parasitémie asymptomatique entre ces épisodes (de 5 % à 14 % environ selon les régions). Ils souffrent souvent d'anémie chronique avec splénomégalie. La mortalité augmente à la fois du fait du paludisme lui-même et, indirectement, du fait d'autres infections, en particulier à Salmonelles mineures, auxquelles le paludisme répété prédispose [17]. Dans ces zones fortement endémiques, la plupart des infections palustres sont asymptomatiques à l'âge adulte. En 2004, une étude de Korenromp et al. a montré que la prévalence de l'anémie modérée à sévère (moins de 8 g/dL) est une mesure de la réduction de l'exposition au paludisme plus sensible que la prévalence parasitaire [18]. C'est pourquoi l'OMS recommande l'utilisation de la mesure de l'anémie comme indicateur supplémentaire pour surveiller la charge du paludisme au niveau communautaire lorsque les interventions de lutte contre le paludisme (moustiquaires imprégnées, chimioprévention, pulvérisations intra-domiciliaires) sont étendues à l'échelle nationale.

1.1.3.4.2. LES FACTEURS DE RISQUES

L'anémie palustre est souvent associée au manque de structures sanitaires, à la prévalence élevée d'autres maladies infectieuses et aux carences nutritionnelles. Une étude au Malawi a montré que les infections bactériennes, l'infection par le VIH, l'ankylostomose et les carences en vitamines A et B12 étaient associées à l'anémie au cours du paludisme [19]. Certaines maladies héréditaires du GR comme la drépanocytose, très prévalente en Afrique subsaharienne, ou le déficit en G6PD, confèrent une protection partielle contre l'infection plasmodiale ou contre les signes cliniques du paludisme, mais peuvent aussi contribuer à l'anémie palustre grave [20], [21].

La résistance aux médicaments antipaludiques, qui favorise les recrudescences, augmente la prévalence et la gravité de l'anémie palustre. Le jeune âge du patient est également un facteur d'aggravation de l'anémie. En effet, dans les régions à forte transmission, des infections

antérieures répétées confèrent une certaine prémunition au patient, et les concentrations d'hémoglobine commencent généralement à augmenter immédiatement après le début d'un traitement antipaludique efficace. Les jeunes enfants n'ayant pas rencontré suffisamment le parasite et les personnes souffrant d'infections prolongées ne possèdent pas encore cette prémunition, et l'anémie qui en résulte est plus grave que chez les patients prémunis [12], [22]. Le jeune âge est en outre un facteur de risque direct d'anémie palustre grave, indépendamment du niveau de transmission [23], par des mécanismes encore inconnus.

1.1.3.4.3. PHYSIOPATHOLOGIE

1.1.3.4.3.1. GÉNÉRALITÉS

L'anémie palustre relève de multiples mécanismes, dont l'importance relative n'est pas clairement établie [24] (Figure 7). En effet, elle peut être liée à la clairance de différentes sous-populations érythrocytaires générées ou modifiées tant par l'infection que par le traitement de l'accès, ainsi qu'à un défaut de production de nouveaux GR.

Il convient aussi de prendre en compte l'état d'hydratation du patient au cours et au décours du traitement : la déshydratation due à la fièvre et aux troubles digestifs peut induire une hémococoncentration et donc induire une sous-estimation artéfactuelle de la profondeur de l'anémie. La réhydratation lors de la prise en charge induit à l'inverse une hémodilution qui peut induire une surestimation, aussi artéfactuelle, de la perte en GR [25]. L'hémodilution iatrogène initiale (par réhydratation) est suivie par une hémolyse progressive au cours des quelques jours suivants, et peut-être associée à une réponse médullaire inadaptée, ou au moins décalée dans le temps [26]. Le nadir d'hémoglobine est généralement atteint environ une semaine après l'admission. Le traitement par dérivés de l'artémisinine permet de limiter la perte d'hémoglobine initiale grâce au pitting des GRi pour générer des GR pittés, qui restent en circulation (voir chapitre sur les traitements contre le paludisme). Schématiquement, une anémie « vraie » peut résulter d'une perte excessive ou bien d'une production insuffisante de GR, ou de ces deux mécanismes opérant simultanément.

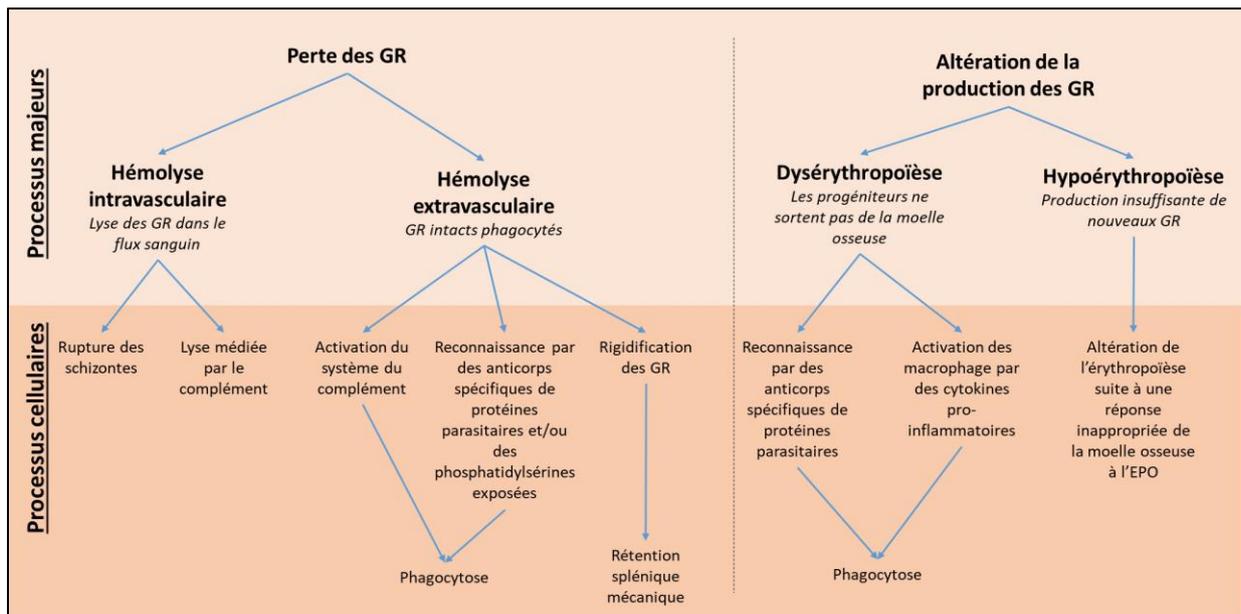


Figure 7 : Résumé des mécanismes avérés et potentiels d'anémie au cours de l'infection par *P. falciparum* (adapté de [24])

1.1.3.4.3.2. PERTE DE GR

L'ampleur de la perte des GR est globalement corrélée à la parasitémie à l'admission. Cependant, la destruction des GRi ne suffit à expliquer l'anémie palustre, et la perte de GRni est un contributeur majeur. Il a été estimé que la perte de GRi ne correspond qu'à 10 à 20 % de la perte totale de GR au cours de l'accès palustre [27]. Durant l'infection par *P. vivax*, environ 34 GRni seraient éliminés pour 1 GRi. Pour le paludisme à *P. falciparum*, environ 8 GRni seraient éliminés contre 1 GRi [12], [28]. Après traitement, plusieurs sous-populations de GR circulent : les GRi, les GR pitéés, et les GRni, mais ayant été potentiellement modifiés par l'infection et/ou le traitement. Il faut enfin compter dans cette liste les GR récemment issus de l'érythropoïèse à partir de la mise en route du traitement, qui n'appartiennent formellement à aucune des 3 populations définies précédemment. En outre, une étude menée chez 17 patients atteints de paludisme grave a montré que leurs GRni avaient une durée de vie réduite d'environ 50 % par rapport à des GR de sujets sains [29]. La destruction plus ou moins prématurée de ces différentes sous-populations de GR peut être intravasculaire ou extravasculaire.

Hémolyse

L'hémolyse correspond à la destruction des globules rouges, quel qu'en soit le mécanisme. L'hémolyse intravasculaire correspond à la rupture des GR dans la circulation sanguine, le secteur vasculaire étant défini par l'espace de circulation sanguine limité par un endothélium. Dans ce cas, l'hémoglobine contenue dans le GR est libérée dans le plasma. Le seul marqueur fiable d'hémolyse intravasculaire pure est un taux élevé d'hémoglobine libre circulante. Les autres marqueurs d'hémolyse, intra ou extravasculaire, sont un taux anormalement bas d'haptoglobines (alpha-globuline antioxydante permettant de limiter la toxicité du fer de l'hémoglobine) et d'hémopexine (glycoprotéine dont le rôle est de se lier aux molécules d'hèmes issues de la dégradation de l'hémoglobine) [22]. Les cellules phagocytaires telles que les monocytes et macrophages éliminent ensuite en quelques minutes le complexe haptoglobine-globine. L'augmentation du taux de lactates déshydrogénases (LDH) libérées dans le plasma suite à la destruction des GR est aussi un marqueur d'hémolyse. En pratique clinique, un taux élevé de réticulocytes est un indicateur indirect d'hémolyse, car il permet, si leur taux est adapté à la profondeur de l'anémie, d'éliminer la responsabilité d'un déficit de production médullaire de nouveaux GR.

Hémolyse intravasculaire (Mécanismes potentiels au cours du paludisme)

Pf étant un parasite intra-érythrocytaire, il y a une destruction obligatoire des GR contenant des parasites lors de la rupture du schizonte arrivé à maturité [30]. Des études menées chez les enfants kenyans atteints d'anémie grave suite à un paludisme à *Pf* ont montré une augmentation des IgG de surface, mais aussi une diminution des protéines régulatrices du complément associées à l'anémie palustre [31]. Oyong et al ont également montré en 2018 la diminution de la quantité de protéines régulatrices du complément CR1 et CD55 sur les GRni durant l'anémie. Cette perte était indépendante de l'âge du patient [32]. Cela suggère une activation de la voie classique du complément durant l'anémie palustre, pouvant mener à une lyse cellulaire suite à l'activation finale du complexe d'attaque membranaire. Cette dernière étude montre également que les GRi par *P. falciparum* ou *P. vivax* présentaient une expression plus forte des protéines CR1, CD55 et CD59, CR1 et CD55 étant des protéines aussi utilisées comme récepteurs d'invasion parasitaire. Pour ces auteurs, les molécules impliquées dans

l'invasion parasitaire protégeraient en parallèle les parasites des mécanismes de clairance de leur cellule hôte.

Hémolyse extravasculaire (Mécanismes potentiels au cours du paludisme)

L'hémolyse extravasculaire correspond à la phagocytose des GR intacts. Elle se déroule majoritairement, mais non exclusivement dans la rate et est opérée par des monocytes et macrophages. En 2010, Fendel et al ont mis en évidence la diminution de CR1 et CD55 à la surface des GR durant l'anémie palustre grave, chez des enfants au Gabon. Les auteurs ont proposé que l'activation du système du complément aboutisse à une érythrophagocytose par les monocytes/macrophages de la rate. Ils complétaient en cela des études antérieures montrant que l'augmentation de l'érythrophagocytose *ex vivo* est accompagnée d'indicateurs d'activation des phagocytes, comme la néoptérine et la taille de la rate [22]. Ces auteurs ont enfin observé une exposition augmentée de la phosphatidylsérine à la surface des GR, ce qui favoriserait leur phagocytose. Par ailleurs, des protéines parasitaires telles que RSP-2/RAP-2 sont adsorbées sur les GRni notamment lors d'invasion abortive [33], [34]. Ces protéines sont reconnues par le sérum de patients ayant développé une anémie durant l'infection [35]. La « décoration » des GR de patients par les protéines parasitaires peut contribuer à la destruction de GR, en induisant l'apparition d'anticorps opsonisants, par l'activation de la voie classique du complément ou par la phagocytose dépendante du complément.

La rétention mécanique des GR dans la rate peut aussi induire leur clairance. En effet, durant le paludisme grave, des mesures populationnelles montrent une baisse de déformabilité corrélée de manière significative avec la baisse du taux d'hémoglobine circulante [36], [37]. Il semblerait que ce soit à la fois les GR infectés par des rings, mais aussi les GRni qui présentent une déformabilité altérée, provoquant probablement une rétention mécanique dans la rate [38], [39]. Cela implique une congestion splénique et donc un risque accru d'anémie, ce qui expliquerait l'association forte entre splénomégalie et anémie palustre grave [40]. Enfin, l'hémozoïne libérée lors de la rupture des schizontes peut exercer une activité pro-oxydante et réduire la déformabilité des GR durant l'infection. Durant l'accès palustre aigu, l'activation des monocytes et des neutrophiles induit la production de superoxydes. Le peroxyde d'hydrogène ensuite formé génère des radicaux libres qui peuvent endommager la membrane érythrocytaire, et réduire la déformabilité du GR de manière dose dépendante *in vitro*.

Cependant, l'effet du peroxyde d'hydrogène n'était significatif sur la déformabilité du GR qu'à des concentrations très élevées, difficilement atteintes *in vivo* [41], [42].

1.1.3.4.3.3. ALTÉRATION DE LA PRODUCTION DES GR

Au cours de l'accès palustre aigu, le taux de réticulocytes est généralement faible [22]. Comme lors de toute anémie aiguë, la réponse réticulocytaire est décalée de plusieurs jours, ce qui ne signifie pas nécessairement que la moelle est dysfonctionnelle. La contribution d'un déficit de production de GR à l'anémie palustre est controversée [24], [43], bien que de nombreux mécanismes potentiels aient été identifiés, généralement dans des modèles *in vitro*. Cette contribution est forcément mineure au cours d'épisodes aigus durant moins de quelques jours [43], elle peut devenir prédominante au cours d'infections subaiguës, chroniques, ou récidivantes.

Mécanismes potentiels de dysérythropoïèse et d'hypoérythropoïèse au cours du paludisme.

Lors d'une insuffisance médullaire, les progéniteurs ne prolifèrent pas suffisamment. L'obstruction des sinusoides de la moelle osseuse par des GRi, ajoutée à la réponse inappropriée de la moelle osseuse à des niveaux appropriés d'érythropoïétine (notamment chez les enfants) contribuerait à l'altération de l'érythropoïèse [44], [45]. La production réticulocytaire devient alors insuffisante par rapport au niveau de la perte globulaire. Lors de l'infection aiguë, le taux de production globulaire se réadapte toutefois rapidement [46].

La dysérythropoïèse quant à elle, correspond à une capacité réduite des progéniteurs érythroïdes à sortir de la moelle osseuse. Chez les enfants atteints d'une infection chronique, on peut observer une cellularité de la moelle osseuse normale ou accrue, mais l'altération de l'utilisation/recyclage du fer [47] et la présence d'érythroblastes morphologiquement anormaux suggère que l'érythropoïèse est d'efficacité réduite [48], [49].

Elle peut être liée à la production intramédullaire de médiateurs suppresseurs de l'érythropoïèse, comme les cytokines pro-inflammatoires, l'oxyde nitrique et les lipoperoxydes. L'activation des macrophages par ces cytokines augmente la phagocytose des progéniteurs (y compris les érythroblastes) par les macrophages de la moelle [50], bien que

les niveaux de cytokines soient généralement plus faibles dans l'anémie palustre sévère que dans les crises cérébrales ou non compliquées [51], [52]. De plus, la dysérythroïèse et l'anémie sont associées au dépôt intramédullaire des produits parasitaires comme l'hémozoïne. L'hémozoïne phagocytée par les neutrophiles et les monocytes/macrophages peut être retrouvée dans la moelle osseuse. Elle est connue pour induire ou supprimer la production de cytokines pro-inflammatoires en fonction des circonstances expérimentales. Par ailleurs, Lavez et al en 2005 ont montré la phagocytose *in vitro* d'érythroblastes opsonisés par les protéines RAP-2/RSP2 [34], ce qui pourrait contribuer à la dysérythroïèse au cours de l'accès palustre.

1.1.3.5. Traitements antipaludiques [26]

Les traitements antipaludiques agissent principalement au niveau du développement intra-érythrocytaire de *Plasmodium*. Ils se distinguent par leur mode d'action et peuvent être divisés en 4 groupes (Tableau 2).

Classe de traitement	Sous-catégories/noms communs	Cible chez le parasite
Antibiotiques	Cyclines Macrolides Rifampicine	Synthèse protéique Synthèse protéique Synthèse des acides nucléiques
Anti-métabolites	Antifoliques Antifoliniques	ADN parasitaire
La quinine et ses dérivés	Chloroquine Primaquine ...	Vacuole digestive Voie métabolique
Les dérivés de l'artémisinine	Artesunate Dihydroartémisinine Artemether Arteether Artemosone	Vacuole digestive et cibles multiples

Tableau 2 : Les différents types de traitements antipaludiques

1.1.3.5.1. LES ANTIBIOTIQUES [53]

Les cyclines et les macrolides agissent sur les synthèses protéiques, tandis que la ciprofloxacine (aujourd'hui disqualifiée) et la rifampicine, sont capables d'agir sur la synthèse ou la modification des acides nucléiques du parasite. Leur d'action antiparasitaire est généralement lente et peu puissante d'où leur utilisation uniquement en prophylaxie ou (désormais rarement) en association.

1.1.3.5.2. LES ANTI-METABOLITES

Divisés en deux sous-catégories, les antifoliques et les antifoliniques, les antimétabolites sont des inhibiteurs de la synthèse d'ADN. Les antifoliques, comme la sulfadoxine et la dapsonne, bloquent la synthèse de l'acide folique, nécessaire aux opérations de synthèse, de réparation et de méthylation de l'ADN parasitaire, à travers l'inhibition de la dihydroptéroate réductase. Dans la deuxième catégorie se trouvent le Proguanil, le Chlorproguanil et la Pyriméthamine. Ils inhibent l'activité de la Dihydrofolate réductase qui permet la synthèse des nucléotides.

Leur action est cependant lente et comporte un risque faible de toxicité hématologique, telle que des leuconéutropénies et anémies, ou cutané (toxidermie). Ils sont utilisés en association pour le traitement intermittent préventif de sous-populations (femmes enceintes).

1.1.3.5.3. LA QUININE ET SES DÉRIVÉS

La quinine a été la première molécule utilisée en France dans le cadre du traitement du paludisme grave, suite à son introduction en Europe dans les années 1630. Extraite de l'écorce du quinquina, cette molécule agit en inhibant l'action de l'hème-polymérase permettant donc l'accumulation d'hémine, un produit de dégradation cytotoxique de l'hémoglobine dans la vacuole parasitophore, tuant ainsi les parasites circulants âgés de 12 h à 42 h. Malgré son efficacité, la quinine a pu montrer plusieurs inconvénients. Son administration par voie intraveineuse nécessite une perfusion contraignante à débit constant trois fois par jour. L'administration intramusculaire est douloureuse et peut causer des abcès [54]. Les principaux effets secondaires de la quinine sont parfois graves. L'hypoglycémie hyper insulinémique induite par la quinine peut poser un réel problème dans la prise en charge des femmes enceintes [55]. On peut également noter que la clairance parasitaire suite au traitement par

la quinine est relativement lente, ce qui peut jouer sur le pronostic du patient. Étant donné son effet sur les jeunes parasites en maturation, et donc la cytoadhérence, son efficacité est limitée [56]. On a également observé en Asie du Sud-Est une émergence de souches résistantes à la quinine [57].

1.1.3.5.4. LES DÉRIVÉS DE L'ARTEMISININE

Pour traiter le paludisme grave, l'OMS préconise l'utilisation de l'artésunate (intraveineux ou intramusculaire) à 2,4 mg/kg immédiatement, puis à 12 h, 24 h et quotidiennement jusqu'à la prise de médicaments oraux. Pour les enfants de moins de 20 kg, la dose parentérale d'artésunate est de 3 mg/kg. Des éléments plus précis sont fournis au chapitre « Traitement du paludisme grave par les dérivés de l'artémisinine ».

1.1.3.5.4.1. HISTORIQUE

En 1971, de manière simultanée avec l'observation de l'émergence de souches résistantes à la quinine, des médecins chinois ont montré les propriétés antipaludiques de l'artémisinine (qinghaosu en chinois), une molécule extraite de *Artemisia annua*, initialement utilisée en médecine traditionnelle chinoise. Cette découverte a valu le prix Nobel de physiologie et médecine au Pr Youyou en 2015.

Entre 2005 et 2010, de grandes études cliniques sont réalisées en zone d'endémie : en Asie du Sud-Est pour SEAQUAMAT (South East Asian QUinine Artesunate MAlaria Trial [58]) et en Afrique subsaharienne pour l'étude AQUAMAT (Artesunate QUinine Artesunate Malaria Treatment [59]). Ces études avaient pour but de comparer les effets de l'artésunate injectable avec la quinine injectable. Ces essais ont apporté deux informations : le taux de mortalité est plus faible sous artésunate que sous quinine, et l'artésunate est mieux toléré que la quinine. Il s'agit des plus grands essais cliniques menés dans le cadre du paludisme à *Pf* [58], [59]. Leurs résultats ont joué un rôle essentiel dans la validation de la recommandation d'utilisation de l'artésunate dans le traitement du paludisme grave.

1.1.3.5.4.2. *MODE D'ACTION*

Contrairement à la quinine qui n'agit que sur les parasites circulants âgés de 12 h à 42 h, les dérivés de l'artémisinine tuent presque tous les stades asexués du parasite [60]. Ils ont aussi un effet sur les gamétocytes immatures [61]. La mort des jeunes parasites circulants entraîne une réduction plus rapide de la parasitémie par rapport aux autres antipaludiques et réduit considérablement le nombre de parasites qui arrivent à maturité pour cythoadhérer à l'endothélium vasculaire. L'action sur les gamétocytes permet également de diminuer le potentiel de transmission.

Il existe plusieurs dérivés de l'artémisinine (arténimol, artéméther, artésunate, artéether) qui ont tous pour structure commune un sesquiterpène avec un pont endopéroxyde, essentiel à l'activité de la molécule (Figure 8). Ce pont endopéroxyde interagit avec le fer organique Fe²⁺, il est ensuite clivé et libère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [62], [63]. Ces dernières possèdent des propriétés toxiques directes sur le parasite en développement et sur sa vacuole nutritive en inhibant l'activité des pompes calcium ATPases parasitaires, aboutissant à la mort du parasite [64]–[66].

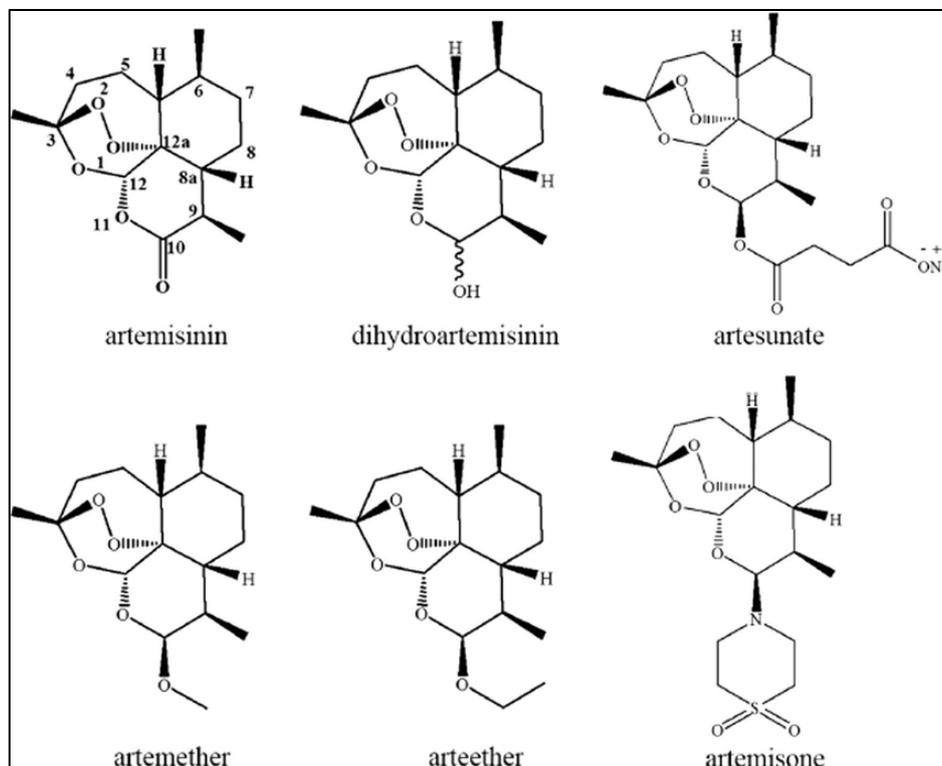


Figure 8 : Structure moléculaire de l'artémisinine et de ses principaux dérivés [67]

En plus d'agir sur presque tous les stades intra-érythrocytaires, les dérivés d'artémisinine sont les antipaludiques les plus puissants, éliminant environ 10 000 parasites par cycle, ne prenant ainsi que 3 à 4 cycles (soit 6 à 8 jours) pour éliminer tous les parasites du sang [68].

1.1.3.5.4.3. *LES COMBINAISONS THÉRAPEUTIQUES À BASE D'ARTEMISININE (CTAS)*

L'utilisation d'artémisinine en monothérapie nécessite un traitement de 7 jours environ pour maximiser le taux de guérison. La prise par voie orale de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTAs) permet d'effectuer un traitement complet en seulement 3 jours. Les CTAs se composent d'une molécule à action rapide, mais à demi-vie courte (l'artémisinine) et d'une molécule partenaire à action lente, mais à demi-vie plus longue. Les associations les plus courantes sont artésunate-amodiaquine, artésunate-méfloquine, la dihydroartémisinine-pipéraquline et artésunate-luméfántrine. L'artémisinine réduit la probabilité qu'un mutant résistant au médicament partenaire puisse survenir lors de l'infection primaire, et le médicament partenaire devrait tuer le parasite potentiellement résistant à l'artémisinine.

Les CTAs sont désormais recommandées par l'OMS comme traitement de première intention pour tous les accès palustres à *Pf* dans les pays endémiques [69]. Dans les milieux à faible transmission, où les infections symptomatiques constituent une source importante de transmission, les CTAs réduisent le portage des gamétocytes et ainsi l'incidence du paludisme à *Pf* [70].

1.1.3.5.4.4. *MISE EN PLACE EN FRANCE*

En France, l'artésunate IV avait été recommandé par un groupe d'experts nationaux en 2007 [71], mais la distribution de ce médicament n'a pas été autorisée immédiatement. La quinine IV était alors encore la seule option effectivement disponible pour le traitement du paludisme grave. En 2009, un panel indépendant d'experts universitaires coordonné par P. Buffet a interpellé l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM, AFSSAPS à l'époque) et, en mai 2011, l'artésunate IV (ACE Pharmaceuticals BV, Pays-Bas) est devenu disponible dans le cadre d'un programme d'autorisation temporaire d'utilisation (ATU) pour le paludisme grave d'importation. Suite à cela, la distribution

spécifique de l'artésunate dans le cadre du traitement d'urgence du paludisme grave a été mise en place dans les pharmacies hospitalières de toute la France. L'ANSM a validé l'utilisation de l'artésunate grâce à un programme spécifiant que les cliniciens, les biologistes et les pharmaciens impliqués dans l'utilisation de l'artésunate fournissent des données sur l'efficacité et l'innocuité du traitement au début, à la fin et après le suivi. Cela a permis au programme français de superviser précisément la mise en œuvre de ce nouveau traitement avec un groupe de travail animé par mon équipe d'accueil, chargé de piloter la surveillance de l'utilisation, la tolérance et l'efficacité de l'artésunate en France. Mon équipe d'accueil a colligé et synthétisé les informations sur les 1391 premiers patients atteints de paludisme sévère d'importation traités par Artésunate IV en France de 2011 à 2017. L'efficacité a été conforme à celle observée dans les grandes études prospectives et aux études de plus petite taille dans le contexte du paludisme d'importation, avec un taux de mortalité de 4 %. Les principaux effets indésirables rapportés sont l'anémie, les troubles cardiaques et l'augmentation du taux d'enzymes hépatiques. L'incidence de l'anémie hémolytique post artésunate étudié dans une sous-cohorte a été plus élevée chez les patients d'origine européenne que chez les patients d'origine africaine. Cette étude montre que l'artésunate rapidement déployé en France apporte un bénéfice clinique robuste malgré la fréquence élevée d'anémie retardée, évoquée en détail au paragraphe « Hémolyse Retardée Post-Artésunate » [72]).

1.1.3.5.4.5. LA RÉSISTANCE PARASITAIRE AUX DÉRIVÉS DE L'ARTEMISININE

L'émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine a été observée pour la première fois en 2008 au Cambodge, et s'est étendue à travers l'Asie du Sud-Est [73], [74]. Elle se manifeste par un retard de clairance des formes asexuées circulantes après monothérapie ou ACT [1], et est mise en évidence par prélèvements répétés sur 72 heures dans des études spécifiques, ou par le taux de frottis sanguins positifs 3 jours après l'initiation du traitement >3 % en surveillance passive. Dans le cas des parasites résistants, on observe une demi-vie de clairance parasitaire augmentée, et parfois une recrudescence plusieurs jours après le traitement [75], [76]. In vitro, la résistance aux artémisinines est démontrée par le « Ring stage Survival Assay » (RSA) qui mesure le délai de réapparition en culture de parasites, soit de

parasites de culture obtenus 0 à 3 h post invasion, soit de parasites fraîchement collectés de patients, exposés 6 h à 700 nM de dihydroartémisinine [77], [78].

La principale cause de cette recrudescence serait la dormance induite en réponse au stress : lorsque la concentration de l'artémisinine circulant dans le sang diminue, une petite proportion de parasites quiescents va reprendre le cycle développement [79]. Des études dans cette région ont permis l'identification de mutations du gène *Pfkelch13* comme marqueur de résistance [78]. Le rôle exact des mutations du gène *kelch13* n'est pas encore parfaitement établi. Cependant, certaines études suggèrent que ces mutations engendrent une endocytose réduite de l'hémoglobine du GR hôte, provoquant une diminution de la libération du Fe²⁺-hème, nécessaire à l'activation de l'artémisinine [80], [81]. Ces mutations ont été également associées à une accélération des voies des UPR (unfolded protein response) [82], à une amélioration de la capacité du parasite à gérer les dommages oxydatifs [83] ainsi qu'à une augmentation des niveaux de la protéine elf2α phosphorylée [84] (conduisant à une répression de la traduction) et du phosphatidylinositol-3-phosphate [85].

La prévalence d'un des variants de souches mutées *kelch13* au Rwanda inquiète la communauté scientifique concernant le risque de co-émergence de parasites résistants à l'artémisinine en Afrique subsaharienne [86], [87]. Le polymorphisme d'autres gènes de *Pf* tels que celui de la ferrédoxine ou bien celui de la multidrug resistance 2 (*pfmdr2*) seraient également impliqués dans la résistance aux artémisinines [87]. Des études récentes de notre équipe démontrent le rôle central de la déformabilité dans la résistance aux artémisinines (Depond et al. ASTMH 2020, non publié encore).

1.1.3.5.4.6. CLAIRANCE PARASITAIRE SOUS DÉRIVÉS DE L'ARTEMISININE - PITTING

Après traitement par les dérivés d'artémisinine, les GR ayant été déparasités retournent en circulation. Ce phénomène d'élimination du parasite préservant l'intégrité du GR, n'est pas observé chez les patients splénectomisés ni *in vitro* [88]. Les stades jeunes exposés à l'artémisinine sont morphologiquement similaires aux corps d'Howell-Jolly. *Pf* étant également un corps anormal dans le GR, est exposé au même phénomène de pitting dans la rate, comme présenté au 1.3 (Figure 9).

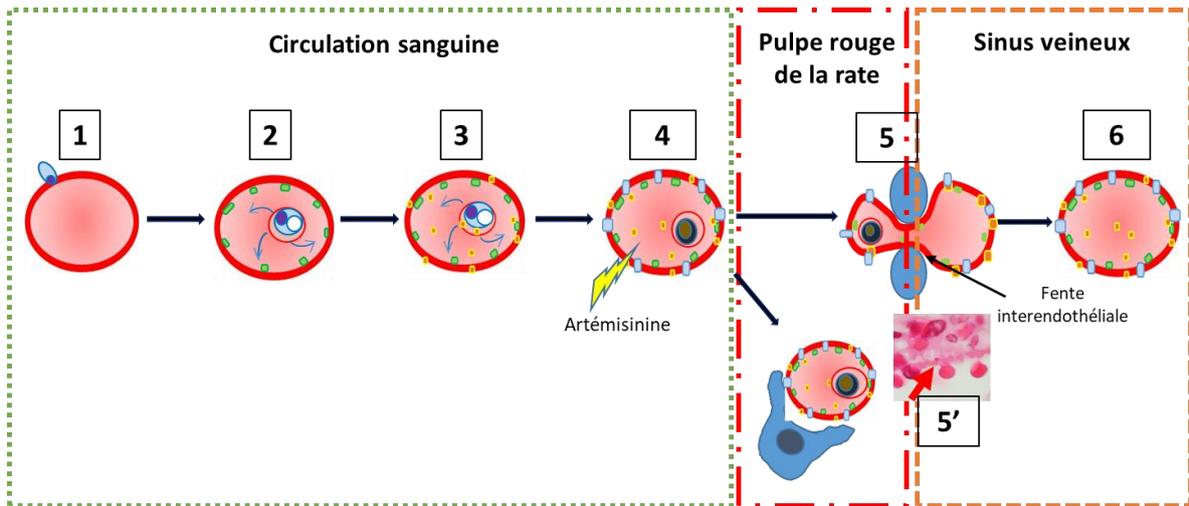


Figure 9 : Mécanisme du pitting dans le contexte du traitement du paludisme. 1 : Invasion du GR sain par un mérozoïte. 2 : Maturation du parasite avec expression de protéines parasitaires dont RESA (en vert). 3 : Synthèse et transport de la protéine parasitaire HRP2 (en jaune). 4 : Les dérivés de l'artémisinine tuent le parasite notamment les stades jeunes et circulants. 5 : Dans la pulpe rouge de la rate, le GR contenant le parasite mort subit un processus de pitting lors du passage des fentes inter-endothéliales. 5' : Analyse histologique d'une coupe de rate humaine isolée perfusée par des GR infectés par des parasites Pf de culture et traités par Artésunate. La flèche rouge indique le pitting d'un GR parasité. 6 : le GR pité retourne en circulation.

Après pitting, des protéines parasitaires comme RESA (Ring Erythrocyte Surface Antigen) perdurent au sein des GR pités, même après élimination du parasite [88], [89]. Les protéines RESA et HRP2 (Histidin Rich Protein2) sont détectables par cytométrie en flux, immunofluorescence [10], [90] ou bien par immunochromatographie basée sur la détection de la protéine HRP2 (Figure 10).

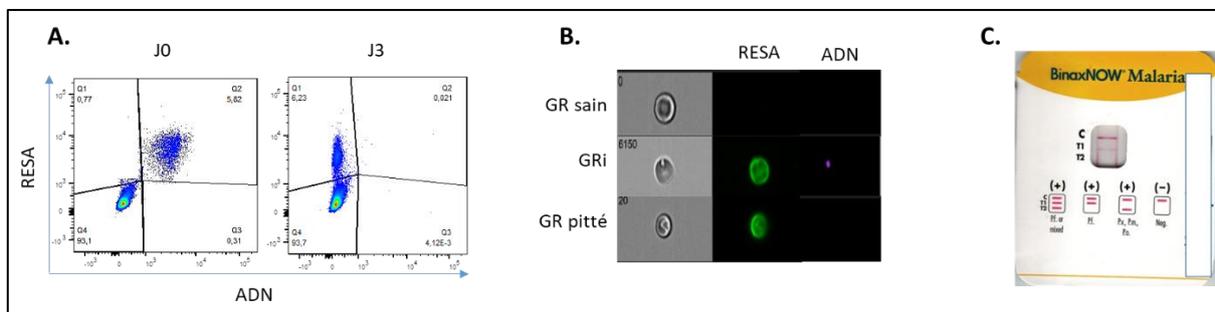


Figure 10 : Détection des GRi RESA+ ADN+ et pités RESA+ ADN - en cytométrie en flux (A) en immunofluorescence (B) et par immunochromatographie (3 jours après le traitement par Artesunate (C), dans des échantillons de patients avant (J0) et après traitement (J3).

Nous pouvons observer ce phénomène dans des proportions moindres chez le sujet non traité et chez le sujet traité à la quinine (Figure 11), tandis que le taux de GRi devenus « GR pittés » (pittémie) dans les 3-7 jours suivant le traitement à l'artémisinine est en général supérieur à 60 % chez les patients atteints de paludisme grave traités par artésunate (contre moins de 30 % chez les patients traités par quinine) [90].

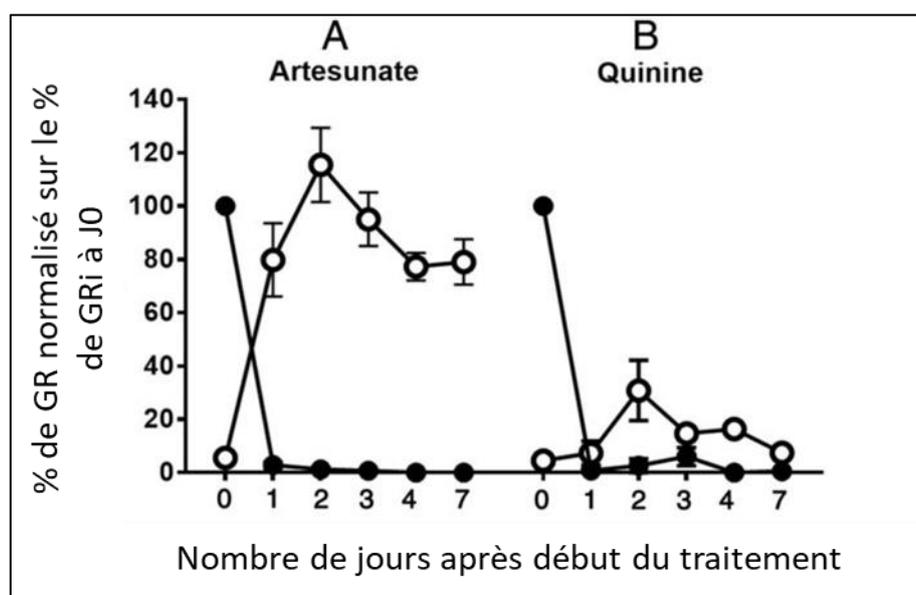


Figure 11 : Cinétique de clairance des GRi (cercles pleins) et relargage des GR pittés (cercles vides) chez les voyageurs français en fonction du traitement (extrait de [90]).

La compensation de la clairance des GRi par le relargage des GR pittés dans la circulation réduit la profondeur de l'anémie immédiate après traitement. Cependant, les GR pittés ont une demie vie plus courte que les GR de sujets sains [89], [91], [92].

1.1.3.5.4.7. L'ANÉMIE HÉMOLYTIQUE POST TRAITEMENT OU POST ARTEMISININS DELAYED HEMOLYSIS

Premières observations et incidence

En 2001 puis en 2011 a été décrit un syndrome hémolytique survenant quelques jours à quelques semaines après traitement du paludisme grave par artésunate [93]. Cet effet

secondaire appelé PADH, pour Post Artesunate Delayed Hemolysis, survient en général un peu plus d'une semaine après l'initiation du traitement. Le premier cas de PADH dans le monde a été rapporté en 2002 [94] et en Europe par Zoller et al. en 2011 [95], dans une étude où 6 patients sur 25 inclus dans une cohorte de paludisme grave, avait développé une PADH à environ 15 jours après l'initiation du traitement. Selon les études, la PADH peut toucher jusqu'à 27 % des patients atteints de paludisme grave [13], [96]–[100].

Les travaux de mon équipe d'accueil [13] ont apporté la première définition critérisée de cette anémie, définie chez les adultes par la variation d'au moins 10 % des marqueurs d'anémie, comme l'augmentation des LDH et la baisse de l'hémoglobine, survenant au moins 7 jours après le début du traitement (Figure 12). Cette définition fait encore consensus aujourd'hui. Les mécanismes de la PADH ne sont pas encore totalement élucidés. Cependant, il a été montré que la PADH était liée au pitting, car seuls les patients ayant produit de nombreux GR pittés juste après traitement développent ensuite une PADH. La PADH survient en même temps que l'élimination des GR pittés [13] (Figure 12).

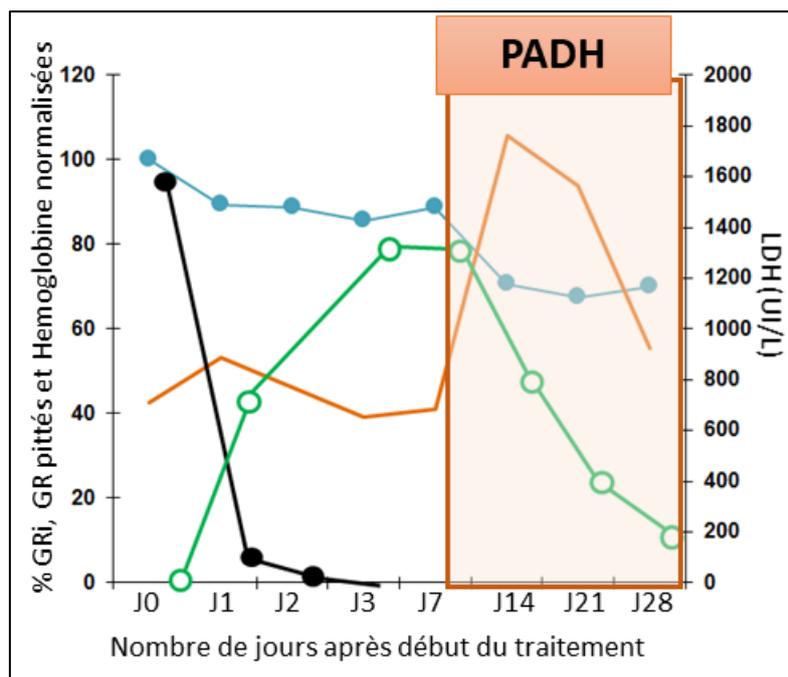


Figure 12 : Principales caractéristiques d'un cas typique de PADH. Après traitement, la clairance des GRi (en noir) est compensée par la remise en circulation des GR pittés (en vert). Quelques jours après le début du traitement, la destruction des GR pittés est accompagnée par une augmentation des LDH (en orange) ou bien d'une baisse de l'hémoglobine (en bleu) d'au moins 10 %.

La PADH a parfois un impact clinique marqué, comme le déclenchement d'une insuffisance rénale aiguë ou d'une anémie grave [92], [101], d'où l'importance de la prédire pour mieux préparer sa prise en charge.

La prédiction

La PADH est liée à la destruction des GR pîtés. Chez les voyageurs traités par dérivés de l'artémisinine, la PADH est corrélée avec la concentration maximale en GR pîtés (en général autour de 3 jours après l'initiation du traitement). Grâce à la détection de protéines parasitaires subsistant dans le GR même après le pitting, comme RESA et HRP2, en cytométrie en flux, la PADH peut être prédite lorsque l'on atteint un seuil de 0,18 G/L de GR pîtés dans le sang [13]. La prédiction par quantification des GR pîtés en cytométrie en flux est faisable dans les hôpitaux bien équipés, mais moins en zone d'endémie. C'est pourquoi l'équipe d'accueil a développé un test prédictif de la PADH en utilisant le test de diagnostic rapide BinaxNow Malaria. C'est un test semi-quantitatif de la protéine HRP2, en diluant le sang total du patient prélevé à J3 post-traitement au 1/500, puis en suivant les recommandations du fournisseur pour la détection de *Pf*. Cette méthode est fiable avec une sensibilité de 89 % et une spécificité de 73 % [10] (Figure 13).

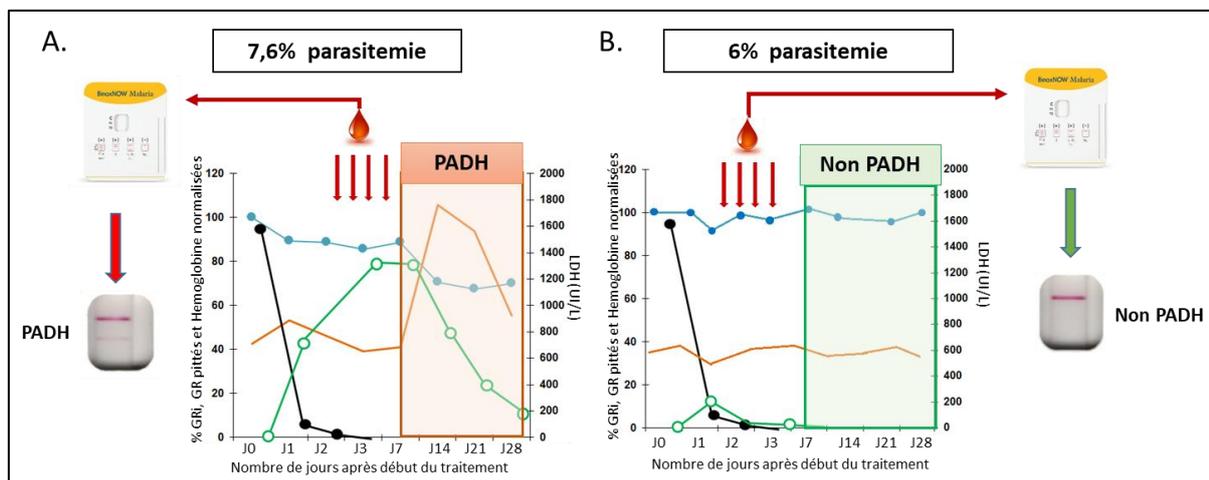


Figure 13 : Prédiction de la PADH chez deux patients atteints de paludisme grave avec hyperparasitémie. (A) Le premier patient a développé une PADH qui a pu être prédite grâce à leur détection sur BinaxNow des GR pîtés à J3 post-traitement. (B) Le test prédictif du deuxième patient était négatif : peu de GR pîtés ont été produits et n'ont pas atteint le seuil de détection du test.

1.2. Le Globule Rouge

1.2.1. Physiologie

Les GR, aussi appelés érythrocytes ou hématies, composent environ 45 % du sang d'un adulte sain (40 à 52 % chez l'homme, 37 à 46 % chez la femme). Ce sont des cellules biconcaves (discocytes) d'environ 2 μm d'épaisseur, de 7 μm de diamètre et sont composés à 95 % d'hémoglobine. Ils sont considérés comme des cellules, mais ne possèdent pas de noyaux, d'ADN ou d'organelles. Cette particularité les empêche de se diviser, de s'autorenouveler, ou bien de synthétiser des protéines de manière indépendante comme n'importe quelle autre cellule.

1.2.2. Érythropoïèse

Chez un être humain adulte en bonne santé, l'érythropoïèse permet la production de 2 millions de GR par seconde. Dans la moelle osseuse chez l'adulte, la cellule souche hématopoïétique multipotente se multiplie et se différencie, en plusieurs étapes, en érythrocyte mature [102]. Dans un premier temps, la cellule souche se différencie en progéniteur mégakaryocytaire-érythroïde, qui se différencie à son tour en burst-forming-unit erythroid (BFU-E) qui est la première cellule progénitrice consacrée uniquement à la lignée érythroïde [103]. La deuxième phase de maturation érythroïde consiste en plusieurs mitoses et en différenciation progressive des précurseurs nucléés en érythroblastes. Cette phase est caractérisée par une accumulation graduelle de l'hémoglobine, une diminution progressive de la taille des cellules et la condensation nucléaire aboutissant à l'énucléation lors de la dernière mitose [104]. La dernière phase de l'érythropoïèse correspond à la maturation du réticulocyte en érythrocyte, qui va alors adopter sa forme biconcave (Figure 14).

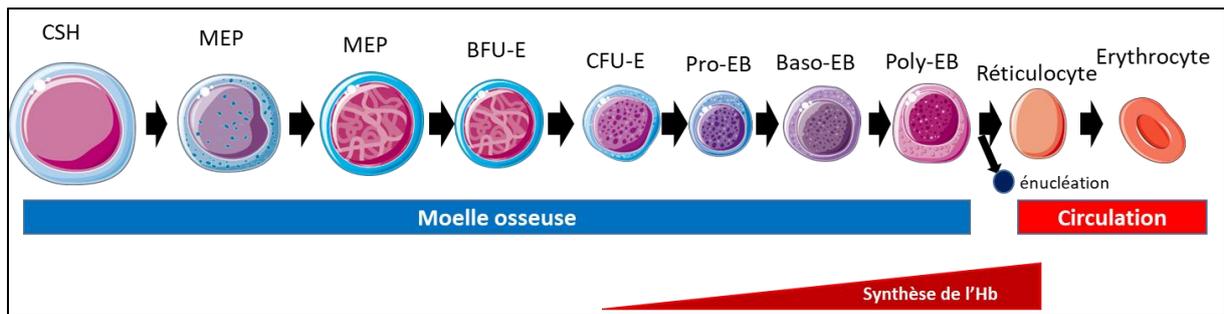


Figure 14 : Schéma de l'érythropoïèse chez l'adulte. CSH : Cellule Souche Hématopoïétique ; MEP: Progéniteur Mégakaryocytaire-Erythroïde ; BFU-E : Burst-Forming-Unit Erythroid ; CFU-E : Colony-Forming-Unit Erythroid ; EB : Erythroblast ; Baso : Basophile ; Poly : Polychromatique ; Ortho : Orthochromatique ; Hb : Hémoglobine.

1.2.3. Structure et fonction

1.2.3.1. **Morphologies**

Comme indiqué précédemment, un GR sain a une forme de disque biconcave, appelé discocyte (Figure 15). Grâce à leur grande déformabilité, les GR sont capables de se déformer en une configuration plus adaptée pour circuler dans les microvaisseaux et les capillaires, parfois plus étroits que leur propre diamètre.

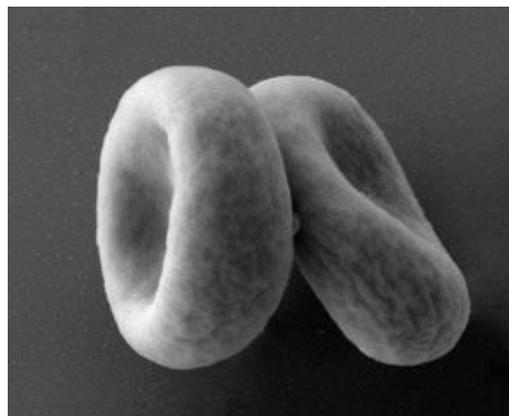


Figure 15 : GR discocytaires de sujet sain en microscopie électronique à balayage. © Institut Pasteur/Stéphanie Guadagnini, Plate-forme de microscopie ultrastructurale

La morphologie du GR est très sensible à l'environnement dans lequel il se trouve. En effet, le changement de pH, d'osmolarité, la viscosité du milieu et l'exposition à des agents chimiques

ont un impact sur la morphologie du GR. De même, les pathologies érythrocytaires modifient parfois la forme du GR, surtout certaines maladies extra-érythrocytaires (diabète, maladie cardio-vasculaires) et leurs traitements [105], [106]. *In vitro*, sont observées des altérations morphologiques des GR, en particulier durant le stockage des GR en poches [107]–[109]. Ces modifications peuvent être irréversibles. L'étude de la morphologie des GR peut ainsi orienter un diagnostic, évaluer la qualité d'une procédure de stockage de GR ou renseigner sur la fonctionnalité de la cellule.

Plusieurs types d'anomalies morphologiques peuvent être observées [110], [111]

(Figure 16) :

- 1) Les anomalies de tailles : la microcytose caractérisée par une taille inférieure à la normale (dans le cadre des anémies ferriprives et des thalassémies) et la macrocytose avec des GR plus grands (lors des dysérythropoïèses).

- 2) Les anomalies de forme :
 - L'échinocyte, avec une forme ronde hérissée de spicules fins et répartis de façon homogène ;
 - L'acanthocyte avec également des spicules, mais de tailles et répartition non homogènes ;
 - Le schizocyte dont au moins deux extrémités sont pointues ;
 - Le stomatocyte, le GR à la forme uniconcave ;
 - L'élliptocyte est de forme allongée, ovale ;
 - Le drépanocyte, ou hématie falciforme, avec une forme de faucille ;
 - Le microsphérocyte, petit GR sphérique ;
 - Le codocyte en forme de cible ;
 - Le dacryocyte, avec une forme de larme ;
 - L'annulocyte, avec un centre clair anormalement grand par rapport à la taille de la cellule.

- 3) Les anomalies de coloration : l'hypochromie et l'hyperchromie se différencient par l'intensité de la coloration de la cellule, l'anisochromie et la polychromatophilie concernent les variations de colorations des GR sur un même frottis.

4) Les inclusions :

- Les corps de Heinz sont constitués globine dénaturée ;
- Les corps d'Howell Jolly sont des restes d'acides nucléiques ;
- Les corps de Pappenheimer représentent du matériel ferrique ;
- Les anneaux de Cabot sont des restes de filaments mitotiques ;
- Les ponctuations basophiles représentent de l'ARN non dégradé par la Pyrimidine 5'nucléotidase ;
- Les parasites comme le paludisme.

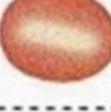
Tailles	Colorations	Formes		Inclusion
Normal 	Hypochromia 1+ 	Codocyte 	Acanthocyte 	Corps de Pappenheimer 
Microcyte 	2+ 	Sphérocyte 	Schizocyte 	Anneaux de Cabot 
Macrocyte 	3+ 	Ovalocyte 	Schizocyte 	Ponctuations basophiles 
Oval macrocyte 	4+ 	Stomatocyte 	Dacryocyte 	Corps d'Howell Jolly 
Hypochromic macrocyte 	Polychromasia 	Drépanocyte 	Echinocyte 	

Figure 16 : Résumé des différentes morphologies du GR. (tiré de askhematologist.com/miscellaneous-red-cell-abnormalities)

1.2.3.2. Structure externe du GR : la membrane plasmique

Le GR a pour caractéristique majeure sa grande capacité à se déformer de façon réversible, ce qui lui permet de circuler tout en maintenant son intégrité. La structure de la membrane plasmique est essentielle pour conserver cette propriété. Celle-ci est constituée d'une bicouche lipidique fluide contenant environ 20 protéines majeures et 850 protéines mineures [112]. La membrane plasmique est attachée à un cytosquelette intracellulaire grâce à des interactions protéine-protéine et lipide-protéine, lui conférant une forme, stabilité et déformabilité propres [113], [114].

1.2.3.2.1. LES LIPIDES MEMBRANAIRES

La membrane plasmique du GR sain est composée de cholestérol et de phospholipides, répartis de façon asymétrique au niveau des feuillet interne et externe. Les phospholipides principaux sont la Phosphatidylcholine, la Phosphatidylsérine, la Phosphatidyléthanolamine, le Phosphatidylinositol et la Sphingomyéline (constituée de céramide et de choline). Les phospholipides sont disposés de façon asymétrique, avec majoritairement la Sphingomyéline et la Phosphatidylcholine au niveau du feuillet externe, la Phosphatidylsérine et la Phosphatidyléthanolamine se situent eux plutôt au niveau du feuillet interne (Figure 17).

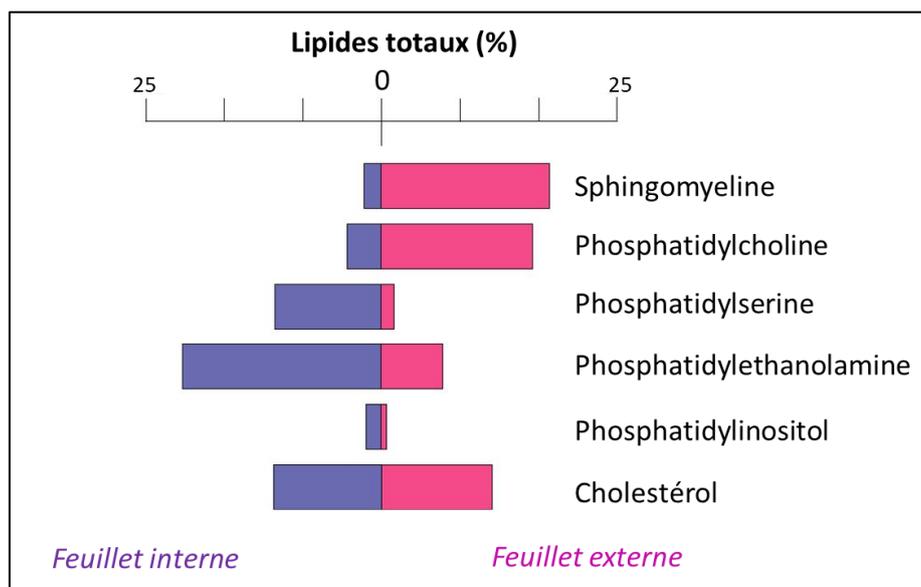


Figure 17 : Distribution des lipides dans la membrane du GR (d'après [115])

Cette asymétrie est régulée par l'action des flippases qui déplacent les phospholipides de la membrane externe vers la membrane interne, les floppases agissent inversement, tandis que les scramblases déplacent les phospholipides de façon bidirectionnelle [116]. Le maintien de cette asymétrie est essentiel pour le maintien du GR en circulation. En outre, l'exposition des Phosphatidylsérines à la surface des GR les rendent reconnaissables par les macrophages qui détectent en cela un signal de phagocytose [117]. Il a également été montré qu'une altération du ratio cholestérol/phospholipide induisait des modifications des caractéristiques biomécaniques du GR (baisse de la fluidité membranaire, rigidification) [118], [119]. Enfin, le GR n'est pas capable de synthétiser de nouveaux lipides, la composition lipidique de sa membrane plasmique est déterminée par les échanges avec les lipides circulants ou bien par dégradation enzymatique [120].

1.2.3.2.2. LES PROTÉINES MEMBRANAIRES (FIGURE 18)

De nombreuses protéines transmembranaires du GR sont aussi des antigènes de groupes sanguins [121]. Le cytosquelette est relié à la membrane plasmique grâce à des sites d'ancrages impliquant des interactions directes entre l'ankyrine et le complexe Rh/RhAG, la glycophorine C et la B-4.1, et enfin la bande 3 et l'ankyrine. Parmi elles la Bande 3, un transporteur d'anions, est la protéine la plus abondante. Des pompes et canaux ioniques ATP dépendants, tels que Piezo, KCNN4 et ABCB6 permettent aux cations d'entrer dans la cellule, pour l'homéostasie Na^+/K^+ entre le milieu intra et extracellulaire [122]. La protéine GLUT1 est un transporteur de glucose et d'acide L-dehydroascorbic et RhAG est un transporteur d'ammonium. Les protéines Ankyrin et B-4.1 sont également ancrées au cytosquelette afin de maintenir la structure de la membrane [123], [124]. Enfin, d'autres protéines permettent d'inhiber les voies de la lyse par le complément, il s'agit du CD55, du CD35 (ou CR1) et du CD59.

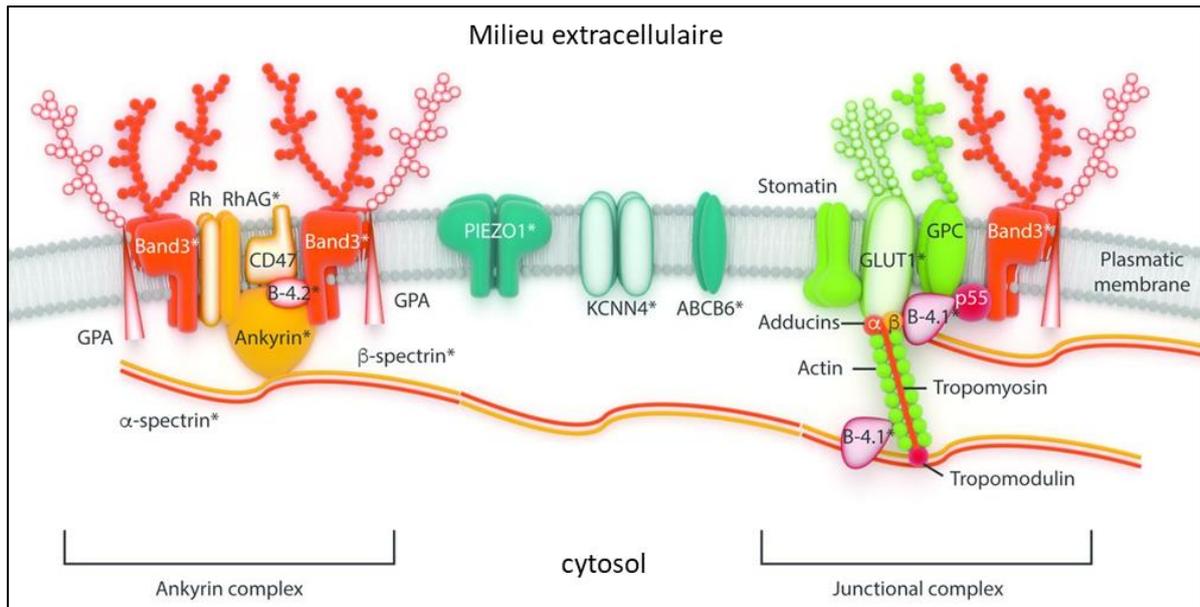


Figure 18 : Schéma de la membrane érythrocytaire. (Tiré de [125]). B-4.1 : protéin band 4.1, B-4.2: protéin band 4.2, GPA: Glycophorin A, GPC : Glycophorin C, Rh : Rhesus polypeptide.

1.2.3.3. Structure interne du GR

1.2.3.3.1. LE CYTOSQUELETTE (FIGURE 18)

Les principaux composants du cytosquelette du GR sont l' α et la β spectrine, l'actine, la protéine 4.1R, l'adductine, la dématine, la tropomyosine et la tropomoduline [113], [126]. Le tétramère de spectrine représente le composant majoritaire de ce réseau squelettique en 2 dimensions. Sa dissociation peut être induite par des déformations de la membrane [127]. L'interaction entre l'actine et la β spectrine est renforcée par la protéine 4.1R [128]. L'interaction entre les dimères de spectrine et le complexe jonctionnel spectrine-actine-protéine 4.1R sont des régulateurs essentiels de la stabilité de la membrane plasmique, notamment dans le contrôle de la déformabilité lors des différents stress mécaniques que la cellule peut rencontrer en circulation [114].

1.2.3.3.2. L'HÉMOGLOBINE

Représentant 95 % du poids total du GR, l'hémoglobine est le composant fonctionnel majeur du GR. C'est une protéine spécialisée qui contient un site de liaison pour le transport des gaz

respiratoires dans le sang, notamment l'oxygène vers les tissus périphériques et le dioxyde de carbone vers les poumons. L'hémoglobine est un hétérotétramère constitué de deux chaînes α et deux chaînes β , dont chaque chaîne est associée à une molécule d'hème, pouvant lier l'oxygène par l'intermédiaire de son atome ferreux [129] (Figure 19). Une molécule d'hémoglobine peut donc lier 4 atomes de dioxygène. La couleur rouge caractéristique des érythrocytes est due aux propriétés spectrales de la liaison des ions de fer hémiques dans l'hémoglobine.

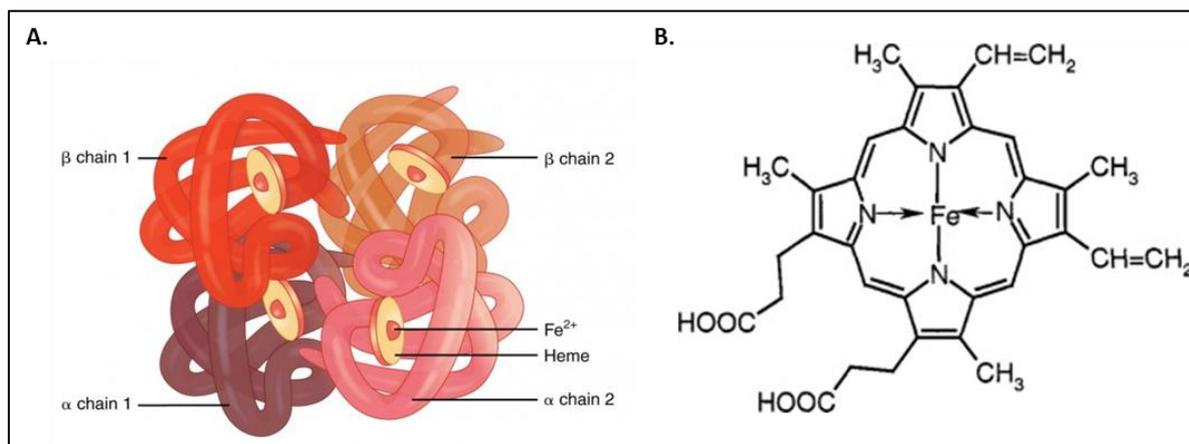


Figure 19 : A. Structure du tétramère d'hémoglobine. B. Structure de l'hème (tiré de [130])

Des mutations au niveau du gène de l'hémoglobine peuvent engendrer des modifications morphologiques du GR. Par exemple, dans le cas de la drépanocytose, la polymérisation des molécules d'hémoglobine mutée HbS provoque une falciformation et une rigidification, entraînant une hémolyse et des crises vaso-occlusives [131]. Dans les β Thalassémies, la synthèse des chaînes β est faible voire nulle, les chaînes α alors libres précipitent, il en résulte une anémie microcytaire responsable de complications cardiaques entre autres. Les patients porteurs du trait drépanocytaire (hétérozygotes HbAS), sont protégés contre les formes sévères du paludisme [132].

1.2.3.4. Propriétés physiques

Durant toute leur durée de vie, les GR vont devoir subir plusieurs stress mécaniques dans la microcirculation notamment lors du passage dans la circulation lente de la rate. C'est pourquoi

leurs capacités à se déformer et à réguler leur volume cellulaire ainsi que la viscosité du cytoplasme sont essentielles pour maintenir leur intégrité [133].

La régulation du volume cellulaire permet de maintenir un ratio surface/volume adapté pour circuler dans les espaces étroits [134]–[136]. Le GR discocytaire a en effet un excès de surface par rapport à son volume, contribuant à sa déformabilité caractéristique et permettant une diffusion passive optimale de l'oxygène dans le GR, qui sera ensuite délivré dans les tissus cibles [138], [139]. Durant la sénescence, le GR perd de la surface membranaire et du volume. Le ratio surface/volume est assuré d'abord par le contrôle de la surface de la membrane plasmique. Cependant, Dale et al en 1990 ont montré par marquage de la surface des GR à la biotine que la perte de surface du GR (10,5 %) était plus importante que la perte de volume (8,4 %), impliquant une modification du ratio Surface/Volume et expliquant l'augmentation de la densité des GR sénescents. Récemment, Roussel et al en 2021 ont montré que lors du stockage des GR en poche, une fraction d'érythrocytes perdait de la surface membranaire par vésiculation, entraînant une diminution du rapport surface/volume. Ces cellules appelées alors microérythrocytes de stockage gagnent en sphéricité, ce qui induit leur clairance *via* leur rétention dans la rate [109]. Certaines anémies hémolytiques sont également expliquées par ce phénomène d'augmentation de la sphéricité due à une altération du ratio surface/volume, c'est le cas des sphérocytoses héréditaires [137]. Le volume cellulaire est quant à lui déterminé par le contenu cationique, *via* l'activité des différents transporteurs membranaires.

La déformabilité membranaire dépend de l'élasticité du réseau de spectrine, l'interaction entre les protéines transmembranaires et les protéines du cytosquelette (le complexe jonctionnel spectrine – actine - protéine 4.1R), mais aussi du contrôle du ratio cholestérol/phospholipides (voir chapitre sur la structure du GR). Les détériorations de la déformabilité membranaire sont caractéristiques de diverses maladies, comme l'ovalocytose héréditaire. Les GR des patients sont appelés ovalocytes et leur membrane est 4 à 8 fois plus rigide que celle de GR normaux, ce qui entraîne des anémies modérées [138].

Enfin, la viscosité du cytoplasme dépend de la concentration en hémoglobine intracellulaire, qui est autour de 27-37g/dL en conditions normales. La viscosité augmente fortement lorsque le seuil de 37 g/dL est dépassé. Alors que la viscosité du cytoplasme n'est que 5 fois supérieure à celle de l'eau à 27 g d'hémoglobine/dL, elle est multipliée par 3 à 37 g/dL. Elle augmente en étant 45 fois supérieure à celle de l'eau à 40 g/dL, atteignant jusqu'à 650 fois la viscosité de

l'eau à 50 g/dL [139]. Par la manipulation micromécanique de cellules isolées, les propriétés rhéologiques des GR normaux et drépanocytaires ont été mesurées en fonction de la concentration en hémoglobine des cellules. La régulation étroite de la concentration d'hémoglobine minimise la dissipation visqueuse cytoplasmique pendant la déformation cellulaire. Lorsque la concentration d'hémoglobine est supérieure à 37 g/dL, la cellule récupère plus lentement et plus difficilement sa forme initiale après déformation importante (lors du passage à travers les fentes inter-endothéliales de la rate par exemple) [140]. La capacité de la cellule à traverser la microcirculation peut donc être compromise par l'augmentation de la viscosité cytoplasmique. La capacité du GR à réguler sa concentration en hémoglobine dépend de sa capacité à contrôler son volume, lui-même déterminé par sa teneur totale en cations. Les transporteurs transmembranaires jouent donc également un rôle important dans le contrôle de la viscosité interne [141], [142]. L'augmentation de la viscosité cytoplasmique est une des caractéristiques de la stomatocytose héréditaire, une maladie provoquant des altérations de la membrane du GR [143].

1.2.3.5. Fonction

Les principales fonctions des GR sont de faciliter les échanges gazeux et de contribuer à la régulation du pH sanguin (avec le rein).

1.2.3.5.1. LES ÉCHANGES GAZEUX

L'hémoglobine est le transporteur principal de l'oxygène. L'oxygène lié à l'hémoglobine induit une augmentation graduelle de l'affinité de liaison à l'oxygène jusqu'à ce que tous les sites de liaison soient occupés, on parle de liaison coopérative. La relation entre la pression en dioxygène (PO_2) dans le sang et la saturation de l'hémoglobine en dioxygène est représentée par une courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (hémoglobine oxygénée). La courbe de dissociation est en forme de sigmoïde, alors qu'en condition de liaison non coopérative, elle a une forme d'hyperbole (Figure 20) [144]. L'affinité est augmentée lorsqu'il y a diminution de la température, de la concentration en 2,3 diphosphoglycérate (2,3 DPG), de la pression

partielle en CO₂, baisse de la concentration érythrocytaire en H⁺, et augmentation du pH sanguin.

Environ 10 % du dioxyde de carbone du corps humain est transporté *via* la liaison à l'hémoglobine. En effet, le dioxyde de carbone peut également se lier à l'hémoglobine, mais via les acides aminés de l'hémoglobine, contrairement au dioxygène qui se lie aux ions Fe²⁺. Le dioxyde de carbone est alors transporté vers les poumons, où il sera évacué.

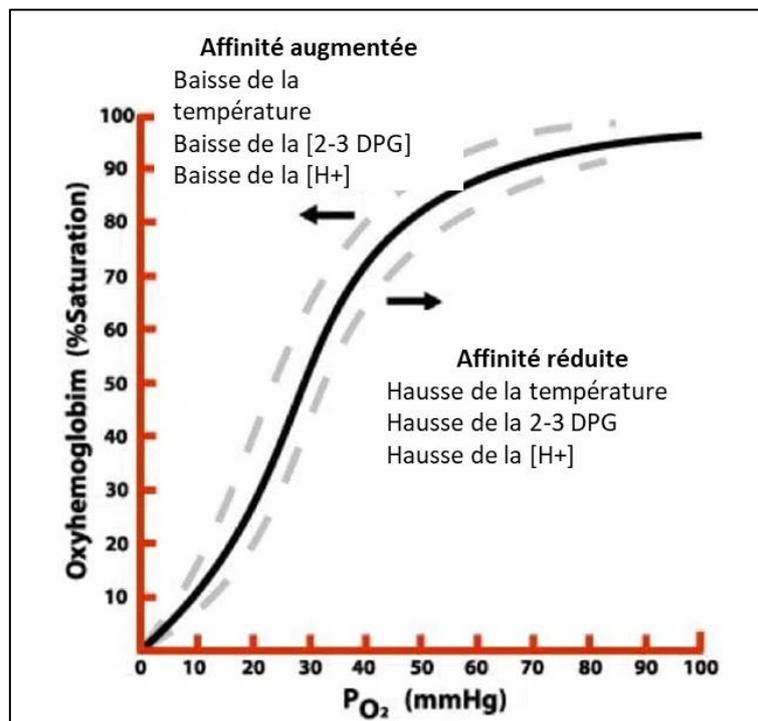


Figure 20 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (Adapté de [145]). La courbe noire est la courbe standard, en conditions normales. Les courbes grises en pointillées correspondent aux décalages dus à une affinité augmentée (vers la gauche) ou à une affinité réduite (vers la droite)

En cas d'anémie symptomatique ou de perte de plus de 30 % du volume sanguin, la transfusion de sang total ou de concentrés érythrocytaires permet de rétablir l'apport d'oxygène aux tissus [146].

1.2.3.5.2. LE CONTRÔLE DU PH SANGUIN

Les GR contribuent au contrôle du pH sanguin pour le maintenir proche de 7,4, en modifiant la forme du dioxyde de carbone dans le sang, de deux manières possibles. Dans un premier

temps, le GR sécrète l'anhydrase carbonique, une enzyme capable de catalyser la conversion réversible du CO₂ et de l'eau en acide carbonique. Ce dernier va alors se dissocier en ions bicarbonate et hydrogène, acidifiant le sang. Au pH physiologique, l'acide carbonique est majoritairement dissocié en ions bicarbonate [147]. Dans un second temps, la liaison entre l'hémoglobine et le CO₂ crée de la carbamino-hémoglobine, empêchant la formation d'acide carbonique. Cela augmente aussi le pH sanguin. Il a été montré que le pH de la solution de stockage des GR affectait considérablement la qualité et la survie des cellules après transfusion [148].

1.2.4. Les mécanismes d'élimination des GR

Un GR de sujet sain reste en circulation environ 120 jours [149], durée qui peut être plus courte en conditions pathologiques comme en cas d'hémolyse aiguë toxique, infectieuse ou chronique comme au cours de la drépanocytose. Les érythrocytes altérés sont susceptibles de libérer des formes anormales d'hémoglobine, pouvant causer des lésions rénales. Une régulation fine de la clairance érythrocytaire est importante pour la survie de l'organisme. Chaque jour et en conditions normales, environ 1 % des GR sont éliminés de façon soit mécanique soit immunologique, ou bien par une combinaison de ces deux mécanismes génériques.

1.2.4.1. Clairance mécanique

Au cours de leur vieillissement et dans certaines situations pathologiques, les GR perdent progressivement leur capacité à se déformer. La rate retient les GR insuffisamment déformables pour franchir les fentes inter-endothéliales (voir chapitre III).

1.2.4.1.1. DÉFORMABILITÉ ALTÉRÉE

Différentes techniques de mesure de la déformabilité du GR ont été décrites [150], [151] (Figure 21) :

- Les pinces optiques utilisent un faisceau laser qui fournit un gradient tridimensionnel capable d'appliquer de très faibles forces et de manipuler les GR électrostatiquement à l'aide de billes de silice ;
- La microscopie à force atomique permet de recueillir des informations sur la force locale, l'élasticité et la rigidité d'une seule cellule ;
- L'aspiration du GR par micropipette indique la déformabilité de la membrane dans la zone aspirée, mais aussi le volume et la surface du GR lorsque celui-ci est totalement aspiré ;
- La microfluidique est une technique qualitative permettant une visualisation, par vidéomicroscopie, du comportement d'une cellule lors de son passage à travers des fentes splénomimétiques ou d'autres types d'obstacles à l'écoulement ;
- L'ektacytométrie est basée sur le profil de diffraction d'un faisceau laser à travers une population de GR soumise à des forces de cisaillement et des pressions osmotiques constantes ou non, et donne donc l'indice d'élongation de cette population par rapport aux conditions appliquées ;
- La microsphiltration évalue la capacité des GR à traverser des fentes créées par des microsphères métalliques, imitant la filtration splénique.

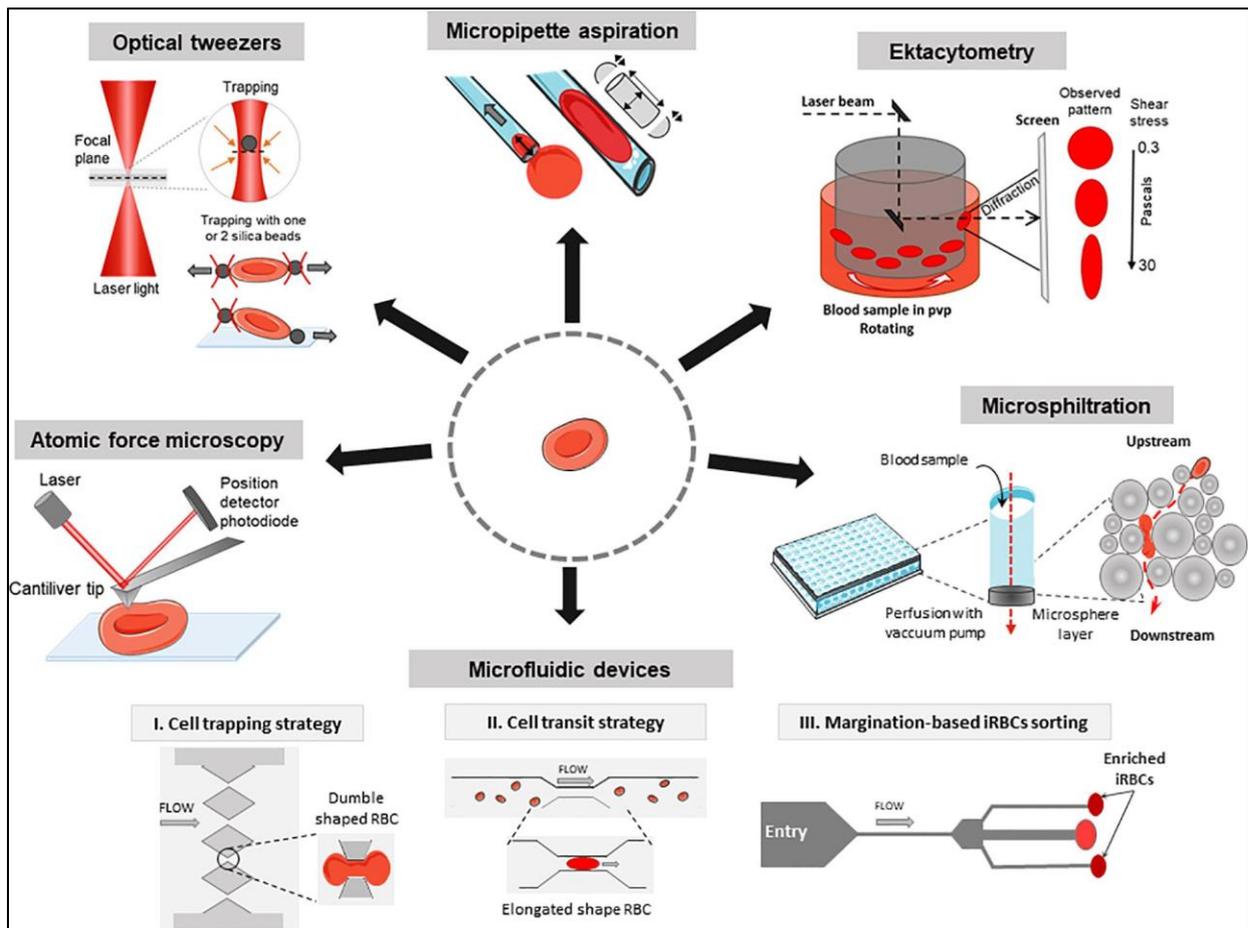


Figure 21 : Les différentes méthodes permettant d'étudier la déformabilité des GR durant l'infection par le paludisme (tiré de [150])

L'imagerie en flux n'est pas, à proprement parler, une technique de mesure de la déformabilité des GR, mais un outil puissant d'analyse morphologique. Combinant la cytométrie en flux et la microscopie, l'imagerie en flux photographie chaque cellule pour pouvoir analyser *a posteriori* sa morphologie. En tenant compte du lien entre la morphologie du GR et sa capacité à se déformer, cette méthode donne des indices sur la déformabilité du GR.

L'ektacytométrie et la microsphiltration ont largement été utilisés pour la réalisation du projet de thèse.

L'altération de la déformabilité peut être due à plusieurs paramètres :

- **Modifications morphologiques : perte de surface et de volume**

Une étude menée en 1992 par Waugh et al a montré que les GR sénescents perdent de la surface et du volume [152]. Les expériences splénomimétiques de Safeukui et al en 2013 ont montré que les GR les plus retenus dans les pseudos fentes inter-endothéliales étaient les GR ayant le plus perdu de leur surface projetée [134]. Dans une étude précédente, une corrélation a été faite entre la baisse de la déformabilité (indice d'élongation mesurée par ektacytométrie) et la perte de la surface projetée des GR traités à la lysophosphatidylcholine [137]. *In vitro*, les altérations morphologiques des GR, notamment durant le stockage des GR en poches démontrent la perte de membrane avec le temps [107]. Plus les altérations morphologiques étaient importantes moins les GR atteints étaient aptes à persister en circulation après transfusion. Par ailleurs, Roussel et al en 2021 ont mis en évidence l'émergence de microérythrocytes de stockage, des petits GR sphériques, moins déformables que des GR normaux et rapidement éliminés lors de la perfusion *ex vivo* dans une rate humaine, indiquant qu'ils ont été retenus/éliminés dans la rate [109].

- **Altération du contenu lipidique de la membrane plasmique**

Les altérations du contenu lipidique de la membrane plasmique modifient les caractéristiques mécaniques des cellules eucaryotes, dont les GR. En effet, la présence de cholestérol au niveau de la membrane est essentielle au maintien de la déformabilité du GR. Dans l'étude de Léonard et al. 2017, l'utilisation de traitements supprimant les domaines riches en cholestérol et d'autres riches en sphingomyéline mime la perte de ces domaines par vésiculation lors du vieillissement [153]. La suppression des domaines riches en cholestérol affecte la déformabilité du GR sain tandis que la perte des domaines riches en sphingomyéline induit une augmentation du volume de la cellule et de la concentration en $[Ca^{2+}]$ intracellulaire. Ils ont enfin démontré que la perte de ces domaines diminuait la résistance des GR à la baisse de l'osmolarité dans le milieu, les rendant plus fragiles.

Cela suggère l'implication des domaines riches en cholestérol et ceux riches en sphingomyéline dans le processus de déformation du GR dans la filtration splénique en particulier en situation de sénescence (Figure 22). Durant la sénescence, la vésiculation des domaines riches en cholestérol et sphingomyéline induirait une augmentation du volume de

par l'entrée du calcium et la perte de membrane. La capacité du GR à se déformer est ainsi altérée.

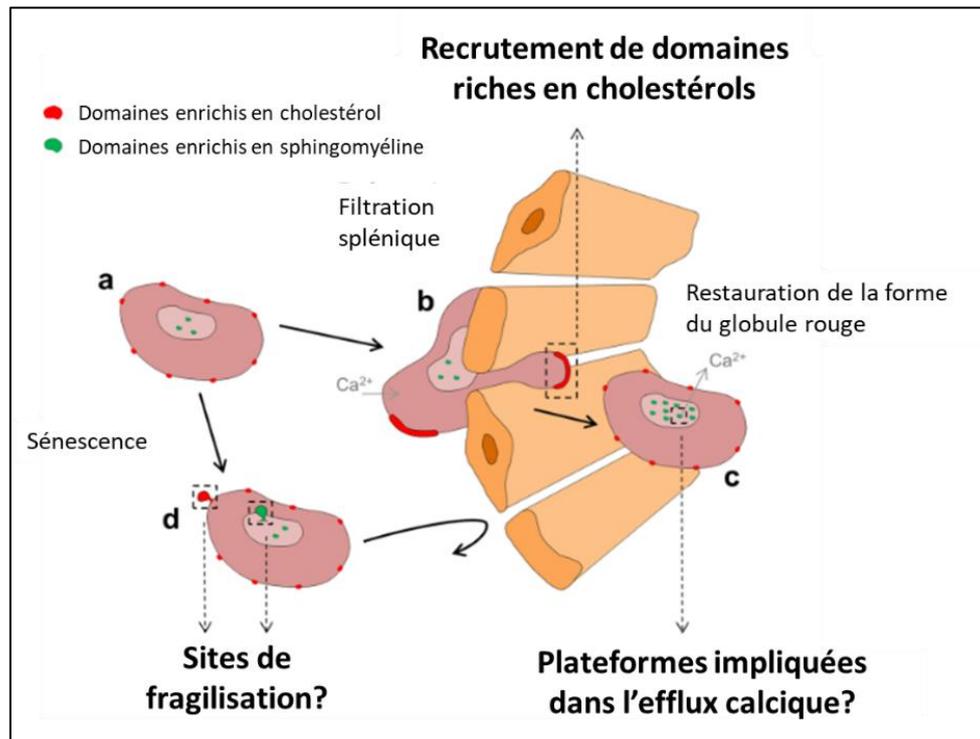


Figure 22 : Modèle adapté de [153], résumant l'implication des domaines riches en cholestérol et des domaines riches en sphingomyéline dans la circulation des GR. (a) Dans les GR frais et sains, les domaines riches en cholestérol sont associés aux zones membranaires très courbées de la cellule, tandis que les domaines riches en sphingomyéline se situent dans les zones faiblement courbées. (b, c) Lors du passage à travers les fentes inter-endothéliales de la rate, le GR se déforme et les domaines enrichis en cholestérol sont concentrés dans les zones de courbures accrues de la membrane. Au cours de la restauration de la forme de la cellule, il va y avoir une augmentation des domaines enrichis en sphingomyéline au niveau de la concavité du GR, et un efflux de calcium. (d) Pendant le vieillissement, les deux domaines lipidiques apparaissent comme des sites spécifiques pour la perte de membrane par vésiculation. Les auteurs suggèrent que ces domaines lipidiques pourraient contribuer au remodelage des GR en tant que modulateurs/stabilisateurs de la flexion membranaire lors de la déformation de la cellule, des plateformes permettant l'efflux de calcium et des sites de fragilité pour la vésiculation membranaire.

D'autres études ont par ailleurs montré que lorsque le ratio cholestérol/phospholipides est altéré, la fluidité membranaire diminue, ce qui rigidifie la cellule [118], [154]–[156].

1.2.4.1.2. FRAGILITÉ OSMOTIQUE

Un autre facteur physique pouvant intervenir dans la clairance des GR en condition physiologique est la variation de la fragilité osmotique. La fragilité osmotique est mesurée par le taux d'hémolyse d'une population de GR soumise à un stress hypoosmotique. Plusieurs facteurs comme la composition membranaire, la taille et le rapport surface/volume influent sur cette mesure. Une cellule dont la fragilité osmotique est élevée sera très sensible à la baisse de l'osmolarité et hémolysera à des osmolarités plus élevées qu'une cellule plus résistante (Figure 23).

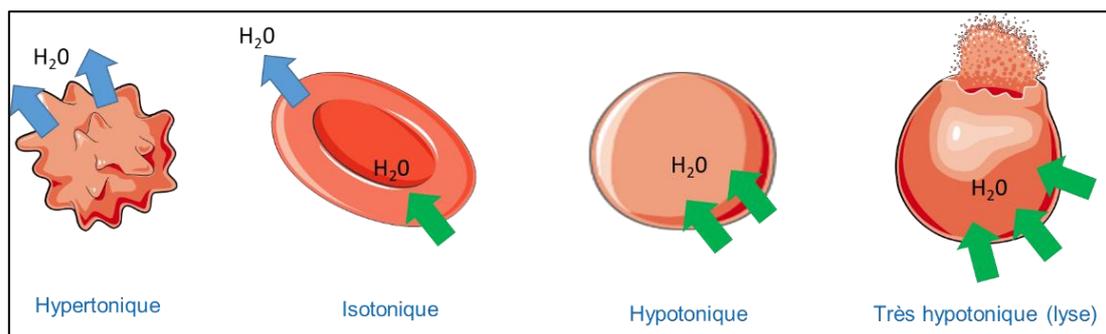


Figure 23 : Effet de l'osmolarité sur les GR

Une technique complète comportant une mesure de la fragilité osmotique est l'OSMOSCAN. L'indice d'élongation est mesuré sous une contrainte de cisaillement constante de 30 Pa et à un gradient osmotique croissant (de 90 à 600 mOsm/kg). On obtient une courbe comportant trois points critiques : O_{min} reflète l'osmolarité à laquelle 50 % de la population de GR est lysée (correspond à la fragilité osmotique et au rapport surface/volume S/V) ; E_{lmax} correspond à la déformabilité la plus élevée ; O_{hyper} est l'osmolalité à la moitié de E_{lmax} dans la région hypertonique de la courbe. O_{hyper} augmente dans les états d'hydratation cellulaire, soit en raison d'une diminution de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, soit en raison d'une augmentation nette de la teneur en eau (Figure 24) [157], [158].

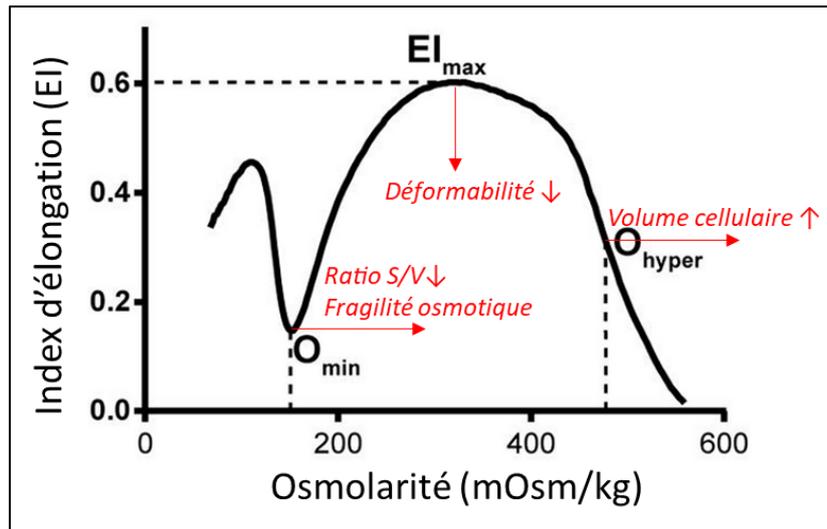


Figure 24 : Courbe typique d'Osmoscan et les paramètres correspondants (adapté du site du fabricant <https://lorrca.com/wikilorrca/osmoscan-test/>).

Les jeunes érythrocytes sont généralement plus résistants à l'hémolyse en milieu hypotonique que les cellules plus âgées [159]. L'étude de Sagawa et al en 1978 a montré que chez les rats splénectomisés, les GR présentent une fragilité osmotique réduite et une augmentation du diamètre ainsi que des teneurs en phospholipides et en cholestérol. À l'inverse, chez les rats présentant une splénomégalie, les cellules ont une fragilité osmotique accrue et une diminution du diamètre et du contenu lipidique [160]. L'augmentation de la teneur en phospholipides semblait donc entraîner une diminution de la fragilité du GR. Plus récemment chez l'homme, Léonard et al en 2017 ont montré que lorsque l'on supprime les domaines riches en cholestérol et ceux riches en sphingomyéline (ce qui mime les GR en sénescence), les GR étaient moins résistants à l'hémolyse [161].

Au contraire, les GR de patients drépanocytaires sont plus rigides que les GR sains et plus résistants à l'hémolyse induite par le stress osmotique [162]. Leur rigidité accrue contribue sans doute aux crises de séquestration splénique aiguë durant lesquelles les drépanocytes sont retenus en amont des fentes inter-endothéliales [163], provoquant une congestion de la pulpe rouge de la rate par les GR sains et pathologiques et une anémie aiguë parfois très profonde.

1.2.4.2. Clairance immunologique

1.2.4.2.1. INDUCTION DE L'ÉRYPTOSE

Les GR étant dépourvus de noyau et de mitochondrie, ils ne peuvent pas s'engager dans une voie apoptotique complète avec implication des caspases et fragmentation d'ADN. Il existe cependant un mécanisme se rapprochant du suicide cellulaire appelé « éryptose », avec exposition des phosphatidylsérines. En effet, lors du vieillissement ou bien en condition pathologiques, les GR sont exposés à des contraintes mécaniques et des environnements oxydatifs [117], [164], [165]. Cela va induire une activation du canal Piezo, permettant l'entrée du calcium dans la cellule. L'augmentation du calcium intracellulaire va provoquer plusieurs phénomènes pouvant entraîner la clairance et/ou la destruction du GR [166] (Figure 25) :

- L'inhibition de la flippase et l'activation de la scramblase, permettant la translocation des phosphatidylsérines à la surface du GR et leur reconnaissance par les macrophages [167] ;
- L'activation du canal Gardos, induisant l'efflux du potassium et d'eau, et donc un rétrécissement cellulaire ;
- L'activation des Calpaines, une famille de protéases dégradant les protéines du cytosquelette, provoquant le bourgeonnement de la membrane.

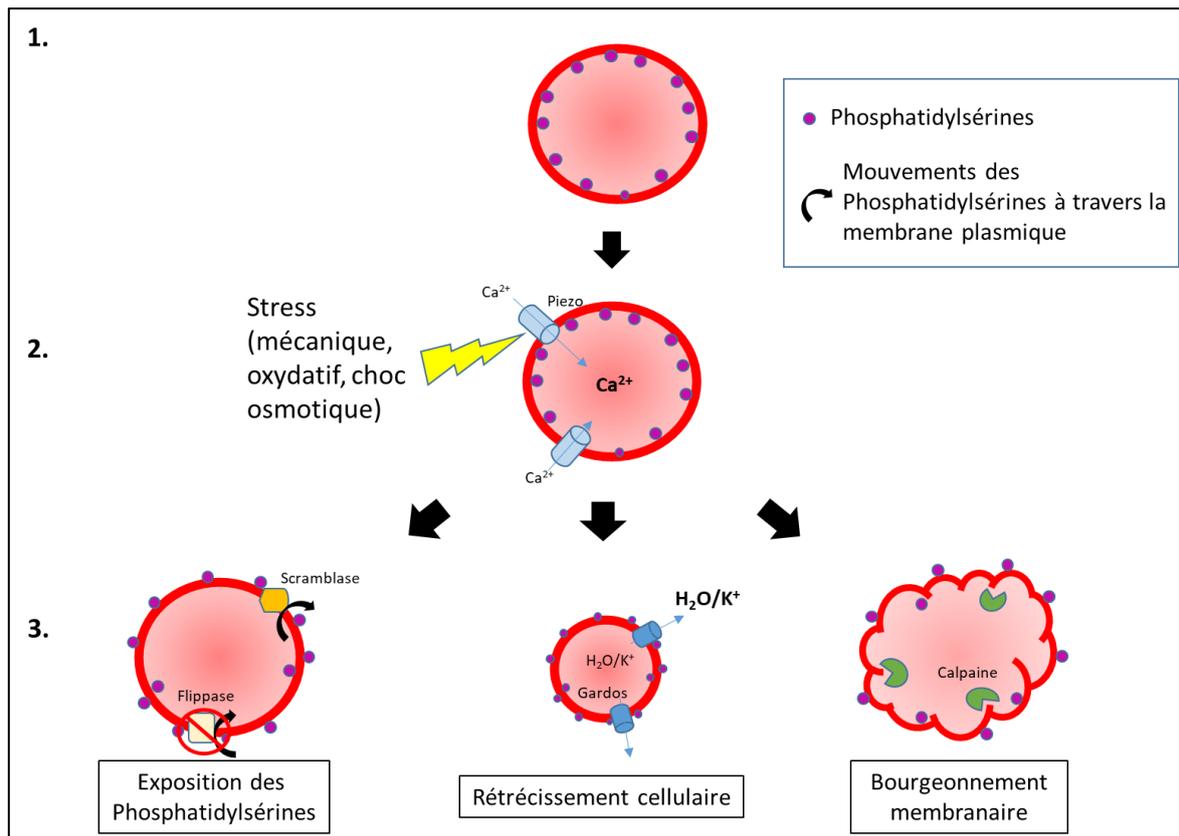


Figure 25 : Mécanismes de l'éryptose (tiré de [166]). 1. Au niveau des GR sains, les phosphatidylsérines se situent majoritairement au feuillet interne. 2. Activation de Piezo suite à un stress. 3. Exposition des phosphatidylsérines au feuillet externe via l'activation de la scramblase, rétrécissement cellulaire par activation du canal potassique Gardos, bourgeoisement de la membrane par dégradation du cytosquelette via les Calpaines.

1.2.4.2.2. PERTE DU CD47

Le CD47 est une protéine transmembranaire ayant une fonction d'inhibition de la phagocytose en se liant au récepteur macrophagique SIRP α . Cette interaction inhibe la phagocytose [168]. La diminution de l'expression du CD47 à la surface des GR durant la sénescence favorise leur clairance dans certains modèles [169].

Dans certaines conditions, le CD47 modifié peut devenir un signal de phagocytose. En effet, un environnement oxydatif peut induire un changement conformationnel du CD47, permettant sa liaison avec la thrombospondine 1, créant ainsi un nouveau site de liaison à SIRP α . Cette nouvelle interaction provoque l'activation de la fonction de phagocytose du macrophage, induisant l'élimination du GR [170]. Le CD47 favorise aussi l'interaction du

fibrinogène avec la membrane du GR. Cela contribue notamment à l'hyper-agrégation des GR et à des modifications des propriétés rhéologiques du sang en conditions inflammatoires [171], [172].

1.2.4.2.3. ACTIVATION DE LA VOIE CLASSIQUE DU COMPLÉMENT

Le système du complément est un effecteur majeur de l'immunité innée, constituant une première ligne de défense contre les pathogènes [173]. Il a trois voies d'activation (Figure 26) : la voie classique, initiée par l'interaction anticorps-antigène et le C1q ; la voie des lectines initiée par la fixation de mannose-binding lectin (MBL) aux sucres présents à la surface de nombreux microorganismes ; la voie alterne qui est activée de façon constitutive dans le plasma par l'hydrolyse basale du C3. L'activation du complément génère trois types d'effecteurs : les anaphylatoxines (C3a et C5a), des molécules pro-inflammatoires ; les opsonines (C3b et C4b), qui décorent la surface de leur cible *via* des liaisons covalentes et peuvent être reconnues par les cellules phagocytaires ; et le complexe d'attaque membranaire C5b-9 (ou MAC), qui lyse directement les pathogènes ou cellules du soi opsonisées. Le système du complément est régulé *via* les « complement regulatory proteins » (CRP), des protéines exprimées à la surface des cellules, GR compris, afin de protéger la cellule contre le complexe d'attaque membranaire.

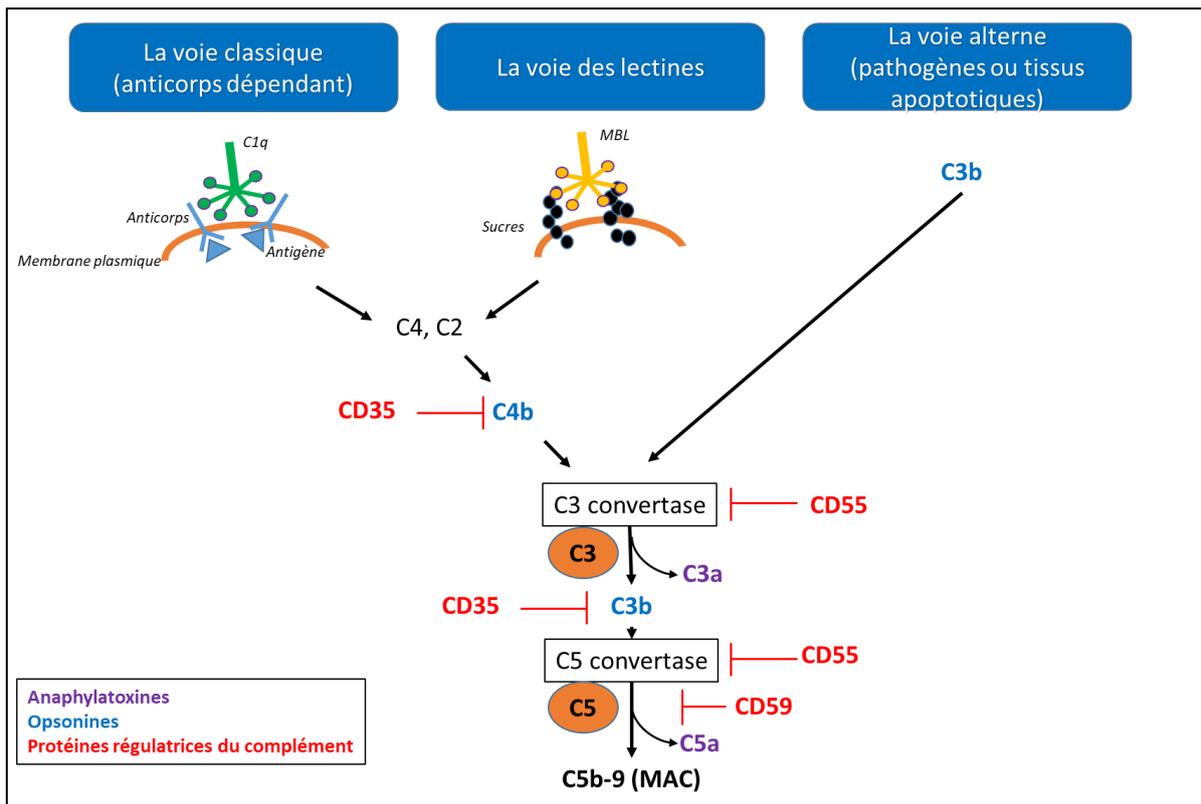


Figure 26 : Schéma résumé de l'activation du système du complément et de ses inhibiteurs.

Dans un contexte pathologique, la clairance des GR peut donc se faire à travers l'activation de la voie classique du complément [174]. Trois CRP sont exprimées à la surface des GR [31] : le complément receptor 1 (CR1 ou CD35) qui clive le C3b et le C4b ; le decay-accelerating factor (DAF ou CD55) qui déstabilise les convertases ; et la protectine (CD59) qui empêche l'association entre le C9 et le C5b, donc l'étape finale de la formation du complexe d'attaque membranaire.

1.2.4.2.4. REGROUPEMENT ET DÉGRADATION DE LA BANDE 3

Le regroupement et/ou la dégradation de la protéine Bande 3 peuvent contribuer à la clairance des GR sénescents [175], [176]. La Bande 3 est une cible de l'oxydation, notamment lorsqu'elle se complexe avec des hémichromes, formes oxydées et dénaturées de l'hémoglobine. L'accumulation d'hémoglobine oxydée est considérée comme l'un des principaux déclencheurs de regroupement molécules de Bande 3. La phosphorylation des

tyrosines 8 et 21 du domaine cytosolique de la Bande 3 réduit aussi son affinité de liaison avec l'ankyrine, causant la déstabilisation de l'interaction entre la Bande 3 et le cytosquelette, et provoquant une augmentation de la mobilité de Bande 3 dans la membrane et la qui forme alors des vésicules [177]. Les grappes (« clusters ») de Bande 3 sont reconnues par les IgG autologues qui peuvent activer la voie classique du complément [178].

1.2.4.3. Sites d'élimination [179] – [181]

1.2.4.3.1. LA RATE

La rate est le site principal de l'élimination des GR, mécanique ou immunologique. Le chapitre 1.3 est dédié à la description de la rate et de sa fonction.

1.2.4.3.2. LA MOELLE OSSEUSE

En conditions physiologiques, il existe une érythrophagocytose basale ayant lieu dans la moelle osseuse. Chez les patients atteints d'anémie hémolytique, cette phagocytose de GR est significativement augmentée. Les GR de rat chauffés, sphériques, sont phagocytés dans la moelle osseuse [182]. La rate constitue ainsi un des lieux de clairance des GR altérés ou sénescents.

1.2.4.3.3. LE FOIE

En dehors de la rate, le foie constitue un lieu de dépôt de GR et joue un rôle important dans la clairance érythrocytaire et le recyclage du fer [183]. Cette clairance est de type immunologique. En effet, la présence de GR endommagés dans le foie induit un recrutement rapide de monocytes, qui vont eux-mêmes donner naissance à des macrophages « transitoires », les cellules Kupffer, équipées pour la phagocytose des GR et le recyclage du fer. Les cellules Kupffer expriment en outre la ferroportine, qui permet la délivrance du fer des GR phagocytés aux hépatocytes.

1.2.5. Le GR au cours de l'infection par *Plasmodium falciparum*

L'invasion par *Pf* modifie le GR. Le parasite réquisitionne l'hémoglobine qui lui apporte les nutriments nécessaires à son développement. Le GR parasité mature adhère aux cellules endothéliales de la microcirculation au sein de laquelle il n'est pas soumis à la filtration splénique.

1.2.5.1. Les protéines parasitaires exportées à la surface du GR hôte

Après avoir envahi son GR hôte, le parasite se développe au sein d'une vacuole parasitophore. Le parasite met en place des voies de trafic intracellulaire pour l'export de plus de 400 protéines dans la cellule hôte, dont des kinases, lipases, adhésines, protéases [184]. Cela induit une réorganisation profonde du GR infecté. La majorité des protéines exportées possède un motif « host targeted signal » appelé aussi « *Plasmodium* export element » (PEXEL). Les protéines possédant le motif PEXEL sont exportées de la vacuole parasitophore à travers un complexe appelé PTEX ou « translocon » [185]. Le parasite développe également un organe secondaire appelé « Maurer's cleft », nécessaire à l'export des protéines de virulence et pour la présentation des protéines membranaires [186]. On compte quatre familles de protéines antigéniques exposées à la surface du GR parasité : Rifin, Stevor, Var et PfMC-2M connues pour être impliquées dans l'adhésion des GRi aux GRni (processus de rosetting), mais aussi dans la cytoadhérence aux cellules endothéliales.

Certaines protéines parasitaires peuvent être adsorbées à la surface de GR non infectés (GRni). RAP2, par exemple, peut se déposer à la surface des GRni lors d'un échec de l'invasion du mérozoïte dans le GR cible [35].

La localisation des protéines parasitaires à la surface de GR (comme pfEMP1 ou bien RAP2) ont amené de nombreuses équipes à les utiliser comme candidats vaccins.

1.2.5.2. Modification de la rhéologie

Certaines protéines comme *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) sont exportées à la membrane du GRi, et permettent l'adhésion de la cellule à l'endothélium des vaisseaux sanguins. Les GRi cytoadhérents ne sont plus soumis au passage à travers la rate, où

les GR altérés sont normalement retenus et phagocytés par les macrophages spléniques. Les PfEMP1 sont des adhésines codées par les gènes *var* et exprimées par les stades matures du parasite. Elles sont regroupées dans les organelles parasitaires « knobs » formées à la surface du GRi. Les knobs servent à présenter PfEMP1 dans une conformation facilitant une adhésion robuste du GRi avec le vaisseau sanguin grâce à l'interaction du domaine extracellulaire de PfEMP1 avec les molécules de la surface des cellules endothéliales comme ICAM-1, CD31, CD36, Chondroïtine sulfate A ou d'autres glycosaminoglycanes [187].

L'expression de protéines parasitaires et leurs interactions avec le cytosquelette peuvent induire une altération de la déformabilité de la membrane du GR [188]–[190]. La protéine RESA par exemple interagit avec la spectrine et contribue à la stabilisation du squelette membranaire [191]. Pf332 exportée à la membrane serait directement impliquée dans la rigidité membranaire et l'adhésion [192]. Les protéines KAHRP (un constituant des knobs) interagissent avec la spectrine, l'ankyrine et l'actine. PfEMP1, PfEMP3 interagissent avec l'actine et la protéine 4.1. Enfin, les protéines PHIST et MESA interagissent avec la protéine 4.1. La diminution de la déformabilité du GR est proportionnelle à l'âge du parasite : plus le parasite est âgé, plus les modifications de son hôte seront importantes, plus le GR est rigide [188]. Les parts respectives de la rigidité du parasite lui-même et du GR hôte ne sont pas robustement établies.

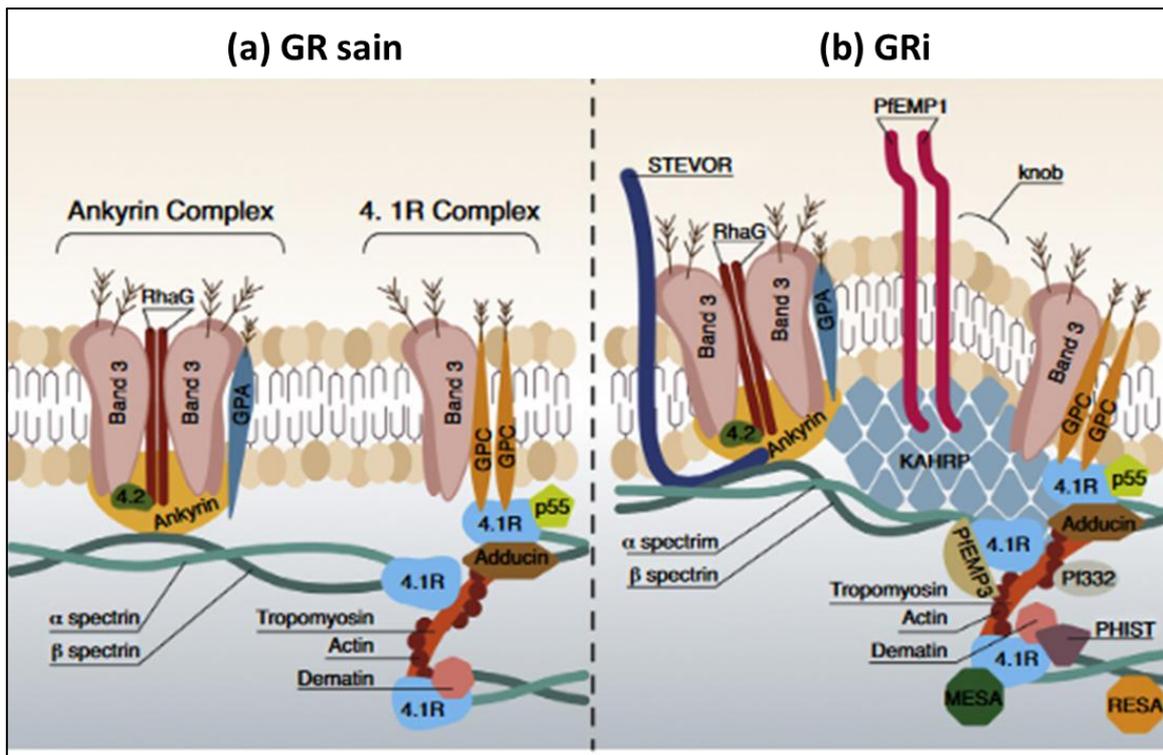


Figure 27 : Représentation schématique de la membrane d'un GR sain (GR sain) (a) et infecté un stade asexué de *Pf* (GRi) (b). (Tiré de [189])

1.2.5.3. Mise en place des New Permeability Pathways (NPP)

La membrane plasmique érythrocytaire possède une gamme de transporteurs spécialisés pour faciliter le passage des substrats. Cependant, ils ne sont pas suffisants, car ils ne permettent pas le passage de tous les nutriments nécessaires au développement de *Pf*. Pour survivre, le parasite met en place de nouvelles voies de signalisation qui altèrent la perméabilité de la membrane du GR permettant l'entrée des nutriments, l'export des déchets métaboliques et la régulation de la composition ionique du cytoplasme de la cellule hôte [193].

Historiquement, des expériences menées sur des GR de singes ont montré une modification des concentrations basales en calcium et potassium intracellulaire, suite à l'infection par *Pf*. L'infection provoquait une augmentation de la perméabilité membranaire [194]. Plus tard, des expériences de mesure de la perméabilité ont été effectuées par lyse iso-osmotique (en utilisant des solutés qui ne traversent pas la membrane du GRni, en condition non pathologique), ou bien par mesure du taux d'absorption de substrats radiomarqués. Ces

expériences ont montré que la perméabilité de la membrane des GRi pour certains solutés est augmentée [195]–[197]. Le patch clamp, permettant de mesurer les courants traversant la membrane, a enfin montré que les GRi par des stades asexués matures avaient une conductance pouvant être jusqu'à 150 fois supérieure à celle d'un GR sain [198].

L'augmentation de la perméabilité membranaire serait le résultat d'une mise en place ou d'une activation de « New Permeability Pathways », ou NPPs. Celles-ci présentent des caractéristiques de transports endogènes, ayant une préférence pour le transport d'anion par rapport aux cations [199]. Les NPPs sont aussi appelés Plasmodium Surface Anion Channel (PSAC), en référence à leur caractéristique de canal anionique. Ils sont établis à la membrane érythrocytaire à partir de 15 h après l'invasion pour atteindre un plateau après 36 h [200].

Malgré l'importance des NPPs pour le développement du parasite, leur origine et leur nature ne sont pas encore clairement définies. Les données d'électrophysiologie et les analyses des transports suggèrent qu'il pourrait exister plus d'un type de canaux [201]. Il semblerait cependant que des protéines parasitaires telles que Clag3, RhopH2 et RhopH3 jouent un rôle dans la formation des NPPs ou l'activation de canaux endogènes [202]–[204]. Au niveau de la membrane érythrocytaire, un autre canal anionique voltage dépendant, VDAC, pourrait jouer le rôle de NPP, puisqu'étant régulé positivement lors de l'infection par *Pf*, mais non régulé par les protéines RhopH [205].

1.2.5.4. *Modification de l'expression des CRPs et du CD47*

Par ailleurs, en plus de l'inhibition de la voie du complément, le CR1 (CD35) est un récepteur qui facilite la clairance des complexes immunitaires de la circulation, où les complexes opsonisés par le C3b se lient au CR1 sur les GR et sont ensuite phagocytés par les macrophages spléniques et hépatocytaires. Les GR eux, sont remis en circulation. Ce procédé retire simultanément le CR1 et le CD55 des GR [206], [207]. La diminution progressive de la quantité de ces CRP rend les GR de plus en plus susceptibles à l'élimination par activation du système du complément et par phagocytose. Durant l'infection par *Pf*, les protéines libérées pendant la rupture des parasites matures forment des complexes immunitaires avec les anticorps, activant le système du complément. Cela induit une augmentation du dépôt des protéines du complément sur les GR, réduisant l'expression des CRP, favorisant donc leur destruction [208].

Les taux de CR1 et CD55, mais également le CD47, sont réduits sur les GR de patients durant l'anémie palustre grave, mais cette perte est restreinte aux GRni, les GRi présentant des taux plus élevés. Cela suggère que les parasites sont protégés de la destruction induite par le complément et de la clairance des macrophages [32]. La protéine régulatrice du complément CD55 (DAF) est requise pour l'internalisation du parasite notamment comme récepteur d'invasion. En effet, Shakya et al en 2021 ont montré que l'entrée du parasite était bloquée lorsque CD55 était absent ou inhibé [209].

1.2.5.5. Modification du contenu lipidique

Les GR étant dépourvus de noyau, ils sont incapables de synthétiser des lipides *de novo*. La composition lipidique de la membrane plasmique des érythrocytes est donc déterminée par les échanges avec les lipides circulants, la dégradation enzymatique ou bien la synthèse par un agent infectieux [120]. L'infection par *Pf* est un exemple de modulation du contenu lipidique des érythrocytes [210].

1.2.5.5.1. LE CHOLESTÉROL

Le cholestérol constitue une des molécules les plus importantes pour la survie du parasite. Des études ont montré que les domaines riches en cholestérol étaient importants pour le transfert de PfEMP1 à la surface de la cellule hôte [211]. Or, *Pf* n'a pas de machinerie pour synthétiser le cholestérol [212]. Le parasite va donc réutiliser le cholestérol préexistant de la membrane érythrocytaire : par un mécanisme encore mal connu, les domaines riches en cholestérol de la membrane du GR peuvent s'invaginer et migrer dans le cytosol, pour finalement fusionner avec la membrane de la vacuole parasitophore [213]. Ainsi, la membrane des GRi présente moins de cholestérol qu'un GR sain [214], [215]. Par ailleurs, des expériences de cocultures de GRi avec des cellules hépatocytaires HepG2 ont montré que le parasite incorporait également le cholestérol dérivé des cellules hépatiques [216].

1.2.5.5.2. LES PHOSPHOLIPIDES

En 1991, une étude a montré que la membrane plasmique des GRi contient plus de phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamines et phosphatidylinositol (mais moins de sphingomyéline) que les GR sains [217]. Cela s'explique en partie par le fait que les parasites *Pf* possèdent des voies de synthèse des acides gras et des phospholipides [218]. De plus, des expériences d'internalisation de lipides utilisant des analogues de phosphatidylsérines, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine conjugués à un fluorophore ont montré que les GRi internalisaient plus de phospholipides fluorescents que les GRni. Cela suggère que les GRi réquisitionnent les phospholipides du milieu extracellulaire pour le développement du parasite. Ajouté à cela, les études ont montré que les GRi ayant une perméabilité accrue, l'augmentation du calcium intracellulaire permet d'activer les scramblase et flippase. Cela induit une exposition des phosphatidylsérines au niveau de la membrane externe du GR. Cette rupture de la régulation de l'asymétrie de la membrane érythrocytaire conduit à une reconnaissance des GRi par les monocytes, et les phagocytent [219].

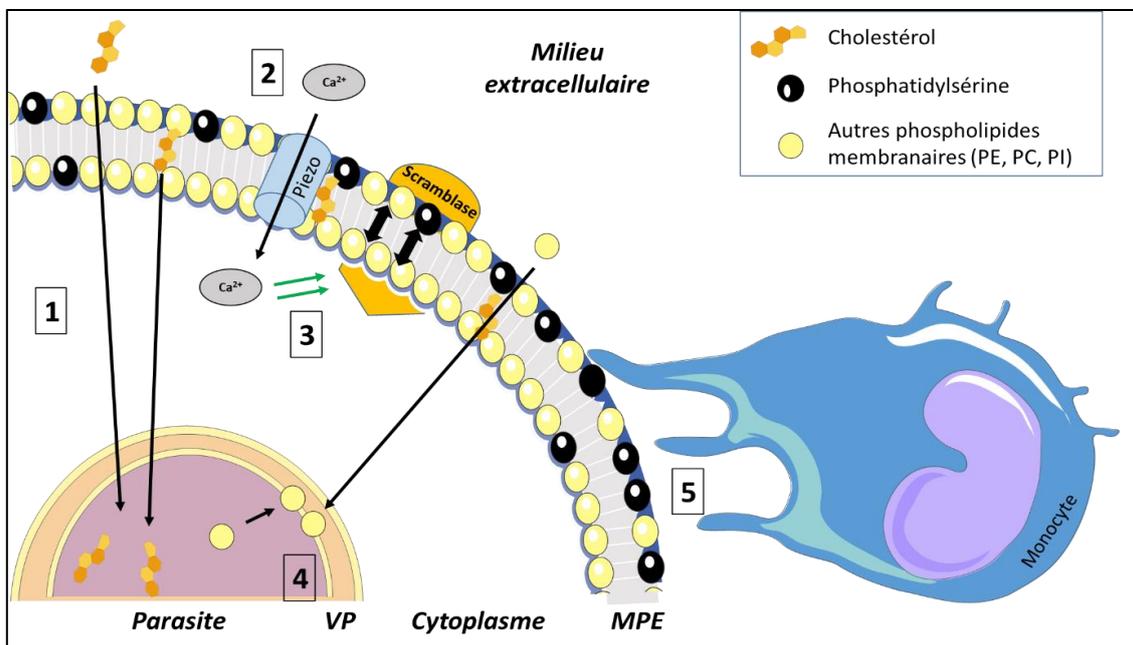


Figure 28 : Modèle proposé de la régulation des lipides lors de l'infection par *Pf*. (1) Le parasite réquisitionne le cholestérol de la membrane du GR et celui fourni par les hépatocytes. (2) L'infection active aussi des canaux ioniques dont Piezo, permettant l'entrée du Ca^{2+} dans le GR. (3) Le Ca^{2+} active la Scramblase, qui expose ainsi les phosphatidylsérines au feuillet externe de la membrane érythrocytaire. (4) Le parasite synthétise et séquestre

des phospholipides du milieu extracellulaire tels que les Phosphatidylinositol (PI), le Phosphatidyléthanolamine (PE) et la Phosphatidylcholine (PC). (5) Les phosphatidylsérines exposées sont reconnues par les monocytes. VP : Vacuole parasitophore ; MPE : Membrane Plasmique Érythrocytaire.

Par ailleurs, le maintien de l'homéostasie des céramides est important pour le développement du parasite et une dérégulation peut avoir des effets délétères. *Pf* importe les céramides [220], mais l'identification de dihydrocéramide, un précurseur des céramides, suggère la capacité de *Pf* d'en synthétiser [221]. Des expériences suggèrent la présence de sphingomyéline synthase dans l'érythrocyte infecté [222]. Plus tard, cette même équipe a montré, chez le parasite lui-même, la présence de sphingomyélinase, responsable de la dégradation de la sphingomyéline pour produire la céramide [223].

1.3. La rate dans le paludisme

1.3.1. Structure de la rate

La rate est un organe plein situé dans la partie gauche de l'abdomen. Sa taille et son poids varient au cours de la vie, pour atteindre chez l'adulte environ 12 cm de long, 8 cm de large, 3-4 cm d'épaisseur et pesant de 100 à 200 g. L'acheminement du sang est assuré par l'artère splénique, qui progresse le long du corps et de la queue du pancréas avant de perfuser la rate au niveau du hile splénique.

Elle est composée de deux compartiments principaux : la pulpe rouge et la pulpe blanche, interconnectées par la zone périfolliculaire. Ces structures servent à la fois à la filtration du sang et à la défense immunitaire. Contrairement aux ganglions lymphatiques, la rate ne possède pas de vaisseaux lymphatiques afférents, toutes les cellules et antigènes entrent dans la rate *via* le sang (Figure 29).

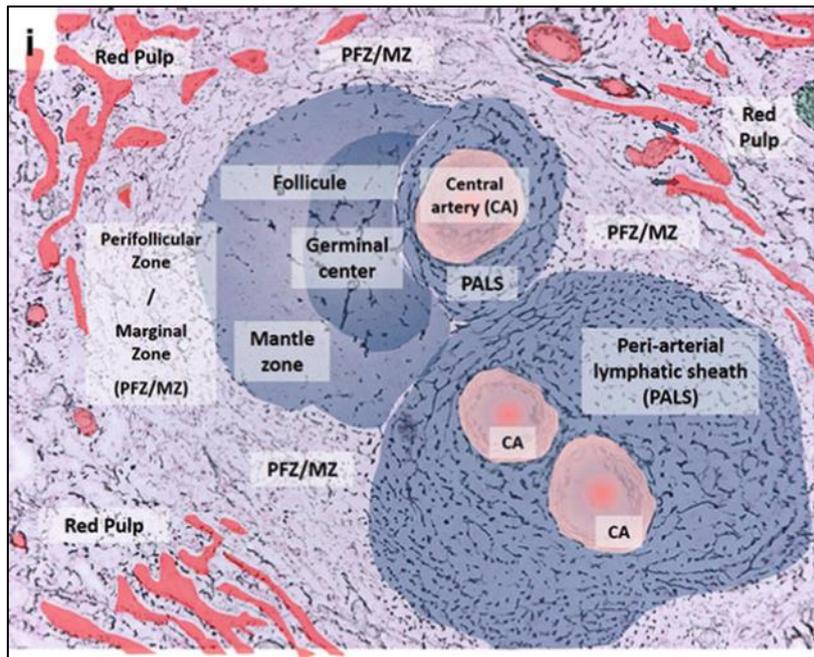


Figure 29 : Caractéristiques histologiques générales de la rate humaine (tiré de [224]). Analyse par immunohistochimie (anticorps anti-actine alpha lisse); le parenchyme splénique contient des zones rondes ou ovales de mononucléaires densément tassés, cellules mononucléaires densément compactes centrées ou non par de gros vaisseaux généralement nommés artéριοles centrales (CA). Ces zones correspondent soit à des nodules lymphoïdes (LN), soit à des gaines lymphatiques périartérielles (PALS). La pulpe rouge est constituée de sinus. Certains nodules lymphoïdes sont partiellement entourés d'espaces microcirculatoires qui correspondent aux zones périfolliculaires lisses positives à l'alpha actine (PFZ). MZ = Marginal Zone (Immunohistochimie, avec l'aimable autorisation du Pr Thierry Molina).

1.3.1.1. La pulpe rouge

La pulpe rouge représente environ trois quarts du volume de la rate. Elle est composée de sinus veineux séparés par des cordons de Billroth (cordon de tissu conjonctif lâche contenant des cellules résidentes) (Figure 30). Les cellules endothéliales des sinus sont en forme de baril et alignées, parallèlement à l'axe longitudinal du sinus et dans la direction du flux sanguin. Elles sont attachées entre elles seulement par endroits par des jonctions serrées et reposent sur une fibre basale hélicoïdale formant un maillage perméable. L'espace entre les cellules, appelé « fente inter-endothéliale », mesure entre 0,2 et 2 µm. Cette structure unique permet le passage des fluides et des GR déformables qui doivent rejoindre la lumière du sinus veineux.

Les cordons de Billroth sont des structures circulatoires non endothélialisées, dites « ouvertes ». Elles sont constituées d'un réseau tridimensionnel de fibroblastes et de

macrophages. Les macrophages de la pulpe rouge représentent environ la moitié du volume des cordons, et peuvent être à la fois dans les cordons de Billroth et dans la lumière du sinus. On peut également observer des érythrocytes et lymphocytes T et B avec des cellules plasmatisques, qui jouent un rôle dans le maintien d'un taux constant d'anticorps circulatoires.

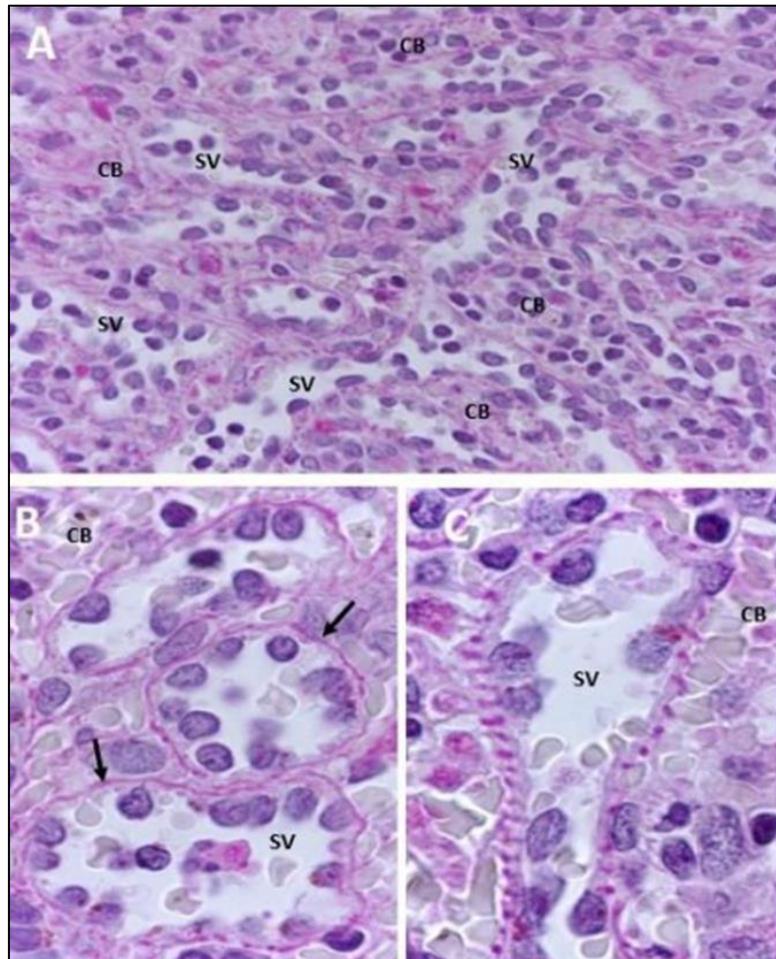


Figure 30 : Coupe histologique de la pulpe rouge de la rate après coloration à l'acide périodique de Schiff (colorant en fuchsia la fibre basale entourant les sinus) (tiré de [225]). Grossissements x200 en (A) x400 (B et C). Les flèches indiquent la position de la membrane basale. CB : cordons de Billroth ; SV : sinus veineux. Les flèches indiquent la position de la membrane basale.

1.3.1.2. La pulpe blanche

La pulpe blanche représente environ 20 % du volume de l'organe. Son organisation est grossièrement similaire à celle d'un ganglion lymphatique. Cette organisation est contrôlée par des chimiokines spécifiques des cellules T (comme CCL9 et CCL21) et B (comme CXCL3),

pour établir des zones spécifiques autour d'une artère centrale : les manchons artériolaires péri lymphatiques, aussi appelé zone des cellules T, et les follicules lymphoïdes B.

Les follicules B ou follicules lymphoïdes (Figure 31 B), sont composés d'un centre germinatif entouré par un manteau. Le centre germinatif est constitué principalement de cellules B lorsque le follicule est sous sa forme « primaire », c'est-à-dire non stimulé par un antigène. La capture d'un antigène par les cellules dendritiques folliculaire va déclencher la formation de follicules secondaires. Le centre germinatif produit alors des cellules B mémoires spécifiques de l'antigène. Les follicules secondaires sont composés de 3 zones distinctes :

- la zone sombre, composée d'un regroupement dense de cellules B, appelées centroblastes ;
- la zone claire constituée de centrocytes (cellules B regroupées moins densément que dans la zone sombre), en interaction avec des cellules dendritiques folliculaires ;
- la zone du manteau, entourant la zone claire et la zone sombre, composée de cellules B naïves.

Les manchons artériolaires péri lymphatiques (Figure 31A), sont aussi appelés « zones des cellules T », car sont majoritairement constitués de lymphocyte T, avec une prédominance de cellules T helper $CD4^+$ par rapport aux cellules T cytotoxiques $CD8^+$. Des cellules folliculaires dendritiques et quelques mastocytes sont aussi retrouvés. Cette zone est entourée d'une couche mince de lymphocytes B recirculant et de lymphocytes B commutés.

Ce compartiment est responsable de la remise en circulation, de la clairance des lymphocytes et de l'initiation de la réponse immunitaire contre les antigènes du sang.

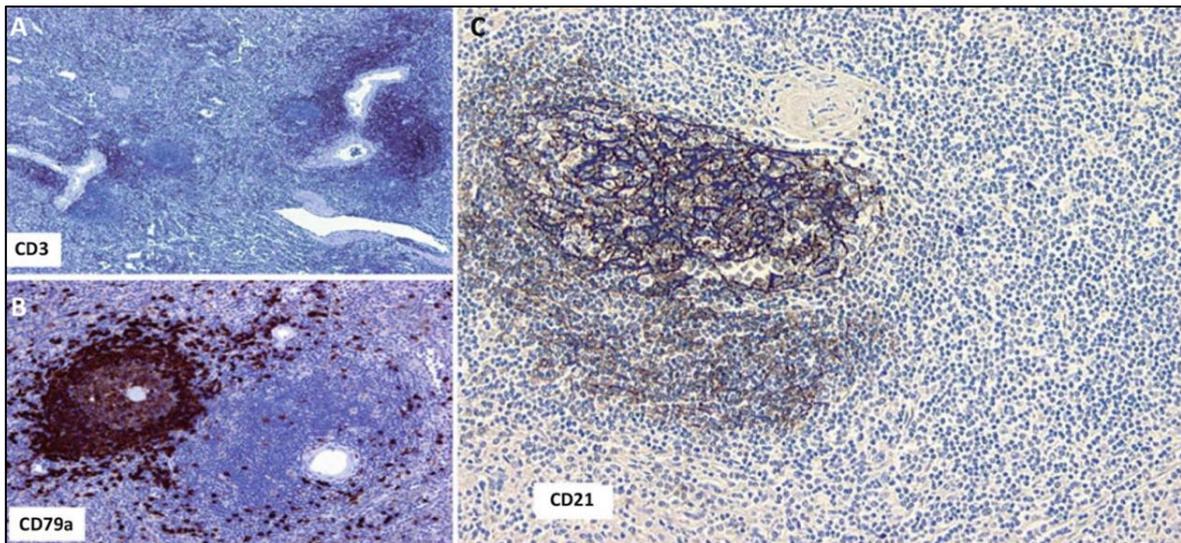


Figure 31 : Colorations immunohistochimiques de coupes histologiques spléniques (tirées de [225]). (A) Grossissement x40 avec l'anti-CD3 marquant la zone des cellules T des manchons artériolaires péri lymphatiques. (B) Grossissement x100 avec l'anti CD79a marquant la zone des cellules B du follicule. (C) Grossissement x100 avec l'anti CD21 soulignant le maillage des cellules dendritiques folliculaires.

1.3.1.3. La zone périfolliculaire

Chez l'Homme à partir de l'âge de 2 ans environ, la pulpe rouge et la pulpe blanche sont connectées grâce à la zone périfolliculaire. Elle est constituée de fibroblastes, de cellules dendritiques, de lymphocytes et de macrophages. C'est une zone de transit important pour les cellules quittant la circulation sanguine. Des fibroblastes et des macrophages spécialisés effectuent un premier tri cellulaire, permettant une circulation sélective : les lymphocytes circulent vers la pulpe blanche tandis que les GR sont dirigés vers la pulpe rouge.

1.3.2. Rôle mécanique [43]

Grâce à son architecture vasculaire unique, la pulpe rouge de la rate joue le rôle de filtre afin d'éliminer les pathogènes sanguins, mais aussi de contrôler la qualité des GR circulants. En effet, il existe deux types de circulations par lesquelles les GR passent pour rejoindre la circulation veineuse : la circulation fermée et rapide (environ 80 à 90 % du flux) et la circulation ouverte et lente (environ 10 à 20 % du flux) (Figure 32).

Dans la circulation rapide et fermée, le flux sanguin provenant de l'artériole se poursuit dans la lumière du sinus veineux. Les GR sont alors dirigés vers les veines spléniques pour rejoindre la circulation systémique.

Dans la circulation ouverte et lente, les GR sont déversés depuis les artérioles directement dans le réseau réticulaire des cordons de Billroth. Le flux est environ 20 fois plus lent que dans la circulation rapide. Ainsi, les GR peuvent avoir un contact étroit et prolongé avec les macrophages spléniques qui phagocytent les pathogènes et les cellules altérées. Les cellules ayant passé ce premier tri subissent un autre tri en traversant les fentes inter-endothéliales du sinus veineux pour rejoindre la circulation rapide. Cette filtration exigeante assurée par les fentes inter-endothéliales (mesurant environ 1 μm de large) permet la rétention des globules altérés peu déformables, mais aussi l'élimination des corps anormaux intra-érythrocytaires sans lyse du GR. Il s'agit là du phénomène de pitting [226].

Les GR non déformables ne pouvant pas passer à travers les fentes inter-endothéliales sont retenus et phagocytés par les macrophages de la pulpe rouge. Les propriétés biomécaniques des GR sont testées lors de chaque passage par la circulation lente splénique, soit environ un passage sur 10, donc toutes les 2 à 3 heures.

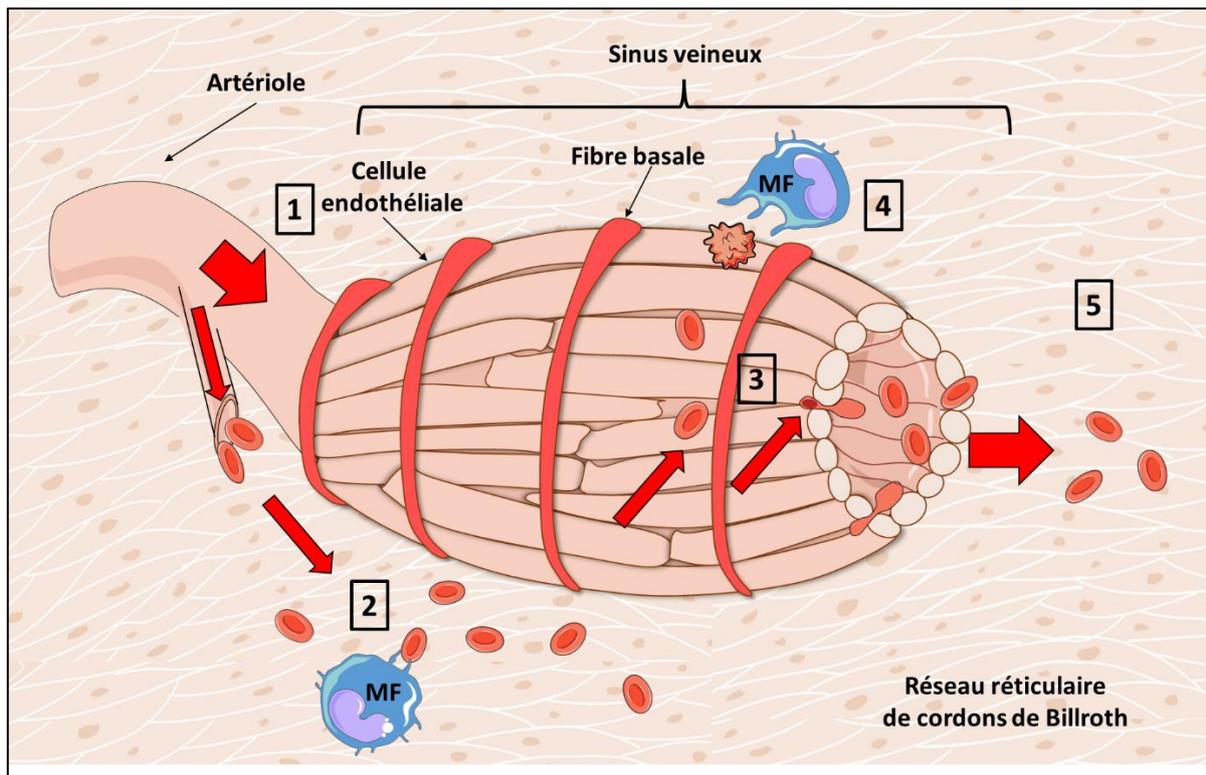


Figure 32 : Schéma de la microcirculation des GR dans la rate. (1) Circulation rapide et fermée à travers la lumière de l'artériole et du sinus veineux. (2) Circulation ouverte et lente dans le réseau réticulaire des cordons de Billroth, les GR altérés sont reconnus et phagocytés. (3) Pitting des corps d'inclusion et filtration des GR à travers les fentes inter-endothéliales. (4) Phagocytose des GR non déformables. (5) Remise en circulation des GR (dans la lumière des veinules, dont la paroi n'est pas montrée sur ce schéma) ayant passé la filtration splénique avec succès. MF : Macrophage. Les flèches rouges indiquent le sens de circulation.

1.3.3. Rôle immunologique

En tant qu'organe lymphoïde secondaire le plus gros du corps humain, la rate peut initier des réponses immunitaires innées et adaptatives pour éliminer les antigènes circulants solubles ou présents à la surface d'éléments corpusculaires (cellules, microorganismes). C'est un réservoir important de cellules B mémoires et de monocytes. Il a été montré que les patients aspléniques étaient plus susceptibles de développer des infections, notamment à cause de la quantité réduite des cellules B mémoires exprimant les IgD et le CD47, et un taux d'IgM spécifiques réduit, par exemple contre le pneumocoque.

La pulpe rouge contient des plasmocytes et des macrophages. Les macrophages sont impliqués dans la phagocytose des GR altérés et participent au stockage/recyclage du fer. Les

plasmocytes sécrètent des anticorps spécifiques de l'antigène et participent donc à l'immunité adaptative humorale. La pulpe blanche contient des lymphocytes T et B. La rencontre avec l'antigène permet d'activer la synthèse d'immunoglobulines spécifiques d'antigènes et d'opsonines, impliquées dans l'immunité adaptative. La rate peut également réguler les réponses immunitaires délétères et pourrait être impliquée dans des phénomènes de tolérance immunologique [227].

1.3.4. La rate au cours de l'infection par *Plasmodium falciparum*

Lors de l'infection plasmodiale, le GR subit diverses modifications biomécaniques et se rigidifie de façon croissante durant la maturation du parasite. Des expériences de perfusions *ex vivo* de GRi dans des rates humaines ont montré qu'une proportion de GR infectés par des stades rings (environ la moitié), et presque la totalité des GR infectés par des stades matures, sont retenus dans la rate [39]. Cependant, *in vivo* ces derniers échappent à la filtration splénique en cytoadhérant. La rétention des stades rings se déroule dans la pulpe rouge de la rate, précisément par filtration à travers les fentes inter-endothéliales. Cette rétention permet de ralentir la charge parasitaire en circulation, et donc réduire le nombre de parasites capables de cytoadhérer et d'être séquestrés dans les autres organes, réduisant le risque de développement de neuropaludisme [228]. Cependant, cela implique une congestion splénique et donc un risque accru d'anémie, en lien probable avec la fréquence élevée de la splénomégalie lors de l'anémie palustre grave.

L'accès palustre aigu augmente également la capacité de la rate à éliminer tous les GR, parasités ou non, induisant l'apparition d'une splénomégalie. La splénomégalie est associée à un avantage de survie [229]. Les modifications des GRi augmentent l'érythrophagocytose par les monocytes durant l'infection palustre aiguë [22]. Une proportion de cette phagocytose se déroule dans la rate (Figure 33) [224], [230]–[232].

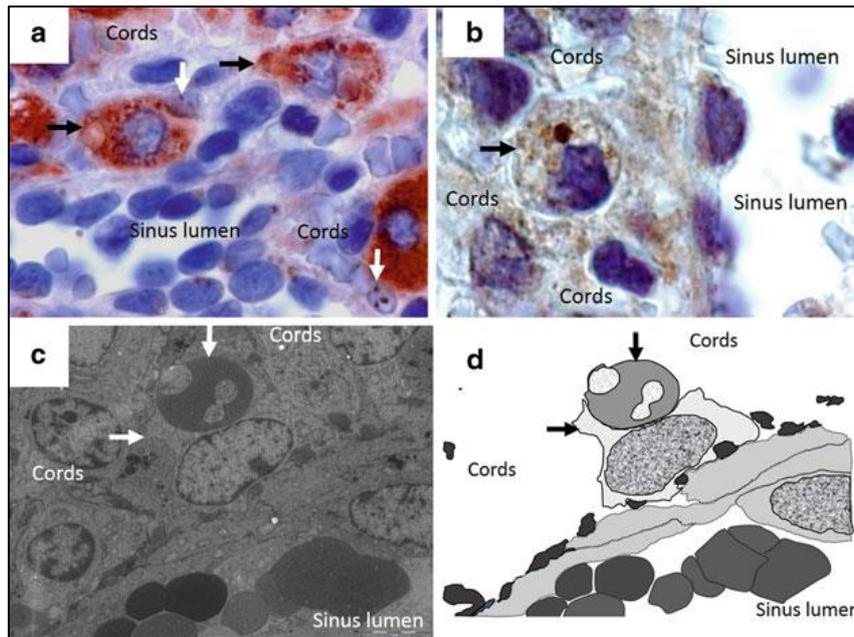


Figure 33 : Phagocytose des GRi dans les cordons de la pulpe rouge (tiré de [224]). Immunohistochimie avec un anticorps anti-CD68 (a, 400), un anticorps anti-*P. falciparum* (b, 600), et la microscopie électronique à transmission (2 000) d'une rate humaine perfusée *ex vivo* montrent (flèches verticales) soit en contact étroit avec des macrophages (a, flèches horizontales), soit sous la forme d'un résidu parasitaire dans une cellule phagocytaire dans les cordons (b).

L'infection palustre peut provoquer dans de rares cas des complications spléniques spécifiques comme une rupture splénique, un hématome intra-splénique ou bien un infarctus splénique [233].

Plusieurs études récentes ont démontré le rôle de la rate dans le portage chronique parasitaire. Il existe en outre une relation entre le portage chronique, l'anémie et la splénomégalie, observée notamment au Ghana et en Indonésie [234] [235]. L'étude menée en Indonésie, sur des rates de patients non traités subissant une splénectomie pour une raison autre que le paludisme, a montré que des GRi sont fortement concentrés dans la rate. De plus, des accès palustres aigus survenant quelques semaines après splénectomie ont été décrits chez les porteurs chroniques qui ne sont plus exposés à la transmission du paludisme [236]. Ces observations suggèrent que la rate peut constituer un abri pour le parasite, permettant probablement un cycle parasitaire intrasplénique [43], [228].

Enfin, après traitement, la rate contribue à l'élimination du parasite et à la remise en circulation du GR anciennement parasité par pitting. Ce processus est expliqué plus précisément dans le chapitre correspondant.

1.4. Problématique du travail de thèse

Les traitements antipaludiques à base de dérivés d'artémisinine (DA) ont prouvé leur supériorité par rapport aux dérivés quinoléiques, grâce à leur action étendue aux stades parasitaires jeunes circulants. Ils réduisent la mortalité en prévenant la séquestration des globules rouges parasités en circulation au moment de la mise sous traitement. Ils limitent également la profondeur de l'anémie post-thérapeutique précoce en induisant le pitting des GRi, qui restent en circulation sous forme de GR pittés plutôt que d'être éliminés. Cependant, l'anémie post-artémisinine retardée qui peut être sévère, est associée à la destruction des GR pittés et constitue l'effet secondaire le plus fréquent du traitement du paludisme grave chez l'adulte. Par ailleurs, chez les enfants avec une immunité antipaludique acquise avec l'âge en zone d'endémie, la clairance parasitaire après le traitement par des DA est indépendante du pitting. L'incidence et l'impact de ces anémies retardées chez l'enfant africain restent donc une question importante dans la prise en charge du paludisme grave, étant donné que cette population constitue plus de 70 % des cas de paludisme en Afrique.

L'infection et le traitement par les DA modifient donc profondément les GR circulants en faisant émerger dans un premier temps les GRi puis les GR pittés et très probablement une 3^{ème} sous-population de GR non infectés, mais altérés. La contribution relative de différentes sous-populations de GR aux anémies post-thérapeutiques précoce et retardée reste mal connue.

La compréhension des mécanismes induisant ces anémies peut contribuer à améliorer la prise en charge des patients, et peut constituer un modèle physiopathologique d'analyse des anémies en général.

1.4.1. Hypothèses de travail

Lors du paludisme traité par les DA, on peut observer une anémie dans les premiers jours suivant le traitement, puis une anémie retardée au-delà de 7 jours post-traitement, alors même qu'il n'y a plus de parasites en circulation. Notre hypothèse est que l'élimination des GRi et des GR pîtés n'explique pas la totalité de la perte des GR ni pour l'anémie précoce ni pour d'anémie retardée. Selon cette hypothèse, l'infection et le traitement induisent des modifications affectant les GRi, les GR pîtés mais aussi une partie importante des GR n'ayant jamais été infectés. En fonction du type d'altération, l'élimination des GR pourrait s'expliquer par une rétention mécanique dans la rate et/ou via des interactions cellule-cellule plus conventionnelles opérant dans la rate, le foie ou d'autres organes ou espaces microcirculatoires (**Figure 34**).

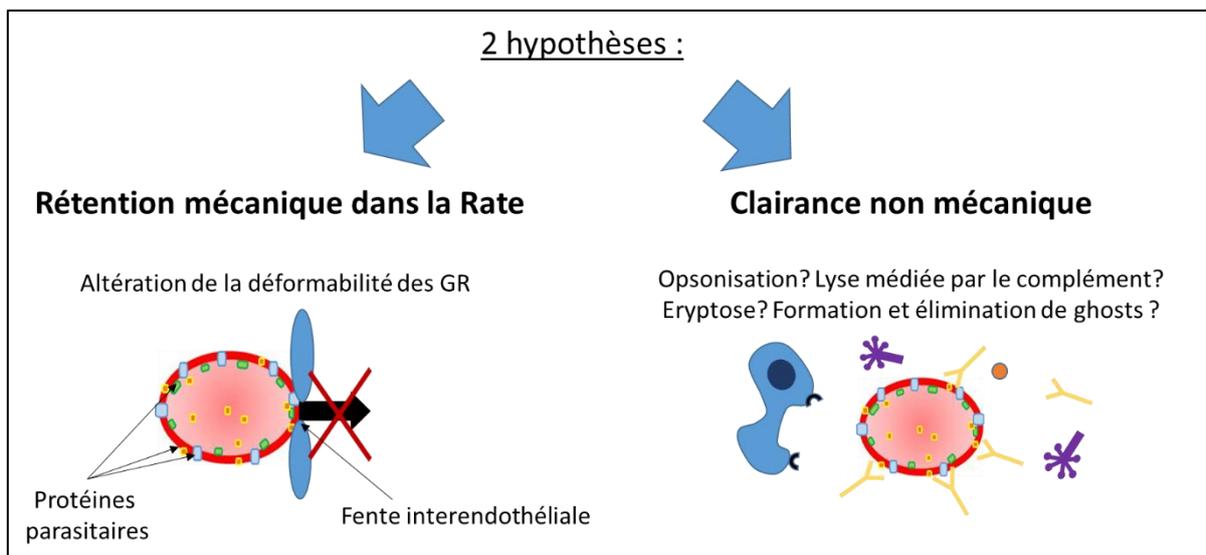


Figure 34 : Représentation schématique des hypothèses de travail.

1.4.2. Objectifs spécifiques

L'objectif général de cette thèse est de comprendre les modifications des globules rouges et les mécanismes causant les anémies post-artémisinine dans le paludisme grave d'importation.

Nos principaux objectifs durant cette thèse étaient :

- a)** De décrire les altérations affectant les sous-populations de GR circulants avant et après traitement par dérivés de l'artémisinine et de déterminer leur contribution à l'anémie
- b)** D'évaluer l'incidence de l'anémie hémolytique retardée chez l'enfant atteint de paludisme grave d'importation
- c)** De déterminer les mécanismes effecteurs de l'élimination des GR durant ces anémies

Résultats

2.1. Altération des sous populations érythrocytaires et anémie post-traitement dans le paludisme grave

Au cours du paludisme, les GR subissent de multiples altérations corrélées à la gravité de la maladie [36] [238]. L'exploration de la pathogenèse de l'anémie au cours du paludisme est confrontée à l'émergence de plusieurs sous-populations de GR avant et après le traitement. Les GRi accumulent des altérations moléculaires à mesure que le parasite mature dans son GR hôte, puis apparaît une sous-population induite par le traitement aux dérivés d'artémisinine : les GR pittés. Cependant, l'élimination des GR en post-thérapeutique précoce ne se limite pas à la clairance des GRi ou des GR pittés. La biomasse des GR éliminés pendant l'anémie post-infection et le traitement est en effet plus grande que ces sous-populations cumulées [2] [13] [36]. Les mécanismes par lesquels chaque sous-population de GR est éliminée sont encore essentiellement inconnus. Différentes modifications des GR ont été décrites au cours du paludisme. Les GRi deviennent sphériques et rigides et ont une déformabilité diminuée qui est corrélée avec une perte du ratio surface/volume [13] [134] [238]. En outre, il a été montré que pendant l'infection, il y a une diminution de la déformabilité des GR circulants qui est corrélée à la gravité de l'accès. Il a été suggéré que cette diminution de déformabilité est principalement due aux GRni [36], [238]. Ces changements contribuent probablement à la clairance des GR dans la rate, puisque les GR moins déformables sont retenus mécaniquement en amont des fentes inter-endothéliales [239]. Enfin, la composition lipidique de la membrane érythrocytaire intervient dans la capacité des GR à rester en circulation. En interagissant avec la spectrine, le contenu lipidique de la membrane plasmique joue un rôle important dans la déformabilité et la stabilité des GR. Des altérations telles que l'augmentation du rapport cholestérol/phospholipides conduisent à une diminution de la fluidité membranaire et compromettent également l'équilibre osmotique [118] [154] [160] [240].

Nous avons exploré les modifications des propriétés biochimiques et fonctionnelles des GR circulants chez les patients atteints de paludisme grave à *Pf*, avant et après traitement par dérivés de l'artémisinine. Les résultats sont présentés dans l'article ci-dessous :



Altered Subpopulations of Red Blood Cells and Post-treatment Anemia in Malaria

Charlotte Chambrier¹, Mallorie Depond¹, Lucia Angella¹, Oussama Mouri², Eric Kendjo², Aurélie Fricot-Monsinjon¹, Camille Roussel^{1,3}, Sylvestre Biligui², Ilhame Tantaoui², Aida Taieb², Nicolas Argy⁴, Sandrine Houzé⁴, Renaud Piarroux⁵, Jean-Yves Siriez⁶, Stéphane Jaureguiberry⁷, Sébastien Larréché⁸, Marc Théliier⁵, Nicolas Cenac⁹, Pierre Buffet^{1†} and Papa Alioune Ndour^{1*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Albe Swanepoel,
North-West University, South Africa

Reviewed by:

Adesola Ademiloye,
Swansea University, United Kingdom

Colby T. Ford,

University of North Carolina at
Charlotte, United States

*Correspondence:

Papa Alioune Ndour
ndourmail@yahoo.fr

†These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Red Blood Cell Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 13 February 2022

Accepted: 14 March 2022

Published: 05 April 2022

Citation:

Chambrier C, Depond M, Angella L, Mouri O, Kendjo E, Fricot-Monsinjon A, Roussel C, Biligui S, Tantaoui I, Taieb A, Argy N, Houzé S, Piarroux R, Siriez J-Y, Jaureguiberry S, Larréché S, Théliier M, Cenac N, Buffet P and Ndour PA (2022) Altered Subpopulations of Red Blood Cells and Post-treatment Anemia in Malaria. *Front. Physiol.* 13:875189. doi: 10.3389/fphys.2022.875189

¹Biologie Intégrée du Globule Rouge, Université de Paris, Université des Antilles, Paris, France, ²Centre National de Référence du Paludisme, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France, ³Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Paris, France, ⁴Centre National de Référence du Paludisme, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France, ⁵Sorbonne Université, Centre National de Référence du Paludisme, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France, ⁶Service d'accueil des Urgences Pédiatriques, Hôpital Robert Debré, Paris, France, ⁷Service Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bicêtre, Krimlin Bicêtre, France, ⁸Département de Biologie Médicale, Hôpital d'Instruction Des Armées Bégin, Saint-Mandé, France, ⁹IRSD, INSERM, INRA, INPENV, Université de Toulouse, Toulouse, France

In acute malaria, the bulk of erythrocyte loss occurs after therapy, with a nadir of hemoglobin generally observed 3–7 days after treatment. The fine mechanisms leading to this early post-treatment anemia are still elusive. We explored pathological changes in RBC subpopulations by quantifying biochemical and mechanical alterations during severe malaria treated with artemisinin derivatives, a drug family that induce “pitting” in the spleen. In this study, the hemoglobin concentration dropped by 1.93 G/dl during therapy. During the same period, iRBC accounting for 6.12% of all RBC before therapy (BT) were replaced by pitted-RBC, accounting for 5.33% of RBC after therapy (AT). RBC loss was thus of 15.9%, of which only a minor part was due to the loss of iRBC or pitted-RBC. When comparing RBC BT and AT to normal controls, lipidomics revealed an increase in the cholesterol/phosphatidylethanolamine ratio (0.17 versus 0.24, $p < 0.001$) and cholesterol/phosphatidylinositol ratio (0.36 versus 0.67, $p = 0.001$). Using ektacytometry, we observed a reduced deformability of circulating RBC, similar BT and AT, compared to health control donors. The mean Elongation Index at 1.69Pa was 0.24 BT and 0.23 AT vs. 0.28 in controls ($p < 0.0001$). At 30Pa EI was 0.56 BT and 0.56 AT vs. 0.60 in controls ($p < 0.001$). The retention rate (rr) of RBC subpopulations in spleen-mimetic microsphere layers was higher for iRBC (rr = 20% $p = 0.0033$) and pitted-RBC (rr = 19%, $p = 0.0031$) than for healthy RBC (0.12%). Somewhat surprisingly, the post-treatment anemia in malaria results from the elimination of RBC that were never infected.

Keywords: P. falciparum, artemisinin derivatives, malaria anemia, RBC deformability, spleen filtering function, pitted or once infected RBC, membrane lipid balance

INTRODUCTION

Malaria is the deadliest parasitic disease worldwide with half of the population exposed to the risk of infection by *Plasmodium falciparum*. The leading cause for morbidity and mortality in malaria is anemia, mainly due to the loss of red blood cells (RBC), that predominantly occurs after treatment (Price et al., 2001; Jaureguiberry et al., 2014; White 2018). Multiple RBC alterations have been described during malaria, including decreased deformability (Cranston et al., 1984; Safeukui et al., 2013; Jaureguiberry et al., 2014) that correlates with disease severity (Dondorp et al., 1999; Dondorp et al., 2002). These alterations may contribute to RBC clearance in the spleen. Less deformable RBC are indeed mechanically retained in inter-endothelial slits in the splenic red pulp (Deplaine et al., 2011). The lipid composition of the RBC membrane also interferes with the ability of RBC to stay in circulation. By interacting with spectrin, plasma membrane lipid content plays indeed an important role in the deformability and stability of RBC. Alterations such as the increase in the cholesterol/phospholipid ratio lead to a decrease in membrane fluidity and also compromise the osmotic balance (Sagawa and Shiraki 1978; Chabanel et al., 1983; Sarkar et al., 2018; Martinez-Vieyra et al., 2019). Multiple surface alterations of infected and uninfected RBC have also been described (Leech et al., 1984; Pouvelle et al., 2000; Awah et al., 2011).

The exploration of how malaria induces anemia is further complexified by the emergence of several RBC subpopulations before and after therapy. Infection obviously creates a new subpopulation of infected RBC (iRBC) with increasing molecular alterations as the parasite matures in its host cell (Fraser et al., 2021), but therapy also induces the emergence of new subsets. Artemisinin derivatives (AD), the most effective antimalarial drugs available, recommended as first-line treatment for severe malaria (WHO Report, 2010), act on all asexual parasite stages, including circulating rings (Rolling et al., Udomsangpetch et al., 1996, Dondorp et al., 2005) When RBC containing AD-altered rings cross the spleen, the parasite remnant is expelled and the pitted RBC returns to the circulation (Angus et al., 1997). The relative contributions to malarial anemia of the clearance of iRBC, pitted RBC and RBC that were never infected (niRBC) have not been analyzed in detail so far in early post-treatment anemia.

We explored the modifications of biochemical and functional properties of circulating RBC in patients with severe malaria before and after treatment with AD, with focus on iRBC and pitted RBC.

MATERIALS AND METHODS

Study Cohort

Between 2017 and 2021, blood samples were collected from 29 patients with imported severe malaria with hyperparasitemia (>4% parasitemia) in France. Severe cases were defined by a positive blood smear with asexual forms of *P. falciparum* associated with at least one of the WHO's severity criteria.

All the patients included were involved in the national surveillance program of the French National Reference Center for Malaria and were treated by first-line treatment with intravenous artesunate (2.4 mg/kg, Guilin Pharmaceutical), or other artemisinin derivatives (Eurartesim 320 mg/40 mg, ≥ 35 kg: four tablets; or artemether Lumefantrine 20 mg/120 mg, ≥ 75 kg: 4 tablets).

Lipidomic Analysis by HPLC and MS/MS

RBC from patients before or after treatment and RBC control from blood bank were washed 4 times in RPMI 1640 GlutaMAX containing HEPES (Life Technologies) and cryopreserved in 50% PBS1X in liquid nitrogen until lipidomic analysis by HPLC and MS/MS. Lipid extraction was performed according to a modified chloroform/ methanol (2:1, v/v) procedure (Petkovic et al., 2005). Briefly, frozen samples were transferred into a 15 ml tube and 2 ml of chloroform/methanol (2:1, v/v) was added; chloroform (Sigma 288,,306-1 L), methanol (Fisher 10675112). The suspension was vortexed and incubated at room temperature with agitation for 20 min. After the incubation, 400 µL of 0.9% NaCl was added to the mixture and was then vortexed and centrifuged at 500 x g for 10 min to separate the organic phase from the aqueous phase. The chloroform (lower) layer was transferred into a new 1.5 ml tube and was centrifuged at 500 x g for 10 min. Finally, the supernatant was collected without touching the pellet and was transferred into a new 1.5 ml tube. Internal standards (Cer d18: 1/15:0, 16 ng; PE 12:0/12:0, 180 ng; PC 13:0/13:0, 16 ng; SM d18:1/12:0, 16ng; PI 16:0/17:0, 30ng; PS 12:0/12:0, 156.25ng; all from Avanti Polar Lipids) were added to 45 µL of lipid extract. Sample solutions were analyzed using an Agilent 1290 UPLC system coupled to a G6460 triple quadrupole spectrometer (Agilent Technologies). MassHunter software was used for data acquisition and analysis. A Kinetex HILIC column (Phenomenex, 50 × 4.6 mm, 2.6 µm) was used for LC separations. The column temperature was maintained at 40°C. Mobile phase A was acetonitrile and B was 10 mM ammonium formate in water at pH 3.2. The gradient was as follows: from 10 to 30% B in 10 min, 100% B from 10 to 12 min, and then back to 10% B at 13 min for 1 min to re-equilibrate prior to the next injection. The flow rate of the mobile phase was 0.3 ml/min, and the injection volume was 5 µL. An electrospray source was employed in positive (for Cer, PE, PC, and SM analysis) or negative ion mode (for PI and PS analysis). The collision gas was nitrogen. Needle voltage was set at +4,000 V. Several scan modes were used. First, to obtain the naturally different masses of different species, we analyzed cell lipid extracts with a precursor ion scan at 184 m/z, 241 m/z, and 264 m/z for PC/SM, PI, and Cer, respectively. We performed a neutral loss scan at 141 and 87 m/z for PE and PS, respectively. The collision energy optimums for Cer, PE, PC, SM, PI, and PS were 25 eV, 20 eV, 30 eV, 25 eV, 45 eV, and 22 eV, respectively. The corresponding SRM transitions were used to quantify different phospholipid species for each class. Two MRM acquisitions were necessary, due to important differences between phospholipid classes. Data were treated

with QqQ Quantitative (vB.05.00) and Qualitative analysis software (vB.04.00).

Parasitized and Pitted RBC Staining

RBC from patients before or after treatment and RBC control were washed 4 times in RPMI 1640 GlutaMAX containing HEPES (Life Technologies) and fixed with 1% glutaraldehyde diluted in PBS 1X. After two washes in PBS1X, samples were incubated with a human polyclonal hyper immune serum (Buffet et al., 2006) at 1:10 in PBS with 1% Albumax II (Life Technologies) and 0.1% Triton X100 (Sigma Aldrich) for membrane permeabilization. After 25 min of incubation under agitation, samples were washed two times in PBS1X and incubated with a secondary antibody goat anti-human IgG coupled with either Alexa Fluor 488 or 568 at 1:500 (Life technologies) or Dylight755 (Invitrogen) at 1:100. Based on the color of the secondary antibody already used, DNA was labeled with either Hoechst 34,580 at 1:1000 or SybrGreen at 1: 5000 (Life Technologies) for 25 min. Parasitemia and pitemia were finally measured by the cytometer BD FACSCanto™II, BD Biosciences and analyses were performed using FlowJo software.

Deformability Assessment by Ektacytometry

After blood collection, elongation indexes of each sample diluted at 1:100 in Polyvinylpyrrolidone polymers buffer (RR mechatronics) were measured by ektacytometry with shear stress from 0.3 to 30Pa. All the samples were processed within 48 h after blood collection. A laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORRCA, RR Mechatronics) was used to calculate the elongation index, which is defined as the ratio of the difference between two axes of the ellipsoidal diffraction pattern and the sum of these two axes. An elongation index at 1.69 Pa shear stress reflects deformability due to membrane rigidity and 30 Pa shear stress reflects deformability due to intern viscosity (Baskurt OK et al. Clin Hemorheol Microcirc. 2009). A one-way Anova parametric unpaired t-test with Bonferroni's correction was performed for statistical analysis.

Microsphiltration Assays

Filtration of RBCs was performed using a mix of calibrated metal microbeads (Industrie des Poudres Sphériques, France), composed of 70% of 5–15 µm diameter and 30% of 15–25 µm diameter and supported by a layer of 25–45 µm diameter microbeads. The beads were distributed in a special 96-well plate adapted for microsphiltration as described in Deplaine et al. Blood 2011. RBCs were prepared at 2% hematocrit (or 1% if parasitemia exceeded 10%) in PBS 1X/1% Albumax II. For each well, 200 µL of RBC suspension were loaded and filtered by aspiration. Wells were flushed with 1.6 ml of PBS/ 1% Albumax II and downstream suspension was collected. Healthy RBC fixed with 1% glutaraldehyde or not were used as controls. Retention rate was calculated as following $[(\% \text{ Downstream} - \% \text{ Upstream})/\% \text{ Upstream}] \times 100$. Positive values represented enrichments and negative values retentions.

Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM six software. For Hb comparison before and after therapy, only patients with available data in both periods were analyzed by a paired t-test with a normal distribution (D'Agostino and Pearson test). Differences at $p < 0.05$ were considered significant. For populational analysis, deformability index and retention rate in microsphiltration, RBC parameters were compared before and after therapy and with healthy RBC from blood bank. Anova test was used when appropriate with a Bonferroni correction. One asterisk (*) identifies adjusted p values between 0.01 and 0.05, two asterisks (**) identify adjusted p values between 0.01 and 0.001.

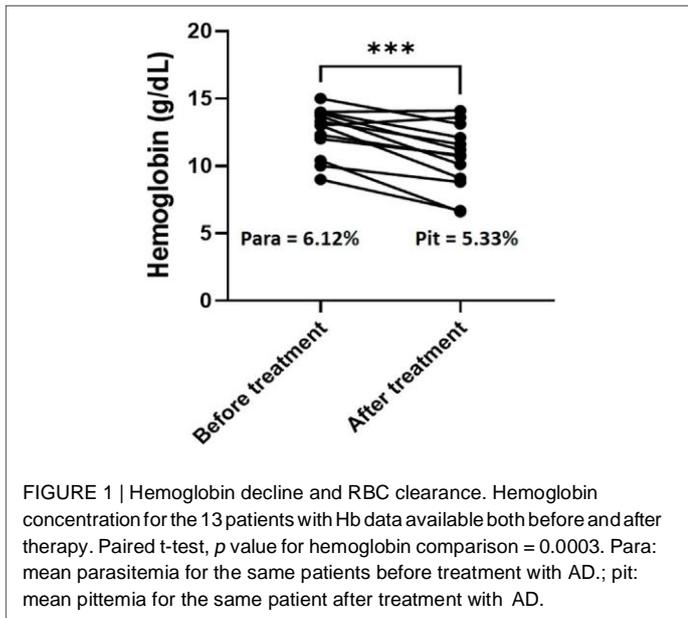
RESULTS

Magnitude of Early Post-treatment Anemia and Clearance of Different RBC Subpopulations

Hemoglobin (Hb) decline was 1.93G/dl with a mean Hb level of BT of 12.86 G/dl vs. 11.01 G/dl AT ($n = 13, p = 0.0003$, Figure 1). RBC loss was thus of 15.9% (or less since a small part of the hemoglobin drop was due to hemodilution AT (Levin et al., 2001; Drevon et al., 2021). During the same period, the loss of iRBC was 5.9%, and the gain of pitted RBC was 5.1% of all RBC, corresponding to a net loss of 0.8% of total RBC. Altogether, the net loss of the subpopulation of RBC directly modified by invasion of RBC by parasites accounted for minor part of the total loss of RBC during this period. The bulk of Hb loss was therefore related to the elimination of RBC that had never been infected (niRBC).

Infection and Treatment Alter the Cholesterol/Phospholipids Ratio in the Membrane of Circulating RBC

We measured the composition of lipids (*de novo* biosynthesis or uptake by *P. falciparum*) in RBC samples BT and at complete clearance of parasites AT. A lipidomic analysis including cholesterol (Chol), four phospholipids (phosphatidylethanolamine: PE, phosphatidylinositol: PI, phosphatidylcholine: PC and phosphatidylserine: PS), and two sphingolipids (ceramide and sphingomyelin) was performed by HPLC and MS/MS on membrane extracts from RBC collected in infected patients BT and AT. RBC from healthy donors were used as controls. Regarding ceramide, PC, PS and sphingomyelin, no significant variations were observed between RBC from healthy donors and RBC from infected patients either BT or AT. Conversely, compared to healthy controls (400.5 arbitrary units (AU), $n = 12$, Figure 2), total Chol amounts were slightly higher than controls BT (433.6, $p = 0.491$) and significantly higher than controls AT (479.5 AU, $p = 0.020$). Compared to healthy controls, PE and PI contents were higher BT (2,111 vs. 2665 AU, $n = 10, p = 0.021$ for PE and 883 vs. 1192 AU, $n = 10, p = 0.095$ for PI, Figure 2A); and then decreased significantly AT to control levels (2082 AU, $n = 12, p = 0.009$ for PE and 850 AU, $n = 12, p = 0.0462$ for PI, Figure 2A). When we analyzed Chol/PE or



Chol/PI ratio that are associated with membrane deformability and stability, both the Chol/PI and Chol/PE ratio increased significantly AT compared to BT (0.24 vs. 0.17, $p < 0.001$ for Chol/PE and 0.67 vs. 0.36 for Chol/PI, $p = 0.001$, Figure 2B). These results suggest that infection, treatment, and pitting altered the lipid composition of RBC plasma membranes.

The Deformability and Retention of Circulating RBC Is Similarly Reduced Before and After Treatment

Changes in the lipid contents of RBCs have been shown to be associated to altered deformability and may contribute to their elimination by the spleen (Sarkar et al., 2018; Martinez-Vieyra et al., 2019). The deformability of RBC collected either BT (parasitemia ranging from 1 to 10.7%, $n = 12$) or AT (concentrations of pitted RBC ranging from 0.4 to 12%, $n = 16$), was quantified by ektacytometry and compared to RBC from healthy donors (CTL, $n = 27$). RBC deformability was significantly lower than controls both BT and AT with and elongation Index (EI) at 1.69 Pa of 0.24 BT and 0.23 AT vs. 0.28 in healthy donors ($n = 28$, $p < 0.0001$). At 30 Pa EI was 0.56 BT and 0.56 AT vs. 0.60 in healthy donors ($n = 27$, $p < 0.001$) (Figures 3A, B). This suggests that their decreased deformability is related to infection-related increase in membrane rigidity or internal viscosity, or both. These results also show that alterations in circulating RBC are not immediately restored after treatment with AD. Finally, the ability of RBC subpopulations (iRBC BT and pitted RBC AT) to cross splenic inter-endothelial slits was assessed using a spleen-mimetic method where microsphere-based filters quantify the retention rates (rr) of RBC subpopulations (Deplaine et al., 2011; Ndour et al., 2015; Depond et al., 2019) (Figure 3B). Both iRBC ($n = 6$) and pitted RBC ($n = 7$)

were more retained in microsphere layers than healthy controls ($n = 8$), at strikingly similar levels (mean rr iRBC: 20% and rr pitted RBC: 19%, Figure 3C).

DISCUSSION

Our careful analysis of RBC properties in patients treated by AD for severe malaria shows that RBC from treated patients display substantially impaired functional alterations. iRBC and pitted RBC, the two subpopulations directly altered by parasite invasion followed by pitting, display similarly altered properties. The intensity of these alterations should result in their clearance by a normal spleen, but surprisingly they are observed in circulation. This suggest that the spleen less stringently senses and retains altered RBC during severe malaria than at baseline. Early anemia occurs despite this relative hyposplenism, and in this cohort, the bulk of Hb loss was therefore likely related to the elimination of RBC that had never been infected (niRBC). The fine mechanisms or their “by-stander” alteration and early clearance remain to be determined.

To maintain tissue homeostasis, healthy red blood cells (RBC) circulate in the vessels and non-vascularized areas in a permanent flow. After infection, *P. falciparum* acts to restore a nucleus in mature RBCs with *de novo* transcription, protein synthesis, and trafficking. Here, we explored the changes caused by the infection in different RBC subpopulations and their subsequent clearance following treatment of patients with the artemisinin derivatives (AD), the first-line recommended antimalarial therapy. Upon entry of merozoite, the properties of RBC plasma membrane complex are extensively modified through its association with early expressed parasite proteins such as the Ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA), which increase stability and rigidity (Pei et al., 2007).

In the context of malaria treated with AD, this maturation of circulating ring-infected RBC is rapidly stopped, and dead parasites are expelled from the host RBC without lysis in the pitting process (Chotivanich et al., 2000; Buffet et al., 2006; Ndour et al., 2015), the major mechanism of parasite clearance in malaria treated with AD (Ndour et al., 2015). In this study, ektacytometry—which measures a populational deformability index (Cranston et al., 1984)—showed a general decrease of this deformability in circulating RBC during infection and after treatment. This decreased deformability is then associated with anemia through a reduced hemoglobin (Hb) concentration (-1.93 g/dl) in patients treated with AD. By exploring the ability of the different RBC subpopulations to cross the spleen using microspherultration assays before and after treatment, we showed that iRBC and pitted RBC displayed a similar increased retention rate in clinical samples. This likely reflects similar alterations that result in the further elimination at least of pitted RBC during delayed anemia (Jaureguiberry et al., 2014), since the early drop in Hb (-15.9%) observed here is not explained by the decrease of iRBC and pitted RBC (-0.8% of all RBC during the three to five first day post-infection and therapy). We could not exclude that the dynamics and physiological mechanism of the infection of RBC, pitting and subsequent elimination of those

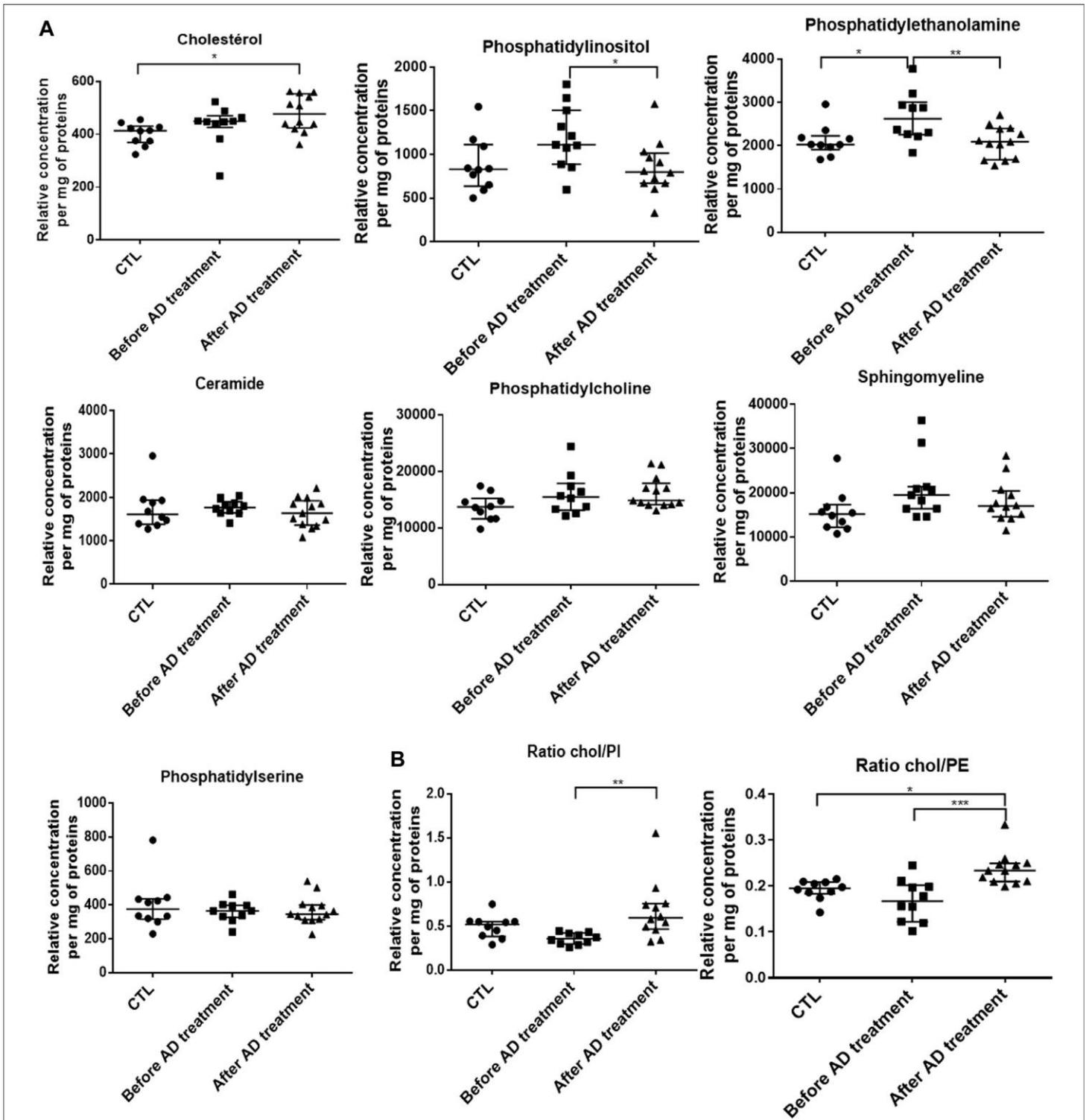


FIGURE 2 | Alterations of cholesterol and phospholipid RBC membrane composition before and after antimalarial therapy in severe malaria. (A). Lipid content of RBC membranes using HPLC and MS/MS on samples from 10 healthy donors (CTL), patients sampled before (N = 10) and after (N = 12) antimalarial therapy. (B). Cholesterol/Phosphatidylethanolamine (ratio Chol/PE) and Cholesterol/Phosphatidylinositol (ratio Chol/PI). Stars indicate significant differences.

subpopulations, can be hidden in the circulating RBC by the kinetics of the spleen filtering function. However, our results suggest that altered never infected (ni)RBC explain presumably the remaining biomass of eliminated RBC. In fact, in addition to parasite proteins, other factors may impact and deteriorate

deformability and the ability of RBC to circulate, since the content and balance of plasma membrane lipids may also change the biomechanical characteristics of RBC (Chabanel et al., 1983; Janero 1990; Martinez-Vieyra et al., 2019) and this balance is also dependent of RBC environment, where certain

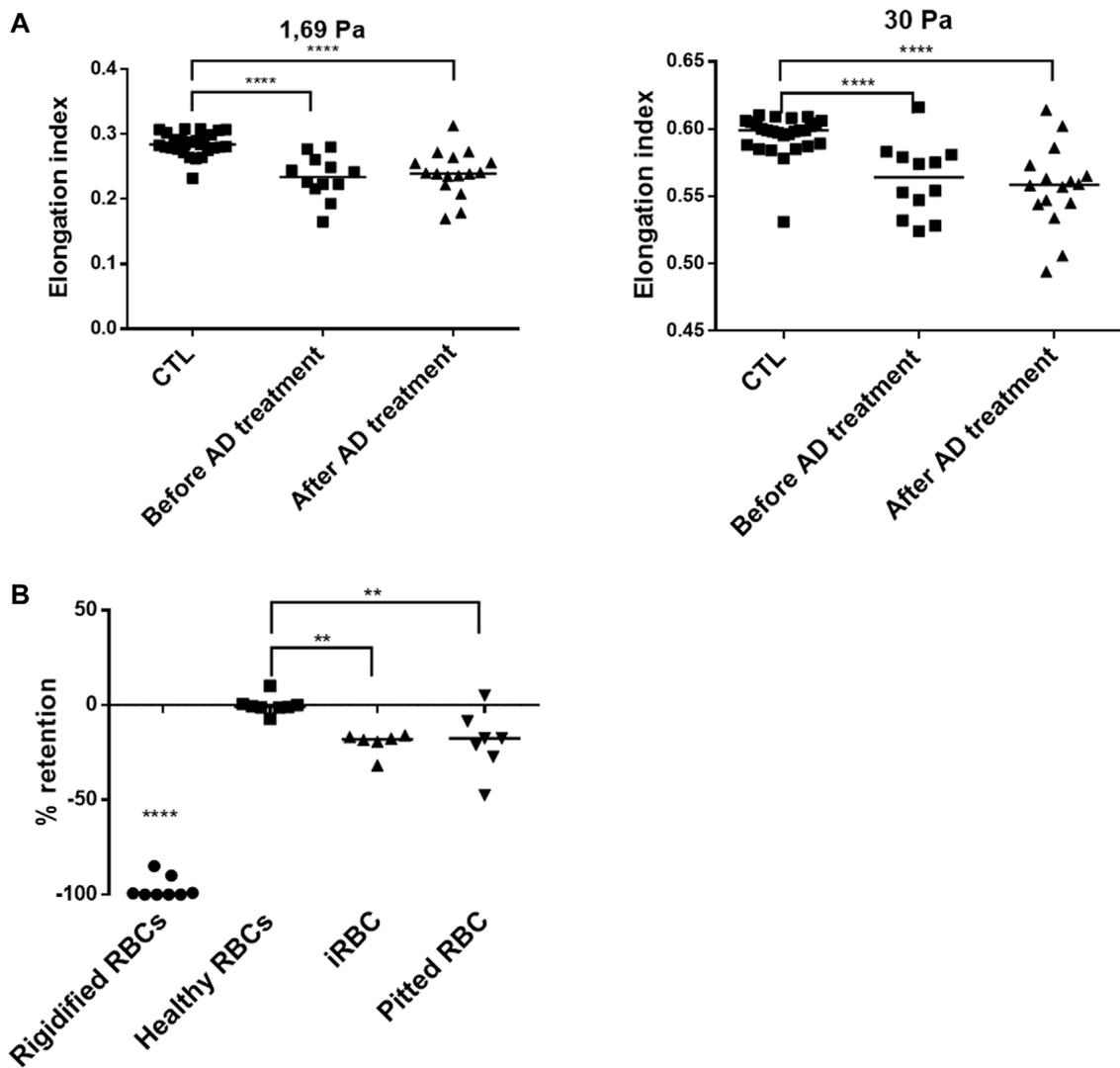


FIGURE 3 | Altered functional properties of circulating RBCs. (A). Elongation index at different shear stresses of RBC from patients before antimalarial therapy ($n=12$) or upon follow-up ($n=16$), compared to RBCs from healthy donors (CTL, $n=27$). (B). Retention of glutaraldehyde-fixed RBC (Rigidified RBC, $n=8$), healthy RBC ($n=8$), patient iRBC ($n=6$), and pitted RBC ($n=7$). Negative values reflect retention in microspheres; positive values reflect enrichment.

lipids directly come from, so infection environment is key determinant. Phospholipids such as phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), and phosphatidylinositol (PI) interact also with spectrin, contributing to the deformability and stability of erythrocytes by maintaining membrane asymmetry (Sarkar et al., 2018). *P. falciparum* is able to produce *de novo* several lipids such as phosphatidylcholine (PC), essential for its metabolism (Pessi et al., 2004), but it lacks a *de novo* cholesterol (Chol) biosynthesis pathway. Parasites need to uptake it from its immediate blood environment via the RBC plasma membrane (Hayakawa et al., 2021). Although Chol has been described to be depleted from the blood and surface membrane of iRBCs during maturation (Tran et al., 2016; Fraser et al., 2021; Hayakawa et al., 2021), we observe a general increase of Chol in whole cell analysis

of samples containing iRBC and then pitted RBC following treatment with AD. This likely reflects the sequestered Chol in circulating iRBC replaced later by pitted RBC or induced changes in the blood flow lipid composition affecting niRBC. While most of the other lipids studied did not vary during infection and after treatment or slightly increased (PC), lipidomic analysis revealed that several lipids from parasite *de novo* biosynthesis (PE and PI) increased during infection in samples containing iRBC and then decreased significantly after treatment and removal of dead parasites. These complex variations reveal the balance between lipid uptake, transport, or biosynthesis by parasite, before metabolism being arrested by AD treatment. As a consequence of these lipid balance fluctuations and alterations after infection and treatment, we observed a general increase in the Chol/PI or

PE ratio (Figure 2) associated with membrane destabilization (Chabanel et al., 1983; Janero 1990; Martinez-Vieyra et al., 2019). Taken together, these data showed that infection by *P. falciparum* induces modification of the proteins and the lipids located in the RBC plasma membrane and cytosol, resulting in a reduced deformability associated with spleen retention and clearance from the blood circulation. These modifications are maintained after treatment with AD. These results also demonstrate that, in addition to specifically and profoundly affecting certain RBC subpopulations, infection and treatment with AD seem to largely alter the circulating niRBC populations. This may explain why the magnitude of niRBCs lost is often higher than iRBC in malaria anemia (Day et al., 1996; Price et al., 2001; White 2018). A similar mechanism was suggested with the loss of pitted RBC in post-artesunate delayed hemolysis where loss of pitted RBC is higher (30-to-70% of all RBC eliminated (Jaureguiberry et al., 2014)). The changes in the RBC property impact their ability to circulate, to cross the spleen and may also induce RBC lysis or elimination through complementary immune mechanisms (Fernandez-Arias et al., 2016; Fraser et al., 2021).

Conclusion: *P. falciparum* infection, artesunate treatment, and pitting induce changes in the biochemical properties of circulating RBC and the early post treatment anemia is mainly due to the clearance of never infected RBC. Given the fact that circulating RBC are supposed to correspond to cells that are found to meet the standard quality control of the spleen (Crosby, et al., 1959), we can speculate that the significant increase in alterations observed in circulating RBC (pitted RBC) is due to a temporal change of the spleen threshold of retention and the further spleen function restoration likely delayed hemolytic anemia few days later (Jaureguiberry et al., 2014). The fine mechanisms or their “by-stander” alteration and early clearance remain to be determined.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

REFERENCES

- Angus, B. J., Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., and White, N. J. (1997). *In Vivo* removal of Malaria Parasites from Red Blood Cells without Their Destruction in Acute Falciparum Malaria. *Blood* 90 (5), 2037–2040. doi:10.1182/blood.v90.5.2037
- Awah, N., Balogun, H., Achidi, E., Mariuba, L. A., Nogueira, P. A., Orlandi, P., et al. (2011). Antibodies to the Plasmodium Falciparum Rhoptry Protein RAP-2/ RSP-2 in Relation to Anaemia in Cameroonian Children. *Parasite Immunol.* 33 (2), 104–115. doi:10.1111/j.1365-3024.2010.01259.x
- Buffet, P. A., Milon, G., Brousse, V., Correas, J.-M., Dousset, B., Couvelard, A., et al. (2006). *Ex Vivo* perfusion of Human Spleens Maintains Clearing and Processing Functions. *Blood* 107 (9), 3745–3752. doi:10.1182/blood-2005-10-4094
- Chabanel, A., Flamm, M., Sung, K. L., Lee, M. M., Schachter, D., and Chien, S. (1983). Influence of Cholesterol Content on Red Cell Membrane Viscoelasticity and Fluidity. *Biophysical J.* 44 (2), 171–176. doi:10.1016/s0006-3495(83)84288-x
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Dondorp, A., Williams, T., Angus, B., Simpson, J. A., et al. (2000). The Mechanisms of Parasite Clearance after Antimalarial Treatment of Plasmodium falciparum Malaria. *J. Infect. Dis.* 182 (2), 629–633. doi:10.1086/315718
- Cranston, H. A., Boylan, C. W., Carroll, G. L., Suter, S. P., Williamson, J. R., Gluzman, I. Y., et al. (1984). Plasmodium Falciparum Maturation Abolishes Physiologic Red Cell Deformability. *Science* 223 (4634), 400–403. doi:10.1126/science.6362007
- Day, N., Pham, T., Phan, T., Dinh, X., Pham, P., Ly, V., et al. (1996). Clearance Kinetics of Parasites and Pigment-Containing Leukocytes in Severe Malaria. *Blood* 88 (12), 4694–4700. doi:10.1182/blood.v88.12.4694. bloodjournal88124694
- Deplaine, G., Safeukui, I., Jeddi, F., Lacoste, F., Brousse, V., Perrot, S., et al. (2011). The Sensing of Poorly Deformable Red Blood Cells by the Human Spleen Can Be Mimicked *In Vitro*. *Blood* 117 (8), e88–e95. doi:10.1182/blood-2010-10-312801
- Depond, M., Henry, B., Buffet, P., and Ndour, P. A. (2019). Methods to Investigate the Deformability of RBC during Malaria. *Front. Physiol.* 10, 1613. doi:10.3389/fphys.2019.01613

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Patients provided consent according to a procedure common to all French National Reference Centers (available at: <https://www.santepubliquefrance.fr/a-propos/nos-principes-fondateurs/centres-nationaux-de-reference-pour-la-lutte-contre-les-maladies-transmissibles>). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC, MD, LA, OM, AF, CR, AT, IT, SB, EK, NA, SH, RP, JYS, SJ, SL, MT, NC, PB and PAN perform or design experiments. PAN supervised the work. CC and PAN wrote original draft of the manuscript. CC, NC, PB and PAN interpret the results and wrote the final version of the manuscript. NC, CC, MD, LA, EK, SJ, PB and PAN performed review and editing. PAN provided funding and resources.

FUNDING

PN was financially supported for this work by the Agence Nationale de la Recherche Française (ANR-JCJC-PHEsMaEBiPPP, grant number ANR-18-CE17-0018) and the GR-Ex laboratory of excellence. CC was supported by the French Ministry of Research.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the CNR network, the artesunate working group and collaborators for all their input. We thank Valentine Carret for her help during revisions. We thank all patients and health care workers for their contributions to this work.

- Dondorp, A. M., Kager, P. A., Hardeman, M. R., Ruangveerayuth, R., Silamut, K., White, N. J., et al. (1999). Red Blood Cell Deformability as a Predictor of Anemia in Severe Falciparum Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60 (5), 733–737. doi:10.4269/ajtmh.1999.60.733
- Dondorp, A. M., Nyanoti, M., Kager, P. A., Mithwani, S., Vreeken, J., and Marsh, K. (2002). The Role of Reduced Red Cell Deformability in the Pathogenesis of Severe Falciparum Malaria and its Restoration by Blood Transfusion. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 (3), 282–286. doi:10.1016/s0035-9203(02)90100-8
- Dondorp, A., Nosten, F., Stepniewska, K., Day, N., White, N., and South, G. (2005). East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial: Artesunate versus Quinine for Treatment of Severe Falciparum Malaria: a Randomised Trial. *Lancet* 366 (9487), 717–725.
- Drevon, L., Maslah, N., Soret-Dulphy, J., Dosquet, C., Ravdan, O., Vercellino, L., et al. (2021). Anemia and Hemodilution: Analysis of a Single center Cohort Based on 2,858 Red Cell Mass Measurements. *haematol* 106 (4), 1167–1171. doi:10.3324/haematol.2020.249409
- Fernandez-Arias, C., Rivera-Correa, J., Gallego-Delgado, J., Rudlaff, R., Fernandez, C., Roussel, C., et al. (2016). Anti-Self Phosphatidylserine Antibodies Recognize Uninfected Erythrocytes Promoting Malarial Anemia. *Cell Host & Microbe* 19 (2), 194–203. doi:10.1016/j.chom.2016.01.009
- Fraser, M., Jing, W., Bröer, S., Kurth, F., Sander, L.-E., Matuschewski, K., et al. (2021). Breakdown in Membrane Asymmetry Regulation Leads to Monocyte Recognition of P. Falciparum-Infected Red Blood Cells. *Plos Pathog.* 17 (2), e1009259. doi:10.1371/journal.ppat.1009259
- Hayakawa, E. H., Kato, H., Nardone, G. A., and Usukura, J. (2021). A Prospective Mechanism and Source of Cholesterol Uptake by Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes Co-cultured with HepG2 Cells. *Parasitol. Int.* 80, 102179. doi:10.1016/j.parint.2020.102179
- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactivity as Diagnostic Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue Injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9 (6), 515–540. doi:10.1016/0891-5849(90)90131-2
- Jauréguiberry, S., Ndour, P. A., Roussel, C., Ader, F., Safeukui, I., Nguyen, M., et al. (2014). Postartesunate Delayed Hemolysis Is a Predictable Event Related to the Lifesaving Effect of Artemisinin. *Blood* 124 (2), 167–175. doi:10.1182/blood-2014-02-555953
- Leech, J. H., Barnwell, J. W., Aikawa, M., Miller, L. H., and Howard, R. J. (1984). Plasmodium Falciparum Malaria: Association of Knobs on the Surface of Infected Erythrocytes with a Histidine-Rich Protein and the Erythrocyte Skeleton. *J. Cell Biol* 98 (4), 1256–1264. doi:10.1083/jcb.98.4.1256
- Levin, J. M., Frederick, B. d., Ross, M. H., Fox, J. F., von Rosenberg, H. L., Kaufman, M. J., et al. (2001). Influence of Baseline Hematocrit and Hemodilution on BOLDfMRI Activation. *Magn. Reson. Imaging* 19 (8), 1055–1062. doi:10.1016/s0730-725x(01)00460-x
- Martínez-Vieyra, V., Rodríguez-Varela, M., García-Rubio, D., De la Mora-Mojica, B., Méndez-Méndez, J., Durán-Álvarez, C., et al. (2019). Alterations to Plasma Membrane Lipid Contents Affect the Biophysical Properties of Erythrocytes from Individuals with Hypertension. *Biochim. Biophys. Acta (Bba) - Biomembranes* 1861 (10), 182996. doi:10.1016/j.bbmem.2019.05.018
- Ndour, P. A., Lopera-Mesa, T. M., Diakité, S. A. S., Chiang, S., Mouri, O., Roussel, C., et al. (2015). Plasmodium falciparum Clearance Is Rapid and Pitting Independent in Immune Malian Children Treated with Artesunate for Malaria. *J. Infect. Dis.* 211 (2), 290–297. doi:10.1093/infdis/jiu427
- Pei, X., Guo, X., Coppel, R., Bhattacharjee, S., Haldar, K., Gratzer, W., et al. (2007). The Ring-Infected Erythrocyte Surface Antigen (RESA) of Plasmodium Falciparum Stabilizes Spectrin Tetramers and Suppresses Further Invasion. *Blood* 110 (3), 1036–1042. doi:10.1182/blood-2007-02-076919
- Pessi, G., Kociubinski, G., and Mamoun, C. B. (2004). A Pathway for Phosphatidylcholine Biosynthesis in Plasmodium Falciparum Involving Phosphoethanolamine Methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (16), 6206–6211. doi:10.1073/pnas.0307742101
- Petkovic, M., Vocks, A., Muller, M., Schiller, J., and Arnhold, J. (2005). Comparison of Different Procedures for the Lipid Extraction from HL-60 Cells: a MALDI-TOF Mass Spectrometric Study. *Z. Naturforsch C J. Biosci.* 60 (1-2), 143–151.
- Pouvelle, B., Buffet, P. A., Lépolard, C., Scherf, A., and Gysin, J. (2000). Cytoadhesion of Plasmodium Falciparum Ring-Stage-Infected Erythrocytes. *Nat. Med.* 6 (11), 1264–1268. doi:10.1038/81374
- Price, R. N., Luxemburger, C., Simpson, J. A., Hkijaroen, L., Nosten, F., White, N. J., et al. (2001). Factors Contributing to Anemia after Uncomplicated Falciparum Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65 (5), 614–622. doi:10.4269/ajtmh.2001.65.614
- Rolling, T., Wichmann, D., Schmiedel, S., Burchard, G. D., Kluge, S., and Cramer, J. P. (2013). Artesunate versus Quinine in the Treatment of Severe Imported Malaria: Comparative Analysis of Adverse Events Focussing on Delayed Haemolysis. *Malar. J.* 12, 241. doi:10.1186/1475-2875-12-241
- Safeukui, I., Buffet, P. A., Perrot, S., Sauvanet, A., Aussilhou, B., Dokmak, S., et al. (2013). Surface Area Loss and Increased Sphericity Account for the Splenic Entrapment of Subpopulations of Plasmodium Falciparum Ring-Infected Erythrocytes. *PLoS One* 8 (3), e60150. doi:10.1371/journal.pone.0060150
- Sagawa, S., and Shiraki, K. (1978). Role of Lipids in Stabilizing Red Cells in Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminology, J Nutr Sci Vitaminol* 24 (1), 57–65. doi:10.3177/jnsv.24.57
- Sarkar, S., Bose, D., Giri, R. P., Mukhopadhyay, M. K., and Chakrabarti, A. (2018). Status of Membrane Asymmetry in Erythrocytes: Role of Spectrin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1112, 3–11. doi:10.1007/978-981-13-3065-0_1
- Tran, P. N., Brown, S. H. J., Rug, M., Ridgway, M. C., Mitchell, T. W., and Maier, A. G. (2016). Changes in Lipid Composition during Sexual Development of the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum. *Malar. J.* 15, 73. doi:10.1186/s12936-016-1130-z
- Udomsangpetch, R., Pipitaporn, B., Krishna, S., Angus, B., Pukrittayakamee, S., Bates, I., et al. (1996). Antimalarial Drugs Reduce Cytoadherence and Rosetting of Plasmodium Falciparum. *J. Infect. Dis.* 173 (3), 691–698. doi:10.1093/infdis/173.3.691
- White, N. J. (2018). Anaemia and Malaria. *Malar. J.* 17 (1), 371. doi:10.1186/s12936-018-2509-9
- World Health Organization (Who) (2010). *Guidelines for the Treatment of Malaria*. Geneva, Switzerland: WHO.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Chambrion, Depond, Angella, Mouri, Kendjo, Fricot-Monsinjon, Roussel, Biligui, Tantaoui, Taieb, Argy, Houzé, Piarroux, Siriez, Jaureguiberry, Larréché, Théliier, Cenac, Buffet and Ndour. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2.2. Anémie Hémolytique Post Artemisinine chez l'enfant atteint de paludisme d'importation

Depuis 2010, l'OMS recommande l'artésunate pour traiter les adultes et les enfants atteints de paludisme grave. Le médicament est administré par voie intraveineuse ou intramusculaire jusqu'à ce qu'un relai oral puisse être effectué, le plus souvent avec une thérapie combinée à base d'artémisinine [241]. L'artémisinine et ses dérivés sont les médicaments les plus efficaces pour traiter le paludisme, mais induisent la PADH, effet secondaire le plus fréquent observé chez les adultes atteints de paludisme grave d'importation [92]. En 2016, une revue de la littérature a rapporté que parmi 74 patients ayant développé une PADH, 50 % ont dû être transfusés [242].

La PADH est liée à un mécanisme particulier de clairance parasitaire chez les patients traités par l'artémisinine : le pitting splénique des GR contenant des parasites morts [10] [13]. Toutefois, ce mécanisme de pitting, prédominant chez la majorité des patients traités pour paludisme grave d'importation, n'est pas d'intensité identique dans toutes les populations. Chez les enfants africains présentant une immunité antiparasitaire [243], la clairance parasitaire induite par l'artémisinine est très rapide et indépendante du pitting. On peut donc s'interroger sur l'existence et l'ampleur de la PADH dans le contexte pédiatrique ou chez les sujets d'origine africaine. En effet, l'origine géographique pourrait être protectrice vis-à-vis de la PADH dans le contexte du paludisme d'importation, comme cela semble être le cas chez l'adulte [72]. La variabilité des taux d'incidence de la PADH (allant de 0 à 27 %) décrits dans la littérature chez l'enfant peut refléter la difficulté de saisir avec précision cet événement indésirable tardif [96] [244]–[248]. J'ai contribué à un protocole d'étude clinique de la PADH : PADHOK. Cette étude comportait une collaboration avec le service des urgences pédiatriques de l'hôpital Robert Debré pour l'exploration de la PADH dans le paludisme d'importation en pédiatrie. Dans le travail présenté ci-après, nous avons évalué la survenue d'une hémolyse post-artémisinine des enfants atteints de paludisme importé grave ou non compliqué. Nous avons ainsi montré que cette anémie retardée post-artémisinine existait chez les enfants atteints de paludisme grave d'importation et qu'elle est potentiellement grave. Le manuscrit ci-dessous est formaté pour soumission comme Short Report à un journal de spécialité.

Post Artemisinin Hemolysis in children with severe malaria, France, 2017–2019

*¹ Charlotte Chambrion, *² Alexandra Tielli, ³ Daniel Bashombe, ¹ Pierre Buffet, ¶¹ Papa Alioune Ndour, ¶² Jean-Yves Siriez

¹ Biologie Intégrée du Globule Rouge, INSERM, Université de Paris, Université des Antilles, Paris, France.

² Service d'accueil des urgences pédiatriques, Hôpital Robert Debré, Paris, France

³ Service de pédiatrie, Centre hospitalo-universitaire Mère-Enfant-Lagune, Cotonou, Bénin

*¶= equal contribution

§ Author for correspondence: Alioune Ndour, PhD

Biologie Intégrée du Globule Rouge, INSERM, Université de Paris, Université des Antilles, Paris, France ; Phone : +33 (0)1 44 49 32 16

Email : ndourmail@yahoo.fr

Abstract

From 2017 through 2019, we assessed the occurrence of post-artemisinin hemolysis in 139 children with severe or uncomplicated imported malaria. In 7 severe malaria children with complete follow-up datasets, median hemoglobin levels dropped from 10.4g/dL on day 0 to 6.6g/dL on day 3–5 ($p=0.007$). Their hemoglobin concentration on day 3–5 was significantly lower than in 125 children with uncomplicated malaria (6.6 g/dL versus 10.7g/dL; $p < 0.0001$). In 3 children, the rise in reticulocyte counts and LDH and drop in haptoglobin concentration confirmed delayed hemolysis. Post-artemisinin hemolysis is potentially severe in children with severe imported malaria.

Introduction

In 2019, the World Health Organization (WHO) reported a slower decline in the incidence of malaria, which predominantly affects children under the age of 5, mainly in sub-Saharan Africa [249]. In 2015, the WHO issued a recommendation to treat adults and children affected by severe malaria with intravenous or intramuscular artesunate for at least 24 hours and until an

oral medication can be administered [241]. Artesunate is safe but delayed episodes of hemolysis following therapy have been reported. First described in 2002 [94], Post Artesunate Delayed Hemolysis (PADH) is defined in adults by a greater than 10% decline in hemoglobin levels associated with markers of hemolysis occurring more than 7 days after the initiation of treatment [250]. In 2016, a literature review reported a post-artemisinin delayed hemolysis in 15.3% (74/485) of patients treated with artesunate for severe imported malaria, of which 50% required transfusion [251]. In endemic countries, the incidence of post-treatment hemolysis varies between 0 and 22% [97]—[100] [252] [253]. The occurrence of PADH is related to the peculiar mechanisms of parasite clearance in patients treated with artemisinin, namely the pitting of red blood cells containing dead parasites by the spleen [250] [254]. Artemisinin-induced parasite clearance is accelerated in African children displaying anti-parasite immunity [90], a pitting-independent process that may explain the lower incidence of PADH observed in several studies, and questions the existence of this complication in the pediatric context or in subjects of African origin. For instance, in 2019 [100], in 91 Ugandan children with severe malaria treated with artesunate, Hawkes found no evidence of post-treatment hemolysis; although 76% of children were transfused on average 30 minutes after admission. In addition, being of African origin is protective against PADH in the context of imported malaria [72]. Whether PADH exists in the pediatric population has been a matter of controversy. We report here 3 well-documented cases of PADH in 7 children treated for severe imported malaria with intravenous artesunate.

Material and methods

Study cohort and case definition

From 2017 through 2019, we studied all children under the age of 18 who presented to the Pediatric Emergency Department at Robert-Debré Hospital (Paris, France) with *P. falciparum* imported malaria. For each child, age, sex, medical history, initial hemoglobin and parasitemia were noted. We separated the patients into two groups: children with uncomplicated malaria were treated with oral artemisinin combined therapy (ACT) (artemimol piperazine 320 mg/40 mg one dose per day for three days or artemether-lumefantrine 20 mg/120 mg

two doses per day for three days, according to the weight of the child). Hemoglobin and parasitemia were measured at least on day (D)0, D 3 +/- 2 days and D28 +/- 2 days. In our protocol, parasitemia counts are repeated on D7 only when the D3 thin smear is positive. There were no such examples in this case series.

Children with severe malaria, defined by a positive blood smear with asexual forms of *P. falciparum* parasite and at least one of the WHO criteria of severity [241], were treated with parenteral artemisinin on admission (intravenous artesunate $\leq 20\text{kg}$: 3 mg/kg ; $>20\text{kg}$: 2.4 mg/kg according to manufacturer recommendations ; minimum 3 doses ; maximum 9 doses), then subsequently with a complete course of anartemisinin-based combination therapy. All patients treated with parenteral artemisinin were proposed a clinical and laboratory follow-up, as per French national recommendations, including hemoglobin, reticulocyte count, haptoglobin and lactate dehydrogenase on D3, D7, D14, D21 and D28. Parasitemia was checked on D0, D3 +/- 2 days and D28 +/- 2 days. Indication for a transfusion was based on the value of hemoglobin and reticulocytes and the clinical condition of the child. Although PADH is defined in adults by a greater than 10% decline in hemoglobin with hemolysis more than 7 days after treatment, we considered a PADH in children whenever the same variations were observed from day 3 to day 30 post treatment because variations occurring before day 7 may have a clinically relevant impact in this pediatric context.

Pitting rate measurement

Parasitemia and pitemia were measured by cytometry as previously described (4) using the cytometer BD FACSCantoTMII, BD Biosciences.

Rapid diagnostic dipstick tests to predict PADH

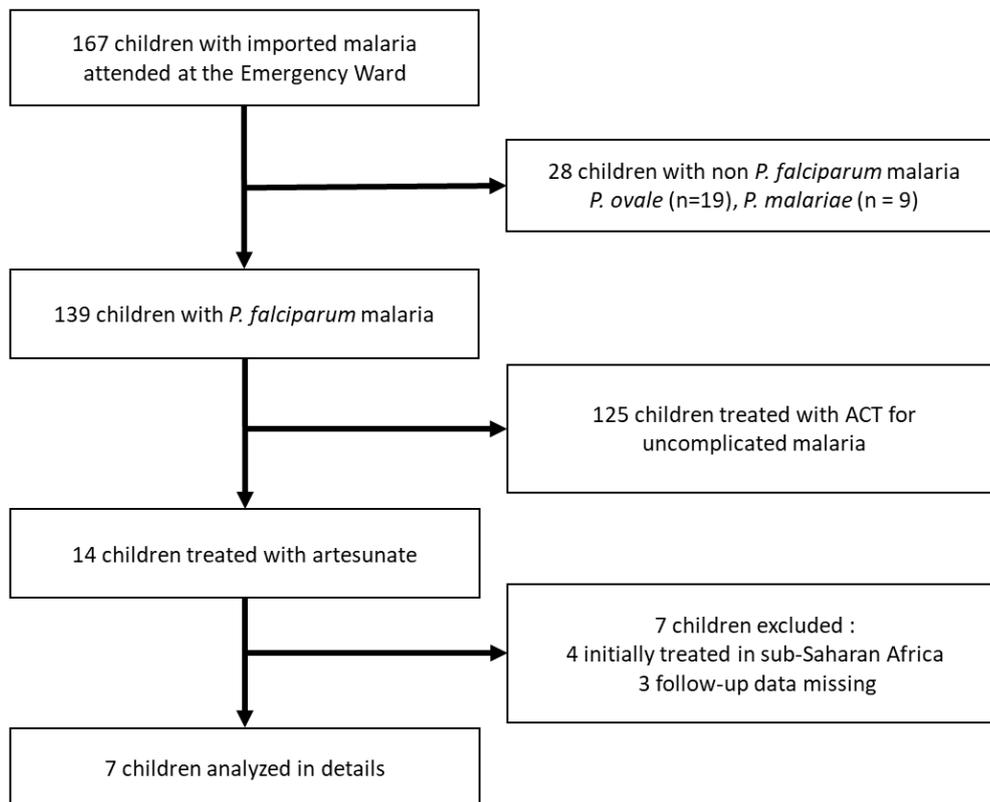
Prediction of PADH was performed as previously described (12). After 15 minutes, the test was invalid if the control line did not appear, negative if only control band appeared and positive if both the control band and the HRP2 band appeared. All readings were confirmed by at least 2 trained biologists.

Results

From January 2017 through December 2019, 167 children <18 years presented at Robert Debré Hospital Emergency Ward with a diagnosis of imported malaria. 28 patients were infected with non-falciparum species and were excluded. Of 139 children infected with *P. falciparum*, 125 were treated with ACT (124 with arteminol-piperaquine, 1 with artemether-lumefantrine) and 14 were initially treated with artesunate (Figure 1A).

Demographic, clinical and laboratory characteristics of the 125 children with uncomplicated *P. falciparum* malaria, treated with ACT are summarized in Figure 1B. Mean age was 121 months (13–202), with 66 females and 59 males; all patients had recently traveled to-or were long-term residents in West Africa. Median initial parasitemia was 1.94%, median hemoglobin concentration on admission was 11.55 g/dL at D0, 10.7 g/dL at D3 +/- 2 days (0.85 g/dL decrease) and 11.6 g/dL at D28 +/- 2 days. Fourteen children were hospitalized for electrolyte disorders, sickle cell disease or poor clinical tolerance of malaria. All patients were ultimately cured. Two patients, including one treated incompletely in Mali, relapsed on D30 with low parasitemia counts and subsequently received a full course of oral ACT. Both tested negative for malaria 30 days later.

A.



B.

	Uncomplicated malaria: Oral ACT (n= 125)	Severe malaria: Parenteral artesunate (n=7)	P value
Median (range) age (months)	121 (13 - 202)	123 (55-186)	0.9426
Female gender	66/125 (52,8%)	2/7 (28,7%)	-
Median (range) parasitemia on admission (%)	1.94 (<0.1 - 23)	14.9 (2 – 27.7)	< 0,0001
Median (range) hemoglobin concentration on admission (g/dL)	11.55 (4.9 -15.6)	10.4 (9.1 – 11.6)	0.0507
Median (range) hemoglobin concentration on Day 3+/- 2 (g/dL)	10.7 (5.4 – 16.1)	6.6 (6 – 10.9)	0.0014
Median (range) hemoglobin concentration on Day 30+/-2 (g/dL)	11.6 (7.2 – 14.4)	11.7 (9.4 – 13.1)	0.7646

Figure 1: Description of study cohort. A. Flowchart B. Sociodemographic and laboratory parameters in children with uncomplicated and severe malaria. ACT: Artemisinin-based combination therapy. Mann-Whitney tests. Bold p values indicate significant differences.

Of 14 patients treated with artesunate, seven were excluded from statistical analysis: four were initially treated in sub-Saharan Africa and three had missing data during follow-up. Seven patients were treated with parenteral artesunate for severe malaria. Severe malaria was defined on admission by the presence of hyperparasitemia $\geq 15\%$, or neurologic symptoms, or both. Their mean age was 123 months (55–186) and mean parasitemia at admission was 14.87%. Median hemoglobin was 10.4 g/dL on D0, 6.6g/dL on D3/D5 (3.8g/dL decrease, $p = 0.0066$) and 11.7 g/dL on D28 +/- 2 days (Figure 1B). Loss in hemoglobin between D0 and D3/5 was significantly higher in these 7 patients than in the 125 children treated for uncomplicated malaria (31% versus 6%, $p < 0.0001$; Figure 2C). The nadir in hemoglobin concentration (6.93 g/dL, 32.5% decrease compared to D0) was reached after a mean of 5.6 days. The reticulocyte crisis appeared in the four children for whom data are available between D7 and D18. In three children, markers of hemolysis were available: values of LDH were elevated and haptoglobin was < 0.3 g/L until D14. One child was transfused because of a high pitting and a low reticulocyte count (21 750/mm³) on D6. One child with a *P. falciparum* parasitemia of 18.7% treated with 3 doses of parenteral artesunate followed by a full course of arteminol-piperaquine, had an uncomplicated malaria attack due to *P. ovale* (0.3% parasitemia) on D37. He was cured with another full course of arteminol-piperaquine. The concentration of pitted red blood cells in circulation was quantified in 6 children with severe malaria. In all the children the concentration was above the threshold of 0.18 G/L (Figure 2D).

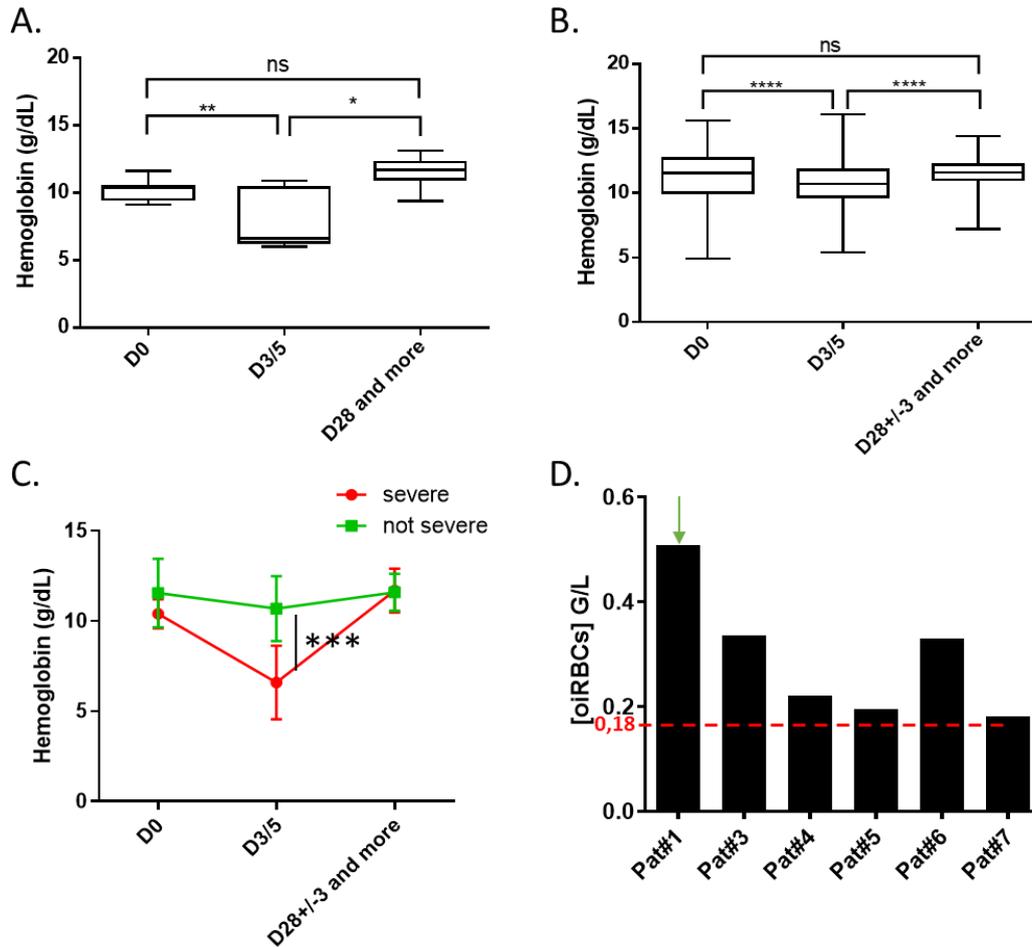


Figure 2. Post-treatment anemia in children with severe malaria treated with artesunate

A. Median (IQR and 95%CI) hemoglobin concentration on admission and upon follow-up in children with severe malaria treated with parenteral artesunate (n=7), (* p < 0.01, paired t-test). B. Median (IQR and 95%CI) hemoglobin concentration on admission and upon follow-up in children with uncomplicated malaria treated with ACT (n=125), (* p < 0.0001, paired t-test). C. Compared kinetics of hemoglobin concentrations (median, SD) in children with either severe (n=7) or uncomplicated (n=125) malaria (* p < 0.0001, unpaired t-test). D. Concentration of pitted RBC in circulation at Day 3+/-2 in children with severe malaria treated with parenteral artesunate. The dotted line corresponds to the concentration above which there is a high risk of PADH in adults with severe imported malaria (Jauréguiberry et al. Blood 2014). The green arrow indicates the patient who was transfused.

Discussion

Of 7 children treated with artesunate for severe malaria, and adequate follow-up data to assess delayed post-treatment events, PADH was confirmed in 3. In 102 African children with severe malaria, Rolling had reported an incidence of 7% of post-treatment hemolysis [252], re-evaluated at 5% by the same authors in 2019 [97]. In 2014, among 350 patients treated with intravenous artesunate for severe *P. falciparum* malaria, a delayed decrease in hemoglobin level (2–5 g/dL) was reported in 23 patients (11.4%) between D7 and D21 [253]. The same year, a case of delayed hemolytic anemia related to artesunate with a strong evidence for drug-immune related mechanism was reported in a 17-year-old female traveling in France from Ivory Coast [98]. Two years later, Kreamsner et al reported a 22% rate of delayed anemia (defined as Hb \leq 7 g/dl 7 days or more after admission) in children treated with artesunate [255]. In 2017, Fanello et al [99] reported in 9.1% children treated for non-severe, high-parasitemic *P. falciparum* malaria with artesunate IV, a decrease in average Hb of 13.7% between D7 and D42; and concluded that clinically significant delayed hemolysis was uncommon in these children. The variability in incidence rates of PADH (0 to 22%) across these reports may reflect the difficulty in accurately capturing this delayed adverse event, or the impact of preexisting immunity on the risk of PADH, or both. In 2021, Roussel et al reported the outcome of imported severe malaria in 1391 patients treated with parenteral artesunate. PADH occurred in 42.81% of 98 carefully analyzed patients (7.1% children) and was significantly more frequent in hyperparasitemic patients and patients of European origin [256].

In our study, complete follow-up data were available in 7 children with severe malaria treated with artesunate. The mean reduction in hemoglobin levels from D0 to D3 was significantly higher in this subgroup than in the 125 children treated with ACT for uncomplicated falciparum malaria. In these 7 patients, hemoglobin continued to drop to a mean nadir of 6.93 g/dL at 5–6 days after treatment initiation. Thick smears confirmed that complete parasite clearance had occurred in the 7 children at D3-5. In three children, evolution of reticulocytes counts, haptoglobin and LDH levels could be measured and were in favor of hemolysis persisting until D14. The concentration of Pitted RBC in circulation was above the threshold of 0.18 G/L, previously identified as predictive of PADH in adults [250]. We therefore hypothesize that the anemia observed in 3/7 (42.8%) children treated with artesunate could

be attributed to post treatment hemolysis. As previously validated in adults [10], we used the BinaxNow Malaria kit on day 3 +/-2 post treatment sample: the six patients in whom this test was performed had a positive predictive test and subsequently had delayed anemia. One patient could not be tested; this patient had the lowest parasitemia on admission (2%) and had no subsequent drop in hemoglobin. In addition, we observed a higher risk of anemia when the concentration of pitted RBCs at D3 reached the discrimination threshold [257]. This small series of cases suggest that the PADH-predictive threshold based on the concentration of pitted RBC is thus similar in adults and children.

The limitations of this study are the small number of severe patients and the incomplete data for some of them. In our hospital, although we take care of an average of 60 children each year with imported malaria, very few children present with severe malaria. In addition, our standard protocol did not require sampling of hemolysis markers in patients treated with artesunate until 2019. However, the drop in hemoglobin is significantly greater in the group of seven children treated with artesunate than in children with uncomplicated malaria and negativity of the parasitemia as well as the presence of markers of hemolysis until D14 in all children where it could have been measured argue for a delayed hemolysis related to artesunate.

Parenteral artemisinin derivatives are the best treatment for severe malaria in children. In our series, however, PADH was frequent (3/7 children, 42.8%). We therefore recommend the use of artesunate after verifying the criteria for severity of malaria. Of notable interest, the recently developed HRP2 dipstick prediction test makes it possible to identify those at higher risk of PADH. In these children, close monitoring for at least four weeks after treatment is recommended to avoid potentially severe complications. A larger prospective study in Africa is needed to clarify the incidence and the potential negative impact of PADH in children.

Notes

Acknowledgments. We thank all patients and their families for participating in this study.

We would like to thank Dr. Matthew Beardmore for his attentive reading.

Disclaimer.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Financial support. This work was supported by the French National Agency of Research (ANR, project PhesMA), the French Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), the GR-Ex laboratory of excellence and Guilin Pharmaceutical. A. T. was supported by the Assistance Publique—Hôpitaux de Paris. C. C. was supported by the French Ministry of Research and by a grant from the GR-Ex laboratory of excellence.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE

Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

2.3. Mécanismes de l'anémie au cours de l'hémolyse retardée post-artémisinine : interactions entre l'hôte, le médicament et le pathogène

Une fois tué par les dérivés de l'artémisinine, *Pf* est expulsé de son RBC hôte dans la rate. Le GR « pité » retourne dans la circulation, mais sa durée de vie est cependant plus courte que celle des GR normaux. La PADH est associée à l'élimination des GR pités [250]. Cependant, la contribution à l'anémie de la seule disparition des GR pités ainsi que les causes de l'élimination tardive post-traitement des GR ne sont toujours pas connues avec précision. En effet, les sous-populations de GR présentes dans la circulation, les GR pités, les GRi et des GRni, pourraient chacune contribuer à l'élimination des GR durant la PADH.

Certaines protéines parasitaires, comme RESA et HRP2, persistent dans le GR même après l'élimination du parasite [89]. C'est d'ailleurs en marquant ces protéines que nous sommes désormais capables de quantifier par cytométrie les GR pités [10].

Dans l'étude qui suit, à partir d'une cohorte de 95 patients présentant un paludisme grave d'importation avec plus de 4 % de parasitémie, nous avons montré que la perte GR pités durant la PADH correspondait à moins de la moitié de la perte totale de GR, suggérant une élimination de certains GR n'ayant jamais été infectés. Par ailleurs, en plus des protéines RESA et HRP2, nous avons montré que 154 protéines parasitaires étaient encore associées aux GR de patients en circulation, même après clairance parasitaire totale. Parmi 37 protéines associées aux GR qui disparaissaient pendant la PADH, 9 d'entre elles pouvaient être immunoprécipitées dans les échantillons prélevés juste avant la PADH, en présence de sérum de patient convalescent. Deux d'entre elles ont pu être mises en évidence en immunofluorescence de surface sur les GR circulants.

S'agissant des mécanismes pouvant être à l'origine de l'élimination de ces GR durant la PADH, nous avons mis en évidence l'augmentation de la fixation de l'opsonine C4b, simultanément avec la diminution de l'expression des protéines inhibitrices du complément (CRP). Parallèlement, la production d'IgG anti-phosphatidylsérine a été corrélée à la perte d'Hb des

patients ayant développé une PADH. Une phagocytose par opsonisation a été également observée plus intensément sur les GR collectés durant la PADH par rapport à ceux collectés aux autres temps de suivi. Le travail et les résultats de cette partie de la thèse sont présentés ci-après de façon détaillée sous la forme d'un manuscrit qui sera soumis prochainement après intégration de quelques données supplémentaires dans le manuscrit final.

Mechanisms of anemia in post-artemisinin delayed hemolysis: host-drug-pathogen interactions

^{1, 2, 3} C. Chambrion ; ^{2,4} EF. Gautier ; ^{1,2,3}A. Fricot-Monsinjon ; ^{1,2,3}M. Depond; ^{1,2,3}L. Angella ; ^{1,2,3}C. Roussel ; ^{3,5}A. Taieb; ⁸N. Argy; ^{3,8}S. Houze; ⁹S. Jauréguiberry; ¹⁰ F. Botterel ; ^{2,4} P. Mayeux ; ⁶ JY. Siriez ; ⁷ S. Larréché ; ^{3,5} M. Thellier ; ^{1, 2, 3} P. Buffet ; ^{1, 2, 3} PA. Ndour

(1) Umr-s1134, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris

(2) Université de Paris, Labex GR-EX

(3) Centre National de Référence du Paludisme, Paris

(4) Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris

(5) AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière

(6) AP-HP, Hôpital Robert-Debré, Paris

(7) Département de Biologie Médicale, Hôpital d'Instruction Des Armées Bégin, Paris

(8) Hôpital Xavier Bichat-Claude Bernard, Paris

(9) AP-HP, Hôpital Kremlin Bicêtre

(10) AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Créteil.

ABSTRACT

Artemisinin kills *P. falciparum* ring stages, which are then expelled from their host red blood cells (RBC) as they cross narrow slits in the spleen. Once “deparasitized”, pitted RBC return to the circulation, thereby tempering early post-treatment anemia. Several days after treatment, however, many pitted RBC are cleared during Post Artesunate Delayed Hemolysis (PADH), a side effect that affects 5–43% of artesunate-treated patients. High initial concentrations of pitted RBC predict PADH but whether the clearance of pitted RBC is the only mechanism of PADH has not been robustly established. Here, we quantified the loss of pitted RBC and explored potential mechanisms of hemolysis during PADH.

In a cohort of 95 consecutive evaluable patients with severe, hyperparasitemic (>4%) malaria, 67 (70.5%) had PADH. The loss of pitted RBCs contributed to no more than 42% of the total RBC loss during PADH. Mass spectrometry on blood samples collected after complete parasite clearance showed the persistence of 153 parasite proteins associated with the membrane of circulating RBC. Thirty-seven of these proteins were fully cleared during PADH. Immunoprecipitation with convalescent serum of PADH patients identified 9 parasite proteins from circulating RBC, among which two were detected by surface immunofluorescence. The presence of opsonin C4b on RBC was significantly lower before than after PADH ($p \leq 0.033$),

while complement regulatory proteins including CD55, CR1, and CD59 were more intensely expressed before than after PADH. Not least, RBC loss and Hb decrease correlated negatively with anti-phosphatidylserine IgG peak levels in PADH patient ($R^2=0.768$), while a more intense opsonic phagocytosis was observed with RBC collected during PADH compared to RBC collected before PADH (37% increase, $n=7$: $p=0.02$).

The clearance of pitted RBC only partially explains RBC loss during PADH, a side effect that affects a majority of patients with severe malaria and high parasitemia treated with artesunate. Treatment with artemisinins induces molecular alterations in RBC that persist in circulation after parasite clearance. RBC circulating after artemisinin-induced parasite clearance display complement-related alterations and exposure of phosphatidyl serine that may contribute to a more intense phagocytosis thereby contributing to their clearance during PADH.

INTRODUCTION

Intravenous artesunate is the first-line treatment for severe malaria, recommended by the WHO worldwide since 2010 [258]. Artemisinin derivatives (AD) are currently the most effective antimalarial drugs, superior to quinine to reduce the death rate of severe malaria [58], [93]. AD act on a wide spectrum of *Plasmodium falciparum* stages, including early circulating ring stages, inducing a strong inhibition of cytoadherence and sequestration of matures forms of *P. falciparum* [259].

After treatment, *P. falciparum* (*Pf*) is expelled from its host red blood cell (RBC) as it crosses narrow slits in the spleen and the pitted (deparasitized) RBC returns to the circulation. The loss of infected RBC is compensated by release of “Pitted” RBC, thereby tempering early post-treatment anemia. Pitted RBC can be quantified by labeling parasite proteins such as RESA and HRP2 [10], [89], which remain associated to the RBC membrane as an imprint, even after parasite removal. Few days after treatment, pitted RBC are cleared from the circulation, contributing to Post Artesunate Delayed Hemolysis (PADH). PADH can be predicted by quantifying pitted RBC by flow cytometry or HRP2-based dipstick [10], [13]. Whether the loss of RESA—and HRP2-expressing pitted RBC explains the bulk of the hemoglobin loss during PADH has not been robustly established. The mechanisms involved in the elimination of RBC

in malaria are diverse (opsonic, non-opsonic, complement dependent or independent, biomechanical, intra/extravascular) and depend on the specific alterations displayed by the different RBC subpopulations. Here we explored the dynamics of molecular changes induced in RBC by heavy infection with *Pf* and treatment with artesunate.

MATERIAL AND METHOD

Study cohort and case definition

From 2012 through 2020, blood samples were collected from French patients with imported severe malaria and hyperparasitemia (>4%). Severe malaria was defined by a positive blood smear with asexual forms of *Pf* associated with at least one of the WHO severity criteria. All patients were involved in the national surveillance program of the French National Reference Center for Malaria and were treated by intravenous Artesunate (2.4 mg/kg, Guilin Pharmaceutical) at 0, 12, 24 and 48 hours, or other artemisinin derivatives (Eurartesim or Arthemeter Lumefantrine). Post-Artesunate Delayed Hemolysis (PADH) was defined as described [13] by a $\geq 10\%$ drop in hemoglobin level or a $\geq 10\%$ rise in LDH concentration occurring anytime between day 8 and the end of follow-up. Patients that could not be classifiable because of a lack of information during the follow-up were allocated to an “undetermined pattern” group (Figure 1).

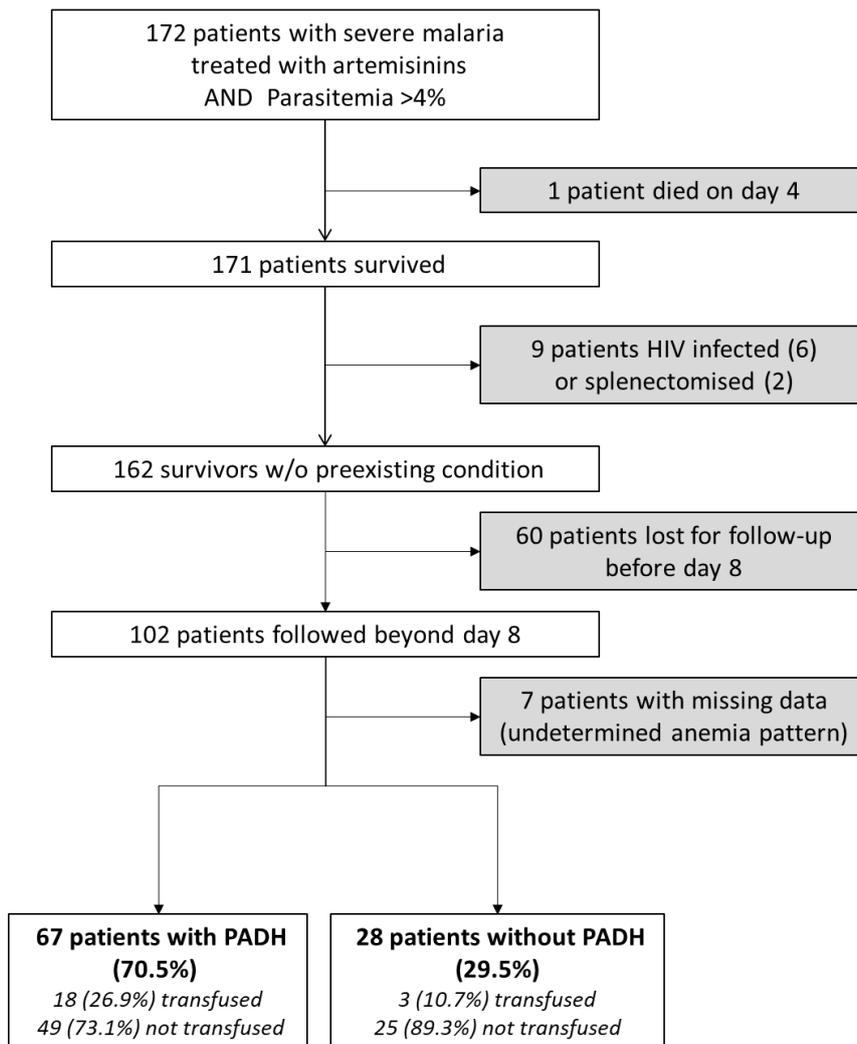


Figure 1. Flowchart

***Pf* parasite cultures**

NF54 strain parasites were cultured in O+ RBCs from healthy donors (Établissement Français du Sang) at 4% hematocrit in a medium composed of RPMI 1640 Glutamax containing HEPES (Life Technologies) supplemented with 10% decomplexed human serum AB+ (Établissement Français du sang), 50µM hypoxanthine (Sigma Aldrich) and 20mg/L gentamicin (Sigma Aldrich). Cultures were maintained under 5% parasitemia and incubated at 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂.

Parasitized and Pitted RBC Staining

Samples were washed 4 times in PBS1X and fixed with 1% glutaraldehyde diluted in PBS1X. After two washes, samples were then incubated with a human polyclonal hyper-immune serum (Buffet et al. Blood 2006) at 1:10 in PBS with 1% Albumax II (Life Technologies) and 0.1% Triton X100 (Sigma Aldrich) for membrane permeabilization. After 25 minutes of incubation under agitation, samples were washed and incubated with a goat anti-human IgG secondary antibody coupled with Alexa Fluor 488 or 568 at 1:500 (Life technologies), DNA was labeled with Hoechst 34580 at 1:1000 (Life Technologies), for 25 minutes. Parasitemia and pitemia were measured by the cytometer BD FACSCanto™II, BD Biosciences and analysis were performed using Flowjo software. Total loss of RBC during PADH was quantified using this following formula: [RBC lost during PADH] = [RBCs at the maximum concentration of pitted RBC]—[RBC concentration at nadir Hb].

Ghosts' Preparation

To remove hemoglobin from RBC, cryopreserved dried RBCs were lysed at 4° C in hypotonic buffer (5mM Na₂HPO₄, pH8, 0.3mM EDTA, 0.5% PMSF), thoroughly mixed, and centrifuged for 20 minutes at 22000g. Membranes were washed 4 times with the hypotonic buffer and pellet of membranes were conserved at -80 °C prior to subsequent experiments.

Proteins Quantification Using Mass Spectrometry

Proteins were extracted and denatured in TRIS 200mM pH8.5 SDS 2% while disulfide bridges were reduced using TCEP 20mM and subsequent free thiols groups were protected using chloroacetamide 50mM for 5 min at 95 °C. Proteins were trypsin-digested overnight using the Filtered-Aided Sample Preparation (FASP) method to collect peptides as previously described as described previously [260]. Peptides released after trypsin digestion were desalted on C₁₈ reverse-phase StageTips and then fractionated into five fractions on Strong Cationic Exchange (SCX) StageTips, dried and solubilized in 10 µl of a 10% acetonitrile (ACN) and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) solution.

C₁₈ liquid nanochromatography and Mass Spectrometry (MS): NanoflowHPLC and MS analyses were performed using an U3000 RSLC system hyphenated to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (all from Thermo Fisher Scientific). All mobile phases are made with milliQ-grade H₂O produced with a milliQ integral-3 (from Merck-Millipore). Peptides were solubilized in 10 µl of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and 10% acetonitrile (ACN). 1 µl was loaded, concentrated, and washed for 3 min on a C₁₈ reverse-phase precolumn (3-µm particle size, 100 Å pore size, 75-µm inner diameter, 2-cm length; Thermo Fischer Scientific) with loading solvent containing 0.1% TFA and 2% ACN. Peptides were separated on a C₁₈ reverse phase resin (2-µm particle size, 100 Å pore size, 75-µm inner diameter, 25-cm length; Thermo Fisher Scientific) with a 170-min gradient starting from 99% of solvent A containing 0.1% formic acid and ending in 55% of solvent B containing 80% ACN, 0.085% formic acid. The mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in a data-dependent scheme with full MS scans acquired with the Orbitrap, followed by as many MS/MS ion trap HCD spectra 3 seconds can fit (data-dependent acquisition with top speed mode: 3-s cycle) using the following settings for full MS: automatic gain control (AGC) target value: 1.10e6, maximum ion injection time (MIIT): 60 ms, resolution: 6.10e4, m/z range 350–1500. For HCD MS/MS: Quadrupole filtering, Normalized Collision Energy: 30. Ion trap rapid detection: isolation width: 1.6 Th, minimum signal threshold: 5000, AGC: 1.10e5, MIIT: 60 ms, resolution: 3.10e4. Peptides with undefined charge state or charge state of 1 or over 7 were excluded from fragmentation, a dynamic exclusion time was set at 30 s.

Protein identification and quantification: Identifications (protein hits) and quantifications were performed by comparison of experimental peak lists with a database of theoretical sequences using MaxQuant version 1.6.17.0 [261]. The databases used were the human sequences from the curated Uniprot Swissprot database (release March 2020), the plasmodium falciparum 3D7 sequences from PlasmoDB v48 and a list of in-house frequent contaminant sequences. A maximum of 2 missed cleavages was allowed for trypsin digestion. Carbamidomethylation of cysteines was set as constant modification, whereas acetylation of the protein N terminus and oxidation of methionines were set as variable modifications. The false discovery rate was kept below 1% on both peptides and proteins. The “match between runs” (MBR) option was allowed with a match time window of 0.7 min and an alignment time window of 20 min.

Statistical analysis: For statistical analysis, data were imported into the Perseus software version 1.6.14.0 [262]. Reverse and contaminant proteins were excluded from analysis. LFQ intensity data were transformed into log₂. Samples with at least 3 valid LFQ values of intensity per condition are selected. Differentially expressed proteins were identified by a Student T-test p-value <0.05 with the addition of proteins not identified in all samples of a group but identified in at least 2 samples of another group or proteins not identified in all samples of a group but identified in at least 2 samples of another group.

Immunoprecipitation Assay

Ghosts were solubilized in buffer (25mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 10% glycerol, 0.01% sodium azide, 1% NP40, pH7.5) at 1:5 ratio, 10 minutes on ice and centrifuged 5 minutes at 22000g at 4° C. Pellets were removed. For immunoprecipitation, 30uL of Protein G Mag Sepharose (GE Healthcare) washed two times with a first washing buffer composed by NaCl 150 mM, NaP 50 mM and protease inhibitors, incubated or not with decomplexed (by incubation 30 minutes at 56 °C) patient serum, from a follow-up just before PADH, and washed two times in the first washing buffer. Beads were then incubated overnight at 4° C under agitation with 200 µg of lysate. Beads were washed 3 times in NaCl 150 mM, NaP 50mM, 0.02% Tween20 and 3 times in NaCl 300mM, NaP 50mM. Proteins of interest were eluted after 5 minutes incubation at 95 °C with 60 µL of SDS 2%, Tris/HCl 200 mM pH8. Eluates were stocked at -20 °C before mass spectrometry analysis. Proteins from whole cell lysate were trypsin-digested overnight using the filtered-aided sample preparation (FASP) method as described previously [260].

Surface Immunofluorescence of Parasite Proteins

Washed RBCs were incubated 1 hour under agitation with either rabbit monoclonal anti-RON3 at 1:250, rabbit polyclonal anti-RAP1 at 1:250, rabbit monoclonal anti-RhopH3 at 1:50, rabbit monoclonal anti-HSP101 at 1:50 or mouse monoclonal anti-KAHRP at 1:50, in PBS1X supplemented with 1% Albumax II (Life Technologies). After 2 washes un PBS1X, RBCs were incubated 1h under agitation with secondary antibodies donkey anti-rabbit or goat anti-mouse, coupled with Alexa Fluor 488 (BD Bioscience), and with Hoechst 1:1000. In parallel,

positive control were performed by the fixation of RBC with 1% glutaraldehyde diluted in PBS1X and washed 2 times, and staining was performed as previously described but in presence of 0.1% Triton X100 (Sigma Aldrich). After 2 washes, quantification of positive cells was performed using the cytometer BD FACSCanto™II, BD Biosciences and analysis were performed using Flowjo software. Staining visualization was performed by imaging flow cytometry (Amnis) and analysis were performed using IDEAS software.

All results were normalized with negative controls which were incubated with secondary antibodies only.

Human Proteins Quantification by Flow Cytometry

Washed glycerol-cryoconserved RBCs were incubated 25 minutes with IgG PE Mouse anti-human CD59 at 1/20, IgG APC Mouse anti-human CD55 at 1/200, IgG1 FITC Mouse anti-human CD35 or corresponding Isotypes (BD Pharmigen™), diluted in PBS/ 1% Albumax II. After two washes in PBS, geometric mean of fluorescence intensity of each antibody was measured by the cytometer BD FACSCanto™II, BD Biosciences, and analyzed using Flowjo software.

ELISA Assay

The determination of human IgG anti-PS antibodies was performed with an ELISA kit (Alegria, ORGENTEC) following the manufacturer's instructions. We then read the optical density at 450nm and calculated the results. Test results were valid if the optical densities at 450nm for calibrators/control and the results for controls comply with the reference range on the certificate of analysis enclosed in each test kit. For quantitative results, we plotted the optical density of each calibrator versus the calibrator concentration to create a calibration curve. The concentration of Ig in patient samples was then be estimated from the calibration curve by interpolation.

Erythrophagocytosis Assay

Human cell line-derived THP1 monocytes were seeded at 100 000–500 000 cells/ml in THP1 medium (RPMI Glutamax supplemented with 15% SVF, 1% penicillin/Streptomycin and 0.5% Sodium bicarbonate) 5% CO₂ at 37 °C. Positive controls were mature parasites enriched by MACS and negative controls were RBCs from healthy donors. RBCs were stained with Violet CellTrace (1:300, Life Technologies) and thoroughly washed. RBCs were co-incubated with THP1 in triplicate at a ratio RBC/THP1 of 1/50, in presence or absence of decomplexed plasma from convalescent patients during PADH (tested RBCs and plasma from the same patient), 1h30 at 37 °C in THP1 medium. Conditions in presence of Cytochalasin D were used as “non-phagocytosis controls.” Phagocytosis was stopped on ice and by cold PBS washing. We finally stained the culture with APC-conjugated anti Glycophorin A antibody (1:50, Miltenyi Biotech), allowing the discrimination of RBCs which were not phagocytosed but not eliminated during previous washing. The proportion of anti-Glycophorin A negative and CellTrace Violet positive cells were measured by flow cytometry. Results were expressed as fold change of phagocytosis compared to Cytochalasin D conditions.

Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM 9 software. We considered as significant differences with *p values* <0.05. Paired t-test or mixed models.

RESULTS

PADH affects a majority of patients with severe malaria and hyperparasitemia treated with artesunate

From September 2012 through August 2021, we preselected 172 patients with severe malaria and hyperparasitemia treated with artemisinin derivatives (Figure 1). Of 95 survivors without preexisting condition who had a complete follow-up and dataset, more than 70% had PADH (Figure 1). Median loss of hemoglobin (hb) between D0 and the day of nadir was significantly higher in patients with PADH compared to patients without PADH (26.4% vs. 14.6% p=0.0049).

Parasitemia at D0, pitemia and concentration of pitted RBCs at D3 after treatment were significantly higher for patients with PADH (10% parasitemia, 6.9% pitted RBCs, 0.29 x10¹² pitted RBCs/L) compared to patients without PADH (7.65% parasitemia, 2.9% pitted RBCs, 0.12 x10¹² pitted RBCs/L; *p*=0.0003) (Table 1).

Characteristic	PADH n=67	no PADH n=28	P value
Male gender N (%)	36 (53.7)	19 (67.9)	0.9846
Age Median (IQR)	38 (25-54)	50 (25-58.3)	0.2107
Treatment			
Artesunate	63 (94)	22 (58.6)	
Dihydroartemisinin piperazine	4 (6)	5 (17.9)	0.9816
Artemether lumefantrine	0	1 (3,6)	
Laboratory parameters			
Median (IQR) parasitemia at D0 (% of infected RBCs)	10 (6.8-17.9)	7.65 (5.5-11.4)	0.0498*
Median (IQR) pitemia at D3 (% of pitted RBCs)	6.9 (4.9-14.6)	3.5 (1.6-5.2)	0.0003*
Median (IQR) [pitted RBCs] at D3 (x10 ¹² RBC/L)	0.29 (0.19-0.54)	0.12 (0.04-0.24)	0.0011*
Median (IQR) hemoglobin at D0 (g/dL)	12.3 (10.4-13.8)	11.3 (10-13.6)	0.5857
Median (IQR) nadir hemoglobin after D7 (g/dL)	8.9 (7.3-10.4)	9.8 (8.7-11.4)	0.0472*
Median (IQR) loss of hemoglobin between D0 and the day of nadir (%)	26.4 (14.4-40.9)	14.6 (10.6-20)	0.0049*

Table 1. Characteristics of patients with or without PADH

*Median loss of hemoglobin was defined by [(hemoglobin at D0 - nadir hemoglobin)/ hemoglobin at D0]x100 ; IQR = Interquartile range ; * Mann Whitney U test*

treatment. A total of 483 and 313 parasite proteins were identified at D0 in patients with and without PADH, respectively (Figure 3). After treatment and pitting, in addition to RESA and HRP2, 154 *P. falciparum* were identified (Figure 4).

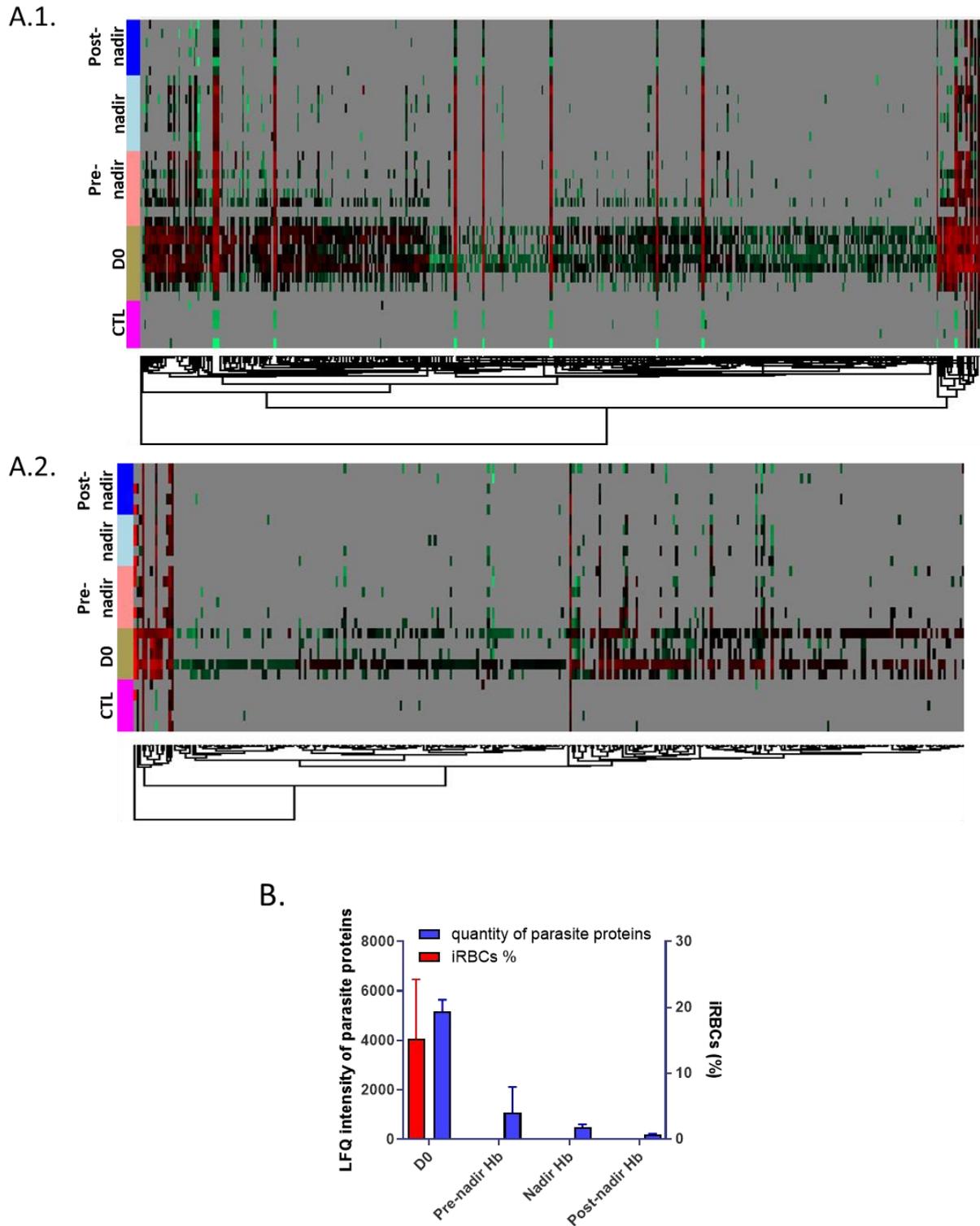


Figure 3. Persistence and decline of parasite proteins after parasite clearance

(A) Heatmap of parasite proteins according to the follow up. Samples from 5 healthy donors, 8 patients PADH patients (A.1), 6 non-PADH patients (A.2). (B) Kinetic of parasite protein clearance in 8 PADH patients during the follow-up. CTL = Control from healthy donors, Pre-nadir = sample collected before nadir of Hb, nadir = sample collected at nadir of Hb, post-nadir = sample collected after nadir of Hb.

The total amount of parasite proteins decreased with time upon follow-up (Figure 3B). 37 proteins significantly decreased or disappeared during or after PADH (Figure 4, Table 2).

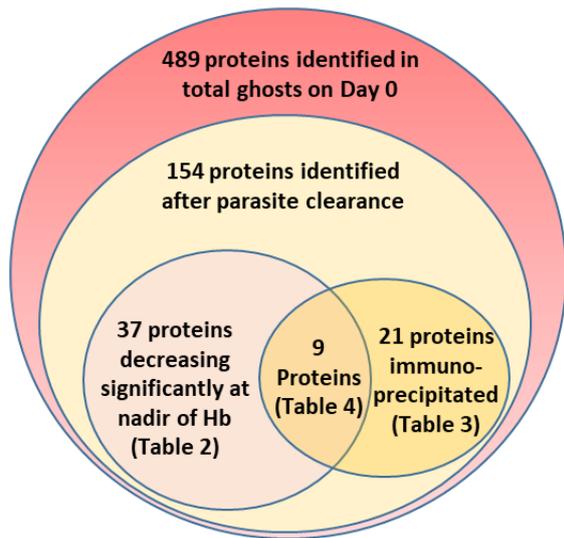


Table 3
Erythrocyte membrane protein 3
Knob-associated histidine-rich protein
Liver stage antigen 3
Protein phosphatase
Rhoptry-associated protein 2
60S ribosomal protein L11a
Dynein heavy chain, putative
High molecular weight rhoptry protein 3
High molecular weight rhoptry protein 2
Ring-exported protein 1
EMP1-trafficking protein
Heat shock protein 101
Exported protein 1
40S ribosomal protein S18
60S ribosomal protein L38
40S ribosomal protein S17
Rhoptry neck protein 3
CX3CL1-binding protein 2
40S ribosomal protein S19
Membrane associated histidine-rich protein 1
Rhoptry-associated protein 1

Table 2
40S ribosomal protein S8
Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)
Exported protein 1
Uncharacterized protein
Heat shock protein 90
14-3-3 protein
Single-strand telomeric DNA-binding protein GBP2, putative
Uncharacterized protein
Acyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.3)
40S ribosomal protein S19
PRESAN domain-containing protein
ATP-dependent RNA helicase DBP1, putative (EC 3.6.4.13)
S-adenosylmethionine synthase (EC 2.5.1.6)
Phosphoglycerate kinase
Thioredoxin-like mero protein
Histone H4
Translocon component PTEX88
Parasitophorous vacuolar protein 1
Ras-related protein Rab-11A (EC 3.6.5.2)
Rhoptry neck protein 3
Knob-associated histidine-rich protein
Ring-exported protein 1
EMP1-trafficking protein
Membrane associated histidine-rich protein 2
High molecular weight rhoptry protein 2
CX3CL1-binding protein 1
Ring-infected erythrocyte surface antigen
Rhoptry-associated protein 3
Heat shock protein 101
Cytoadherence linked asexual protein 3.2
High molecular weight rhoptry protein 3
Cytoadherence linked asexual protein 9
Protein phosphatase (EC 3.1.3.16)
L-lactate dehydrogenase
Sporozoite and liver stage tryptophan-rich protein
Ring-exported protein 2
Rhoptry-associated protein 1

Table 4
Knob-associated histidine-rich protein
High molecular weight rhoptry protein 3
High molecular weight rhoptry protein 2
Ring-exported protein 1
EMP1-trafficking protein
Heat shock protein 101
Exported protein 1
Rhoptry neck protein 3
Rhoptry-associated protein 1

Figure 4. Parasite proteins associated with erythrocyte membranes after parasite clearance

Identification of parasite proteins by mass spectrometry on RBCs from 8 PADH patients and immunoprecipitation of parasite proteins with convalescent serum (n=4). Tables 2, 3, 4 : list of corresponding proteins identified

Immunoprecipitation with convalescent serum identifies 21 parasite proteins

In order to identify parasite proteins associated with RBC membrane and recognized by serum components, we performed co-immunoprecipitations using RBC membranes collected from patients with PADH in the presence or absence of serum collected just after the episode. The proteins immunoprecipitated with the serum immunoglobulin were then identified by mass spectrometry. 21 parasite proteins were immunoprecipitated (Figure 4, Table 3), among which, 9 were cleared during the episode of PADH Table 2 (Table 4 and 5).

Protein	Role/Function
Knob-associated histidine-rich protein	Association with PfEMP1 for cytoadhesion Gangluly et al. 2015
High molecular weight rhoptry protein 3	Role in invasion and nutrient uptake Sherling et al. 2017
High molecular weight rhoptry protein 2	Entry of nutrients, growth and replication Counihan et al, 2017
Ring-exported protein 1	Role in PfEMP1 export McHugh et al. 2015
EMP1-trafficking protein	Transport of PfEMP1 to the RBC membrane Maier et al. 2008
Heat shock protein 101	Export of parasite proteins into the RBC cytoplasm Chi-Min Ho et al. 2018
Exported protein 1	Location of EXP2 at the parasitophorous vacuole membrane Nessel et al. 2020
Rhoptry neck protein 3	Released to bind to the RBC membrane Xin Xiao et al. 2014
Rhoptry-associated protein 1	Role in rhoptry biogenesis, and in invasion Topolska et al. 2004

Table 5. Role/function of parasite proteins identified by immunoprecipitation through immunoglobulins from convalescent serum and confirmed by mass spectrometry (n=4).

Parasite proteins are detected at the surface of circulating RBC after parasite clearance

The 9 parasite proteins identified by mass spectrometry are either involved in the RBC invasion by *Pf* or in protein traffic of in the cytoadherence of iRBC (Table 5). In follow-up samples from 4 patients, we performed surface immunofluorescence using antibodies against 4 of the 9

previously selected proteins. RBCs were observed using both flow cytometry for cells count and imaging flow cytometry. Immunofluorescence was detected at the surface of circulating RBC with anti-RhopH3 and anti-RAP1 antibodies (Figure 5A&B). No marked immunofluorescence was detected anti-RON3 and anti-KAHRP antibodies.

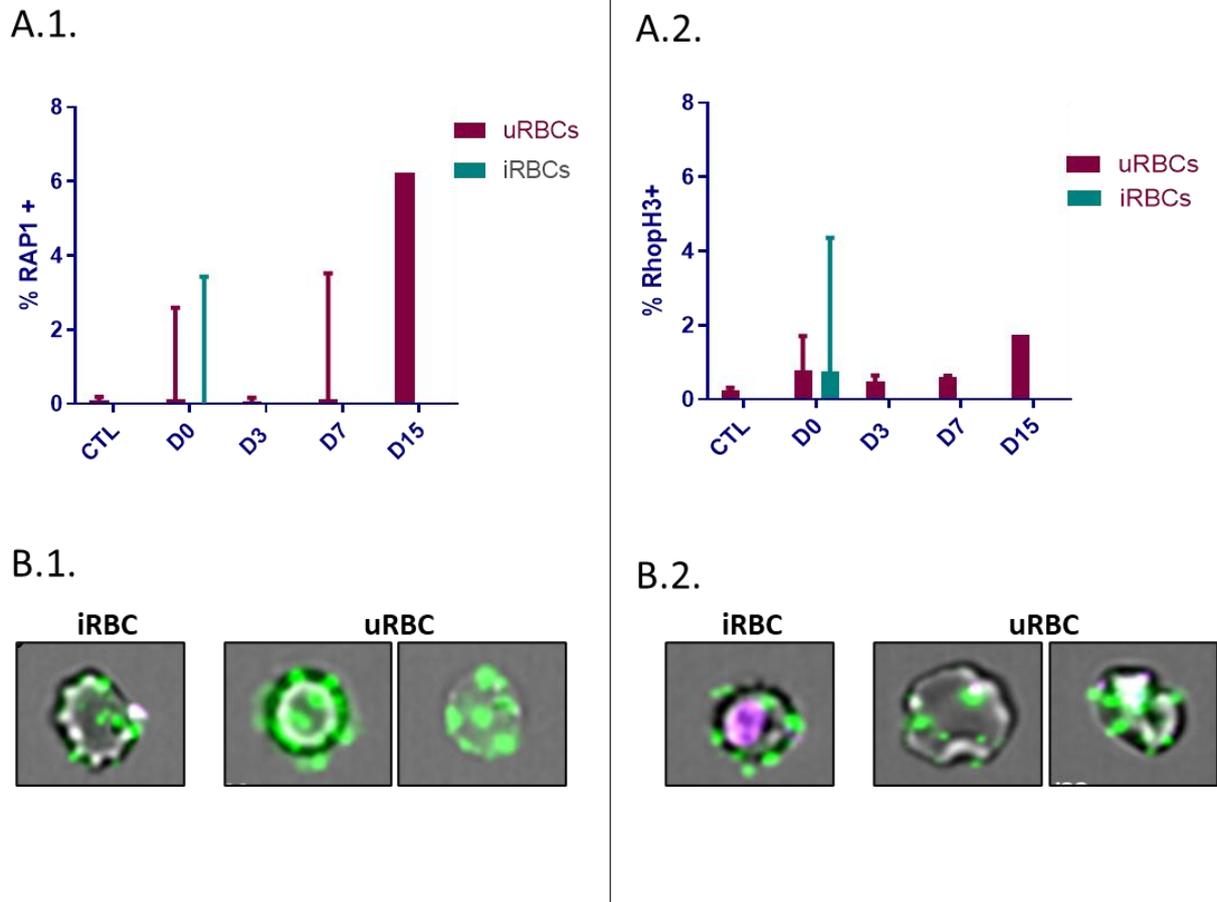


Figure 5 : Surface immunofluorescence with anti-RAP-1 and anti-RhopH3 antibodies (n=5).
 (A) Fluorescence intensity by flow cytometry. (B) Typical aspect by imaging flow cytometry

Hb loss correlates with anti-Phosphatidylserine increase in PADH patient

We measured the levels of anti-phosphatidyl serine (PS) IgG during follow-up. In patients with PADH, there was a correlation between the peak levels of anti-PS IgG and the nadir of Hb both observed on D14 ($p=0.02$), while no correlation was observed in patients without PADH (Figure 6, $p=0.51$).

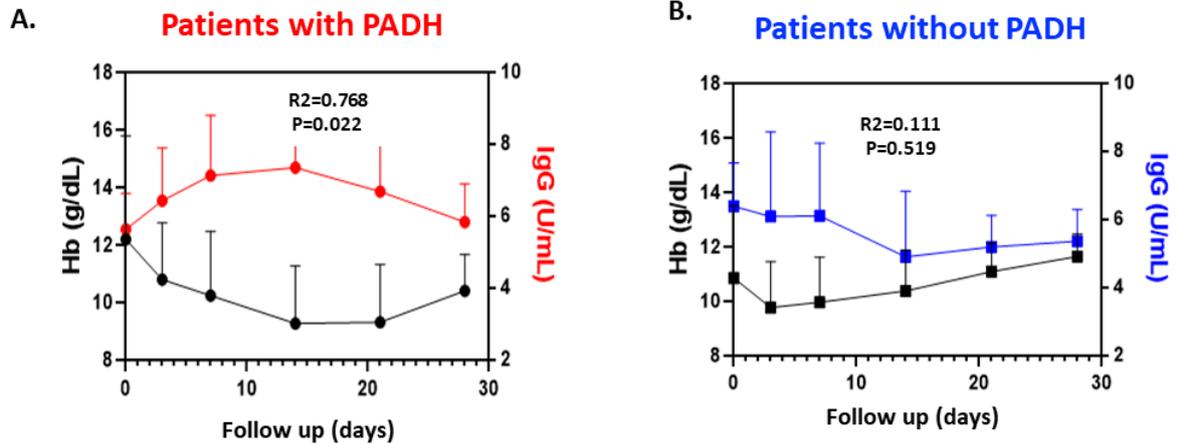


Figure 6. Correlation curve between hemoglobin and anti-phosphatidyl serine IgG. Kinetics of hemoglobin concentration (black line) and anti-Phosphatidyl serine IgG levels in patients A) with (red line, n=19) or B) without PADH (blue line n=6) levels during follow-up. Pearson correlation

Kinetics of RBC-bound C4b and complement regulatory proteins during PADH

To assess the potential involvement of the complement pathway during PADH, we quantified RBC-bound C4b by mass spectrometry and complement regulatory proteins (CRP) by flow cytometry (Figure 7). C4-B opsonin increased progressively from treatment to nadir of hb ($p \leq 0.033$) (Figure 7A). CRP expression significantly decreased upon infection to reach a maximum loss at nadir of Hb ($p \leq 0.0001$ for CD55, $p=0.004$ for CR1, $p=0.048$ for CD59, compared to control). In patients with PADH, CD55 and CR1 significantly decreased before and at hb nadir compared to post-nadir levels ($p \leq 0.02$ for CD55 and $p \leq 0.04$ for CR1) (Figure 7A). The expression of all CRP was similar at baseline (D0) and at the end of the follow-up.

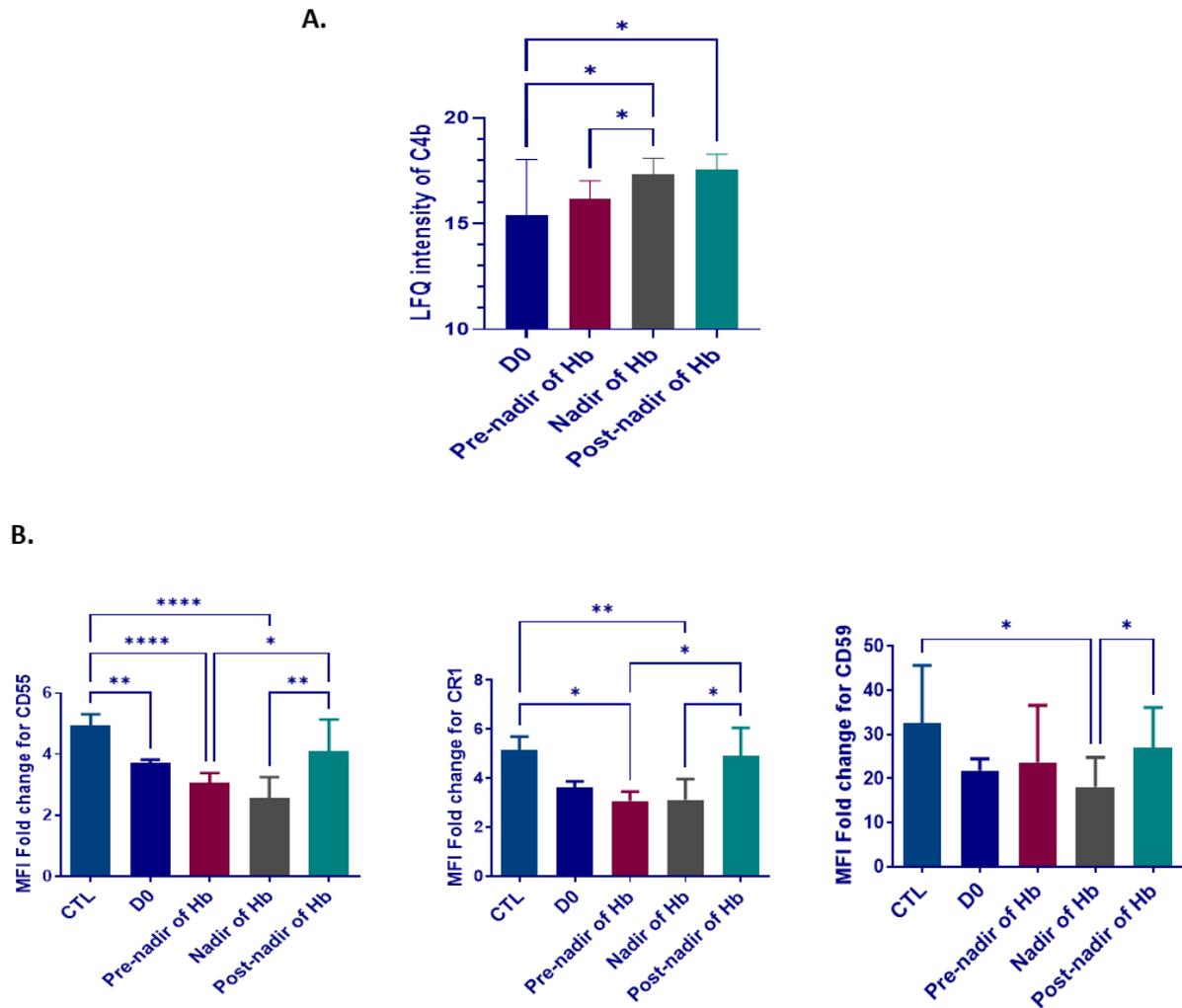


Figure 7. Kinetics of C4b and complement regulatory proteins during PADH.

(A) Quantification by mass spectrometry of opsonin C4b in RBC membranes in 8 PADH patients (B) Quantification by Flow Cytometry of complement regulatory proteins on circulating RBC from 8 PADH patients Paired t-test mixed effects analysis.

Erythrophagocytosis is increased during PADH

We explored if a subpopulation of RBC could be targeted and eliminated by phagocytosis during PADH. Erythrophagocytosis experiments in samples of follow-up were performed with and without opsonization of serum components collected during PADH. Phagocytosis of cultured trophozoite-infected RBC used as a positive control was significantly greater than all other RBC tested ($p < 0.0001$), with opsonization. Erythrophagocytosis was significantly greater in patient's RBC collected during PADH compared to RBC collected before nadir of Hb (37%,

p=0.02) (Figure 8). Added to this, erythrophagocytosis was in mean 1.6 times more important in the presence of convalescent serum (p=0.038, data not shown). This suggests that in circulating RBC are more eliminated through phagocytosis during PADH episode than before or after nadir of Hb.

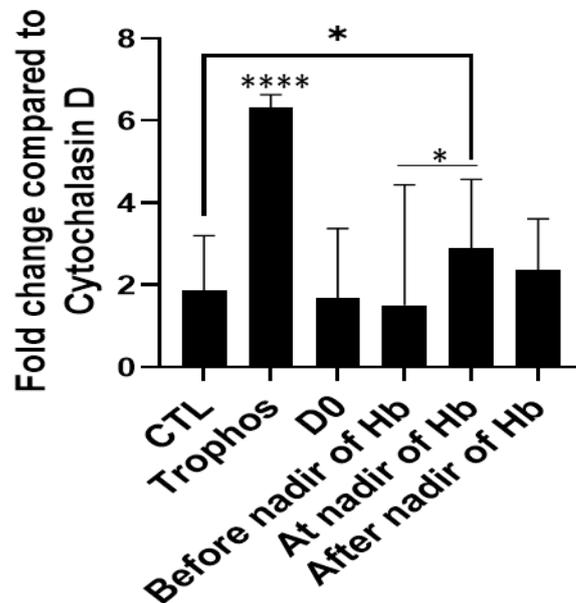


Figure 8. Erythrophagocytosis of patient RBC patient. Erythrophagocytosis was performed in samples collected from 7 PADH patients in presence of convalescent serum. Paired t-test mixed effects analysis.

DISCUSSION

We prospectively explored the mechanisms of post-treatment anemia in 172 patients with severe malaria and hyperparasitemia treated with artemisinin derivatives. Of 95 survivors without preexisting condition who had a complete follow-up and dataset, more than 70% had PADH compared to 15–43% previously described in severe malaria in general [72], [92], [95]. This observation confirms that the risk of PADH is very high in patients with initial parasitemia greater than 4%. As expected, the median loss of hemoglobin between D0 and the day of nadir was significantly greater in patients with PADH compared to patients without PADH. We also confirm that PADH is related to peak levels of pitted RBC [13]. We show, however, that the loss of pitted RBCs is not the predominant mechanism of anemia during PADH. The total loss of RBCs during episodes of PADH is indeed more than twice the peak number of pitted RBCs.

Assuming that all pitted RBCs present at their peak are lost during PADH leads to an overestimate of their contribution to the hemolytic episode because a proportion of them are eliminated after the nadir of hemoglobin has been reached. In addition, the total RBCs loss was underestimated because the compensation by inflowing reticulocytes during the episode was not taken into account in our calculation. Taken together, these data indicate that the loss of pitted RBCs during PADH accounts for less than half—probably about one third—of the total RBCs loss during PADH episodes.

This led us to speculate that infection by *P. falciparum* followed by treatment with artemisinin derivatives triggers alterations of RBCs that persist in circulation beyond parasite clearance. Mass spectrometry analysis on patient samples before and after hemolytic episodes confirmed that multiple parasite proteins persist beyond parasite clearance. We identified indeed 154 parasite proteins present in RBCs collected after all parasitized RBCs had been cleared from the circulation. Of these parasite proteins, 37 disappeared or significantly decreased during the hemolytic episode. Whether these “parasite imprint” proteins are only predictors or rather true operators of anemia during episodes of PADH remains to be firmly established.

A pathogenic role for immunoglobulins in malarial anemia has been suggested by several studies [263], [264], but not specifically explored in the context of PADH.

Immunoprecipitation with convalescent serum followed by mass spectrometry identified 9 parasite proteins associated with RBCs membranes in the post-treatment period and targets of the adaptive host response. Antibodies in the serum of patients with PADH, collected at hemoglobin nadir, recognized indeed parasite proteins considered as candidate operators of anemia because they disappear from the circulation during episodes of PADH. Among those, RAP1, an analog of RAP2 was immunoprecipitated by patient antibodies. Whether RAP1 “decorates” uninfected RBC as previously observed with RAP2/RSP2 [34] is suggested by our observations using surface immunofluorescence. Opsonization, activation of the classical or alternate complement pathways may be favored by such an RBC decoration. Recent studies in patients with PADH [265], [266] highlight the possible contribution of autoimmune and complement-related pathways during PADH, although no robust correlation exists between the results of the direct antiglobulin test and anemia during PADH [267]. We also observed a loss of complement regulatory proteins during malarial anemia. A significant increase of opsonin C4b fixation to RBC during PADH was observed by mass spectrometry, along with a

decrease in the expression of complement regulatory protein by flow cytometry (Figure 6). These data suggest a possible implication of the complement pathway during PADH.

PS exposed on the external plasma membrane of RBC can be recognized by either anti-PS immunoglobulins and, directly or indirectly by cells of the monocyte-macrophage lineage, ultimately resulting in the phagocytosis of altered RBC. Here, we showed that, in patients with PADH, there is a significant correlation between peak levels of anti-PS antibodies and the fall in Hb, a correlation that was not observed in patients without PADH. This suggests that PS exposure and an activation of the immune response during PADH may contribute to anemia. Along this line, there was a significant of 37% increase in RBC phagocytosis in the presence of convalescent serum when comparing samples collected before and after PADH (Figure 6). Simultaneously, the expression of RBC-bound “don’t eat me” signal CD47 did not vary (data not shown).

We therefore propose that after treatment with artemisinins, RBC in circulation after parasite clearance are modified by pitting, and possibly by decoration of uninfected RBC by RAP-1. Opsonization or dysregulation of RBC-bound complement fractions or regulatory proteins may thus contribute to anemia during PADH through processes that affect not only pitted RBCs but also RBCs that have never been infected.

Beyond the mechanistic exploration of malarial anemia before and after treatment, the multiple molecular alterations observed on RBC persisting in circulation at least until hemolysis during PADH may also lead to the identification of new candidates for new diagnosis and PADH-predictive tests, in the context of sustained emergence of indel mutations in the *P. falciparum* HRP2 gene. These results may also open interesting avenues in the context of natural and vaccine-induced immunization.

Notes

Acknowledgments. We thank all patients and their families for participating in this study.

Disclaimer.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Financial support. This work was supported by the French National Agency of Research (ANR, project PhesMA), the French Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), the GR-Ex laboratory of excellence and Guilin Pharmaceutical. A. T. was supported by the Assistance Publique—Hôpitaux de Paris. C. C. was supported by the French Ministry of Research and by a grant from the GR-Ex laboratory of excellence.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE

Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

2.4. Explorations complémentaires

2.4.1. Contexte

Les changements dans les propriétés biomécaniques conduisant à l'élimination des GR peuvent être liés à des altérations morphologiques. Pendant l'infection par *Pf*, les GRi ont une déformabilité réduite, conséquence d'une perte du rapport surface/volume [134], [250]. Ils deviennent sphériques et rigides [238]. Ces changements contribuent probablement à la clairance des GR dans la rate, puisque les GR moins déformables sont retenus mécaniquement en amont des fentes inter-endothéliales [239]. La morphologie des GR dépend de plusieurs paramètres dont la composition/stabilité de la membrane et la composition/viscosité du cytosol. Afin d'évaluer l'impact de l'infection par *Pf* et les conséquences du traitement par les DA, nous avons mesuré les caractéristiques morphologiques (surface projetée, circularité et rapport d'aspect) des GRi avant traitement et des GR pittés après le traitement, par rapport aux GRni contenus dans les mêmes échantillons. Ces explorations ont été réalisées sur des échantillons collectés directement chez des patients ou sur des échantillons de cultures traités puis injectés dans des rates humaines isolées et perfusées pour induire la clairance parasitaire et générer des GR pittés *ex vivo*. Les analyses ont été réalisées à l'aide de la technologie Imagestream.

Par ailleurs, le contrôle du volume du GR et le transport des nutriments nécessaires à la survie du parasite sont assurés en partie par l'activité des NPP. Leur origine et leur nature n'étant pas encore définies, nous avons voulu vérifier si l'expression de canaux ioniques, qui font probablement partie des NPPs, était modulée après traitement par DA dans les différentes sous-populations de GR circulants. Comme la quantité de canaux ne reflète pas forcément leur réelle activité, nous avons également évalué la perméabilité des GR de patients (reflétant l'activité des canaux ioniques) par la technique de Patch clamp en collaboration avec l'équipe du Dr Stéphane Egée. Cependant l'étude en patch clamp que nous avons réalisée est une analyse cellule par cellule complexe et à très faible flux, surtout dans les cas où les cellules d'intérêt sont rares ou difficilement repérables dans le milieu. Si des données existent pour les GRi par des formes matures de *Pf*, aucune donnée n'est disponible concernant les GR parasités par des formes jeunes (anneaux) et les GR pittés. Actuellement, les GR pittés ne

peuvent pas être triés/concentrés par cytométrie en flux. Nous avons donc d'abord mis au point une méthode de concentration des GR infectés par des stades anneaux (jeunes) du parasite et des GR pittés. Nous avons ensuite analysé et comparé en Patch clamp les résultats obtenus entre les GR sains, GRi-matures, GRi-rings circulant et GR pittés.

2.4.2. Matériel et Méthode

Souches parasitaires et conditions de culture

Les parasites de la souche NF54 ont été cultivés dans des globules rouges O+ de donneurs sains (Établissement Français du sang) à 4 % d'hématocrite dans un milieu composé de RPMI 1640 Glutamax contenant HEPES (Life Technologies) complété par 10 % de sérum humain décomplémenté AB+ (Établissement Français du sang), 50 μ M d'hypoxanthine (Sigma Aldrich) et 20 mg/L de gentamicine (Sigma Aldrich). Les cultures ont été maintenues sous une parasitémie de 5 % et incubées à 37 °C, 5 % CO₂, 5 % O₂ et 90 % N₂.

Perfusion d'une culture de *P. falciparum* (GRi) traitée par DA dans des rates humaines isolées

Des cultures asexuées de *P. falciparum* au stade ring ont été traitées avec 1 μ M d'artésunate pendant 6 h puis post-incubées pendant 12 h puis lavées deux fois avec du RPMI. Les rates issues du protocole « Spleen vivo » ont été prélevées comme décrit précédemment [38]. Les échantillons utilisés pour la perfusion de la rate ont été colorés CellTrace Far Red (Life Technology) à 1:460 pendant 30 minutes, lavés deux fois dans du PBS, et mélangés avec 10 volumes de RBC provenant du même donneur. L'expérience a été réalisée dans une solution de Krebs (tampon Krebs-Henseleit, Sigma Aldrich), complétée par 2 g de glucose, 2,1 g de bicarbonate de sodium, 0,175 g de chlorure de calcium déshydraté, et 5 g d'Albumax II (Thermofisher) dans 1 litre d'eau stérile, et ajustée à pH 7,4. Des échantillons ont été prélevés à différents moments de la perfusion afin de suivre la clairance du parasite, le relargage des GR pittés et d'évaluer les changements morphologiques des GR au cours des différents passages spléniques.

Analyse morphologique par Imagerie en Flux

Au moins 100 000 globules rouges ont été acquis par imagerie en flux (Amnis ImageStream, EMD Millipore). Le logiciel IDEAS 6,2 a été utilisé pour distinguer les GRni, les GRi et les GR pittés. La surface projetée, l'aspect ratio et la circularité des cellules enregistrées nettes et vues de face ont été évalués comme décrit dans [268]. Nous supposons que la coloration des RBC induit des modifications similaires sur les différentes sous-populations de RBC provenant du même échantillon. Les pourcentages de variation par rapport aux GRni ont été calculés à l'aide de la formule suivante : $\text{variation \%} = (\text{moyennes pour GR pittés ou GRi} - \text{moyenne GRni}) / \text{moyenne GRni} \times 100$. Un t test apparié paramétrique Anova a été réalisé pour les données des rates humaines perfusées *ex vivo*, et un t test apparié a été réalisé pour les données des GR des patients.

Aliquotage, stockage et test de SLO

La streptolysine-O (SLO, Sigma-Aldrich S5265-25KU, [CAS 98072-47-0]) a été dissoute dans 1 ml de DPBS1x. 4 flacons ont été rassemblés, aliquotés et stockés à -80 °C. Le DiThioThreitol (DTT, Sigma-Aldrich D9779 [CAS 3483-12-3]) a été préparé en dissolvant 1,54 g de DTT dans 10 ml de HEPES stérile et conservé à -20 °C.

L'activité hémolytique de SLO a été mesurée sur des GR sains et des GRi, à 2 % d'hématocrite en DPBS1X. Le SLO a été activé en ajoutant 0,1 volume de DTT 1M et en incubant le mélange à température ambiante pendant 15 minutes. Les échantillons de GR ont été incubés dans 6 conditions différentes de SLO (0U / 20U / 40U / 60U / 80U / 120U) à 37 °C pendant 30 minutes. Après 3 minutes à 2500 g, le surnageant a été recueilli et les culots ont été lavés avec 25 mL de DPBS1X-BSA 5 %. Comme contrôle, des frottis sanguins ont été réalisés à partir des culots et ensuite colorés avec la coloration de Giemsa. L'hémolyse a été mesurée à partir des surnageants par le photomètre Plasma/Low Hb (HemoCue). La quantité de SLO permettant de lyser la moitié des GR est appelée unité hémolytique (HU) Sur la base de l'hémolyse, l'HU a été calculée et 20HU/200 µl d'échantillon ont été utilisés pour les expériences.

Enrichissement de GRi par des stades rings et de GR pittés par Streptolysine O (SLO)

La souche F32 Tem synchronisée au stade ring et les GR de patients avant ou après traitement ont été centrifugés à 300 g pendant 5 min et lavés 2 fois avec du DPBS1x. 40 µl et 400 µl de chaque culot ont été ajoutés respectivement à 160 µl et 1600 µl de DPBS1x pour atteindre 20 % d'hématocrite. Les culots de 40 µl (ci-après « pré-SLO ») ont été conservés à 4 °C comme contrôle. Un nombre adéquat d'aliquotes SLO a été décongelé, assemblé et entièrement activé en ajoutant 0,1 volume de DTT 1M et en incubant le mélange à RT pendant 15 min. Chaque culot a été mélangé avec 40HU de SLO activé (par exemple, pour un lot dans lequel 1UH correspondait à 60U, 105,6 µl de SLO activé ont été ajoutés à 400 µl de culot dissous dans DPBS1X). Les échantillons ont été agités à la main pendant 6 min, permettant l'action lytique de l'ALS. Le processus a été arrêté par un lavage avec au moins 20 ml de DPBS1X/BSA5 % deux fois suivi d'un autre lavage avec au moins 20 ml de DPBS1X supplémenté avec 1%BSA pendant 1 fois (centrifugation à 2500xg pendant 3 min). Le volume du culot a été estimé, des frottis sanguins ont été réalisés et colorés avec le réactif Giemsa pour une analyse ultérieure. Tout le volume a ensuite été transféré dans un nouveau tube plus approprié et ajouté avec 160 µl de DPBS1.

Patch Clamp

Les expériences de patch-clamp ont été réalisées à température ambiante en utilisant la configuration « whole cell ». Les pipettes ont été étirées à l'aide d'un extracteur universel DMZ (Zeitz Instruments, Allemagne) à partir de capillaires en verre de borosilicate (GC150F-10, appareil Harvard, Royaume-Uni). La solution de Ringer NaCl ajustée à pH 7,4 a été utilisée pour la totalité de l'expérience. Dans 500ul de Ringer sont ajoutés 4ul de RBCs à analyser. Un GR a été ensuite attrapé par une aspiration délicate. Les résistances du scellement ou « seal » étaient de $> 5 \text{ G}\Omega$, et la configuration « whole cell » (configuration dans laquelle on peut enregistrer l'ensemble des conductances de la membrane) a été obtenue par une brève impulsion électrique (zap) et a été évaluée par l'observation de capacités transitoires et la réduction de la résistance. Les courants ont été enregistrés à l'aide d'un amplificateur Axopatch 200B (Molecular Devices, USA) ou RK400 (Biologic, France). Les courants ont été provoqués en générant une série de potentiels de membrane de +100 à -100 mV par pas de -

10 mV pendant 500 ms, à partir d'un potentiel de maintien de 0 mV. Le 5-nitro-2-(3-phénylpropylamino) benzoate (NPPB) a été utilisé comme inhibiteur sélectif des canaux chlorure.

L'analyse finale des courants enregistrés a été réalisée par Guillaume Boyer de la Station Biologique de Roscoff comme indiqué sur la Figure ci-dessous. À noter que la courbe I/V d'un GR de sujet sain est plane et sa conductance membranaire est négligeable (de l'ordre de 45 pico-Siemens).

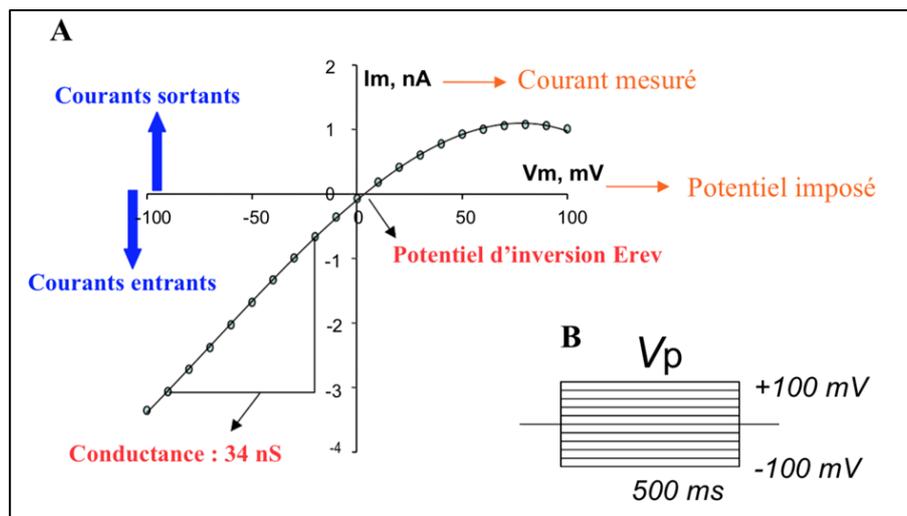


Figure 35 : Principes de l'analyse des courants enregistrés en patch-clamp. (A) Courbe courant-potential I/V tracée après analyse des courants pour chaque potentiel imposé, on y lit ici en configuration whole-cell la conductance et le potentiel d'inversion. (B) Stimulation imposée (whole-cell) : rampes de potentiels de -100 à +100 mV d'une durée de 500 ms chacune.

2.4.3. Résultats

Altérations morphologiques des GR pittés suite à l'infection et au traitement

Nous avons analysé les différentes sous-populations de GR à partir d'expériences *ex vivo* par perfusion de rates humaines avec des cultures de parasites asexués de *Pf* (Figure 36C) et directement *in vivo* à partir d'échantillons de sang de patients avant (GRi) et après traitement (GR pittés) (Figure 36B). Le principal paramètre morphologique modifié a été la perte de surface projetée des GR pittés par rapport aux GRni/GR pittés, à la fois *in vivo* (-2,64 %, $p=0,037$) et *ex vivo* (-12,8 %, $p<0,001$), confirmant une précédente observation allant dans ce

sens *in vivo* sur un petit nombre d'échantillons [250]. Une altération légère, mais significative de l'aspect ratio a également été observée *in vivo* avec un nombre élevé de mesures et d'échantillons, à la fois pour les GRi et les GR pittés (+0,32 % et 0,23 %, $n = 25$ et 33 et $p < 0,0001$).

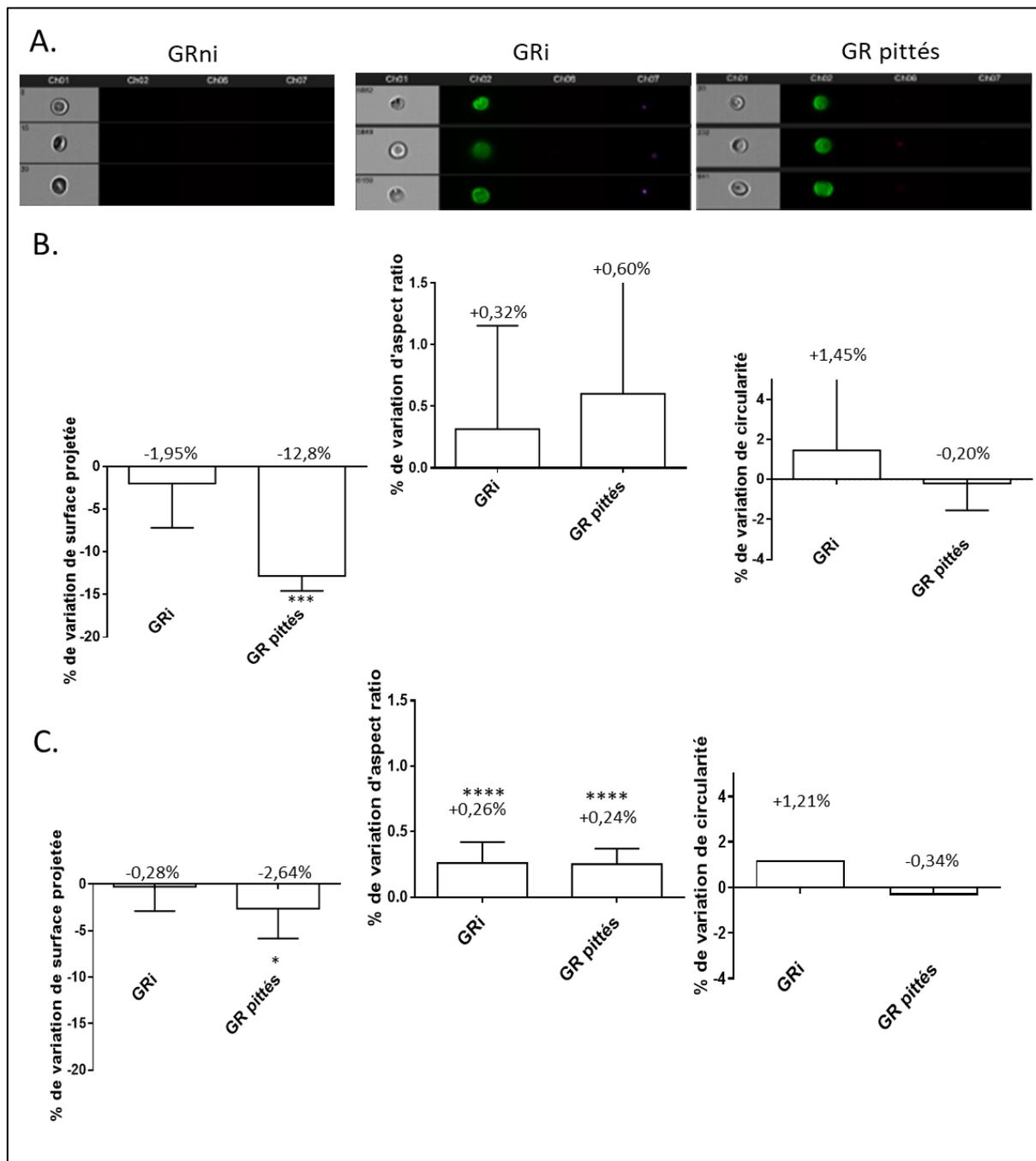


Figure 36 : Altérations morphologiques des GR et GR pittés. Analyse par imagerie en flux de différents paramètres : surface projetée, aspect ratio et circularité. A. Images de globules rouges non infectés, infectés et une fois infectés. Canal 1 : Brightfield ; Canal 2 : ADN du parasite ; Canal 6 : SSC ; Canal 7 : Immunofluorescence avec un sérum polyclonal humain hyperimmun. B & C. Variation de la surface projetée, de l'aspect ratio et de la circularité des

GRI ou des GR pitées par rapport aux GRni dans le même échantillon, soit à partir d'une perfusion *ex vivo* à travers des rates humaines (B, n=4), soit à partir du sang de patients (C, GRI n=25 ; GR pitées n=34). Median with interquartile range. T test appariés

Surexpression de VDAC durant l'infection et le traitement.

La quantité de canaux ioniques présents dans les GR de patients à différents temps post-traitement a été mesurée par spectrométrie de masse selon le protocole indiqué dans le **chapitre 2.3**. Nous avons constaté que Piezo (canal impliqué dans l'entrée de calcium dans le GR, l'activation de Gardos, l'exposition des phosphatidylsérines à la surface du GR ou encore le rétrécissement cellulaire) n'était ni surexprimé ni sous exprimé durant la convalescence du patient. En revanche, la quantité de Voltage Dependant Anion Channel (VDAC) impliquée dans le relargage d'ATP et dans l'éryptose [269], et up régulée dans les GRI par *Pf* [270]) était significativement augmentée durant la PADH (p=0,018) (Figure 37).

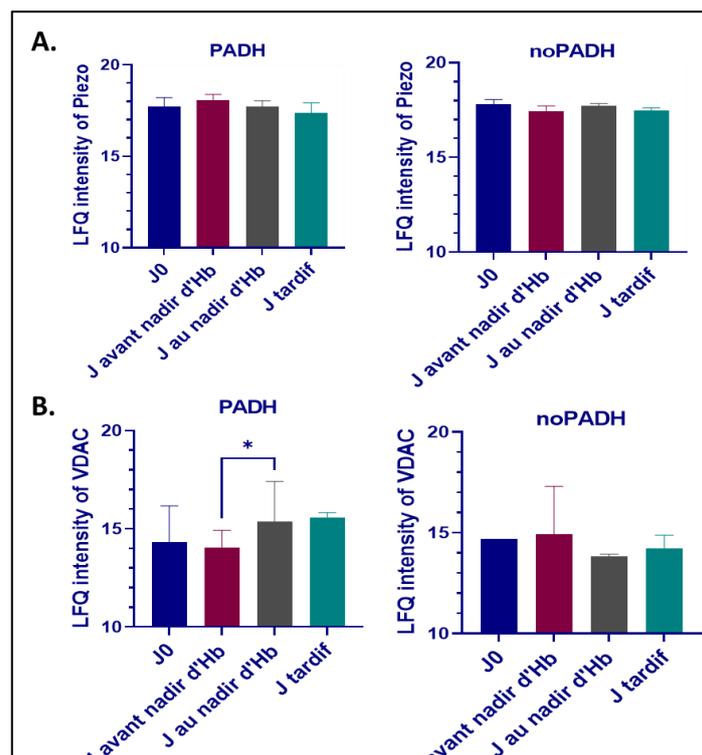


Figure 37 : Quantification de canaux ioniques par spectrométrie de masse à différents temps post-traitement. Sur des échantillons de patients provenant de 8 patients ayant développé une PADH et 6 patients n'ayant pas développé de PADH. Quantités en LFQ intensity de (A) Piezo, (B) VDAC. Median with interquartile range. Tests statistiques en modèles mixtes.

L'activité des NPPs est mise en place de façon très précoce après l'infection et persiste dans le GR pité

Le profil électrophysiologique des GRi par des stades trophozoïtes est relativement facile à obtenir, car le parasite est très visible à l'œil nu. Cependant, les GRi par des stades rings et les GR pités ne sont pas aussi visibles. Il est donc difficile de les repérer et de les analyser en patch clamp. C'est pourquoi il était nécessaire de trouver une méthode d'enrichissement/purification pour augmenter la chance de pouvoir analyser leur profil électrophysiologique. La SLO a la propriété de former des pores au niveau des molécules de cholestérol dans la membrane des GR. Sachant que lors de l'infection, *Pf* réquisitionne le cholestérol de la membrane de GR, des équipes ont montré qu'elle peut être utilisée pour lyser préférentiellement les GR qui n'ont jamais été infectés dans des cultures de *Pf* [271], [272]. Des études préliminaires réalisées par Ilhame Tantaoui (étudiante pharmacienne qui a réalisé son stage de master au sein de l'équipe) ont montré la persistance de la fonctionnalité/viabilité des cellules concentrées après SLO pour la souche de culture, puisqu'après remise en culture, les parasites ont bien mûri et recommencé de nouveaux cycles de multiplication. La signature électrophysiologique typique de l'infection a pu être caractérisée sur des GRi par des stades trophozoïtes (Figure 38A), par des courbes courant-tension montrant un flux entrant ou courant rectifié entrant (courant plus faible au potentiel de membrane positif qu'aux potentiels de membrane négatifs). Dans les GRi par des stades rings enrichis par SLO, il a été observé pour la première fois que leur profil électrophysiologique montrait également un flux entrant même s'il était moins important (amplitude de la courbe moins marquée) que pour les GRi par des stades matures (**Figure 38B**). Cela suggère que le parasite met en place de manière très précoce l'activité des NPPs. De façon intéressante, lorsque l'on a mimé la physiologie d'un GR de patient après traitement en traitant des GRi par des stades rings par artésunate 48 h, puis en les concentrant à la SLO, le profil de conductance se trouvait très similaire à celui des GRi par des stades trophozoïtes (**Figure 38C**). Les NPP semblent être mis en place de manière continue même après traitement.

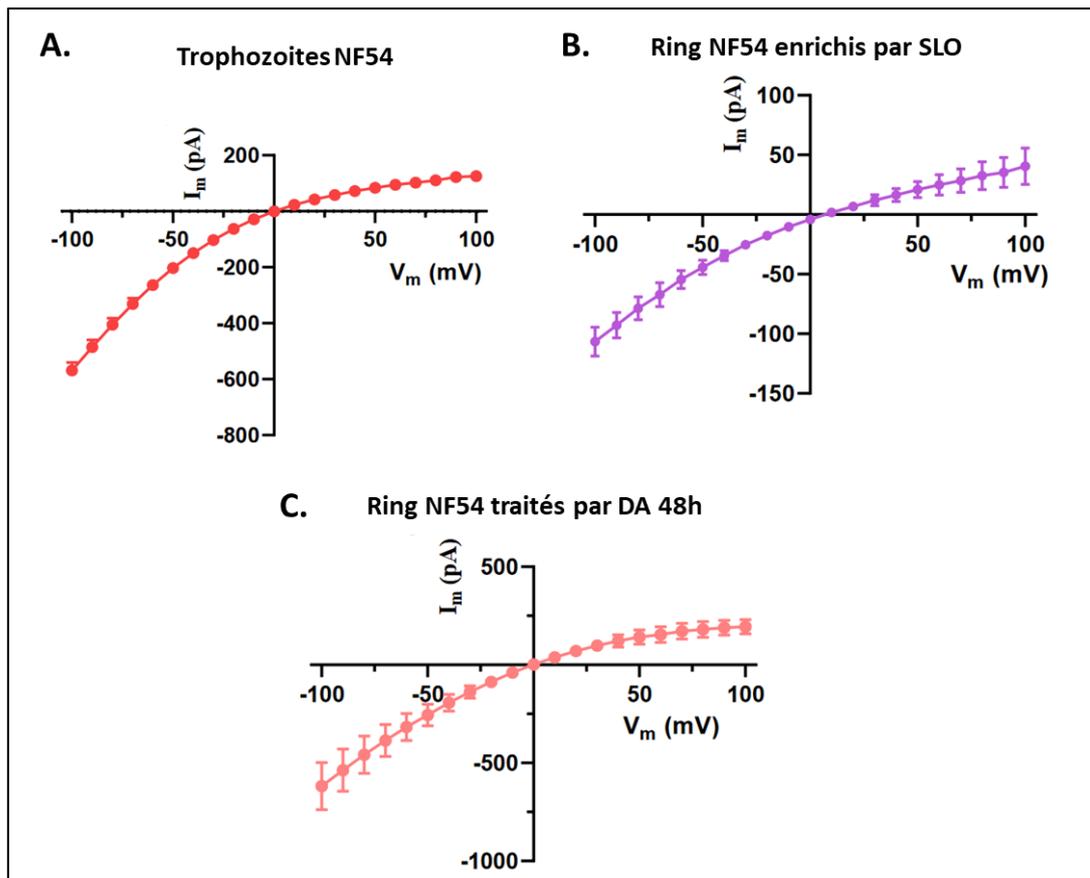


Figure 38 : Courbe courant/potentiel (I/V) de GR infectés. (A) *GRi* par des stades trophozoïtes ($n=14$). (B) *GRi* par des stades rings enrichis par SLO ($n=3$). (C) *GRi* par des stades ring, traités 48 h par artésunate (DA) et concentrés à la SLO ($n=4$).

En partant de l'hypothèse que la membrane du GR pité était similaire à celle du *GRi* par des stades rings, Ilhame Tantaoui a également montré que les GR pités pouvaient être concentrés grâce à la SLO. De façon intéressante, les GR pités présentaient un flux entrant similaire à celui des *GRi* par des rings, représentant l'activité maintenue des canaux ioniques. Ce flux se trouve être significativement inhibé suite à l'utilisation de l'inhibiteur des canaux chlorure NPPB, prouvant ainsi l'origine du flux entrant observé (Figure 39).

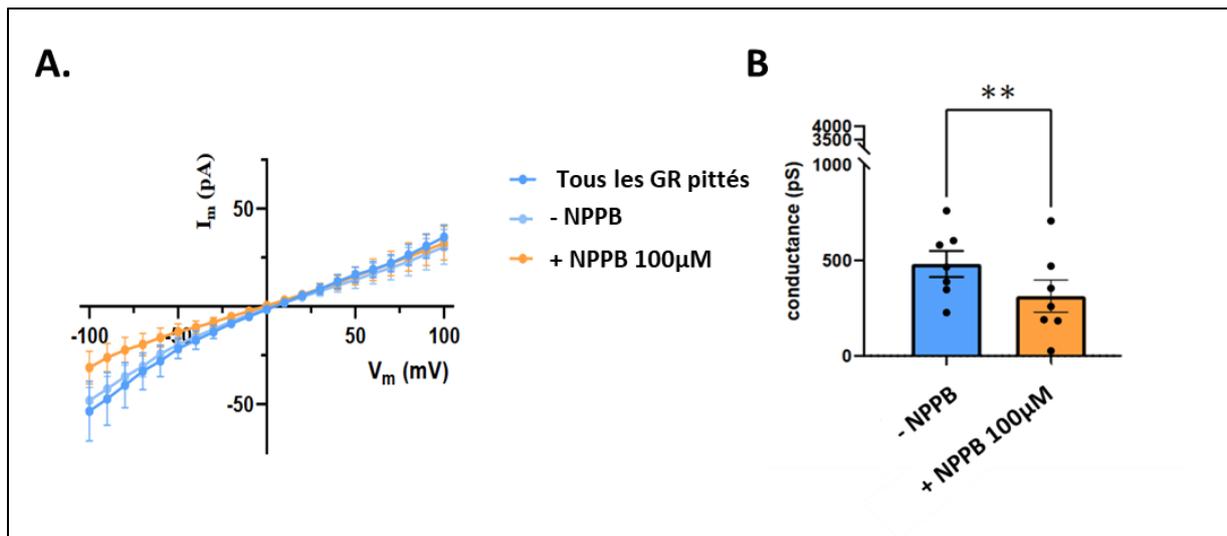


Figure 39 : Conductance des GR pittés. Courbe I/V (A) et comparaison des conductances des GR pittés non traités au NPPB (-NPPB) ou traités avec 100µM de NPPB (+100µM de NPPB). Tous les GR pittés sans traitement NPPB (n=22), GR pittés avant traitement NPPB et GR pittés traités au NPPB. T tests appariés

2.4.4. Résumé

Nous avons vu dans les résultats précédents que les GR pittés étaient plus retenus dans les expériences de microfiltration (**chapitre 2.1**) L'observation d'une diminution de la surface projetée des GR pittés en Imagerie en flux pourrait suggérer que lors du pitting, l'expulsion du parasite entraîne une perte de membrane. Si cette perte de surface n'est pas associée à une perte de volume, le ratio surface/volume diminué pourrait expliquer la rigidification du GR pitté, le rendant moins de moins en moins apte à traverser le filtre splénique.

De plus, l'augmentation de l'expression de VDAC induit la baisse d'ATP intracellulaire, ce qui pourrait être à l'origine de modifications de la morphologie et d'une baisse de la déformabilité [273] [274]. Nos résultats montrent que la quantité de Piezo n'était pas impactée par le traitement, mais cela ne prouve toutefois pas que son activité ne soit pas modifiée durant la convalescence. Le prétraitement par SLO a permis d'enrichir efficacement les GR infectés par les stades jeunes et les GR pittés provenant de cultures ou de patients atteints de paludisme grave. Cela a permis d'analyser pour la première fois ces cellules en Patch Clamp et de montrer que l'activation des NPP survient plus tôt dans le cycle de développement asexué que ce qui était connu, c'est-à-dire dès le stade anneaux. Cette activité NPP persiste dans les GR parasités

par des anneaux tués par artésunate, ainsi que dans les GR pittés. Ces nouvelles observations indiquent une modification précoce puis persistante des canaux ioniques dans les GR pittés qui pourrait être impliquée dans leur élimination retardée lors de la PADH.

Discussion

3.1. Synthèse

L'objectif général de cette thèse était la compréhension des mécanismes conduisant à l'élimination des GR lors des anémies dans le cadre du paludisme grave d'importation traité. Parce que l'anémie précoce survient après traitement par tout antipaludique alors que l'anémie différée complique quasi exclusivement les traitements par dérivés de l'artémisinine, nous avons abordé séparément ces deux entités.

Une anémie précoce peut se produire après le traitement, avec un nadir de l'hémoglobine généralement observé 3 à 7 jours après le traitement. Les mécanismes complexes de ces anémies ne sont pas totalement élucidés. Nous avons montré que la perte des GRi et/ou pittés ne suffit pas à l'expliquer totalement. Cette dernière résulte donc, au moins en partie, de l'élimination de GR qui n'ont jamais été infectés. Plusieurs pistes mécanistiques non mutuellement exclusives, liées à la fois à la biomécanique des GR et à leur composition membranaire, ont été explorées. Ces pistes confirment l'existence d'altérations parfois marquées, sans pouvoir toutefois conclure formellement quant à leur responsabilité directe dans une clairance excessive ou accélérée des GR pouvant expliquer l'anémie.

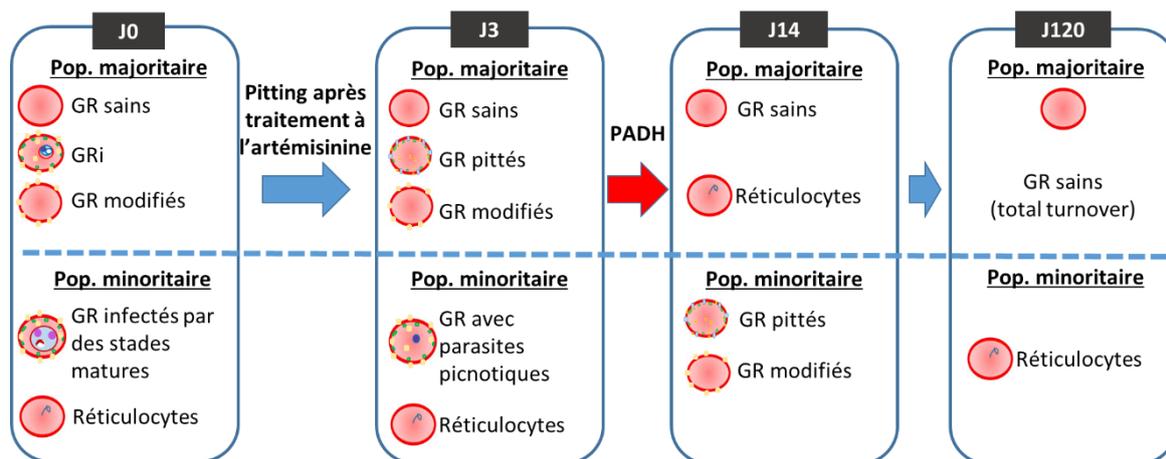


Figure 40 : Distribution théorique des différentes sous populations de GR liées aux anémies post-traitement

À la suite de l'introduction de l'artésunate en France et plus largement en Europe [92] [95] [96] [275], mon équipe d'accueil et d'autres équipes européennes ont mis en évidence la survenue d'anémie hémolytique retardée. Cet effet secondaire avait été rapporté au Japon une fois en 2002 [94] sans vraiment attirer l'attention de la communauté scientifique. L'artésunate a été disponible plus largement en Europe dans les années 2010 du fait de la levée d'obstacles réglementaires quant à sa production aux normes GPM, de la publication de grandes études cliniques [58] [59], et de la mise à jour des recommandations de l'OMS [241] et de l'avis d'experts français qui se sont mobilisés en 2009 pour faire appliquer les recommandations de la conférence de consensus nationale de 2007 sur le traitement du paludisme. Dès lors, des pays comme la France qui est le premier pays de paludisme d'importation, ont pu observer sur des suivis de 28 jours, que 15 à 27 % des patients traités par artésunate pour un paludisme grave développaient cette anémie hémolytique retardée [244] [247] [248] [250] [252]. D'autres grands pays d'importation du paludisme comme les États-Unis n'ont pu voir ce phénomène que tardivement puisque leurs suivis se limitaient pour la plupart à J7, voire un dernier point de suivi à J28. Cette anémie hémolytique, définie par l'équipe d'accueil comme une baisse d'au moins 10 % du taux d'hémoglobine et/ou 10 % d'augmentation de la LDH au-delà de J7, a été appelé Post-Artesunate Delayed Hemolysis (PADH) [250]. Contrairement à l'anémie précoce post-traitement, la PADH est associée à la destruction des GR pittés [250] [275]. Bien que le taux élevé de GR pittés corrèle avec la survenue de la PADH, nous avons également montré que le nombre de GR perdus durant la PADH était au moins deux fois supérieur au nombre total de GR pittés produits après mise en route du traitement. Chez

95 patients suivis avec précision, nous avons montré que la perte des GR pitées ne pouvait rendre compte au maximum que de 42 % de la perte totale des GR durant la PADH, suggérant que la perte de GR n'ayant jamais été infectés contribuait également grandement à cette anémie retardée. Il y a là un point de convergence avec nos explorations des mécanismes de l'anémie post-thérapeutique précoce. Ces résultats suggèrent en effet la présence d'altérations de GR n'ayant jamais été infectés, mais ayant subi des modifications moléculaires, biochimiques ou morphologiques pendant l'infection et/ou le traitement, suffisantes pour induire leur clairance (**Figure 40**). Même si le mécanisme exact de ces anémies retardées n'était pas encore clarifié, leur incidence élevée chez l'adulte en fait l'effet secondaire le plus fréquent dans le traitement du paludisme.

Par ailleurs, le lien entre la PADH et le pitting d'une part et la clairance parasitaire indépendante du pitting dans certaines catégories d'âge chez l'enfant d'autre part [243], ajouté à d'autres études rapportant une incidence très variable chez l'enfant [244]–[248], [252], nous a conduit à explorer en collaboration avec le service d'urgence pédiatrique de l'hôpital Robert Debré, la PADH chez l'enfant atteint de paludisme grave d'importation.

L'exploration des causes de ces anémies post-traitement est complexe puisque le paludisme et/ou son traitement par DA peuvent induire de nombreuses altérations des GR de patients, pouvant être à l'origine de la perte de GR, soit en induisant la rétention splénique (rigidification des GR, cytoadhérence aux cellules endothéliales ou bien par rosetting [8]), soit en induisant leur élimination par des effecteurs immunologiques. Nous avons donc procédé à la caractérisation des GR avant et après traitement selon les modifications de types biochimiques et moléculaires ou bien de types biomécaniques. Nous avons ensuite exploré des mécanismes potentiels de leur élimination.

Ce travail de thèse a donc été subdivisé en 3 études étroitement liées par le phénomène de perte érythrocytaire après traitement du paludisme grave.

1) Étude des altérations des GR post-traitement par artémisinine au cours du paludisme grave

Dans notre première étude, nous avons exploré les modifications physiopathologiques des sous-populations de GR en évaluant les altérations biochimiques et mécaniques au cours d'un paludisme grave traité avec des dérivés de l'artémisinine.

Tout d'abord, l'équilibre lipidique de la membrane plasmique est un élément important dans la déformabilité et la stabilité des GR [117]–[119]. Dans le cas de l'infection à *Pf*, qui permet le retour d'un « noyau » dans le GR, le parasite doit mettre en place différents mécanismes afin de disposer des lipides nécessaires à son développement et sa survie (biosynthèse de certains phospholipides ou séquestration du cholestérol qu'il n'est pas capable de synthétiser). La mesure du contenu lipidique avant traitement des patients par dérivé d'artémisinine a révélé un maintien du rapport Cholestérol/Phospholipides après l'invasion. On note toutefois une augmentation du taux de cholestérol et du taux de Phosphatidylinositol (PI) et Phosphatidyletanolamine (PE) simultanément. Vu la stabilité de l'équilibre lipidique en condition normale, on peut supposer que ces variations observées à l'échelle populationnelle soient liées aux changements induits dans la sous-population de GRi. Ce résultat n'est donc pas étonnant, car le parasite séquestre le cholestérol de la membrane du GR de même qu'il incorpore celui dérivé des cellules hépatiques [216]. Cependant, après le traitement, on observe une augmentation du rapport Cholestérol/Phospholipides. En effet, la production de PI et PE par le parasite est arrêtée lorsque celui-ci est tué par le traitement, puis éliminé par le pitting. Le cholestérol réquisitionné par le parasite semble persister vraisemblablement dans le GR pité. Ajouté à la diminution de la surface projetée des GR pités observée en Imagerie en flux, ces résultats suggèrent que lors du pitting, l'expulsion du parasite entraîne principalement la perte de PI et PE (soit associés au résidu expulsé soit à la membrane du GR perdu). Cette altération du ratio Cholestérol/Phospholipides peut entraîner une diminution de la fluidité membranaire et augmenter l'hémolyse lors du passage des GR dans les fentes inter-endothéliales de la rate [118], [154], [160], [161], [240].

D'autres altérations de la surface des GRi et GRni telles que l'exposition des Phosphatidylsérines ont également été décrites [219]. Nous n'avons pas pu faire de mesures directes à la surface des GR de patients et les dosages en lipidomique ont été réalisés sur les lipides totaux, ce qui ne permet pas d'apprécier leur exposition ou non à la surface.

Par ailleurs les changements des propriétés mécaniques des GR ont aussi un impact sur leur capacité à circuler et à traverser la rate. Pendant l'infection à *Pf*, les GRi ont une déformabilité réduite, conséquence d'une perte du rapport surface/volume [134], [250]. Les GRi deviennent sphériques et rigides [238]. Ces changements contribuent probablement à la clairance des GR dans la rate puisque les GR moins déformables sont retenus mécaniquement dans la fente interendothéliale [239]. En lien avec ces observations, nous avons pu consolider des données antérieures de l'équipe, en montrant que les GR pittés et dans une moindre mesure, les GRi, ont une surface projetée réduite. Ces résultats ont été obtenus en analysant des GRi issus de patients ou de culture et des GR pittés de suivis de patients ou que nous avons générés *ex vivo* dans des expériences de perfusion de GRi traités par artémisinine dans des rates humaines. Les GR pittés générés *ex vivo* présentaient une perte de surface de 12,8 % et les GR pittés de patients avaient une surface projetée diminuée de 2,94 % par rapport aux GR n'ayant jamais été infectés. La différence d'amplitude de la perte de surface est marquée, mais cela pourrait être dû à la différence de cinétique de clairance des échantillons analysés, puisque le mécanisme de clairance des GR altérés est continu et progressif chez le patient, alors que les conditions expérimentales et la cinétique courte dans la perfusion de la rate peuvent permettre la circulation de ces GR altérés. Le seuil de rétention de la rate pourrait également différer *ex vivo* en devenant plus permissif pour les GR altérés.

Ces données sont en tout cas cohérentes avec le fait que les GRi et les GR pittés étaient plus retenus que pour les GR sains dans les expériences de microsphiltration. De plus, l'ektacytométrie a révélé que les échantillons de patients contenant des GRi (avant traitement) et ceux contenant des GR pittés (après traitement) avaient une déformabilité réduite par rapport aux GR de donneurs sains. L'infection et le traitement ont donc pour conséquences des générer un ensemble de modifications, créant des sous-populations de GR avec des altérations susceptibles d'induire leur clairance et donc une anémie post-traitement.

2) La PADH chez l'enfant atteint de paludisme d'importation

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la PADH, l'effet secondaire le plus fréquent après le traitement du paludisme. La PADH est liée au pitting qui est le mécanisme majeur de clairance parasitaire avec les dérivés de l'artémisinine chez l'adulte non immun

[243], [250]. Cependant, la clairance parasitaire induite par l'artémisinine est plus rapide chez l'enfant ayant acquis une immunité antipaludique et donc moins dépendante du pitting. Ceci rend vraisemblablement la physiopathologie de la PADH plus complexe chez l'enfant africain et les quelques études rapportées jusqu'ici montrent une grande variabilité du taux d'incidence de la PADH chez les enfants en zone d'endémie (allant de 0 à 22 % selon les études) [244]–[248], [252]. Dans notre étude en collaboration avec le Dr Tielli et Dr Siriez du service d'urgence pédiatrique de l'hôpital Robert Debré, nous avons exploré la survenue de cet évènement indésirable chez des enfants ayant un paludisme d'importation grave ou non durant 2 ans. Malgré la baisse d'hémoglobine post-traitement observée dans les 125 cas de paludismes non compliqués, aucune hémolyse retardée n'a été rapportée. En revanche, pour 6 des 7 cas graves documentés, une anémie post-traitement avaient pu être anticipée par le test de prédiction développé par l'équipe d'accueil [10] et 3 d'entre eux ont développé une anémie hémolytique post-traitement confirmée. Le nadir d'hémoglobine a atteint 6,6 g/dL contre 10,7 g/dL pour les cas non compliqués, indiquant que ces anémies pouvaient, tout comme chez l'adulte, être sévères et nécessiter une plus grande attention pour la prise en charge. Malgré un nombre de patients relativement faible, la qualité du recueil de données semble indiquer que cette anémie hémolytique n'est pas rare chez l'enfant africain comme certaines études semblent l'affirmer [247]. De plus nous avons pu observer que cette anémie post-traitement semble survenir de manière plus précoce chez l'enfant (autour de 5 jours après l'initiation du traitement contre > 7 jours chez l'adulte). Ces observations ont rendu nécessaire la mise en place d'une étude prospective multicentrique de plus grande ampleur qui est actuellement en cours dans 2 sites en Afrique pour clarifier l'incidence et l'impact clinique potentiel de cet effet indésirable chez l'enfant.

3) Mécanisme d'élimination des GR durant la PADH

Nos observations indiquent que la perte des GR pittés ne pouvait rendre compte que de 42 % maximum de la perte totale des GR durant la PADH, alors même que la quantification de ces GR pittés permettait de prédire la PADH. Cela suggère que les GR pittés déterminent ou déclenchent la PADH, mais qu'un mécanisme d'élimination érythrocytaire plus complexe, incluant la destruction massive de GR n'ayant jamais été infectés, contribuait fortement à cette anémie retardée. La présence de GR altérés n'ayant jamais été infectés, mais ayant subi

des modifications pendant l'infection et/ou le traitement, serait suffisante pour induire leur élimination massive de la circulation.

L'implication des immunoglobulines au cours de l'anémie palustre a déjà été décrite durant l'anémie palustre [263], [264], mais les rares éléments physiopathologiques disponibles en ce qui concerne la PADH ne sont guère tranchés et aucune étude mécanistique spécifique n'a pour l'heure été réalisée. En effet, une revue de littérature compilant des données de 39 patients PADH a montré que seulement 43,6 % d'entre eux avaient présenté un test de Coombs (méthode utilisée pour démontrer la présence d'anticorps ou de complément liés aux GR) positif [267], et postule ainsi que le système immunitaire n'est probablement pas un acteur responsable de la PADH. Le temps écoulé entre l'initiation du traitement et la réalisation du test n'est en revanche pas indiqué dans cette revue d'article. La PADH étant un phénomène dynamique, un test ponctuel visant un opérateur qui disparaît suite à son exposition, n'est pas forcément un bon marqueur.

Dans notre étude, l'augmentation observée sur un suivi précis de 28 jours de la production progressive d'IgG anti-Phosphatidylsérines corrélée avec la baisse de l'hémoglobine pour les patients ayant développé la PADH (et non pour les patients non PADH) suggère une exposition des Phosphatidylsérines à la surface des GR qui pourrait déclencher leur élimination. La démonstration est certes indirecte et ne révèle pas la cible opératrice, mais compte tenu de la dimension multifactorielle et complexe de ces hémolyses, ce résultat est en faveur d'une activation de la réponse immunitaire au cours de la PADH. Dans le groupe non PADH, les taux d'IgG anti-PS étaient significativement plus élevés à l'admission. Cette observation laisse supposer la présence d'une immunité préexistante ou d'une réponse IgG plus précoce chez les non PADH, qui d'ailleurs se présentent à l'admission avec un taux d'Hb plus bas.

Par ailleurs, la spectrométrie de masse nous a permis de montrer qu'après traitement et la clairance du parasite des GR circulants durant le pitting, il n'y avait pas seulement RESA et HRP2 qui persistaient comme admis jusqu'à maintenant [10], mais plus de 150 protéines parasitaires étaient encore associées aux GR circulants durant le suivi. Parmi elles, certaines sont connues pour interagir avec le cytosquelette du GR, comme RESA ou bien la protéine KAHRP [188]–[190] et d'autres pour être des candidats vaccins [276]–[278]. La question de la circulation et de l'élimination de ces cellules s'est dès lors posée avec un tel nombre de protéines parasitaires toujours associées aux GR circulants. Nous avons donc décidé d'utiliser

une stratégie de sélection des protéines d'intérêt pouvant potentiellement être impliquées dans l'élimination des GR porteurs. Dans un premier temps nous avons identifié 37 protéines ayant significativement diminué ou disparu avec leurs GR hôtes durant la PADH. Ensuite, nous avons identifié 21 protéines parasitaires associées aux GR circulants par immunoprécipitation en utilisant le sérum convalescent des patients PADH, suivi d'une identification en spectrométrie de masse. L'analyse combinée de ces 2 stratégies a révélé 9 protéines en commun dans notre sélection de protéines parasitaires pouvant être potentiellement impliquées dans l'élimination des GR durant la PADH (**page 126, Article 2, fig.4**).

De façon intéressante, nos expériences d'immunofluorescence de surface ont montré la présence durant le suivi post-traitement des protéines rhotries RAP1 et RhopH3 associées à la surface des GR circulants. Depuis des décennies, plusieurs études sont à la recherche, sans succès d'antigènes parasitaires potentiels à la surface des globules rouges infectés. Le contexte dans lequel nous avons fait ces explorations est cependant différent puisqu'il ne s'agit pas de GRi, mais des GR collectés à distance de l'accès palustre, et qui seraient impliqués dans cette anémie retardée décrite que très récemment. La « décoration » des GR n'ayant jamais été infectés par des protéines parasitaires comme RAP2/RSP2, liée notamment à l'échec d'une invasion parasitaire, a été rapporté [34], sans que cette présence ait pu aboutir au développement par exemple de vaccin. Ce résultat potentiellement majeur nécessitera donc d'être consolidé avec notamment des confirmations sur d'autres patients. La présence de telles protéines peut contribuer à la perte de GR à travers la reconnaissance spécifique par des anticorps, l'activation de la voie classique du complément (anticorps dépendant) et la phagocytose après opsonisation. Si comme RAP2, son analogue RAP1 peut être adsorbé sur des GR n'ayant jamais été infectés, alors ces derniers peuvent être éliminés de façon immunologique. Dans ce contexte, comme le système du complément est connu pour être activé lors de l'infection [208] avec notamment une levée de l'inhibition par les CRP lors de l'anémie palustre [32], nous avons aussi voulu vérifier si une activation du système du complément pouvait être aussi associée à la PADH. La diminution progressive des protéines régulatrices du complément et la fixation croissante de l'opsonine C4b observées durant la PADH vont également dans le sens d'une activation du système du complément durant la PADH. L'ensemble de ces observations sont soutenues par la phagocytose opsonisation-dépendante accrue des GR de patients prélevés durant la PADH.

3.2. Apport de l'étude

Ce travail de thèse a mis en évidence et caractérisé des modifications des sous-populations de GR circulants potentiellement impliquées dans les anémies post-traitement. Les modifications de composition lipidique membranaire, de déformabilité et d'expression de protéines parasitaires pouvant induire la clairance puis l'élimination des GR par des effecteurs de l'hôte, éclairent la physiopathologie des anémies post-thérapeutiques. Cette approche analysant des sous-populations érythrocytaires bien caractérisées pourrait à terme servir de modèle d'analyse pour les anémies hémolytiques en général. Les protéines identifiées à la surface des globules rouges peuvent en effet contribuer à une stimulation immunitaire et à une réponse conduisant à la clairance érythrocytaire.

Ce travail a montré que la PADH n'était pas rare chez l'enfant africain et que le test de prédiction de la PADH mis au point par l'équipe d'accueil dans une population essentiellement adulte est sans doute aussi valide dans le contexte du paludisme grave pédiatrique. Nous espérons aussi que les connaissances plus précises concernant les protéines parasitaires restant associées aux membranes érythrocytaires plusieurs jours voire semaines après clairance parasitaire vont aider à une meilleure prédiction de la PADH. L'incidence croissante de mutations/délétions de la *P. falciparum* Histidin Rich Protein-2 (HRP2) qui est actuellement la protéine utilisée pour le test de prédiction, fait peser le risque d'une augmentation des tests faux négatifs dans les années à venir. Il a récemment été rapporté un cas de PADH fatale après traitement oral par artémether - lumefantrine [279]. Il s'agissait d'une femme de 60 ans traitée au Congo 1 mois pour un paludisme non grave, qui a refusé la transfusion conformément à ses convictions personnelles. Ceci souligne l'importance du suivi post-artémisinine et la nécessité de suivi accru surtout dans les zones d'endémie où l'accès aux soins peut être très limité. Les autres protéines parasitaires « empreintes » de l'infection identifiées dans cette thèse pourraient constituer des solutions de recours pour la prédiction de la PADH par test rapide, et d'une façon plus large permettre de sélectionner des protéines cibles moins susceptibles d'induire de faux positifs prolongés après traitement par ACT.

3.3. Limites du travail de thèse

Limites méthodologiques, de recueil de données et d'effectifs. Dans ces études, nous avons suivi des cohortes de patients souffrant de paludisme grave avec hyperparasitémie. Notre étude n'a pas bouleversé l'estimation de l'incidence générale des anémies post-traitement établie par plusieurs études précédentes autour de 20-25 % chez l'adulte et 5-15 % chez l'enfant [72] [95]. Même si notre taux de suivi reste meilleur que dans les autres grands pays d'importation de paludisme, comme les États-Unis ou le Royaume-Uni, nous avons perdu de vue de nombreux patients, surtout au-delà du septième jour post-traitement, en dépit des recommandations officielles françaises de suivi hebdomadaire systématique jusqu'à J28. Dans l'étude sur l'anémie hémolytique post-artémisinine chez les enfants atteints de paludisme grave d'importation, la cohorte de paludisme grave est très petite et nous n'avons pu confirmer le caractère hémolytique que chez 3 sur 7 enfants pour lesquels nous avons suffisamment de données. Par ailleurs, lors de la prise en charge des patients, la déshydratation initiale, liée à la fièvre et aux troubles digestifs, a pu induire une surestimation de l'hématocrite et du taux d'Hb, par hémococoncentration. À l'inverse, la réhydratation parentérale des premiers jours de prise en charge a pu induire une sous-estimation de ces taux, par hémodilution. Les estimations de perte totale de GR ont pu être biaisées par ces éléments « artéfactuels », sans toutefois dépasser 10 % à 15 % d'erreur.

Verrous techniques.

Plusieurs études ont été réalisées sur population globulaire totale puisque le tri des différentes populations de GR (notamment des GR pittés) n'est pas réalisable sans altérer leur fonctionnalité. Les mesures par ektacytométrie et analyses lipidomiques donnent des informations importantes sur les cellules en circulation, mais elles manquent d'indications spécifiques concernant les différentes sous-populations de GR. De plus, nos expériences de microfiltration ont quantifié la rétention des GRi et de GR pittés au sein de la population globale du prélèvement du patient, mais ne permettent pas de déterminer la rétention des GR n'ayant jamais été infectés par rapport à des GR de sujets sains. Nous ne pouvons donc pas prouver directement que les GR n'ayant jamais été infectés de patients peuvent être retenus à travers les fentes inter-endothéliales de la rate.

De plus, la difficulté de disposer d'une grande quantité de sang frais, provenant de patients présentant un profil défini, pour faire l'ensemble des explorations ainsi que la non-présentation des patients durant des points de suivi, a limité le nombre de certaines expériences. Nous n'avons, par exemple, pas pu explorer l'impact des altérations lipidiques et biomécaniques des GR durant la PADH, ni pu comparer directement de patients PADH et non PADH sur une partie de nos expériences.

Limites d'interprétation mécanistique : Nous avons corrélé la présence de marqueurs d'altérations des sous-populations de GR éliminées durant ces anémies et l'activation de plusieurs effecteurs de façon concomitante, mais notre approche n'a pas permis d'identifier un opérateur unique. Les différents mécanismes potentiels d'anémie identifiés ne sont d'ailleurs pas mutuellement exclusifs. Cela reflète la complexité de cette physiopathologie à facteurs multiples qui stipule en outre qu'une altération érythrocytaire déclenchant rapidement la clairance du GR altéré devient inobservable sur les GR circulants. Il est enfin difficile de mesurer le seuil d'expression de ces marqueurs associé à une clairance des GR. Du fait de la variabilité inter-individuelle et des temps de prélèvement, comment déterminer si et pendant combien de temps une altération peut être présente avant d'induire la clairance érythrocytaire ? La comparaison des altérations exprimées par les GR circulants et les GR intra-spléniques permet théoriquement d'impliquer fortement la responsabilité d'une altération, mais cette approche n'est actuellement faisable qu'au cours d'expériences de perfusion splénique *ex vivo* dont la pertinence physiologique et physiologique est probable, mais non formellement démontrée. Les seuils de rétention ou encore la présence et l'activation d'effecteurs sont peut-être différents entre rate isolée-perfusée et rate en situation physiologique ou physiopathologique. Plusieurs arguments suggèrent que la rate humaine est « activée » pendant plusieurs semaines au décours d'un accès palustre [228], retenant de façon excessive des globules rouges normaux transfusés.

3.4. Perspectives

Clairance érythrocytaire et antigènes cryptiques : L'identification potentielle de cibles et de leurs effecteurs spécifiques durant les différentes anémies nécessitera donc des explorations plus ciblées. Les protéines cibles doivent être disponibles et accessibles aux effecteurs. La

confirmation de la localisation des protéines candidates par immunomarquage doit donc être consolidée, en augmentant l'effectif et en simulant le vieillissement/altération *ex vivo* des cellules cibles pour évaluer leur élimination par un effecteur. De plus, dans certaines circonstances spécifiques (infections bactériennes sévères, dysérythropoïèse, troubles pré-leucémiques), des antigènes glucidiques T, Tn et Tk, qui sont des composants normaux de la membrane du GR mais non exposés, peuvent être activés à la surface des GR. On les appelle « antigènes cryptiques ». Ils peuvent alors être reconnus par leurs anticorps correspondants [280]–[282]. Il a été rapporté que l'artémisinine modifiait la membrane des GRi [283]–[285]. Il est donc concevable que l'infection et/ou le traitement agissent de façon synergique en induisant l'exposition de certains antigènes cryptiques des GR, même non infectés. Des techniques de puce à ARN, ELISA avec les antigènes potentiels identifiés (protéines parasitaires ou antigènes cryptiques) comme cibles et comme effecteurs les anticorps présents dans le sérum du patient permettraient d'identifier précisément les cibles immunologiques impliquées dans ces anémies.

Flux ioniques érythrocytaires, altérations de morphologie et de surface. L'implication possible des flux ioniques dans l'élimination des GR pourrait être améliorée par la mesure du taux d'ATP et du Calcium intracellulaire à différents temps post-traitement. La chute d'ATP ou l'augmentation du Calcium intracellulaires durant les anémies indiquerait la probabilité accrue d'éryptose ou de phagocytose suite à l'exposition des phosphatidylsérines induite par les flux ioniques [269], [286], [287]. Pour compléter les résultats de Patch clamp sur GR pitéés, des expériences reposant sur la faible perméabilité des GRni, comme l'hémolyse par traitement long au sorbitol, pourrait être envisagées. Si une voie sélective existe dans les GR pitéés, le sorbitol induira une entrée d'eau, une hyperhydratation cellulaire dépassant le volume critique et une hémolyse [196]. Cette méthode peut fournir une mesure semi-quantitative du flux en suivant l'évolution de l'hémolyse par spectrophotométrie à la longueur d'onde d'absorption de l'hémolyse.

Optimisations méthodologiques : Une étude mécanistique robuste des anémies post-thérapeutiques requiert le recueil d'échantillons à tous les points de suivi. Ainsi, l'étude d'une potentielle rétention mécanique de la rate des GR doit être réitérée à tous les temps post-traitement et la totalité de nos résultats seraient plus robustes si nous pouvions les comparer à tous les temps avec des patients n'ayant pas développé de PADH. Il serait également

intéressant de générer des GR présentant les différentes altérations observées et de les perfuser *ex vivo* dans les rates humaines isolées, « activée » par l'artésunate ou non, ou bien dans un modèle de puce de microfluidique couplé à de la vidéomicroscopie « fonctionnalisée » par ajout de cellules phagocytaires (macrophages et monocytes) spléniques.

Utilité des résultats de protéomique pour les approches vaccinales : Au-delà de la physiopathologie de l'anémie, on pourrait utiliser les nouvelles connaissances concernant ces protéines « rémanentes » pour mieux évaluer leur potentiel d'efficacité ou de mauvaise tolérance (anémie) en cas d'utilisation vaccinale.

Pour conclure, mon sujet de thèse, initialement axé sur la compréhension de l'anémie retardée post-artésunate, s'est avéré plus large qu'initialement envisagé compte tenu de la complexité des mécanismes en jeu durant l'infection et après le traitement. En effet, l'anémie peut survenir à différents temps clés de la maladie et de son traitement, qu'il a fallu distinguer pour chacun des patients participant aux études : l'anémie pré-thérapeutique, l'anémie post-thérapeutique immédiate et l'anémie retardée. Toutes trois contribuent à compliquer l'évolution, avec parfois des conséquences graves en partie indépendantes de la pathogénicité directe de *Plasmodium falciparum*. Toutes trois peuvent être expliquées par des mécanismes au moins en partie différents. En effet, les GR pîttés n'apparaissent par exemple qu'après traitement et disparaissent de façon tardive. En conséquence, ils atténuent plus qu'ils aggravent l'anémie précoce, alors que leur clairance joue au minimum un rôle déclencheur de l'anémie tardive. Nous avons étendu considérablement la liste des protéines parasitaires persistant comme empreinte au sein des GR circulants après clairance parasitaire complète, certaines pouvant être la cible d'effecteurs immunitaires adaptatifs. Nous avons identifié plusieurs altérations érythrocytaires (composition lipidique de la membrane, exposition de fractions activatrices ou régulatrices du complément) sans toutefois valider précisément le niveau d'implication des unes et les autres dans la clairance érythrocytaire. Ces altérations ont en effet été identifiées sur des GR circulants qui n'ont donc, par définition, pas encore été encore éliminés. Ces résultats ouvrent toutefois des pistes nouvelles dans l'identification à terme d'un ou plusieurs véritables opérateurs de clairance érythrocytaire et d'anémie. Nous avons montré que, de façon commune aux anémies post-thérapeutiques précoce et tardive, une part importante, même prédominante de la perte de GR concerne des GR n'ayant jamais

été infectés, observation contrintuitive qui opère un véritable recentrage des explorations mécanistiques de ces anémies. Nous espérons que ces résultats participent au minimum à définir un cahier des charges utile pour les futures études translationnelles dans ce champ physiopathologique passionnant, mais complexe.

Valorisation

4.1. Publications

4.1.1. Articles de thèse

Publié :

C. Chambrion ; M. Depond ; L. Angella ; O. Mouri ; E. Kendjo ; A. Fricot-Monsinjon ; C. Roussel ; S. Biligui ; I. Tantaoui ; A. Taieb ; N. Argy ; S. Houze ; R. Piarroux ; JY. Siriez ; S. Jauréguiberry ; S. Larréché ; M. Thellier ; N. Cénac ; *P. Buffet ; **PA. Ndour. *Altered subpopulations of red blood cells and post-treatment anemia in malaria. Front Physiol* **2022** Apr 5;13:875189. [✉] = Corresponding author.

En préparation :

- ***C Chambrion**, ***A Tielli**, D Bashombe, P Buffet, [✉]* P A Ndour, *JY Siriez. *Post Artemisinin Hemolysis in children with severe malaria, France 2017–2019. Format Journal of Infectious disease.* [✉] = Corresponding author. *= equal contribution.
- **C. Chambrion** ; EF. Gautier ; A. Fricot-Monsinjon ; M. Depond ; L. Angella ; C. Roussel ; A. Taieb ; N. Argy ; S. Houze ; S. Jauréguiberry ; F. Botterel ; P. Mayeux ; JY. Siriez ; S. Larréché ; M. Thellier ; *P. Buffet ; **PA. Ndour. *Mechanisms of anemia in post-artemisinin delayed hemolysis: host-drug-pathogen interactions.* [✉] = Corresponding author. *= equal contribution.

4.1.2. Articles en collaboration

Publiés :

- C Roussel ; P Ndour ; E Kendjo ; S Larréché ; À Taieb ; B Henry ; B Lebrun-Vignes ; **C Chambrion** ; N Argy ; S Houzé ; O Mouri ; D Courtin ; À Angoulvant ; H Delacour ; F Gay ;

Jean-Yves Siriez ; M Danis ; F Bruneel ; O Bouchaud ; E Caumes ; R Piarroux ; M Thellier ; S Jauréguiberry ; P Buffet ; the French Artesunate Working Group. *Intravenous artesunate for the treatment of severe imported malaria: implementation, efficacy and safety in 1391 patients*. **Clin Infect Dis** 2021 Nov 16;73(10):1795–1804.

Contribution : Dans ce travail, j'ai contribué à la collecte des échantillons et des données cliniques dans le cadre du protocole de recherche clinique PADHOK, ainsi qu'à la relecture du papier avant soumission.

- C Roussel ; À Morel ; M Dussiot ; M Marin ; M Colard ; À Fricot ; À Martinez ; **C Chambrion** ; B Henry ; M Casimir ; G Volle ; M Depond ; S Dokmak ; F Paye ; A Sauvanet ; C Le Van Kim ; Y Colin Aronovicz ; S Georgeault ; P Roingearde ; S L Spitalnik ; P A Ndour ; O Hermine ; E A Hod ; P Buffet ; P Amireault. *Rapid clearance of storage-induced micro-erythrocytes alters transfusion recovery*. **Blood** 2021 Apr 29;137 (17):2285–2298.

Contribution : Dans ce travail, j'ai contribué à la récupération des rates aux blocs opératoires, à la préparation du matériel et des tampons de perfusion, à la perfusion et à l'analyse des résultats pour cette expérience. J'ai également contribué à la relecture de l'article avant soumission.

- M Wojnarski ; O Mouri ; **Charlotte Chambrion** ; C Roussel ; N Chartrel ; B Smith ; P L. Smith ; M Thellier ; P Buffet ; P A Ndour. *Plasmodium falciparum Clearance Is Pitting-Dependent With Artemisinin-Based Drugs but Pitting-Independent With Atovaquone-Proguanil or Mefloquine*. **J Infect Dis**. 2019 Jul 2;220 (3):535–539.

Contribution : Dans ce travail, j'ai contribué à la collecte des échantillons et des données cliniques.

- C Roussel ; M Marin ; D Michaël ; À Fricot ; **C Chambrion** ; B Henry ; G Volle ; M Depond ; S Rougé ; S Dokmak ; F Paye ; À Sauvanet ; O Hermine ; C Le Van Kim ; Y Colin ; P A Ndour ; P Amireault ; P Buffet. *Clairance post-transfusionnelle des globules rouges stockés : analyse dans un modèle de rate humaine isolée-perfusée*. **Transfusion Clinique et Biologique 2019** 26 (3), S102

Contribution : Dans ce travail, j'ai contribué à la récupération des rates aux blocs opératoires, à la préparation du matériel et des tampons de perfusion, à la perfusion et à l'analyse des résultats pour cette expérience. J'ai également contribué à la relecture de l'article avant soumission.

Publication de congrès :

C Roussel ; À Morel ; M Dussiot ; M Marin ; M Colard ; À Fricot ; À Martinez ; **C Chambrion** ; B Henry ; G Volle ; M Depond ; S Dokmak ; F Paye ; À Sauvanet ; C Le Van Kim ; Y Colin Aronovicz ; S L Spitalnik ; P A Ndour ; E A Hod ; O Hermine ; P Buffet ; P Amireault. *Storage-Induced Micro-Erythrocytes Are Rapidly Cleared from Recipient Circulation and Predict Transfusion Recovery*. **Blood 2019** ; 134 (Supplement_1): 717

En préparation :

- I Tantaoui ; G Bouyer ; **C Chambrion** ; L Angella ; M Depond ; A Fricot ; D Monedero Alonso ; P Buffet ; M Thellier ; S Egée ; P A Ndour. *Early and persistent changes in ion channels of infected and pitted red blood cells during severe malaria treated with artesunate*.

Contribution : J'ai contribué à l'élaboration du projet, à la mise au point des expériences et à la réalisation d'un certain nombre d'entre elles, notamment à la Station Biologique de Roscoff. J'ai également participé à l'analyse des résultats et je contribuerai à la relecture de l'article avant soumission.

- M Dépond ; C Amaratunga ; L Angella ; **C Chambrion** et al. *Alterations in red blood cell deformability and circulation associated with resistance to malaria treatments.*

Contribution : Dans ce travail, j'ai contribué à la récupération des rates aux blocs opératoires, à la préparation du matériel et des tampons de perfusion, à la perfusion, à l'entretien des cultures parasitaires, aux marquages et acquisitions en cytométrie et imagerie en flux, et à l'analyse des résultats pour cette expérience. Je contribue également à la rédaction de l'article.

- V Carret ; N Fievet ; **C Chambrion** et al. *Post-artemisinin hemolytic anemia in African children with severe malaria.*

Contribution : Dans ce travail, j'ai contribué à la mise en place de l'étude clinique lors d'une mission d'une semaine au Bénin avec une formation des équipes de recherche impliquées dans le projet sur les techniques du laboratoire pour l'exploration de la PADH et j'ai participé au suivi hebdomadaire de l'avancée des travaux. Je participe également à l'analyse des résultats et je contribuerai à la relecture de l'article avant soumission.

- B Henry ; G Volle ; H Akpovi ; C Roussel ; P A Ndour ; F Tossou ; F Suarez ; F Palstra ; À Fricot ; **C Chambrion** ; J Solinc ; M Garé ; F Aussenac ; CH Cottart ; R Adamou ; G Milon ; N Fievet ; D Courtin ; J Clain ; O Hermine ; A Garcia ; A Sabbagh* ; P Buffet*. *Splenic clearance of rigid erythrocytes as inherited mechanism for splenomegaly and natural resistance to malaria. Soumis au journal eBioMedicine :*

Contribution : Dans ce travail, j'ai contribué à l'entretien des cultures parasitaires et à leur enrichissement pour différentes expériences, ainsi qu'à la mise en place des expériences de phagocytose. J'ai contribué à la relecture de l'article avant soumission.

4.2. Communications orales

4.2.1. GR-Ex Talk and poster seminar (Paris, Mars 2020) : Best talk Award

Mechanisms of erythrocytes elimination during post-treatment hemolysis in severe malaria

C. Chambrion^{1,2,3}; M. Depond^{1,2}; EF. Gautier^{2,4}; O. Mouri^{3,5}; M. Dussiot²; E. Kendjo^{3,5}; A. Fricot-Monsinjon^{1,2}; C. Roussel^{1,2,3}; A. Taieb^{1,3}; J. Cros⁹; S. Dokmac⁹; N. Argy^{3,8}; S. Houze^{3,8}; P. Mayeux^{2,4}; R. Piarroux^{3,5}; JY. Siriez⁶; S. Larréché⁷; M. Thellier^{3,5}; *P. Buffet^{1,2,3}; *PA. Ndour^{1,2,3}; Artesunate working group

(1) Umr-s1134, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris ; (2) Université de Paris, Labex GR-EX ; (3) Centre National de Référence du Paludisme, Paris ; (4) Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris ; (5) AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière (6) AP-HP, Hôpital Robert-Debré, Paris ; (7) Département de Biologie Médicale, Hôpital d'Instruction Des Armées Bégin, Paris ; (8) Hôpital Xavier Bichat-Claude Bernard , Paris ; (9) AP-HP, Hôpital Beaujon ***Equal Contribution**

Artemisinin derivatives kill ring-stage Plasmodium falciparum which is then expelled from its host red blood cell (RBC) as it crosses narrow slits in the spleen. Once "deparasitized", the pitted RBC returns to the circulation, thereby tempering early post-treatment anemia. Ten days after treatment however, pitted RBCs are cleared, triggering Post Artesunate Delayed Hemolysis (PADH). PADH affects 5–25% of artesunate-treated patients. Pitted RBCs are quantified by labeling parasite proteins that persist as imprints in pitted RBC even after the parasite has been expelled. High initial concentrations of pitted RBC predict PADH.

What causes hemolysis during PADH is still unclear. Using RBC samples from artemisinin-treated patients before and after the onset of a PADH episode, we performed mass spectrometry on blood samples which contained variable concentrations of pitted RBC. There was a correlation between the amount of parasite proteins and the proportion of pitted RBC. Until now, only RESA and HRP2 were described as markers of pitted RBCs. Interestingly, mass spectrometry analysis showed that samples with pitted RBCs contain more than 100 parasite proteins, including 31 that disappeared after PADH. Some of them seem to be associated to anemia (RAP2) and other to RBC deformability (KAHRP) making them potentially related to PADH. Imaging flow cytometry on control and pitted RBC generated by ex-vivo perfusion through human spleens showed that pitted RBCs were smaller, less circular and less regularly shaped than never infected RBCs. These morphological alterations may be related to a reduced RBC deformability and their ability to cross splenic slits. We also observed an increase in Immunoglobulin fixation at the surface of RBC during PADH.

The clearance of pitted RBC may result from a decrease in deformability, expected to induce their mechanical retention in the spleen. Opsonisation via specific recognition and phagocytosis of pitted and "decorated" RBCs by antibodies may also contribute to hemolysis during PADH. Because PADH is a very well limited hemolytic process, deciphering how it occurs may inform mechanisms of anemia in general.

4.2.2. Congrès de l'American Society of Tropical Medicine and Hygiene (en
distanciel, Octobre 2020)

Erythrocytes clearance during post-treatment delayed hemolysis in severe malaria: the biomechanical hypothesis

C. Chambrion^{1,2,3}; M. Depond^{1,2}; O. Mouri^{3,4}; S. Biligui^{3,4}; M. Dussiot²; E. Kendjo^{3,4}; A. Fricot-Monsinjon^{1,2}; A. Taieb^{1,3}; C. Roussel^{1,2,3}; J. Cros⁸; S. Dokmak⁸; I. Tantatoui^{3,4}; N. Argy^{3,7}; S. Houze^{3,7}; R. Piarroux^{3,4}; JY. Siriez⁵; S. Larréché⁶; M. Thellier^{3,4}; *P. Buffet^{1,2,3}; *PA. Ndour^{1,2,3}; Artesunate working group

(1) Umr-s1134, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris ; (2) Université de Paris, Labex GR-EX ; (3) Centre National de Référence du Paludisme, Paris ; (4) AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière (5) AP-HP, Hôpital Robert-Debré, Paris ; (6) Département de Biologie Médicale, Hôpital d'Instruction Des Armées Bégin, Paris ; (7) Hôpital Xavier Bichat-Claude Bernard, Paris ; (8) AP-HP, Hôpital Beaujon. * = *these authors contribute equally to this work*

French National Reference Center of Malaria, Hôpital Pitié Salpêtrière

Intravenous artesunate is a first-line treatment for severe malaria. Once ring-circulating *P. falciparum* is killed, the dead parasite is expelled from the RBC in the spleen. The resulting pitted RBC then returns to the circulation. Their elimination few days/weeks later contributes to post-artemisinin delayed hemolysis (PADH). PADH is reported in 5–25% of artesunate-treated patients. Changes in pitted RBC, by infection, treatment then pitting, likely induce alterations leading to their clearance. Preliminary data suggest that part of the massive loss of RBC during PADH is by opsonization likely *via* a specific recognition of parasite antigens or lysis by complement. However pitted RBC may be less deformable and mechanically retained by the spleen.

Imaging flow cytometry (allowing morphological features analysis) of pitted RBC obtained from severe malaria patients (n=32) or generated through an *ex-vivo* human spleen model (n=2) showed up to 12.75% reduction of surface area, compared to never infected RBC. By ektacytometry, patient's RBC after treatment were 6% (n=6) less deformable than those from healthy donors (n=8). Finally, through a microfiltration device mimicking spleen filtration, we measured the filterability of pitted RBC and iRBC during the follow-up of severe malaria patients subjected to delayed hemolysis compared to control RBC. The result showed that on average, iRBC (n=8) were 6.5 more retained than healthy RBC (n=4) and pitted RBC (n=9) were 12.6 more retained than healthy RBC.

These results suggest that morphological alterations of pitted RBC could lead to the reduced RBC deformability and impair their ability to cross the splenic slits. Taken together, this data support that both immunological and mechanical processes likely contribute to the massive elimination of RBC during post-artemisinin delayed hemolysis.

Deciphering PADH's pathogenesis may allow to prevent and anticipate an appropriate care of the patient, organ failure linked to worsening of the anemia.

4.2.3. Congrès de l'European Red Cell Society (2 présentations) (Milan, Avril 2022)

Abstract de la première présentation :

Mechanisms of red blood cells elimination during post-artemisinin anemia in severe malaria

^{1, 2, 3}C. Chambrion ; ^{2,4}EF. Gautier ; ¹¹N. Cenac ; ^{1,2,3}A. Fricot-Monsinjon ; ^{1,2,3}M. Depond ; ^{1,2,3}L. Angella ; ^{1,2} M. Dussiot ; ^{3,5}A. Taieb ; ⁸N. Argy ; ^{3,8}S. Houze ; ⁹S. Jauréguiberry ; ¹⁰F. Botterel ; ^{2,4} P. Mayeux ; ⁶JY. Siriez ; ⁷S. Larréché ; ^{3,5} M. Thellier ; ^{1, 2, 3} P. Buffet ; ^{1, 2, 3} PA. Ndour

(1) Umr-s1134, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris ; (2) Université de Paris, Labex GR-EX ; (3) Centre National de Référence du Paludisme, Paris ; (4) Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris ; (5) AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière (6) AP-HP, Hôpital Robert-Debré, Paris ; (7) Département de Biologie Médicale, Hôpital d'Instruction Des Armées Bégin, Paris ; (8) Hôpital Xavier Bichat-Claude Bernard , Paris, (9) ; AP-HP, Hôpital Kremlin Bicêtre. (10) AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Créteil ; (11) IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, INPENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France ; (12) U1163, Laboratoire de Mécanismes Cellulaires et Moléculaires des Troubles Hématologiques et Implications Thérapeutiques, Paris

Intravenous artesunate (IA) is the first-line treatment of severe malaria. Once killed by artemisinins, *P. falciparum* parasite is expelled from host RBC in the spleen. The once-infected (pitted) RBC returns to the circulation. The lifespan of pitted RBC is however shorter compared to normal RBC and their elimination is associated with a post artesunate delayed hemolysis (PADH), although other uninfected (u) RBC are also eliminated in the same period. The causes and the different RBC subpopulations cleared during this post treatment anemia remain are to be defined.

The general objective of this study is to identify the phenotypical and molecular modifications in post-therapeutic circulating RBC and the effectors involved in the mechanisms of their destruction during post-treatment anemia.

Through *P. falciparum* cultures and samples collected from severe malaria patients followed before (BT) and after therapy (AT), we first characterized alterations of circulating RBC using lipidomic and proteomic analysis. We then evaluate the morphological changes BT and AT using imaging flow analysis. Finally, through immunological and functional tests, we evaluated the potential effectors involved in these RBC subpopulations at the time of delayed hemolysis.

Lipidomic analysis showed that the balance of plasma membrane lipid content of circulating RBC was significantly modified AT and morphological analysis revealed a reduced surface area in pitted RBC compared to iRBC and uRBC. Measure of the deformability by ektacytometry and the ability RBC subpopulation to cross the interendothelial slits of the spleen, through microfiltration method, showed that pitted RBC AT, as iRBC are significantly more retained compared uRBC. Then we analyzed RBC from patients by mass spectrometry before and after

PADH. Findings were compared to RBC from patients who did not develop post-treatment hemolysis and from healthy donors. In addition to RESA & HRP2, the 2 parasite proteins previously shown to persist in pitted RBC, we identified 154 parasite proteins present in RBC collected after parasite clearance. Of these, 40 disappeared or significantly decreased during PADH.

We then attempted to define the mechanisms of immunological RBC's during PADH. To answer this objective, we identified 8 potential antigens targeted by specific antibodies by immunoprecipitation followed by mass spectrometry. We also observed an increase of opsonin C4b fixation to RBC during PADH and a decrease in the expression of complement regulatory proteins, in flow cytometry too regarding these last ones. The capacity of red blood cells from patients developing PADH to be phagocytosed was finally evaluated. Finally, we measured RBC phagocytosis in presence of convalescent serum. We thus observed 37% increase opsonic phagocytosis during PADH compared to phagocytosis of RBC collected before PADH

Conclusion: These results suggest that in patients with severe malaria, infection by *P. falciparum* followed by treatment with AS trigger alterations in RBC that persist in circulation beyond parasite clearance. These changes can impair their ability to cross the splenic slits. It may cause congestion. Blocked RBCs expressing parasite antigens are likely to be recognized by antibodies. These alterations are expected to favor the complement-mediated and/or opsonic clearance of RBC a few days after treatment explaining the intensity of delayed hemolytic episodes. These observations open the way to a more precise prediction of PADH and anemia in general.

Abstract de la deuxième présentation :

Early and persistent changes in ion channels of infected and pitted red blood cells during severe malaria treated with artesunate

Ilhame Tantaoui ^{1,3}, Guillaume Bouyer ^{2,5}, Charlotte Chambrion ^{3,4,5}, Lucia Angella ^{3,4,5}, Mallorie Depond ^{3,4,5}, Aurélie Fricot ^{3,4}, David Monedero Alonso ^{2,5}, Pierre Buffet ^{3,5,6}, Marc Thellier ^{1,7}, Stéphane Egée ^{2,5}, Papa Alioune Ndour ^{3,4,5}

¹ AP-HP, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France ; ² Sorbonne Université, CNRS UMR 8227, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France, ³ Université de Paris, Biologie Intégrée du Globule Rouge, UMR_S1134, BIGR, INSERM, F-75015 Paris, France ; ⁴ Institut National de la Transfusion Sanguine; Paris, France, ⁵ Laboratoire d'Excellence Gr-Ex, Paris, France ; ⁶ APHP, Hôpital Necker Enfants Maladies, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur, Institut Imagine, ⁷ Sorbonne Université, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Background. Artesunate, the recommended drug for severe malaria, rapidly clears circulating *P. falciparum* ring infected RBC by pitting process but this clearance mechanism is frequently associated with post-artesunate delayed hemolysis—(PADH). PADH is related to the destruction, more than 7 days after therapy, of the pitted red cells (or once-infected RBCs, oiRBCs) that likely harbor deep molecular and biochemical alterations compared to never infected RBCs. Mature *P. falciparum* parasite induces New Permeation Pathways (NPP) in the host RBC membrane via increased ion channels activity. Since it is highly challenging to purify ring-infected RBCs (ring-iRBCs) and oiRBCs, the characterization of changes in these RBC subpopulations that trigger their elimination are still elusive.

Objectives. Here we aimed to develop a ring-iRBCs and oiRBCs concentration method and then investigate if NPP activity could be involved in the reduced life-span of oiRBCs and PADH.

Methods. *P. falciparum* NF54 synchronized cultures at the ring stage and blood samples collected from severe malaria patients treated with intravenous artesunate, were concentrated using the pore-forming toxin, streptolysin O (SLO) that preferentially lyses uninfected RBC (uRBC). Purified ring-iRBCs and oiRBCs during follow-up were then studied using the whole cell configuration of the patch-clamp method to measure the membrane conductance in these RBC subpopulations.

Results. Optimized SLO method allowed parasitemia enrichment of iRBCs at ring stage from NF54 cultures >90%, from patient circulating iRBCs >80% and from patient once-infected RBCs >70% (as assessed by Pf-RESA immune-staining). In whole-cell patch-clamp analysis, we surprisingly observed that ring-iRBCs and oiRBCs circulating during the post therapeutic follow-up displayed an increased ion channel activity with a whole-cell conductance profile similar to that of trophozoite/schizont stage parasites, albeit a four to five-fold lower intensity. This current is indeed related to New Permeation Pathways (NPP) as it is inhibited by the 5-nitro-2 (3-phenylpropilamino) benzoate (NPPB).

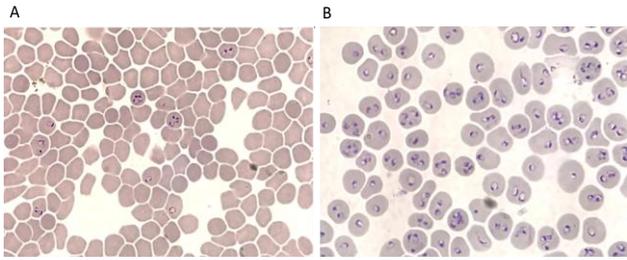


Figure 1. NF54 in culture (A) before and (B) after SLO enrichment

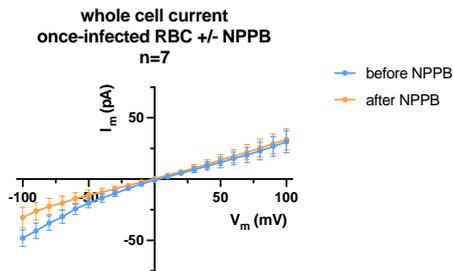


Figure 2. Intensity/Voltage curve, before and after treatment with NPPB inhibitor in oiRBCs.

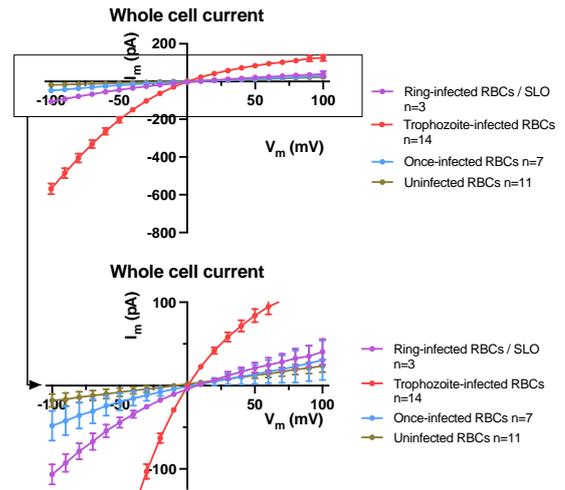


Figure 3. Comparison current profiles recorded in whole-cell configuration, on iRBCs, oiRBCs and uRBCs.

Conclusions. The SLO enrichment method effectively enriches ring-iRBCs and oiRBCs from cultures or patients with severe malaria. Patch-clamp results demonstrate the activation of NPP from the ring-stage, increasing their permeability. More importantly, the NPP activity persists in oiRBCs up to 7 days after treatment. These new observations indicate an early and then persistent ion channels modification in oiRBC that may be involved in their delayed elimination during PADH.

4.3. Posters

4.3.1. Congrès de la Société Française d'Hématologie (Paris, Mars 2019)

sifh 2019

Elimination des globules rouges au cours de l'anémie hémolytique post traitement dans le paludisme grave

C. Chambrión ^{1,2,3}; A. Taieb ^{1,3}; EF. Gautier ^{2,4}; O. Mouri ^{3,5}; M. Dussiot ²; E. Kendjo ^{3,5}; A. Fricot-Monsinjon ^{1,2}; C. Roussel ^{1,2,3}; P. Mayeux ^{2,4}; JY. Siriez ⁶; S. Larréché ⁷; M. Thellier ^{3,5}; *P. Buffet ^{1,2,3}; *PA. Ndour ^{1,2,3}; Groupe de travail sur l'Artesunate

(1) Umr-s1134, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris; (2) Université Paris Descartes, Labex GR-EX; (3) Centre National de Référence du Paludisme, Paris; (4) Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris; (5) AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière (6) AP-HP, Hôpital Robert-Debré; (7) Département de Biologie Médicale, Hôpital d'Instruction Des Armées Bégin, Paris, France
*Contribution égale ✉Correspondance: andour@ints.fr

INTRODUCTION

L'artésunate intraveineux est le médicament recommandé en première intention pour le paludisme grave par l'OMS. Une fois tué par ce dérivé de l'artémisinine, le parasite est expulsé du globule rouge lors de son passage dans les fentes interendothéliales de la rate. Le globule rouge ainsi débarrassé de son parasite, appelé **globule rouge pité**, est remis en circulation (Figure 1). Ces globules rouges pités sont éliminés à partir de la fin de la première semaine post-traitement, provoquant une **anémie hémolytique différée (PADH)** (Figure 2). La PADH touche 5 à 25% des sujets traités. Aujourd'hui, la quantification des globules rouges pités (par détection des protéines parasitaires persistantes après expulsion du parasite, Figure 3) permet de prédire la PADH mais les mécanismes d'hémolyse restent à clarifier. En particulier, on ne comprend pas pourquoi l'anémie est plus profonde que si elle n'était due qu'à la perte des globules rouges pités.

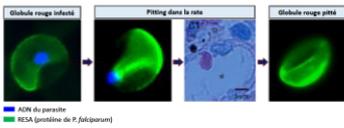


Figure 1. Description du pitting. Suite au traitement par l'artésunate, le globule rouge débarrassé du parasite (en bleu) mais présentant des protéines parasitaires comme RESA (en vert) est alors remis en circulation.

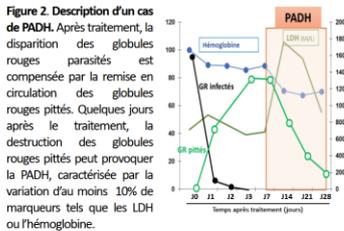


Figure 2. Description d'un cas de PADH. Après traitement, la disparition des globules rouges parasités est compensée par la remise en circulation des globules rouges pités. Quelques jours après le traitement, la destruction des globules rouges pités peut provoquer la PADH, caractérisée par la variation d'au moins 10% de marqueurs tels que les LDH ou l'hémoglobine.



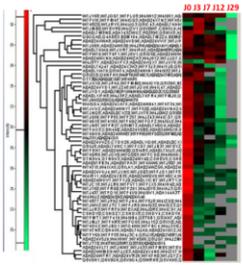
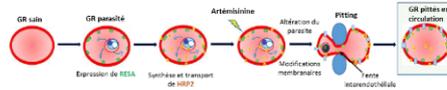
Figure 3. Marqueurs des globules rouges pités. Les protéines parasitaires RESA (en rouge) et HRP2 (en vert) sont laissées en tant qu'empreintes dans le globule rouge, alors que le parasite expulsé est retenu dans la pulpe rouge de la rate. Ces protéines permettent d'identifier et de quantifier les globules rouges pités. GR ni = globules rouges non infectés

Chattavich et al., JID 2002 | Buffet et al., Blood 2006 | Fernandez-Arias, C. et al. Cell Host Microbe 2016
Ndour, P. A. et al. Sci Transl. Med., 2017 | Wojnarski et al. JID 2019

Caractérisation des globules rouges pités à l'origine de l'anémie hémolytique

RÉSULTATS

A : Persistance des protéines parasitaires et clairance des globules rouges pités



Heatmap des protéines parasitaires d'un patient à suivi complet

Figure 4. Analyse protéomique par spectrométrie de masse d'échantillons contenant des globules rouges pités. La comparaison entre un échantillon contenant des globules rouges parasités (J0) et des échantillons contenant des globules rouges pités (J3, J7, J12, J29) montre une persistance importante de protéines parasitaires après l'élimination des parasites (à partir de J3). Nous avons observé 3 profils de clairance des protéines parasitaires, associés à la clairance des globules rouges pités:

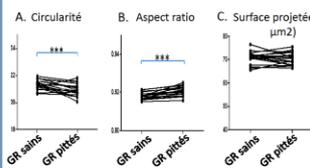
- 1 → Clairance rapide entre J0 et J3 : protéines éliminées avec le parasite.
- 2 → Clairance intermédiaire : disparition des protéines à partir de J7 jusqu'à J29 durant les épisodes hémolytiques.
- 3 → Clairance lente : persistance des protéines parasitaires à la fin du suivi.

Certaines protéines à clairance intermédiaire telles que KAHRP et RON3 jouent un rôle dans la rigidité du globule rouge mais aussi dans l'invasion du parasite. Elles pourraient être impliquées dans l'élimination des globules rouges pités lors de la PADH.

B : Exploration des mécanismes de la PADH

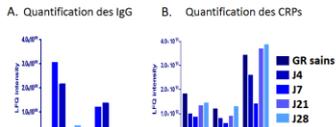


Figure 5. Modifications morphologiques



Les analyses morphologiques par imagerie en flux sur 19 patients montrent que les globules rouges pités (GR pités) sont moins circulaires (A) et ont un aspect ratio (rapport entre la largeur et la longueur de la cellule) plus important (B) que les globules rouges sains (GR sains). Ces différences morphologiques pourraient impacter la capacité du GR à passer la barrière de la filtration splénique.

Figure 6. Altération des protéines membranaires et interactions antigéniques



La quantification de protéines totales par spectrométrie de masse montre une augmentation des immunoglobulines (A) ainsi qu'une diminution des protéines inhibitrices de la lyse par le complément CRPs (B) environ 7 jours après le début du traitement, soit juste avant la disparition des globules rouges pités.

CONCLUSION – DISCUSSION

Ces résultats suggèrent que l'élimination des globules rouges à l'origine de la PADH pourrait être à la fois mécanique et immunologique. En effet, les modifications morphologiques de globules rouges sont connues pour impliquer une altération de leur déformabilité et donc leur capacité à traverser la barrière splénique. La levée de l'inhibition du complément

expliquerait par ailleurs pourquoi l'anémie est plus profonde que si elle n'était due qu'à la perte des globules rouges pités. Ces observations pourront mener vers l'identification de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la PADH. Ajouté à cela, la physiopathologie de la PADH pourrait servir de modèle d'étude des phénomènes d'hyperhémolyse au cours de certaines anémies hémolytiques.



Email : charlotte.chambrión@inserm.fr

4.3.2. Congrès de l'American Society of Tropical Medicine and Hygiene (Washington, Novembre 2019)

Mechanisms of red blood cell clearance during post-artemisinin hemolysis: a proteomic approach

C. Chambrion^{1,2,3}; A. Taieb^{1,3}; EF. Gautier^{2,4}; O. Mouri^{3,5}; M. Dussiot²; E. Kendjo^{3,5}; A. Fricot-Monsinjon^{1,2}; M. Depond^{1,2}; C. Roussel^{1,2,3}; N. Argy^{3,8}; S. Houze^{3,8}; P. Mayeux^{2,4}; JY. Siriez²; S. Larréché⁷; M. Thellier^{3,5}; *P. Buffet^{1,2,3}; **PA. Ndour^{1,2,3}; French artesunate working group

Umr-s1134, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris; (2) Université de Paris, Labex GR-EX; (3) Centre National de Référence du Paludisme, Paris; (4) Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris; (5) AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière (6) AP-HP, Hôpital Robert-Debré; (7) Département de Biologie Médicale, Hôpital d'Instruction Des Armées Bégin, Paris, France; (8) Hôpital Xavier Bichat-Claude Bernard

*Equal contribution.

First author: charlotte.chambrion@inserm.fr

Corresponding authors: alioune.ndour@inserm.fr, pabuffet@gmail.com

INTRODUCTION

Intravenous artesunate (IA) is WHO-recommended first-line treatment of severe malaria. Once killed by artemisinins, *Plasmodium falciparum* is expelled from its host RBC in the spleen. The once-infected "pitted" RBC returns to the circulation (Fig. 1). The lifespan of pitted RBC is however shorter compared to normal RBC. More than 80% of patients with high concentration of pitted RBC develop Post-Artemisinin Delayed Hemolysis (PADH) 7- to 21-day following treatment with IA (Fig. 2), when pitted RBC are cleared. The objective of this study was to characterize RBC modifications responsible for the elimination of pitted RBC by a proteomic approach.

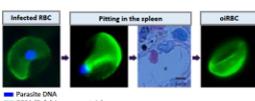


Figure 1. Pitting following treatment with artemisinins. Pitted RBCs are quantified by labelling parasite proteins, like RESA (in green here) that persist as imprints in RBC even after the parasite has been expelled.

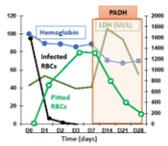
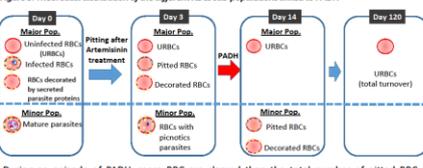


Figure 2. Main features of a typical episode of PADH. After treatment, the clearance of parasitized RBC (black) is compensated by the recirculation of pitted RBC (green). A few days after treatment, the destruction of pitted RBC triggers PADH, characterized by a > 10% rise in LDH levels (dark green) or a > 10% drop in hemoglobin levels (blue), or both.

Pitted RBC are cleared by the end of the first week post-treatment, causing Post Artesunate Delayed Hemolysis in 5% to 25% of patients with severe malaria (Figure 2).

The quantification of pitted RBCs by flow cytometry or HRP2-based dipstick predicts PADH but the mechanisms by which pitted RBC are cleared is still unknown. In particular, it is not clear why the anemia is deeper than what would be observed if only pitted RBC were lost during the episode.

Figure 3. Theoretical distribution of the different RBC sub-populations linked to PADH.



During an episode of PADH, more RBC are cleared than the total number of pitted RBC. PADH is likely due to the clearance of both pitted and decorated RBC. Identifying specific markers of to-be-cleared RBC would clarify the pathogenesis of PADH.

Chotivichai et al., *JID* 2002; Buffet et al., *Blood* 2006, 2011; Jaurigerry, Ndour et al., *Blood* 2014 / Fernandez-Arias, C. et al. *Cell Host Microbe* 2016; Ndour et al. *Sci Transl. Med.*, 2017; Wijnarski et al. *JID* 2019

Objective : Identify markers of RBC subpopulations cleared during episodes of post-treatment hemolysis

METHODS

- Characterize pitted RBC and identify parasite proteins involved in post-treatment hemolysis, by a proteomic analysis (mass spectrometry) of patient samples
- Morphological analysis using imaging flow cytometry on control and pitted RBC generated by ex-vivo perfusion through human spleens, and on patients samples
- Study of immunoglobulin fixation on RBC in the circulating blood of patients

Images : azom.com researchgate.net, Servier medical art

RESULTS

A : Characterization of pitted RBCs

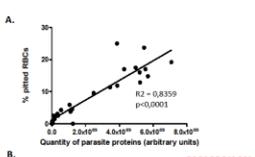
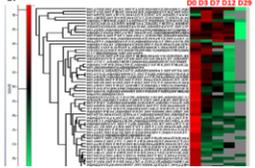
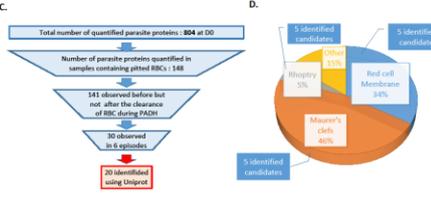
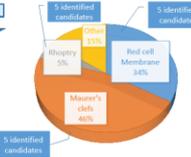





Figure 4. Identification of parasite proteins potentially involved in the clearance of RBC during PADH, by mass spectrometry on patient blood samples. We observed a significant correlation between the number of pitted RBC and the amount of parasite proteins (A). Comparison between a sample containing parasitized RBC (D0) and samples containing pitted RBC (D5, D7, D12, D20) confirmed the persistence of parasite proteins beyond parasite clearance (D3) (B). This observation enabled the selection of parasite proteins potentially involved in PADH : candidates are present before PADH and absent after resolution of the episode (C). Figure D shows the distribution of candidates.

B : Cellular & molecular mechanisms of PADH

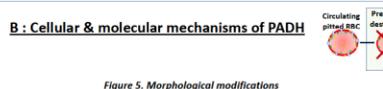


Figure 5. Morphological modifications

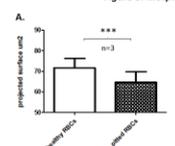
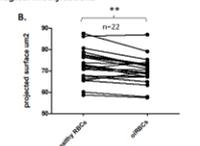
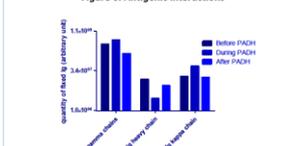



Figure 6. Antigenic interactions



We observed an increase of immunoglobulins fixation at the surface of RBC during PADH (n=6 patients) suggesting that clearance may result from the opsonization of RBC expressing neo-antigens on their surface.

CONCLUSION

Two hypothesis for the clearance of RBC during PADH :

- 1) Reduced surface → Decrease in deformability → Mechanical retention in the spleen
- 2) Opsonisation via specific recognition of neo-antigens → Phagocytosis

PADH is a short-lived, well-defined hemolytic process deciphering its pathogenesis may identify generic mechanisms of hemolysis.

4.3.3. Congrès de la Société Française d'Hématologie (Paris, septembre 2020)



Mécanismes de clairance érythrocytaire durant l'anémie hémolytique liée au traitement du paludisme grave

C. Chambrier^{1,2,3}; M. Depond^{1,2}; EF. Gautier^{2,4}; O. Mouri^{3,5}; M. Dussiot²; E. Kendjo^{3,5}; A. Fricot-Monsinjon^{1,2}; C. Roussel^{1,2,3}; A. Taieb^{1,3}; N. Argy^{3,8}; S. Houze^{3,8}; P. Mayeux^{2,4}; R. Piarroux^{3,5}; JY. Siriez⁶; S. Larréché⁷; M. Thellier^{3,5}; *P. Buffet^{1,2,3}; *PA. Ndour^{1,2,3}; Groupe de travail sur l'artésunate

(1) Umr-s1134, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris; (2) Université de Paris, Labex GR-EX; (3) Centre National de Référence du Paludisme, Paris; (4) Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris; (5) AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière (6) AP-HP, Hôpital Robert-Debré, Paris; (7) Département de Biologie Médicale, Hôpital d'Instruction Des Armées Bégin, Paris; (8) Hôpital Xavier Bichat-Claude Bernard, Paris

Correspondances : charlotte.chambrier@inserm.fr, alouine.ndour@inserm.fr

INTRODUCTION

Les dérivés de l'artémisinine sont recommandés en première intention par l'OMS pour traiter le paludisme grave. Le parasite mort est ensuite expulsé du globule rouge (GR) lors de son passage dans les fentes inter-endothéliales de la rate et le GR dit « pité » est remis en circulation (Figure 1).

Figure 1. Pitting après traitement par l'artémisinine. Les GRs pités peuvent être quantifiés en marquant les protéines parasitaires laissées en tant qu'empreintes après l'expulsion du parasite, comme RESA (en vert) ou HRP2.

Une anémie hémolytique différée (PADH) liée à la destruction des globules rouges pités est observée environ dix jours après le début du traitement. Cet effet secondaire concerne 5 à 25% des sujets traités.

Figure 2. Caractéristiques d'un cas typique de PADH. Dès le début du traitement, la clairance des GRs infectés (en noir) peut être compensée par le relargage des GRs pités (en vert). Environ une semaine plus tard, les globules rouges pités sont détruits, provoquant la PADH. Celle-ci est caractérisée par une variation d'au moins 10% d'un marqueur d'anémie tels que les LDH et l'hémoglobine.

L'équipe a pu mettre au point des tests basés sur la quantification de HRP2 permettant de prédire la survenue de la PADH. Cependant, l'anémie est plus profonde que si seuls les GR pités étaient éliminés et les mécanismes de clairance de ces globules rouges ne sont pas encore définis. Nous pensons qu'une population de GR « décorés » durant l'infection et/ou le traitement seraient également éliminés durant la PADH (Figure 3).

Figure 3. Distribution théorique des différentes sous-populations de GRs liées à la PADH.

Chotivanich et al., JID 2002; Buffet et al., Blood 2006, 2011; Jourdain et al., Blood 2014; Fernandez-Ariza, C. et al. Cell Host Microbe 2016; Ndour et al. Sci Transl. Med., 2017; Wojnarowski et al. JID 2019

Comment les GRs sont-ils éliminés durant la PADH?

2 hypothèses

Rétention biomécanique dans la rate

GR moins déformable

Reconnaissance immunitaire

Opsonisation, phagocytose, lyse médiée par le complément...

RESULTATS

A : Caractérisation des GRs éliminés durant la PADH

Figure 4. Identification par spectrométrie de protéines parasitaires potentiellement impliquées dans la clairance des GRs durant la PADH, sur des échantillons de patients. Une corrélation significative a été observée entre % de GR pités et la quantité de protéines parasitaires (A). La comparaison entre les échantillons contenant des GR parasités (J0) et des échantillons contenant des GR pités (J3, J7, J12, J25) confirme la persistance des protéines parasitaires même après expulsion du parasite. Cette étude a également permis la sélection de protéines potentiellement impliquées dans la PADH en identifiant celles qui sont présentes avant la PADH et disparaissent après l'épisode de PADH (C). De même, la figure C représente la distribution cellulaire de ces protéines ainsi que leur proportion.

B : Mécanismes cellulaires et moléculaires de la PADH

Les GRs pités ont une morphologie altérée.

Figure 5. Etude des modifications morphologiques par imagerie en flux. Des différentes sous-populations de GRs contenues dans les échantillons générés ex-vivo (via 4 rates isolées perfusées) (A) ou dans les échantillons de patients (B) ont été analysées par imagerie en flux. Cette étude a permis de montrer que les GR pités (pRBCs) ont tendance à avoir une surface projetée réduite par rapport aux GR infectés (iRBCs) et sains (uRBCs), un aspect ratio plus important que les uRBCs et sont moins circulaires que les iRBCs.

Implication potentielle des immunoglobulines (Ig) et de la voie du complément dans le mécanisme de la PADH

Figure 6. Quantification des Ig et des protéines de la voie du complément sur des GRs de patients, avant et après traitement. Grâce à la spectrométrie de masse, une augmentation de la fixation des immunoglobulines et des protéines du complément à la surface des GRs et une diminution de la quantité des CRPs durant la PADH a été observée. Cela suggère qu'une opsonisation des GRs peut être à l'origine de la PADH.

CONCLUSION

Les résultats obtenus vont dans le sens des hypothèses émises pour expliquer les mécanismes de clairance des GRs durant les épisodes hémolytiques :

- 1) Altération de la morphologie → Diminution de la déformabilité → Rétention mécanique dans la Rate
- 2) Opsonisation via la reconnaissance spécifique d'antigènes de surfaces → Phagocytose

A terme, cette étude permettra l'identification de nouveaux biomarqueurs prédictifs de l'hémolyse post-artésunate mais aussi de comprendre les mécanismes de clairance érythrocytaire en général.



4.3.4. Congrès de l'American Society of Tropical Medicine and Hygiene (en distanciel, Novembre 2021)

Markers and mechanisms of immune-mediated clearance of red blood cells during post-artemisinin hemolysis in severe malaria

C. Chambion^{1,2,3}; EF. Gautier^{2,4}; M. Depond^{1,2}; O. Mouri^{3,5}; E. Kendjo^{3,5}; M. Dussiot²; A. Fricot-Monsinjon^{1,2}; L. Angella^{1,2}; A. Taieb^{1,3}; N. Argy^{3,8}; S. Houze^{3,8}; JF. Timsit⁶; P. Mayeux^{2,4}; JY. Siriez⁶; S. Larréché⁷; M. Thellier^{3,5}; *P. Buffet^{1,2,3}; *PA. Ndour^{1,2,3}; Groupe de travail sur l'artésunate

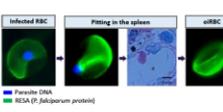
(1) Umr-s1134, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris; (2) Université de Paris, Labex GR-EX; (3) Centre National de Référence du Paludisme, Paris; (4) Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris; (5) AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière (6) AP-HP, Hôpital Robert-Debré, Paris; (7) Département de Biologie Médicale, Hôpital d'Instruction Des Armées Bégin, Paris; (8) Hôpital Xavier Bichat-Claude Bernard, Paris

Corresponding authors charlotte.chambion@inserm.fr, alioune.ndour@inserm.fr

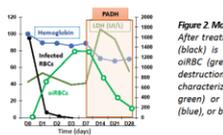
INTRODUCTION

Intravenous artesunate is WHO-recommended first-line treatment of severe malaria. Once killed by artemisinins, *Plasmodium falciparum* is expelled from its host red blood cell (RBC) in the spleen. The once-infected "pitted" or once infected RBC (oIRBC) returns to the circulation (Fig. 1). The lifespan of oIRBC is however shorter compared to normal RBC. More than 80% of patients with high concentration of pitted RBC develop Post-Artemisinin Delayed Hemolysis (PADH) 7-to-21 day following treatment with IA (Fig. 2), when pitted RBC are cleared.

The objective of this study was to decipher mechanisms PADH.

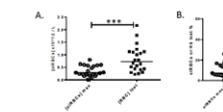


oIRBC are cleared by the end of the first week post-treatment, causing Post Artesunate Delayed Hemolysis (PADH) in 5% to 25% of patients with severe malaria (Figure 2).



The quantification of oIRBCs by flow cytometry or HRP2-based dipstick predicts PADH but the mechanisms by which oIRBC are cleared is still unknown. In particular, it is not clear why the anemia is deeper than what would be observed if only pitted RBC were lost during the episode.

Figure 3. Pitting maximum doesn't correspond to the total variation percentage of anemia markers. A. (oIRBCs)max compared to [total RBCs] lost during PADH (n=25). B. Pitting maximum (oIRBCs max %) compared to Hb lost during PADH (n=27). Medians of the values is represented by the horizontal lines.



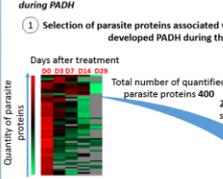
During an episode of PADH, more RBC are cleared than the total number of oIRBC. PADH is likely due to the clearance of both pitted and decorated RBC. Identifying specific markers of to-be-cleared RBC would clarify the pathogenesis of PADH.

Chotivanich et al., JID 2002 | Buffet et al., Blood 2006, 2011, Harkgolberg, Ndour et al., Blood 2014 | Fernandez-Arias, C. et al. Cell Host Microbe 2016 | Ndour et al. Sci Transl. Med., 2017 | Wijnhoven et al. JID 2019

RESULTS

Figure 4. Identification of parasite proteins which could act as antigen during PADH

1) Selection of parasite proteins associated with RBCs of patients which developed PADH during their follow up



206 parasite proteins quantified on samples containing pitted RBCs

Around 40 proteins significantly decrease during PADH

2) Immunoprecipitation followed by mass spectrometry (n=4)

8 parasite proteins at the surface membrane recognized by antibodies in the plasma from convalescent PADH patients

Figure 5. Recognition of parasite protein by immunoglobulins by mass spectrometry on patient's samples. We quantified an increase of immunoglobulins fixation at the surface of RBC during PADH (n=8 patients) suggesting that clearance may result from the opsonization of RBC-expressing neo-antigens on their surface.

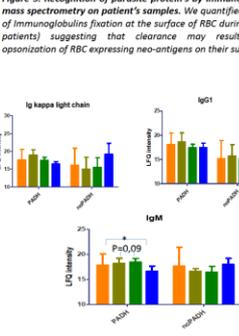


Figure 6. Disappearance of Complement Regulatory Proteins and fixation of complement proteins correlate with PADH

A. Quantification by mass spectrometry of opsonin C4b on samples from 8 PADH patients and 6 patients which didn't develop PADH (noPADH)

B. Quantification by flow cytometry of complement regulatory proteins on RBCs from patients which develop PADH

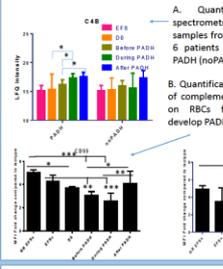
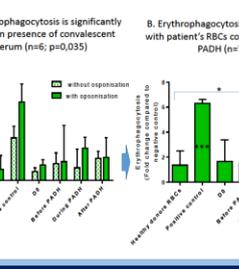


Figure 7. PADH's RBCs are more phagocytosed than RBCs from healthy donors.

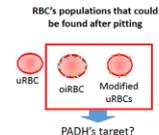
A. Erythrophagocytosis is significantly higher in presence of convalescent serum (n=6; p=0,035)

B. Erythrophagocytosis is improved with patient's RBCs collected during PADH (n=7)



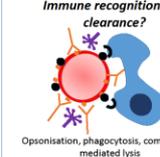
How RBC are eliminated during PADH?

RBC's populations that could be found after pitting



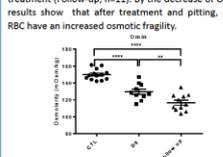
PADH's target?

Immune recognition and clearance?



Opsonisation, phagocytosis, complement mediated lysis

Figure 8. Increase of osmotic fragility in follow up of patient's RBCs. We measured by ektacytometry the osmotic fragility of healthy donors RBCs (CTL, n=13), RBCs from patients before treatment (DO, n=10) and after treatment (Follow-up, n=11). By the decrease of Osm, our results show that after treatment and pitting, patient's RBC have an increased osmotic fragility.



CONCLUSION

Hypothetic mechanisms of PADH:

- 1) Modifications of RBCs following artemisinin treatment and pitting
- 2) Recognition of antigens by Immunoglobulins
- 3) Activation of the classical component pathway
- 4) Opsonization of RBCs by complement component and degradation of CRPs
- 5) Lysis by the complement and phagocytosis

These observations open the way to identify general mechanisms of anemia.



Formations suivies au cours de la thèse

Au cours de ma thèse j'ai pu suivre 3 différentes formations.

1) Méthodes d'analyse protéomique comparative globale (3,5 jours + une journée de pratique)

Objectifs :

- Comprendre les méthodes de protéomique utilisées pour identifier et quantifier les protéines
- Apprécier l'intérêt, la puissance des techniques présentées et leurs limites
- Appréhender les différentes techniques d'analyse comparative de protéomes complexes et choisir la plus adaptée à sa problématique et à la nature de son matériel biologique

2) Statistiques notions fondamentales (4 jours)

Objectifs :

- Décrire synthétiquement et graphiquement une série de mesures quantitatives
- Donner un sens physique aux indicateurs tels que moyenne, médiane, écart-type, CV
- Comprendre la notion d'échantillonnage et de population
- Calculer et interpréter un intervalle de confiance pour une moyenne, une proportion
- Différencier la notion d'écart-type (SDet d'erreur-type (Sem)
- Comprendre la démarche de mise en place d'un test d'hypothèse
- Mettre en œuvre un test d'hypothèse classique (Student, Fisher, χ^2)
- Traduire en connaissances métiers les résultats statistiques issus d'un test d'hypothèse
- Choisir entre un test paramétrique et non paramétrique
- Calculer la taille des échantillons nécessaire dans un test ainsi que la puissance associée au test.

3) Application aux statistiques avec Graphpad (4 jours)

Objectifs :

- Structurer des données afin d'effectuer les traitements statistiques appropriés
- Maîtriser l'interface du logiciel Connaître l'éventail du potentiel statistique disponible
- Maîtriser les fonctionnalités graphiques
- Mettre en œuvre les traitements statistiques du logiciel (tests d'hypothèses, Anova un et deux facteurs, régression simple, Analyse de survie) NB : Cette formation est essentiellement orientée sur la maîtrise de l'interface logiciel GraphPad même si quelques rappels de méthodologie statistiques peuvent être effectués

Bibliographie

- [1] « Rapport 2020 sur le paludisme dans le monde - Messages généraux - World | ReliefWeb ». <https://reliefweb.int/report/world/rapport-2020-sur-le-paludisme-dans-le-monde-messages-generaux> (consulté le 18 mai 2022).
- [2] N. J. White, « Anaemia and malaria », *Malar. J.*, vol. 17, oct. 2018, doi : 10.1186/s12936-018-2509-9.
- [3] L. H. Camacho, V. R. Gordeuk, P. Wilairatana, P. Pootrakul, G. M. Brittenham, et S. Looareesuwan, « The course of anaemia after the treatment of acute, falciparum malaria », *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, vol. 92, n° 5, p. 525-537, juill. 1998, doi: 10.1080/00034983.1998.11813310.
- [4] C.-C. for D. C. and Prevention, « CDC - Malaria - Malaria Worldwide - Impact of Malaria », 26 janvier 2021. https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html (consulté le 1 avril 2021).
- [5] « World malaria report 2021 ». <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021> (consulté le 18 mai 2022).
- [6] N. J. White, S. Pukrittayakamee, T. T. Hien, M. A. Faiz, O. A. Mokuolu, et A. M. Dondorp, « Malaria », *The Lancet*, vol. 383, n° 9918, p. 723-735, févr. 2014, doi : 10.1016/S0140-6736(13)60024-0.
- [7] B. Cooke, R. Coppel, et M. Wahlgren, « Falciparum Malaria: Sticking up, Standing out and Outstanding », *Parasitol. Today*, vol. 16, n° 10, p. 416-420, oct. 2000, doi: 10.1016/S0169-4758(00)01753-1.
- [8] O. K. Doumbo *et al.*, « High Levels of Plasmodium falciparum Rosetting in All Clinical Forms of Severe Malaria in African Children », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 81, n° 6, p. 987-993, déc. 2009, doi : 10.4269/ajtmh.2009.09-0406.
- [9] A. Biswas, P. K. Gangopadhyay, D. Guha, et T. Roy, « Multiple brain haemorrhages in falciparum malaria », *J. Assoc. Physicians India*, vol. 52, p. 928-930, nov. 2004.
- [10] P. A. Ndour *et al.*, « Measuring the Plasmodium falciparum HRP2 protein in blood from artesunate-treated malaria patients predicts post-artesunate delayed hemolysis », *Sci. Transl. Med.*, vol. 9, n° 397, juill. 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aaf9377.
- [11] « Thick and Thin Blood Smear for Malaria Diagnosis • Microbe Online », *Microbe Online*, 20 avril 2010. <https://microbeonline.com/microscopic-diagnosis-of-malaria/> (consulté le 23 mai 2022).
- [12] R. N. PRICE *et al.*, « FACTORS CONTRIBUTING TO ANEMIA AFTER UNCOMPLICATED FALCIPARUM MALARIA », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 65, n° 5, p. 614-622, nov. 2001.
- [13] S. Jauréguiberry *et al.*, « Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins », *Blood*, vol. 124, n° 2, p. 167-175, juill. 2014, doi: 10.1182/blood-2014-02-555953.
- [14] J. Crawley, *Reducing the Burden of Anemia in Infants and Young Children in Malaria-endemic Countries of Africa: From Evidence to Action*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2004. Consulté le : 18 mai 2022. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3747/>
- [15] H. L. Guyatt et R. W. Snow, « The epidemiology and burden of Plasmodium falciparum-related anemia among pregnant women in sub-Saharan Africa », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 64, n° 1_suppl, p. 36-44, janv. 2001, doi : 10.4269/ajtmh.2001.64.36.

- [16] D. Schellenberg *et al.*, « African children with malaria in an area of intense Plasmodium falciparum transmission: features on admission to the hospital and risk factors for death », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 61, n° 3, p. 431-438, sept. 1999, doi: 10.4269/ajtmh.1999.61.431.
- [17] P. Wilairatana, W. Mala, W. K. Klangbud, K. U. Kotepui, P. Rattaprasert, et M. Kotepui, « Prevalence, probability, and outcomes of typhoidal/non-typhoidal Salmonella and malaria co-infection among febrile patients: a systematic review and meta-analysis », *Sci. Rep.*, vol. 11, n° 1, Art. n° 1, nov. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00611-0.
- [18] E. L. Korenromp, J. R. M. Armstrong-Schellenberg, B. G. Williams, B. L. Nahlen, et R. W. Snow, « Impact of malaria control on childhood anaemia in Africa – a quantitative review », *Trop. Med. Int. Health*, vol. 9, n° 10, p. 1050-1065, 2004, doi: 10.1111/j.1365-3156.2004.01317.x.
- [19] J. C. J. Calis *et al.*, « Severe anemia in Malawian children », *N. Engl. J. Med.*, vol. 358, n° 9, p. 888-899, févr. 2008, doi: 10.1056/NEJMoa072727.
- [20] T. N. Williams, « Sickle Cell Disease in Sub-Saharan Africa », *Hematol. Clin.*, vol. 30, n° 2, p. 343-358, avr. 2016, doi: 10.1016/j.hoc.2015.11.005.
- [21] S. Uyoga *et al.*, « Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and the risk of malaria and other diseases in children in Kenya: a case-control and a cohort study », *Lancet Haematol.*, vol. 2, n° 10, p. e437-e444, oct. 2015, doi: 10.1016/S2352-3026(15)00152-0.
- [22] R. Fendel *et al.*, « Hemolysis Is Associated with Low Reticulocyte Production Index and Predicts Blood Transfusion in Severe Malarial Anemia », *PLOS ONE*, vol. 5, n° 4, p. e10038, avr. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010038.
- [23] H. Reyburn *et al.*, « Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe Plasmodium falciparum malaria », *JAMA*, vol. 293, n° 12, p. 1461-1470, mars 2005, doi: 10.1001/jama.293.12.1461.
- [24] N. M. Douglas, « The anaemia of Plasmodium vivax malaria », p. 14, 2012.
- [25] J. Hanson *et al.*, « The reliability of the physical examination to guide fluid therapy in adults with severe falciparum malaria: an observational study », *Malar. J.*, vol. 12, p. 348, oct. 2013, doi : 10.1186/1475-2875-12-348.
- [26] World Health Organization, *World Malaria report 2014*. Geneva: World Health Organization, 2014. Consulté le : 23 mai 2022. [En ligne]. Disponible sur : <https://apps.who.int/iris/handle/10665/144852>
- [27] N. J. White et M. Ho, « The Pathophysiology of Malaria », in *Advances in Parasitology*, vol. 31, J. R. Baker et R. Muller, Éd. Academic Press, 1992, p. 83-173. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60021-4.
- [28] G. N. Jakeman, A. Saul, W. L. Hogarth, et W. E. Collins, « Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes », *Parasitology*, vol. 119, n° 2, p. 127-133, août 1999, doi : 10.1017/S0031182099004564.
- [29] S. Looareesuwan *et al.*, « Erythrocyte survival in severe falciparum malaria », *Acta Trop.*, vol. 48, n° 4, p. 263-270, févr. 1991, doi : 10.1016/0001-706X(91)90014-B.
- [30] « Two monographs on malaria and the parasites of malarial fevers : I. Marchiafava and Bignami. II. Mannaberg. », *Wellcome Collection*. <https://wellcomecollection.org/works/x8xfyf2> (consulté le 19 mai 2022).
- [31] J. A. Stoute, A. O. Odindo, B. O. Owuor, E. K. Mibei, M. O. Opollo, et J. N. Waitumbi, « Loss of Red Blood Cell–Complement Regulatory Proteins and Increased Levels of Circulating Immune Complexes Are Associated with Severe Malarial Anemia », *J. Infect. Dis.*, vol. 187, n° 3, p. 522-525, févr. 2003, doi : 10.1086/367 712.
- [32] D. A. Oyong *et al.*, « Loss of complement regulatory proteins on uninfected erythrocytes in vivax and falciparum malaria anemia », 15 novembre 2018. <https://insight.jci.org/articles/view/124854/sd/1> (consulté le 28 novembre 2018).
- [33] J.-B. L. Douki *et al.*, « Adhesion of normal and Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes to endothelial cells and the placenta involves the rhoptry-derived ring surface protein-2 », *Blood*, vol. 101, n° 12, p. 5025-5032, juin 2003, doi : 10.1182/blood-2002-12-3710.

- [34] C. Layez *et al.*, « Plasmodium falciparum rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage », *Blood*, vol. 106, n° 10, p. 3632-3638, nov. 2005, doi : 10.1182/blood-2005-04-1574.
- [35] L. A. Mariuba, P. P. Orlandi, M. Medeiros, R. Holanda, A. Grava, et P. A. Nogueira, « Improving the production of the denatured recombinant N-terminal domain of rhoptry-associated protein 2 from a Plasmodium falciparum target in the pathology of anemia in falciparum malaria », *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 103, n° 6, p. 522-527, sept. 2008, doi: 10.1590/S0074-02762008000600002.
- [36] A. M. Dondorp *et al.*, « Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 60, n° 5, p. 733-737, mai 1999, doi : 10.4269/ajtmh.1999.60.733.
- [37] J. Li, M. Dao, C. T. Lim, et S. Suresh, « Spectrin-Level Modeling of the Cytoskeleton and Optical Tweezers Stretching of the Erythrocyte », *Biophys. J.*, vol. 88, n° 5, p. 3707-3719, mai 2005, doi : 10.1529/biophysj.104.047332.
- [38] P. A. Buffet *et al.*, « Ex vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions », *Blood*, vol. 107, n° 9, p. 3745-3752, mai 2006, doi : 10.1182/blood-2005-10-4094.
- [39] I. Safeukui *et al.*, « Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen », *Blood*, vol. 112, n° 6, p. 2520-2528, sept. 2008, doi: 10.1182/blood-2008-03-146779.
- [40] C. M. Cserti-Gazdewich *et al.*, « Inter-Relationships of Cardinal Features and Outcomes of Symptomatic Pediatric Plasmodium falciparum Malaria in 1,933 Children in Kampala, Uganda », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 88, n° 4, p. 747-756, avr. 2013, doi : 10.4269/ajtmh.12-0668.
- [41] F. Nuchsongsin *et al.*, « Effects of Malaria Heme Products on Red Blood Cell Deformability », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 77, p. 617-22, nov. 2007, doi : 10.4269/ajtmh.2007.77.617.
- [42] F. Omodeo-Salè, A. Motti, A. Dondorp, N. J. White, et D. Taramelli, « Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by Plasmodium falciparum haem products », *Eur. J. Haematol.*, vol. 74, n° 4, p. 324-332, 2005, doi: 10.1111/j.1600-0609.2004.00352.x.
- [43] P. A. Buffet *et al.*, « The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology », *Blood*, vol. 117, n° 2, p. 381-392, janv. 2011, doi: 10.1182/blood-2010-04-202911.
- [44] H. Burgmann *et al.*, « Serum levels of erythropoietin in acute Plasmodium falciparum malaria », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 54, n° 3, p. 280-283, mars 1996, doi: 10.4269/ajtmh.1996.54.280.
- [45] A. M. A. E. Hassan, A. M. Saeed, J. Fandrey, et W. Jelkmann, « Decreased erythropoietin response in Plasmodium falciparum malaria-associated anaemia », *Eur. J. Haematol.*, vol. 59, n° 5, p. 299-304, 1997, doi: 10.1111/j.1600-0609.1997.tb01690.x.
- [46] J. a. L. Kurtzhals, O. Rodrigues, M. Addae, J. O. O. Commey, F. K. Nkrumah, et L. Hviid, « Reversible suppression of bone marrow response to erythropoietin in Plasmodium falciparum malaria », *Br. J. Haematol.*, vol. 97, n° 1, p. 169-174, 1997, doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.82654.x.
- [47] Q. de Mast *et al.*, « Increased serum hepcidin and alterations in blood iron parameters associated with asymptomatic P. falciparum and P. vivax malaria », *Haematologica*, vol. 95, n° 7, p. 1068-1074, juill. 2010, doi: 10.3324/haematol.2009.019331.
- [48] S. Abdalla, D. j. Weatherall, S. N. Wickramasinghe, et M. Hughes, « The Anaemia of P. falciparum Malaria », *Br. J. Haematol.*, vol. 46, n° 2, p. 171-183, 1980, doi: 10.1111/j.1365-2141.1980.tb05956.x.
- [49] S. N. Wickramasinghe, S. Abdalla, et D. J. Weatherall, « Cell Cycle Distribution of Erythroblasts in P. falciparum Malaria », *Scand. J. Haematol.*, vol. 29, n° 1, p. 83-88, 1982, doi: 10.1111/j.1600-0609.1982.tb00567.x.
- [50] S. N. Wickramasinghe et S. H. Abdalla, « Blood and bone marrow changes in malaria », *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 13, n° 2, p. 277-299, juin 2000, doi : 10.1053/beh.1999.0072.

- [51] J. A. Kurtzhals *et al.*, « Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria », *The Lancet*, vol. 351, n° 9118, p. 1768-1772, juin 1998, doi: 10.1016/S0140-6736(97)09439-7.
- [52] P. E. Thuma *et al.*, « Distinct Clinical and Immunologic Profiles in Severe Malarial Anemia and Cerebral Malaria in Zambia », *J. Infect. Dis.*, vol. 203, n° 2, p. 211-219, janv. 2011, doi : 10.1093/infdis/jiq041.
- [53] A. Patenotte, O. Dupuy, F. Peyron, H. Delolme, et A. Flechaire, « Antibiotiques et paludisme. Revue de la littérature », *Med. Mal. Infect.*, vol. 10, n° 25, p. 970-975, 1995, doi: 10.1016/S0399-077X(05)80311-7.
- [54] L. M. Yen *et al.*, « Role of quinine in the high mortality of intramuscular injection tetanus », *The Lancet*, vol. 344, n° 8925, p. 786-787, sept. 1994, doi: 10.1016/S0140-6736(94)92342-6.
- [55] N. J. White *et al.*, « Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in falciparum malaria », *N. Engl. J. Med.*, vol. 309, n° 2, p. 61-66, juill. 1983, doi: 10.1056/NEJM198307143090201.
- [56] N. J. White, « Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, n° 7, p. 1413-1422, juill. 1997.
- [57] S. Pukrittayakamee, W. Supanaranond, S. Looareesuwan, S. Vanijanonta, et N. J. White, « Quinine in severe falciparum malaria: evidence of declining efficacy in Thailand », *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 88, n° 3, p. 324-327, mai 1994, doi : 10.1016/0035-9203(94)90102-3.
- [58] A. Dondorp, F. Nosten, K. Stepniewska, N. Day, N. White, et South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) group, « Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 366, n° 9487, p. 717-725, sept. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)67176-0.
- [59] A. M. Dondorp *et al.*, « Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial », *The Lancet*, vol. 376, n° 9753, p. 1647-1657, nov. 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)61924-1.
- [60] F. ter Kuile, N. J. White, P. Holloway, G. Pasvol, et S. Krishna, « Plasmodium falciparum: in vitro studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria », *Exp. Parasitol.*, vol. 76, n° 1, p. 85-95, févr. 1993, doi : 10.1006/expr.1993.1010.
- [61] P. Q. Chen, G. Q. Li, et X. B. Guo, « [The infectivity of gametocytes of Plasmodium falciparum from patients treated with artemisinin] », *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, vol. 74, n° 4, p. 209-10, 253-4, avr. 1994.
- [62] J. Cazelles, A. Robert, et B. Meunier, « Alkylation of heme by artemisinin, an antimalarial drug », *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. IIC - Chem.*, vol. 4, n° 2, p. 85-89, févr. 2001, doi : 10.1016/S1387-1609(00)01188-9.
- [63] C. O. Egwu, I. Tsamesidis, P. Pério, J.-M. Augereau, F. Benoit-Vical, et K. Reybier, « Superoxide: A major role in the mechanism of action of essential antimalarial drugs », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 167, p. 271-275, mai 2021, doi : 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.001.
- [64] R. K. Haynes *et al.*, « The Fe²⁺-Mediated Decomposition, PfATP6 Binding, and Antimalarial Activities of Artemisone and Other Artemisinins: The Unlikelihood of C-Centered Radicals as Bioactive Intermediates », *ChemMedChem*, vol. 2, n° 10, p. 1480-1497, oct. 2007, doi: 10.1002/cmdc.200700108.
- [65] A. M. Gopalakrishnan et N. Kumar, « Antimalarial Action of Artesunate Involves DNA Damage Mediated by Reactive Oxygen Species », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, n° 1, p. 317-325, janv. 2015, doi: 10.1128/AAC.03663-14.
- [66] J. L. Bridgford *et al.*, « Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome », *Nat. Commun.*, vol. 9, n° 1, p. 3801, sept. 2018, doi : 10.1038/s41467-018-06221-1.
- [67] Z. Li, Q. Li, J. Wu, M. Wang, et J. Yu, « Artemisinin and Its Derivatives as a Repurposing Anticancer Agent: What Else Do We Need to Do? », *Molecules*, vol. 21, n° 10, Art. n° 10, oct. 2016, doi: 10.3390/molecules21101331.
- [68] N. J. White, « Qinghaosu (artemisinin): the price of success », *Science*, vol. 320, n° 5874, p. 330-334, avr. 2008, doi: 10.1126/science.1155165.

- [69] World Health Organization, « The world health report : 2006 : working together for health », World Health Organization, 2006. Consulté le : 19 mai 2022. [En ligne]. Disponible sur : <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43432>
- [70] A. Bhattarai *et al.*, « Impact of Artemisinin-Based Combination Therapy and Insecticide-Treated Nets on Malaria Burden in Zanzibar », *PLOS Med.*, vol. 4, n° 11, p. e309, nov. 2007, doi: 10.1371/journal.pmed.0040309.
- [71] « Prise en charge et prevention du paludisme d'importation a Plasmodium falciparum : recommandations pour la pratique clinique 2007 (Revisions de la Conference de consensus 1999). Texte long », *Réanimation*, vol. 17, n° 5, p. e1-e54, juill. 2008, doi: 10.1016/j.reaurg.2008.03.004.
- [72] C. Roussel *et al.*, « Intravenous Artesunate for the Treatment of Severe Imported Malaria: Implementation, Efficacy, and Safety in 1391 Patients », *Clin. Infect. Dis.*, vol. 73, n° 10, p. 1795-1804, nov. 2021, doi: 10.1093/cid/ciab133.
- [73] A. M. Dondorp *et al.*, « Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria », *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, n° 5, p. 455-467, juill. 2009, doi: 10.1056/NEJMoa0808859.
- [74] H. Noedl, Y. Se, K. Schaecher, B. L. Smith, D. Socheat, et M. M. Fukuda, « Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, n° 24, p. 2619-2620, déc. 2008, doi: 10.1056/NEJMc0805011.
- [75] S. Nakazawa, T. Maoka, H. Uemura, Y. Ito, et H. Kanbara, « Malaria Parasites Giving Rise to Recrudescence In Vitro », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, n° 4, p. 958-965, avr. 2002, doi: 10.1128/AAC.46.4.958-965.2002.
- [76] M. S. Tucker, T. Mutka, K. Sparks, J. Patel, et D. E. Kyle, « Phenotypic and Genotypic Analysis of In Vitro-Selected Artemisinin-Resistant Progeny of Plasmodium falciparum », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, n° 1, p. 302-314, janv. 2012, doi: 10.1128/AAC.05540-11.
- [77] B. Witkowski *et al.*, « Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies », *Lancet Infect. Dis.*, vol. 13, n° 12, p. 1043-1049, déc. 2013, doi : 10.1016/S1473-3099(13)70252-4.
- [78] F. Ariey *et al.*, « A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria », *Nature*, vol. 505, n° 7481, p. 50-55, janv. 2014, doi : 10.1038/nature12876.
- [79] Q. Cheng, D. E. Kyle, et M. L. Gatton, « Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum: A process linked to dormancy? », *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, vol. 2, p. 249-255, janv. 2012, doi: 10.1016/j.ijpddr.2012.01.001.
- [80] T. Yang *et al.*, « Decreased K13 Abundance Reduces Hemoglobin Catabolism and Proteotoxic Stress, Underpinning Artemisinin Resistance », *Cell Rep.*, vol. 29, n° 9, p. 2917-2928.e5, nov. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.10.095.
- [81] J. Birnbaum *et al.*, « A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites », *Science*, vol. 367, n° 6473, p. 51-59, janv. 2020, doi : 10.1126/science.aax4735.
- [82] S. Mok *et al.*, « Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance », *Science*, vol. 347, n° 6220, p. 431-435, janv. 2015, doi : 10.1126/science.1260403.
- [83] F. Rocamora *et al.*, « Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites », *PLOS Pathog.*, vol. 14, n° 3, p. e1006930, mars 2018, doi: 10.1371/journal.ppat.1006930.
- [84] M. Zhang *et al.*, « Inhibiting the Plasmodium eIF2 α Kinase PK4 Prevents Artemisinin-Induced Latency », *Cell Host Microbe*, vol. 22, n° 6, p. 766-776.e4, déc. 2017, doi: 10.1016/j.chom.2017.11.005.
- [85] A. Mbengue *et al.*, « A molecular mechanism of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria », *Nature*, vol. 520, n° 7549, p. 683-687, avr. 2015, doi : 10.1038/nature14412.
- [86] P. Mesén-Ramírez *et al.*, « The parasitophorous vacuole nutrient channel is critical for drug access in malaria parasites and modulates the artemisinin resistance fitness cost », *Cell Host Microbe*, vol. 29, n° 12, p. 1774-1787.e9, déc. 2021, doi: 10.1016/j.chom.2021.11.002.

- [87] A. Uwimana *et al.*, « Association of Plasmodium falciparum kelch13 R561H genotypes with delayed parasite clearance in Rwanda: an open-label, single-arm, multicentre, therapeutic efficacy study », *Lancet Infect. Dis.*, vol. 21, n° 8, p. 1120-1128, août 2021, doi : 10.1016/S1473-3099(21)00142-0.
- [88] K. Chotivanich *et al.*, « Central role of the spleen in malaria parasite clearance », *J. Infect. Dis.*, vol. 185, n° 10, p. 1538-1541, mai 2002, doi : 10.1086/340 213.
- [89] K. Chotivanich *et al.*, « The mechanisms of parasite clearance after antimalarial treatment of Plasmodium falciparum malaria », *J. Infect. Dis.*, vol. 182, n° 2, p. 629-633, août 2000, doi : 10.1086/315 718.
- [90] P. A. Ndour *et al.*, « Plasmodium falciparum Clearance Is Rapid and Pitting Independent in Immune Malian Children Treated With Artesunate for Malaria », *J. Infect. Dis.*, vol. 211, n° 2, p. 290-297, janv. 2015, doi : 10.1093/infdis/jiu427.
- [91] B. Angus, K. Chotivanich, R. Udomsangpetch, et N. White, « In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria. », *Blood*, 1997, doi: 10.1182/BLOOD.V90.5.2037.
- [92] S. Jauréguiberry *et al.*, « Delayed-Onset Hemolytic Anemia in Patients with Travel-Associated Severe Malaria Treated with Artesunate, France, 2011–2013 », *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 21, n° 5, p. 804-812, mai 2015, doi : 10.3201/eid2105.141171.
- [93] T. Rolling, D. Wichmann, S. Schmiedel, G. D. Burchard, S. Kluge, et J. P. Cramer, « Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis », *Malar. J.*, vol. 12, p. 241, juill. 2013, doi : 10.1186/1475-2875-12-241.
- [94] I. Itoda *et al.*, « Severe Falciparum Malaria with Prolonged Hemolytic Anemia after Successful Treatment with Intravenous Artesunate », *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, vol. 76, n° 8, p. 600-603, 2002, doi: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.76.600.
- [95] T. Zoller *et al.*, « Intravenous Artesunate for Severe Malaria in Travelers, Europe », *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 17, n° 5, p. 771-777, mai 2011, doi : 10.3201/eid1705.101229.
- [96] T. Rolling *et al.*, « Delayed hemolysis after treatment with parenteral artesunate in African children with severe malaria--a double-center prospective study », *J. Infect. Dis.*, vol. 209, n° 12, p. 1921-1928, juin 2014, doi : 10.1093/infdis/jit841.
- [97] K. Scheu *et al.*, « Determinants of post-malarial anemia in African children treated with parenteral artesunate », *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 1, p. 18134, déc. 2019, doi : 10.1038/s41598-019-54639-4.
- [98] L. Raffray, M.-C. Receveur, M. Beguet, P. Lauroua, T. Pistone, et D. Malvy, « Severe delayed autoimmune haemolytic anaemia following artesunate administration in severe malaria: a case report », *Malar. J.*, vol. 13, n° 1, p. 398, 2014, doi: 10.1186/1475-2875-13-398.
- [99] C. Fanello *et al.*, « Post-treatment haemolysis in African children with hyperparasitaemic falciparum malaria; a randomized comparison of artesunate and quinine », *BMC Infect. Dis.*, vol. 17, n° 1, p. 575, déc. 2017, doi : 10.1186/s12879-017-2678-0.
- [100] M. T. Hawkes *et al.*, « Anemia and transfusion requirements among Ugandan children with severe malaria treated with intravenous artesunate », *Pediatr. Hematol. Oncol.*, vol. 37, n° 2, p. 140-152, févr. 2020, doi : 10.1080/08880018.2019.1701161.
- [101] K. Plewes *et al.*, « Severe falciparum malaria treated with artesunate complicated by delayed onset haemolysis and acute kidney injury », *Malar. J.*, vol. 14, n° 1, p. 246, juin 2015, doi : 10.1186/s12936-015-0760-x.
- [102] S. H. Orkin, « Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages », *Nat. Rev. Genet.*, vol. 1, n° 1, Art. n° 1, oct. 2000, doi: 10.1038/35049577.
- [103] C. Gregory et A. Eaves, « Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses », *Blood*, vol. 49, n° 6, p. 855-864, juin 1977, doi : 10.1182/blood.V49.6.855.855.
- [104] S. Granick et R. D. Levere, « HEME SYNTHESIS IN ERYTHROID CELLS », *Prog. Hematol.*, vol. 4, p. 1-47, 1964.

- [105] A. Xanthopoulos *et al.*, « Red blood cell distribution width as a prognostic marker in patients with heart failure and diabetes mellitus », *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 16, n° 1, p. 81, juill. 2017, doi: 10.1186/s12933-017-0563-1.
- [106] W. H. Reinhart et A. Singh, « Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry », *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 20, n° 4, p. 458-462, 1990, doi: 10.1111/j.1365-2362.1990.tb01884.x.
- [107] N. Z. Piety, S. C. Gifford, X. Yang, et S. S. Shevkopyas, « Quantifying morphological heterogeneity: a study of more than 1 000 000 individual stored red blood cells », *Vox Sang.*, vol. 109, n° 3, p. 221-230, 2015, doi : 10.1111/vox.12277.
- [108] C. Roussel, P. Buffet, et P. Amireault, « Conserver les globules rouges pour la transfusion », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2020, n° 525, p. 52-58, sept. 2020, doi: 10.1016/S1773-035X(20)30275-6.
- [109] C. Roussel *et al.*, « Rapid clearance of storage-induced microerythrocytes alters transfusion recovery », *Blood*, vol. 137, n° 17, p. 2285-2298, avr. 2021, doi: 10.1182/blood.2020008563.
- [110] J. Ford, « Red blood cell morphology », *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 35, n° 3, p. 351-357, juin 2013, doi : 10.1111/ijlh.12082.
- [111] « Développement et Santé | Morphologie des hématies normales et pathologiques ». <https://devsante.org/articles/morphologie-des-hematies-normales-et-pathologiques> (consulté le 29 décembre 2021).
- [112] E. N. Pesciotta, S. Sriswasdi, H.-Y. Tang, P. J. Mason, M. Bessler, et D. W. Speicher, « A label-free proteome analysis strategy for identifying quantitative changes in erythrocyte membranes induced by red cell disorders », *J. Proteomics*, vol. 76 Spec No., p. 194-202, déc. 2012, doi : 10.1016/j.jprot.2012.08.010.
- [113] N. Mohandas et P. G. Gallagher, « Red cell membrane: past, present, and future », *Blood*, vol. 112, n° 10, p. 3939-3948, nov. 2008, doi: 10.1182/blood-2008-07-161166.
- [114] S. E. Lux, « Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions », *Blood*, vol. 127, n° 2, p. 187-199, janv. 2016, doi: 10.1182/blood-2014-12-512772.
- [115] A. J. Verkleij, R. F. A. Zwaal, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn, et L. L. M. van Deenen, « The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 323, n° 2, p. 178-193, oct. 1973, doi: 10.1016/0005-2736(73)90143-0.
- [116] D. L. Daleke, « Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane », *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 15, n° 3, p. 191-195, mai 2008, doi : 10.1097/MOH.0b013e3282f97af7.
- [117] F. E. Boas, L. Forman, et E. Beutler, « Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, n° 6, p. 3077-3081, mars 1998, doi: 10.1073/pnas.95.6.3077.
- [118] vette Martínez-Vieyra *et al.*, « Alterations to plasma membrane lipid contents affect the biophysical properties of erythrocytes from individuals with hypertension », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1861, n° 10, p. 182996, oct. 2019, doi: 10.1016/j.bbamem.2019.05.018.
- [119] Y. Yawata *et al.*, « Self-adaptive modification of red-cell membrane lipids in lecithin: Cholesterol acyltransferase deficiency. Lipid analysis and spin labeling », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 769, n° 2, p. 440-448, janv. 1984, doi: 10.1016/0005-2736(84)90328-6.
- [120] M. Carquin, L. D'Auria, H. Pollet, E. R. Bongarzone, et D. Tyteca, « Recent progress on lipid lateral heterogeneity in plasma membranes: From rafts to submicrometric domains », *Prog. Lipid Res.*, vol. 62, p. 1-24, avr. 2016, doi : 10.1016/j.plipres.2015.12.004.
- [121] J. P. Cartron et Y. Colin, « Structural and functional diversity of blood group antigens », *Transfus. Clin. Biol.*, vol. 8, n° 3, p. 163-199, juin 2001, doi : 10.1016/S1246-7820(01)00142-2.
- [122] S. M. Cahalan, V. Lukacs, S. S. Ranade, S. Chien, M. Bandell, et A. Patapoutian, « Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume », *eLife*, vol. 4, p. e07370, doi : 10.7554/eLife.07370.

- [123] V. M. Fowler et V. Bennett, « Erythrocyte membrane tropomyosin. Purification and properties. », *J. Biol. Chem.*, vol. 259, n° 9, p. 5978-5989, mai 1984, doi : 10.1016/S0021-9258(18)91110-5.
- [124] M. Salomao *et al.*, « Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: New insights into the structural organization of the red blood cell membrane », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 23, p. 8026-8031, juin 2008, doi : 10.1073/pnas.0803225105.
- [125] I. Andolfo, R. Russo, A. Gambale, et A. Iolascon, « New insights on hereditary erythrocyte membrane defects », *Haematologica*, vol. 101, n° 11, p. 1284-1294, nov. 2016, doi : 10.3324/haematol.2016.142463.
- [126] V. Bennett, « The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.*, vol. 988, n° 1, p. 107-121, janv. 1989, doi: 10.1016/0304-4157(89)90006-3.
- [127] X. An, M. C. Lecomte, J. A. Chasis, N. Mohandas, et W. Gratzer, « Shear-Response of the Spectrin Dimer-Tetramer Equilibrium in the Red Blood Cell Membrane * », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 35, p. 31796-31 800, août 2002, doi : 10.1074/jbc.M204567200.
- [128] V. Ohanian, L. C. Wolfe, K. M. John, J. C. Pinder, S. E. Lux, et W. B. Gratzer, « Analysis of the ternary interaction of the red cell membrane skeletal proteins, spectrin, actin, and 4.1 », *ACS Publications*, 1 mai 2002. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00314a027> (consulté le 20 mai 2022).
- [129] M. F. PERUTZ, « STRUCTURE AND MECHANISM OF HAEMOGLOBIN », *Br. Med. Bull.*, vol. 32, n° 3, p. 195-208, sept. 1976, doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071363.
- [130] Lakna, « What is the Function of Hemoglobin in the Human Body », *Pediaa.Com*, 19 février 2017. <https://pediaa.com/what-is-the-function-of-hemoglobin-in-the-human-body/> (consulté le 24 mai 2022).
- [131] J. R. Murphy, « Hemoglobin CC disease: rheological properties of erythrocytes and abnormalities in cell water », *J. Clin. Invest.*, vol. 47, n° 7, p. 1483-1495, juill. 1968, doi: 10.1172/JCI105842.
- [132] S. M. Taylor, C. M. Parobek, et R. M. Fairhurst, « Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis », *Lancet Infect. Dis.*, vol. 12, n° 6, p. 457-468, juin 2012, doi : 10.1016/S1473-3099(12)70055-5.
- [133] N. Mohandas, M. R. Clark, M. S. Jacobs, et S. B. Shohet, « Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. », *J. Clin. Invest.*, vol. 66, n° 3, p. 563-573, sept. 1980, doi: 10.1172/JCI109888.
- [134] I. Safeukui *et al.*, « Surface Area Loss and Increased Sphericity Account for the Splenic Entrapment of Subpopulations of Plasmodium falciparum Ring-Infected Erythrocytes », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 3, mars 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0060150.
- [135] G. B. Nash, O. Linderkamp, C. Pfafferoth, et H. J. Meiselman, « Changes in Human Red Cell Mechanics During In Vivo Aging: Possible Influence on Removal of Senescent Cells », in *Blood Cells, Rheology, and Aging*, Berlin, Heidelberg, 1988, p. 99-112. doi: 10.1007/978-3-642-71790-1_10.
- [136] C. Renoux *et al.*, « Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition », *Sci. Rep.*, vol. 9, mai 2019, doi : 10.1038/s41598-019-43200-y.
- [137] I. Safeukui *et al.*, « Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen », *Blood*, vol. 120, n° 2, p. 424-430, juill. 2012, doi: 10.1182/blood-2012-01-404103.
- [138] N. Mohandas, L. Lie-Injo, M. Friedman, et J. Mak, « Rigid membranes of Malayan ovalocytes: a likely genetic barrier against malaria », *Blood*, vol. 63, n° 6, p. 1385-1392, juin 1984, doi : 10.1182/blood.V63.6.1385.1385.
- [139] G. R. Cokelet et H. J. Meiselman, « Rheological Comparison of Hemoglobin Solutions and Erythrocyte Suspensions », *Science*, vol. 162, n° 3850, p. 275-277, oct. 1968, doi : 10.1126/science.162.3850.275.

- [140] E. Evans, N. Mohandas, et A. Leung, « Static and dynamic rigidities of normal and sickle erythrocytes. Major influence of cell hemoglobin concentration. », *J. Clin. Invest.*, vol. 73, n° 2, p. 477-488, févr. 1984, doi: 10.1172/JCI111234.
- [141] M. A. Milanick et J. F. Hoffman, « Ion Transport and Volume Regulation in Red Blood Cells », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 488, n° 1, p. 174-186, 1986, doi: 10.1111/j.1749-6632.1986.tb54402.x.
- [142] C. Brugnara, « Erythrocyte membrane transport physiology », *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 4, n° 2, p. 122-127, mars 1997, doi: 10.1097/00062752-199704020-00008.
- [143] J. Delaunay, « The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations », *Semin. Hematol.*, vol. 41, n° 2, p. 165-172, avr. 2004, doi : 10.1053/j.seminhematol.2004.02.005.
- [144] R. Macdonald, « Red cell 2,3-diphosphoglycerate and oxygen affinity », *Anaesthesia*, vol. 32, n° 6, p. 544-553, juin 1977, doi: 10.1111/j.1365-2044.1977.tb10002.x.
- [145] C. Nickson, « Oxygen-Haemoglobin Dissociation Curve », *Life in the Fast Lane • LITFL*, 2 janvier 2019. <https://litfl.com/oxygen-haemoglobin-dissociation-curve/> (consulté le 20 mai 2022).
- [146] S. Sharma, P. Sharma, et L. N. Tyler, « Transfusion of Blood and Blood Products: Indications and Complications », *Am. Fam. Physician*, vol. 83, n° 6, p. 719-724, mars 2011.
- [147] A. C. Guyton, A. J. Cowley, D. B. Young, T. G. Coleman, J. E. Hall, et J. W. DeClue, « Integration and control of circulatory function », *Int. Rev. Physiol.*, vol. 9, p. 341-385, janv. 1976.
- [148] A. L. Chang, Y. Kim, A. P. Seitz, R. M. Schuster, A. B. Lentsch, et T. A. Pritts, « ERYTHROCYTE DERIVED MICROPARTICLES ACTIVATE PULMONARY ENDOTHELIAL CELLS IN A MURINE MODEL OF TRANSFUSION », *Shock Augusta Ga*, vol. 47, n° 5, p. 632-637, mai 2017, doi : 10.1097/SHK.0000000000000780.
- [149] F. G. Ebaugh, C. P. Emerson, J. F. Ross, R. Aloia, P. Halperin, et H. Richards, « THE USE OF RADIOACTIVE CHROMIUM 51 AS AN ERYTHROCYTE TAGGING AGENT FOR THE DETERMINATION OF RED CELL SURVIVAL IN VIVO 12 », *J. Clin. Invest.*, vol. 32, n° 12, p. 1260-1276, déc. 1953, doi: 10.1172/JCI102855.
- [150] M. Depond, B. Henry, P. Buffet, et P. A. Ndour, « Methods to Investigate the Deformability of RBC During Malaria », *Front. Physiol.*, vol. 10, p. 1613, 2019, doi : 10.3389/fphys.2019.01613.
- [151] B. Cooke, N. Mohandas, et R. Coppel, « The malaria-infected red blood cell: Structural and functional changes », in *Advances in Parasitology*, vol. 50, Elsevier, 2001, p. 1-86. doi: 10.1016/S0065-308X(01)50029-9.
- [152] R. Waugh, M. Narla, C. Jackson, T. Mueller, T. Suzuki, et G. Dale, « Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age », *Blood*, vol. 79, n° 5, p. 1351-1358, mars 1992, doi: 10.1182/blood.V79.5.1351.1351.
- [153] C. Léonard *et al.*, « Contribution of plasma membrane lipid domains to red blood cell (re) shaping », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 1-17, 2017.
- [154] A. Chabanel, M. Flamm, K. L. Sung, M. M. Lee, D. Schachter, et S. Chien, « Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity », *Biophys. J.*, vol. 44, n° 2, p. 171-176, nov. 1983, doi : 10.1016/S0006-3495(83)84288-X.
- [155] D. R. Janero, « Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 9, n° 6, p. 515-540, janv. 1990, doi: 10.1016/0891-5849(90)90131-2.
- [156] J. W. Harvey, « Chapter 7 - The Erythrocyte: Physiology, Metabolism, and Biochemical Disorders », in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Fifth Edition)*, J. J. Kaneko, J. W. Harvey, et M. L. Bruss, Éd. San Diego : Academic Press, 1997, p. 157-203. doi: 10.1016/B978-012396305-5/50008-7.
- [157] M. R. Clark, N. Mohandas, et S. B. Shohet, « Osmotic Gradient Ektacytometry: Comprehensive Characterization of Red Cell Volume and Surface Maintenance », *Blood*, vol. 61, n° 5, p. 899-910, mai 1983, doi : 10.1182/blood.V61.5.899.899.

- [158] L. Da Costa *et al.*, « Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer », *Blood Cells. Mol. Dis.*, vol. 56, n° 1, p. 9-22, janv. 2016, doi : 10.1016/j.bcmd.2015.09.001.
- [159] P. A. Marks et A. B. Johnson, « Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes », *J. Clin. Invest.*, vol. 37, n° 11, p. 1542-1548, nov. 1958, doi: 10.1172/JCI103746.
- [160] S. SAGAWA et K. SHIRAKI, « Role of lipids in stabilizing red cells in rats », *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, vol. 24, n° 1, p. 57-65, 1978.
- [161] C. Leonard *et al.*, « Contribution of plasma membrane lipid domains to red blood cell (re)shaping », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 1-17, juin 2017, doi : 10.1038/s41598-017-04388-z.
- [162] V. L. Tatum et C. K. Chow, « Antioxidant Status and Susceptibility of Sickle Erythrocytes to Oxidative and Osmotic Stress », *Free Radic. Res.*, vol. 25, n° 2, p. 133-139, janv. 1996, doi : 10.3109/10715769609149918.
- [163] V. Brousse, P. Buffet, et D. Rees, « The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen », *Br. J. Haematol.*, vol. 166, n° 2, p. 165-176, 2014, doi: 10.1111/bjh.12950.
- [164] E. Lang *et al.*, « Accelerated apoptotic death and in vivo turnover of erythrocytes in mice lacking functional mitogen- and stress-activated kinase MSK1/2 », *Sci. Rep.*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, nov. 2015, doi: 10.1038/srep17316.
- [165] C. R. Kiefer et L. M. Snyder, « Oxidation and erythrocyte senescence », *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 7, n° 2, p. 113-116, mars 2000.
- [166] C. Boulet, C. D. Doerig, et T. G. Carvalho, « Manipulating Eryptosis of Human Red Blood Cells: A Novel Antimalarial Strategy? », *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 8, 2018, doi : 10.3389/fcimb.2018.00419.
- [167] A. J. Schroit, Y. Tanaka, J. Madsen, et I. J. Fidler, « The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidylserine and possible implications of membrane phospholipid asymmetry », *Biol. Cell*, vol. 51, n° 2, p. 227-238, 1984, doi: 10.1111/j.1768-322X.1984.tb00303.x.
- [168] P.-A. Oldenburg, H. D. Gresham, et F. P. Lindberg, « Cd47-Signal Regulatory Protein α (Sirp α) Regulates Fc γ and Complement Receptor–Mediated Phagocytosis », *J. Exp. Med.*, vol. 193, n° 7, p. 855-862, avr. 2001.
- [169] M. H. Antonelou, A. G. Kriebardis, et I. S. Papassideri, « Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice », *Blood Transfus.*, vol. 8, n° Suppl 3, p. s39-s47, juin 2010, doi : 10.2450/2010.007S.
- [170] P. Burger, P. Hilarius-Stokman, D. de Korte, T. K. van den Berg, et R. van Bruggen, « CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis », *Blood*, vol. 119, n° 23, p. 5512-5521, juin 2012, doi : 10.1182/blood-2011-10-386805.
- [171] S. De Oliveira, V. V. de Almeida, A. Calado, H. S. Rosário, et C. Saldanha, « Integrin-associated protein (CD47) is a putative mediator for soluble fibrinogen interaction with human red blood cells membrane », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1818, n° 3, p. 481-490, mars 2012, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.10.028.
- [172] M. Wiewiora, J. Piecuch, L. Sedek, B. Mazur, et K. Sosada, « The effects of obesity on CD47 expression in erythrocytes », *Cytometry B Clin. Cytom.*, vol. 92, n° 6, p. 485-491, 2017, doi: 10.1002/cyto.b.21232.
- [173] M. Noris et G. Remuzzi, « Overview of Complement Activation and Regulation », *Semin. Nephrol.*, vol. 33, n° 6, p. 479-492, nov. 2013, doi : 10.1016/j.semnephrol.2013.08.001.
- [174] A. L. Henderson, M. A. Lindorfer, A. D. Kennedy, P. L. Foley, et R. P. Taylor, « Concerted clearance of immune complexes bound to the human erythrocyte complement receptor: development of a heterologous mouse model », *J. Immunol. Methods*, vol. 270, n° 2, p. 183-197, déc. 2002, doi: 10.1016/S0022-1759(02)00296-X.
- [175] A. Pantaleo *et al.*, « Irreversible AE1 Tyrosine Phosphorylation Leads to Membrane Vesiculation in G6PD Deficient Red Cells », *PLOS ONE*, vol. 6, n° 1, p. e15847, janv. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0015847.

- [176] M. M. Kay, G. J. Bosman, et C. Lawrence, « Functional topography of band 3: specific structural alteration linked to functional aberrations in human erythrocytes. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 85, n° 2, p. 492-496, janv. 1988, doi : 10.1073/pnas.85.2.492.
- [177] E. Ferru *et al.*, « Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3 », *Blood*, vol. 117, n° 22, p. 5998-6006, juin 2011, doi : 10.1182/blood-2010-11-317024.
- [178] H. U. Lutz, M. Nater, et P. Stammer, « Naturally occurring anti-band 3 antibodies have a unique affinity for C3. », *Immunology*, vol. 80, n° 2, p. 191-196, oct. 1993.
- [179] J. H. Jandl, M. S. Greenberg, R. H. Yonemoto, et W. B. Castle, « CLINICAL DETERMINATION OF THE SITES OF RED CELL SEQUESTRATION IN HEMOLYTIC ANEMIAS 1 », *J. Clin. Invest.*, vol. 35, n° 8, p. 842-867, août 1956, doi: 10.1172/JCI103338.
- [180] N. C. H. Jones, P. L. Mollison, M. A. Robinson, et A. S. Parkes, « Factors affecting the viability of erythrocytes stored in the frozen state », *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B - Biol. Sci.*, vol. 147, n° 929, p. 476-497, déc. 1957, doi : 10.1098/rspb.1957.0067.
- [181] A. Ferrant *et al.*, « Assessment of Bone Marrow and Splenic Erythropoiesis in Myelofibrosis », *Scand. J. Haematol.*, vol. 29, n° 5, p. 373-380, 1982, doi: 10.1111/j.1600-0609.1982.tb00611.x.
- [182] F. Marton, « Erythrophagocytosis in the Human Bone Marrow », *Scand. J. Haematol.*, vol. 7, n° 3, p. 177-183, 1970, doi: 10.1111/j.1600-0609.1970.tb01885.x.
- [183] I. Theurl *et al.*, « On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver », *Nat. Med.*, vol. 22, n° 8, Art. n° 8, août 2016, doi: 10.1038/nm.4146.
- [184] L. Tilley, M. W. A. Dixon, et K. Kirk, « The Plasmodium falciparum-infected red blood cell », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 43, n° 6, p. 839-842, juin 2011, doi : 10.1016/j.biocel.2011.03.012.
- [185] T. F. de Koning-Ward *et al.*, « A novel protein export machine in malaria parasites », *Nature*, vol. 459, n° 7249, p. 945-949, juin 2009, doi : 10.1038/nature08104.
- [186] W. Trager, M. A. Rudzinska, et P. C. Bradbury, « The fine structure of Plasmodium falciparum and its host erythrocytes in natural malarial infections in man », *Bull. World Health Organ.*, vol. 35, n° 6, p. 883-885, 1966.
- [187] J. A. Rowe, A. Claessens, R. A. Corrigan, et M. Arman, « Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications », *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 11, mai 2009, doi : 10.1017/S1462399409001082.
- [188] F. K. Glenister, R. L. Coppel, A. F. Cowman, N. Mohandas, et B. M. Cooke, « Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells », *Blood*, vol. 99, n° 3, p. 1060-1063, févr. 2002, doi : 10.1182/blood.V99.3.1060.
- [189] C. Lavazec, « Molecular mechanisms of deformability of Plasmodium-infected erythrocytes », *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 40, p. 138-144, déc. 2017, doi : 10.1016/j.mib.2017.11.011.
- [190] A. Paul, G. Ramdani, U. Tatu, G. Langsley, et V. Natarajan, « Studying the rigidity of red blood cells induced by Plasmodium falciparum infection », *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 1, Art. n° 1, avr. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-42721-w.
- [191] W. Ruangjirachuporn, R. Udomsangpetch, J. Carlsson, D. Drenckhahn, P. Perlmann, et K. Berzins, « Plasmodium falciparum: Analysis of the interaction of antigen Pf155/RESA with the erythrocyte membrane », *Exp. Parasitol.*, vol. 73, n° 1, p. 62-72, juill. 1991, doi: 10.1016/0014-4894(91)90008-K.
- [192] F. K. Glenister *et al.*, « Functional alteration of red blood cells by a megadalton protein of Plasmodium falciparum », *Blood*, vol. 113, n° 4, p. 919-928, janv. 2009, doi : 10.1182/blood-2008-05-157735.
- [193] R. E. Martin et K. Kirk, « Transport of the essential nutrient isoleucine in human erythrocytes infected with the malaria parasite Plasmodium falciparum », *Blood*, vol. 109, n° 5, p. 2217-2224, oct. 2006, doi : 10.1182/blood-2005-11-026963.
- [194] R. R. Overman, « Reversible cellular permeability alterations in disease. in vivo studies on sodium, potassium and chloride concentrations in erythrocytes of the malarious monkey », *Am. J. Physiol.-Leg. Content*, vol. 152, n° 1, p. 113-121, déc. 1947, doi : 10.1152/ajplegacy.1947.152.1.113.

- [195] C. A. Homewood et K. D. Neame, « Malaria and the permeability of the host erythrocyte », *Nature*, vol. 252, n° 5485, Art. n° 5485, déc. 1974, doi : 10.1038/252718a0.
- [196] H. Ginsburg, M. Krugliak, O. Eidelman, et Z. Ioav Cabantchik, « New permeability pathways induced in membranes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes », *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 8, n° 2, p. 177-190, juin 1983, doi : 10.1016/0166-6851(83)90008-7.
- [197] H. M. Staines, C. Rae, et K. Kirk, « Increased permeability of the malaria-infected erythrocyte to organic cations », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1463, n° 1, p. 88-98, janv. 2000, doi: 10.1016/S0005-2736(99)00187-X.
- [198] S. Egée *et al.*, « A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite plasmodium falciparum », *J. Physiol.*, vol. 542, n° 3, p. 795-801, 2002, doi : 10.1113/jphysiol.2002.022970.
- [199] K. Kirk, H. A. Horner, B. C. Elford, J. C. Ellory, et C. I. Newbold, « Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. », *J. Biol. Chem.*, vol. 269, n° 5, p. 3339-3347, févr. 1994, doi : 10.1016/S0021-9258(17)41868-0.
- [200] H. M. Staines, J. C. Ellory, et K. Kirk, « Perturbation of the pump-leak balance for Na⁺ and K⁺ in malaria-infected erythrocytes », *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 280, n° 6, p. C1576-C1587, juin 2001, doi: 10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1576.
- [201] M. Krugliak et H. Ginsburg, « The evolution of the new permeability pathways in Plasmodium falciparum—infected erythrocytes—a kinetic analysis », *Exp. Parasitol.*, vol. 114, n° 4, p. 253-258, déc. 2006, doi : 10.1016/j.exppara.2006.03.015.
- [202] E. S. Sherling, E. Knuepfer, J. A. Brzostowski, L. H. Miller, M. J. Blackman, et C. van Ooij, « The Plasmodium falciparum rhoptry protein RhopH3 plays essential roles in host cell invasion and nutrient uptake », *eLife*, vol. 6, p. e23239, mars 2017, doi : 10.7554/eLife.23239.
- [203] C.-M. Ho *et al.*, « Native structure of the RhopH complex, a key determinant of malaria parasite nutrient acquisition », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 118, n° 35, p. e2100514118, août 2021, doi : 10.1073/pnas.2100514118.
- [204] N. A. Counihan, J. K. Modak, et T. F. de Koning-Ward, « How Malaria Parasites Acquire Nutrients From Their Host », *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, 2021, Consulté le : 21 mai 2022. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.649184>
- [205] N. A. Counihan *et al.*, « Plasmodium falciparum parasites deploy RhopH2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate », *eLife*, vol. 6, p. e23217, mars 2017, doi : 10.7554/eLife.23217.
- [206] S. Biryukov et J. A. Stoute, « Complement activation in malaria: friend or foe? », *Trends Mol. Med.*, vol. 20, n° 5, p. 293-301, mai 2014, doi: 10.1016/j.molmed.2014.01.001.
- [207] M. L. Craig, J. N. Waitumbi, et R. P. Taylor, « Processing of C3b-Opsonized Immune Complexes Bound to Non-Complement Receptor 1 (CR1) Sites on Red Cells: Phagocytosis, Transfer, and Associations with CR1 », *J. Immunol.*, vol. 174, n° 5, p. 3059-3066, mars 2005, doi : 10.4049/jimmunol.174.5.3059.
- [208] P. Dasari *et al.*, « Digestive vacuole of Plasmodium falciparum released during erythrocyte rupture dually activates complement and coagulation », *Blood*, vol. 119, n° 18, p. 4301-4310, mai 2012, doi : 10.1182/blood-2011-11-392134.
- [209] B. Shakya, S. D. Patel, Y. Tani, et E. S. Egan, « Erythrocyte CD55 mediates the internalization of Plasmodium falciparum parasites », *eLife*, vol. 10, p. e61516, mai 2021, doi : 10.7554/eLife.61516.
- [210] F. Tokumasu, E. H. Hayakawa, J. Fukumoto, S. M. Tokuoka, et S. Miyazaki, « Creative interior design by Plasmodium falciparum: Lipid metabolism and the parasite's secret chamber », *Parasitol. Int.*, vol. 83, p. 102369, août 2021, doi : 10.1016/j.parint.2021.102369.
- [211] S. Frankland *et al.*, « Delivery of the Malaria Virulence Protein PfEMP1 to the Erythrocyte Surface Requires Cholesterol-Rich Domains », *Eukaryot. Cell*, vol. 5, n° 5, p. 849-860, mai 2006, doi: 10.1128/EC.5.5.849-860.2006.

- [212] I. W. Sherman, « Biochemistry of Plasmodium (malarial parasites) », *MICROBIOL REV*, vol. 43, p. 43, 1979.
- [213] E. H. Hayakawa, K. Yamaguchi, M. Mori, et G. Nardone, « Real-time cholesterol sorting in Plasmodium falciparum-erythrocytes as revealed by 3D label-free imaging », *Sci. Rep.*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, févr. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-59552-9.
- [214] P. N. Tran, S. H. J. Brown, M. Rug, M. C. Ridgway, T. W. Mitchell, et A. G. Maier, « Changes in lipid composition during sexual development of the malaria parasite Plasmodium falciparum », *Malar. J.*, vol. 15, févr. 2016, doi : 10.1186/s12936-016-1130-z.
- [215] P. A. Maguire et I. W. Sherman, « Phospholipid composition, cholesterol content and cholesterol exchange in Plasmodium falciparum-infected red cells », *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 38, n° 1, p. 105-112, janv. 1990, doi : 10.1016/0166-6851(90)90210-D.
- [216] E. H. Hayakawa, H. Kato, G. A. Nardone, et J. Usukura, « A prospective mechanism and source of cholesterol uptake by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes co-cultured with HepG2 cells », *Parasitol. Int.*, vol. 80, p. 102179, févr. 2021, doi : 10.1016/j.parint.2020.102179.
- [217] L. L. Hsiao, R. J. Howard, M. Aikawa, et T. F. Taraschi, « Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite Plasmodium falciparum », *Biochem. J.*, vol. 274, n° 1, p. 121-132, févr. 1991, doi : 10.1042/bj2740121.
- [218] S. Besteiro, S. V. Duy, C. Perigaud, I. Lefebvre-Tournier, et H. J. Vial, « Exploring metabolomic approaches to analyse phospholipid biosynthetic pathways in Plasmodium », *Parasitology*, vol. 137, n° 9, p. 1343-1356, août 2010, doi : 10.1017/S0031182009991934.
- [219] M. Fraser *et al.*, « Breakdown in membrane asymmetry regulation leads to monocyte recognition of P. falciparum-infected red blood cells », *PLoS Pathog.*, vol. 17, n° 2, p. e1009259, févr. 2021, doi : 10.1371/journal.ppat.1009259.
- [220] K. Haldar, L. Uyetake, N. Ghori, H. G. Elmendorf, et W.-L. Li, « The accumulation and metabolism of a fluorescent ceramide derivative in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes », *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 49, n° 1, p. 143-156, nov. 1991, doi : 10.1016/0166-6851(91)90137-U.
- [221] S. Gulati *et al.*, « Profiling the Essential Nature of Lipid Metabolism in Asexual Blood and Gametocyte Stages of Plasmodium falciparum », *Cell Host Microbe*, vol. 18, n° 3, p. 371-381, sept. 2015, doi: 10.1016/j.chom.2015.08.003.
- [222] S. A. Lauer, N. Ghori, et K. Haldar, « Sphingolipid synthesis as a target for chemotherapy against malaria parasites. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, n° 20, p. 9181-9185, sept. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.20.9181.
- [223] S. Lauer, « Uptake and hydrolysis of sphingomyelin analogues in Plasmodium falciparum-infected red cells », *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 115, n° 2, p. 275-281, juill. 2001, doi: 10.1016/S0166-6851(01)00281-X.
- [224] P. A. Ndour, I. Safeukui, S. Diakité, J. Duez, S. Jauréguiberry, et P. Buffet, « Role of the Spleen in Human Malaria », in *Encyclopedia of Malaria*, Springer, New York, NY, 2015, p. 1-24. doi : 10.1007/978-1-4614-8757-9_89-1.
- [225] C. Roussel, S. Dokmak, T. J. Molina, et P. Buffet, « Spleen », in *Hematopathology*, T. J. Molina, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2020, p. 461-474. doi: 10.1007/978-3-319-95309-0_3826.
- [226] W. H. Crosby, « Normal functions of the spleen relative to red blood cells: a review », *Blood*, vol. 14, n° 4, p. 399-408, avr. 1959.
- [227] V. Bronte et M. J. Pittet, « The spleen in local and systemic regulation of immunity », *Immunity*, vol. 39, n° 5, p. 806-818, nov. 2013, doi : 10.1016/j.immuni.2013.10.010.
- [228] B. Henry, C. Roussel, M. Carucci, V. Brousse, P. A. Ndour, et P. Buffet, « The Human Spleen in Malaria: Filter or Shelter? », *Trends Parasitol.*, vol. 36, n° 5, p. 435-446, mai 2020, doi : 10.1016/j.pt.2020.03.001.
- [229] S. Kotlyar, J. Nteziyaremye, P. Olupot-Olupot, S. O. Akech, C. L. Moore, et K. Maitland, « Spleen volume and clinical disease manifestations of severe Plasmodium falciparum malaria in

- African children », *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 108, n° 5, p. 283-289, mai 2014, doi : 10.1093/trstmh/tru040.
- [230] A. C. Groom, E. E. Schmidt, et I. C. MacDonald, « Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy », *Scanning Microsc.*, vol. 5, n° 1, p. 159-73; discussion 173-4, mars 1991.
- [231] S. Kho *et al.*, « Evaluation of splenic accumulation and colocalization of immature reticulocytes and *Plasmodium vivax* in asymptomatic malaria: A prospective human splenectomy study », *PLOS Med.*, vol. 18, n° 5, p. e1003632, mai 2021, doi: 10.1371/journal.pmed.1003632.
- [232] R. Joice *et al.*, « Evidence for spleen dysfunction in malaria-HIV co-infection in a subset of pediatric patients », *Mod. Pathol.*, vol. 29, n° 4, Art. n° 4, avr. 2016, doi: 10.1038/modpathol.2016.27.
- [233] P. Imbert, C. Rapp, et P. A. Buffet, « Pathological rupture of the spleen in malaria: Analysis of 55 cases (1958–2008) », *Travel Med. Infect. Dis.*, vol. 7, n° 3, p. 147-159, mai 2009, doi : 10.1016/j.tmaid.2009.01.002.
- [234] S. Kho *et al.*, « High Risk of *Plasmodium vivax* Malaria Following Splenectomy in Papua, Indonesia », *Clin. Infect. Dis.*, vol. 68, n° 1, p. 51-60, janv. 2019, doi: 10.1093/cid/ciy403.
- [235] B. T. Crookston *et al.*, « Exploring the relationship between chronic undernutrition and asymptomatic malaria in Ghanaian children », *Malar. J.*, vol. 9, n° 1, p. 39, févr. 2010, doi : 10.1186/1475-2875-9-39.
- [236] F. Bidegain *et al.*, « Acute *Plasmodium falciparum* Malaria Following Splenectomy for Suspected Lymphoma in 2 Patients », *Clin. Infect. Dis.*, vol. 40, n° 11, p. e97-e100, juin 2005, doi : 10.1086/430061.
- [237] A. M. Dondorp, M. Nyanoti, P. A. Kager, S. Mithwani, J. Vreeken, et K. Marsh, « The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe *falciparum* malaria and its restoration by blood transfusion », *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 96, n° 3, p. 282-286, juin 2002, doi : 10.1016/S0035-9203(02)90100-8.
- [238] H. A. Cranston *et al.*, « *Plasmodium falciparum* Maturation Abolishes Physiologic Red Cell Deformability », *Science*, vol. 223, n° 4634, p. 400-403, janv. 1984, doi: 10.1126/science.6362007.
- [239] G. Deplaine *et al.*, « The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro », *Blood*, vol. 117, n° 8, p. e88-e95, févr. 2011, doi : 10.1182/blood-2010-10-312801.
- [240] S. Sarkar, D. Bose, R. P. Giri, M. K. Mukhopadhyay, et A. Chakrabarti, « Status of Membrane Asymmetry in Erythrocytes: Role of Spectrin », in *Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules*, K. Chattopadhyay et S. C. Basu, Éd. Singapore: Springer, 2018, p. 3-11. doi: 10.1007/978-981-13-3065-0_1.
- [241] Organisation mondiale de la santé, *Guidelines for the treatment of malaria*. 2015. Consulté le : 3 mars 2021. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>
- [242] C. Roussel, E. Caumes, M. Thellier, P. A. Ndour, P. A. Buffet, et S. Jauréguiberry, « Artesunate to treat severe malaria in travellers: review of efficacy and safety and practical implications », *J. Travel Med.*, vol. 24, n° 2, mars 2017, doi: 10.1093/jtm/taw093.
- [243] P. A. Ndour *et al.*, « *Plasmodium falciparum* clearance is rapid and pitting independent in immune Malian children treated with artesunate for malaria », *J. Infect. Dis.*, vol. 211, n° 2, p. 290-297, janv. 2015, doi: 10.1093/infdis/jiu427.
- [244] K. Scheu *et al.*, « Determinants of post-malarial anemia in African children treated with parenteral artesunate », *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 1, Art. n° 1, déc. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-54639-4.
- [245] L. Raffray, M.-C. Receveur, M. Beguet, P. Lauroua, T. Pistone, et D. Malvy, « Severe delayed autoimmune haemolytic anaemia following artesunate administration in severe malaria: a case report », *Malar. J.*, vol. 13, n° 1, p. 398, oct. 2014, doi : 10.1186/1475-2875-13-398.

- [246] C. Burri *et al.*, « Delayed Anemia after Treatment with Injectable Artesunate in the Democratic Republic of the Congo: A Manageable Issue », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 91, n° 4, p. 821-823, oct. 2014, doi : 10.4269/ajtmh.14-0149.
- [247] C. Fanello *et al.*, « Post-treatment haemolysis in African children with hyperparasitaemic falciparum malaria; a randomized comparison of artesunate and quinine », *BMC Infect. Dis.*, vol. 17, n° 1, p. 575, août 2017, doi : 10.1186/s12879-017-2678-0.
- [248] M. T. Hawkes *et al.*, « Anemia and transfusion requirements among Ugandan children with severe malaria treated with intravenous artesunate », *Pediatr. Hematol. Oncol.*, vol. 37, n° 2, p. 140-152, févr. 2020, doi : 10.1080/08880018.2019.1701161.
- [249] WORLD HEALTH ORGANIZATION, *WORLD MALARIA REPORT 2019*. S.I. : WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019.
- [250] S. Jauréguiberry *et al.*, « Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins », *Blood*, vol. 124, n° 2, p. 167-175, juill. 2014, doi: 10.1182/blood-2014-02-555953.
- [251] C. Roussel, E. Caumes, M. Thellier, P. A. Ndour, P. A. Buffet, et S. Jauréguiberry, « Artesunate to treat severe malaria in travellers: review of efficacy and safety and practical implications », *J. Travel Med.*, vol. 24, n° 2, mars 2017, doi: 10.1093/jtm/taw093.
- [252] T. Rolling *et al.*, « Delayed Hemolysis After Treatment With Parenteral Artesunate in African Children With Severe Malaria—A Double-center Prospective Study », *J. Infect. Dis.*, vol. 209, n° 12, p. 1921-1928, juin 2014, doi : 10.1093/infdis/jit841.
- [253] C. Burri *et al.*, « Delayed Anemia After Treatment with Injectable Artesunate in the Democratic Republic of the Congo: A Manageable Issue », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 91, n° 4, p. 821-823, oct. 2014, doi : 10.4269/ajtmh.14-0149.
- [254] P. A. Ndour *et al.*, « Measuring the *Plasmodium falciparum* HRP2 protein in blood from artesunate-treated malaria patients predicts post-artesunate delayed hemolysis », *Sci. Transl. Med.*, vol. 9, n° 397, p. eaaf9377, juill. 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aaf9377.
- [255] P. G. Kremsner *et al.*, « Intramuscular Artesunate for Severe Malaria in African Children: A Multicenter Randomized Controlled Trial », *PLOS Med.*, vol. 13, n° 1, p. e1001938, janv. 2016, doi: 10.1371/journal.pmed.1001938.
- [256] C. Roussel *et al.*, « Intravenous Artesunate for the Treatment of Severe Imported Malaria: Implementation, Efficacy, and Safety in 1391 Patients », *Clin. Infect. Dis.*, p. ciab133, févr. 2021, doi : 10.1093/cid/ciab133.
- [257] M. Wojnarski *et al.*, « Plasmodium falciparum Clearance Is Pitting-Dependent With Artemisinin-Based Drugs but Pitting-Independent With Atovaquone-Proguanil or Mefloquine », *J. Infect. Dis.*, vol. 220, n° 3, p. 535-539, juill. 2019, doi : 10.1093/infdis/jiz115.
- [258] I. Chuang et T. L. Richie, « World Malaria Report 2010: documenting progress towards malaria eradication », *Expert Rev. Vaccines*, vol. 11, n° 1, p. 39-41, janv. 2012, doi : 10.1586/erv.11.165.
- [259] R. Udomsangpetch *et al.*, « Antimalarial drugs reduce cytoadherence and rosetting Plasmodium falciparum », *J. Infect. Dis.*, vol. 173, n° 3, p. 691-698, mars 1996, doi: 10.1093/infdis/173.3.691.
- [260] J. R. Wiśniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, et M. Mann, « Universal sample preparation method for proteome analysis », *Nat. Methods*, vol. 6, n° 5, Art. n° 5, mai 2009, doi: 10.1038/nmeth.1322.
- [261] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Luber, I. Paron, N. Nagaraj, et M. Mann, « Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ * », *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 13, n° 9, p. 2513-2526, sept. 2014, doi: 10.1074/mcp.M113.031591.
- [262] S. Tyanova *et al.*, « The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data », *Nat. Methods*, vol. 13, n° 9, Art. n° 9, sept. 2016, doi: 10.1038/nmeth.3901.
- [263] M. J. Boyle *et al.*, « IgM in human immunity to Plasmodium falciparum malaria », *Sci. Adv.*, vol. 5, n° 9, sept. 2019, doi: 10.1126/sciadv.aax4489.

- [264] C. Fernandez-Arias *et al.*, « Anti-self phosphatidylserine antibodies recognize uninfected erythrocytes promoting malarial anemia », *Cell Host Microbe*, vol. 19, n° 2, p. 194-203, févr. 2016, doi: 10.1016/j.chom.2016.01.009.
- [265] D. Camprubí *et al.*, « Positive direct antiglobulin test in post-artesunate delayed haemolysis: more than a coincidence? », *Malar. J.*, vol. 18, p. 123, avr. 2019, doi : 10.1186/s12936-019-2762-6.
- [266] D. A. Oyong *et al.*, « Loss of complement regulatory proteins on red blood cells in mild malarial anaemia and in Plasmodium falciparum induced blood-stage infection », *Malar. J.*, vol. 18, sept. 2019, doi : 10.1186/s12936-019-2962-0.
- [267] A. B. T *et al.*, « Systematic analysis of direct antiglobulin test results in post-artesunate delayed haemolysis », *Malar. J.*, vol. 20, n° 1, avr. 2021, doi: 10.1186/s12936-021-03735-w.
- [268] C. Roussel *et al.*, « Spherocytic shift of red blood cells during storage provides a quantitative whole cell-based marker of the storage lesion », *Transfusion (Paris)*, vol. 57, n° 4, p. 1007-1018, avr. 2017, doi : 10.1111/trf.14015.
- [269] M. F. L. Denis, H. A. Alvarez, N. Lauri, C. L. Alvarez, O. Chara, et P. J. Schwarzbaum, « Dynamic Regulation of Cell Volume and Extracellular ATP of Human Erythrocytes », *PLOS ONE*, vol. 11, n° 6, p. e0158305, juin 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158305.
- [270] G. Bouyer *et al.*, « Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by Plasmodium falciparum », *Blood*, vol. 118, n° 8, p. 2305-2312, août 2011, doi : 10.1182/blood-2011-01-329300.
- [271] I. Ansoorge, K. Paprotka, S. Bhakdi, et K. Lingelbach, « Permeabilization of the erythrocyte membrane with streptolysin O allows access to the vacuolar membrane of Plasmodium falciparum and a molecular analysis of membrane topology », *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 84, n° 2, p. 259-261, févr. 1997, doi : 10.1016/S0166-6851(96)02806-X.
- [272] K. E. Jackson *et al.*, « Selective permeabilization of the host cell membrane of Plasmodium falciparum-infected red blood cells with streptolysin O and equinatoxin II », *Biochem. J.*, vol. 403, n° 1, p. 167-175, mars 2007, doi: 10.1042/BJ20061725.
- [273] M. Nakao, T. Nakao, S. Yamazoe, et H. Yoshikawa, « Adenosine Triphosphate and Shape of Erythrocytes », *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 49, n° 6, p. 487-492, juin 1961.
- [274] M. Marin *et al.*, « Metabolic rejuvenation upgrades circulatory functions of red blood cells stored under blood bank conditions », *Transfusion (Paris)*, vol. 61, n° 3, p. 903-918, mars 2021, doi: 10.1111/trf.16245.
- [275] J. N. Jarvis, C. E. M. Coltart, M. Pule, P. L. Chiodini, et T. Doherty, « Artemisinin therapy and severe delayed haemolysis », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 382, n° 9887, p. 180, juill. 2013, doi: 10.1016/S0140-6736(13)60812-0.
- [276] C. Aguttu, B. A. Okech, A. Mukisa, et G. W. Lubega, « Screening and characterization of hypothetical proteins of Plasmodium falciparum as novel vaccine candidates in the fight against malaria using reverse vaccinology », *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 19, n° 1, p. 103, juill. 2021, doi: 10.1186/s43141-021-00199-y.
- [277] J. G. Beeson, D. R. Drew, M. J. Boyle, G. Feng, F. J. I. Fowkes, et J. S. Richards, « Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 40, n° 3, p. 343-372, mai 2016, doi : 10.1093/femsre/fuw001.
- [278] X. Zhao *et al.*, « PfrON3 is an erythrocyte-binding protein and a potential blood-stage vaccine candidate antigen », *Malar. J.*, vol. 13, n° 1, p. 490, déc. 2014, doi : 10.1186/1475-2875-13-490.
- [279] L. Gustafsson, S. James, Y. Zhang, et K. P. Thozhuthumpambal, « Fatal case of delayed-onset haemolytic anaemia after oral artemether-lumefantrine », *BMJ Case Rep.*, vol. 14, n° 11, p. e245718, nov. 2021, doi : 10.1136/bcr-2021-245718.
- [280] D. Osborn, K. Lui, P. Pussell, A. Jana, A. Desai, et M. Cole, « T and Tk antigen activation in necrotising enterocolitis: manifestations, severity of illness, and effectiveness of testing », *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, vol. 80, n° 3, p. F192-F197, mai 1999.
- [281] C. Yamada et R. D. Davenport, « A case of extravascular hemolysis with Tk-activation », *Clin. Case Rep.*, vol. 2, n° 4, p. 137-142, août 2014, doi : 10.1002/ccr3.80.

- [282] M. L. Beck, « Red blood cell polyagglutination: Clinical aspects », *Semin. Hematol.*, vol. 37, n° 2, p. 186-196, avr. 2000, doi : 10.1016/S0037-1963(00)90043-X.
- [283] H. B. Bakhshi, T. Gordi, et M. Ashton, « In-vitro Interaction of Artemisinin with Intact Human Erythrocytes, Erythrocyte Ghosts, Haemoglobin and Carbonic Anhydrase », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 49, n° 2, p. 223-226, 1997, doi: 10.1111/j.2042-7158.1997.tb06784.x.
- [284] N. Sibmooch *et al.*, « Increased fluidity and oxidation of malarial lipoproteins: Relation with severity and induction of endothelial expression of adhesion molecules », *Lipids Health Dis.*, vol. 3, p. 15, juill. 2004, doi: 10.1186/1476-511X-3-15.
- [285] P. A. Berman et P. A. Adams, « Artemisinin Enhances Heme-Catalysed Oxidation of Lipid Membranes », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 22, n° 7, p. 1283-1288, janv. 1997, doi: 10.1016/S0891-5849(96)00508-4.
- [286] M. Föllner et F. Lang, « Ion Transport in Eryptosis, the Suicidal Death of Erythrocytes », *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, p. 597, juill. 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00597.
- [287] F. Lang, K. S. Lang, P. A. Lang, S. M. Huber, et T. Wieder, « Mechanisms and significance of eryptosis », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 8, n° 7-8, p. 1183-1192, août 2006, doi : 10.1089/ars.2006.8.1183.