



HAL
open science

Etude de l'hémozoïne des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* et impact de la ganaplacide

Roukayatou Omorou

► **To cite this version:**

Roukayatou Omorou. Etude de l'hémozoïne des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* et impact de la ganaplacide. Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10249 . tel-04708966

HAL Id: tel-04708966

<https://theses.hal.science/tel-04708966v1>

Submitted on 25 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.

**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° 205
interdisciplinaire sciences santé**

Discipline : Parasitologie

Soutenue publiquement le 30/11/2023, par :
Roukayatou OMOROU

**Étude de l'hémozoïne des gamétocytes
de *Plasmodium falciparum* et impact de
la ganaplacide**

Devant le jury composé de :

ARIEY Frédéric, Professeur, HDR, Université Paris V, France
BERRY Antoine, Professeur, HDR, Université de Toulouse III, France
LOISEAU Philippe, Professeur, HDR, Université Paris Paris-Saclay, France
BENOIT-VICAL Françoise, Docteure, HDR, Université de Toulouse, France
MIELE Adriana, Professeure, HDR, UCBL, France

Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Présidente

PICOT Stéphane, Professeur, HDR, UCBL, France

Directeur de thèse

Université Claude Bernard – Lyon1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Président de la Commission Recherche	M. Hamda BEN HADID
Vice-présidente de la Commission de la formation et de la vie universitaire	Mme. Céline BROCHIER
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

Composantes secteur Sciences et Technologie

UFR Biosciences	Directrice : Kathrin GIESELER
UFR Faculté des sciences	Directeur : Bruno ANDRUIOLETTI
UFR des Sciences et Techniques et Sportives (STAPS)	Directeur : Guillaume BODET
Département Génie Électrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Rosaria FERRIGNO
Département informatique	Directrice : Saida BOUAKAZ BRONDEL
Département Mécanique	Directeur : Marc BUFFFAT
Institut Universitaire de Technologie Lyon1 (IUT)	Directeur : Michel MASSENZIO
Institut de Science Financière et Assurances (ISFA)	Directeur : Nicolas LEBOISNE
Institut National Supérieure du Professorat et de l'Éducation (INSPé)	Directeur : Pierre CHAREYRON
Polytech Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
Observatoire de Lyon	Directeur : Bruno LEBOISNE

Composantes Santé

Faculté de Médecine Lyon Est	Directeur : Giles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud-Charles Mérieux	Directeur : Philippe PAPAREL
Faculté d'Odontologie	Directeur : Jean-Christophe MAURIN
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB)	Directeur : Claude DUSSART
Institut des Sciences et Technique de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Jacques LUAUTE



Deuxième réunion annuelle des investigateurs de WANEAM-2 (15 et 16 mars 2022 à Lambaréné, Gabon)

« La science ne connaît pas de pays, parce que la connaissance appartient à l'humanité, et qu'elle est le flambeau qui éclaire le monde » - Louis Pasteur (1822-1895)

À mon cher frère,

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire Malaria Research Unit de l'équipe SMITH (SMITH-MRU) qui fait partie de l'unité mixte de recherche 5246 , Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) sous tutelle de l'Université Lyon1 / CNRS / CPE –Lyon / INSA Lyon.



ICBMS
LYON



INSA | INSTITUT NATIONAL
DES SCIENCES
APPLIQUÉES
LYON



Université Claude Bernard Lyon 1
Bâtiment Raulin
2, rue Victor Grignard 69100
Villeurbanne

Cette thèse a été possible grâce au projet West African Network for Clinical Trials of Antimalarial drugs (WANECAM 2) financé par [European & Developing Countries Clinical Trials Partnership](#) (EDCTP).



This project is part of the EDCTP2 programme supported by the European Union



EDCTP

Publications scientifiques

- Omorou, R., Bin Sa'id, I., Delves, M., Severini, C., Kouakou, Y. I., Bienvenu, A.-L., & Picot, S. (2022). Protocols for *Plasmodium* gametocyte production *in vitro*: An integrative review and analysis. *Parasites & Vectors*, 15(1), 451. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05566-3>
- Kouakou, Y. I., Omorou, R., Said, I. B., Lavoignat, A., Bonnot, G., Bienvenu, A.-L., & Picot, S. (2022). Assessment of quantitative and semi-quantitative biological test methods of artesunate *in vitro*. *Parasite (Paris, France)*, 29, 18. <https://doi.org/10.1051/parasite/2022019>
- Bin Said, I., Kouakou, Y. I., Omorou, R., Bienvenu, A.-L., Ahmed, K., Culleton, R., & Picot, S. (2022). Systematic review of *Plasmodium knowlesi* in Indonesia: A risk of emergence in the context of capital relocation to Borneo? *Parasites & Vectors*, 15(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05375-8>
- Kouakou, Y. I., Millet, A., Fromentin, E., Hauchard, N., Farias, G., Fieux, M., Coudert, A., Omorou, R., Bin Sa'id, I., Lavoignat, A., Bonnot, G., Bienvenu, A.-L., & Picot, S. (2022). Pre-referral intranasal artesunate powder for cerebral malaria: A proof-of-concept study. *Malaria Journal*, 21(1), 291. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04309-0>

Article soumis pour publication

Roukayatou Omorou*, Blanche Delabie, Adeline Lavoignat, Victorien Chaker, Guillaume Bonnot, Karim Traore, Anne-Lise Bienvenu, Stephane Picot. Nanoparticle-tracking analysis of natural hemozoin from *Plasmodium* parasites. *Acta tropica*

Article en cours de modification pour une resoumission.

Roukayatou Omorou*, Blanche Delabie, Adeline Lavoignat, Victorien Chaker, Guillaume Bonnot, Christelle Fabrer-Boulé, Lucie Geay, Anne-Lise Bienvenu, & Stephane Picot. Impact of KAF156/ganaplacide on *Plasmodium falciparum* gamétocytes *in vitro*

Communications orales

JEDISS : 26^{ième} journée scientifique de l'EDISS (18 novembre 2021_ Lyon-France)

Roukayatou Omorou, Anne-lise Bienvenu, Yobouet Inès Kouakou, Adeline Lavoignat, Guillaume Bonnot, Ibrahim Bin said, Stephane Picot. Effective *in vitro* gametocytes production and cryopreservation conditions of *Plasmodium falciparum* toward the discovery of malaria transmission-blocking drugs

SOAP : congrès de la Société Africaine de Parasitologie (1, 2 et 3 décembre 2021_ en ligne)

Roukayatou Omorou, Anne-lise Bienvenu, Yobouet Inès Kouakou, Adeline Lavoignat, Guillaume Bonnot, Ibrahim Bin said, & Stephane Picot. Effective *in vitro* gametocytes production and cryopreservation conditions of *Plasmodium falciparum* toward the discovery of malaria transmission-blocking drugs

Deuxième réunion annuelle des investigateurs de WANECAM-2 (15 et 16 mars 2022_ Lambaréné-Gabon)

Roukayatou Omorou, Anne-lise Bienvenu, Yobouet Inès Kouakou, Adeline Lavoignat, Guillaume Bonnot, Ibrahim Bin said, & Stephane Picot. KAF156/LUM-SDF effect on *Pf* gametocytes: *in vitro* and *ex vivo* evaluation

Communications affichées

ECTMIH : European Congress on Tropical Medicine and International Health (28 septembre - 1er octobre 2021_en ligne)

Roukayatou Omorou, Anne-lise Bienvenu, Yobouet Inès Kouakou, Adeline Lavoignat, Guillaume Bonnot, Ibrahim Bin said, & Stephane Picot. Effective *in vitro* gametocytes production and cryopreservation conditions of *Plasmodium falciparum* toward the discovery of malaria transmission blocking drugs.

SFPSFMM : congrès annuel conjoint des Sociétés Françaises de Mycologie Médicale et de Parasitologie (Lyon, 28 and 29 october 2021)

Roukayatou Omorou, Anne-lise Bienvenu, Yobouet Inès Kouakou, Adeline Lavoignat, Guillaume Bonnot, Ibrahim Bin said, & Stephane Picot. Effective *in vitro* gametocytes production and cryopreservation conditions of *Plasmodium falciparum* toward the discovery of malaria transmission blocking drugs.

Journée scientifique de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) (18 juillet 2023_ Lyon-France)

Roukayatou Omorou, Blanche Delabie, Adeline Lavoignat, Victorien Chaker, Guillaume Bonnot, Christelle Fabrer-Boulé, Lucie Geay, Anne-lise Bienvenu, & Stephane Picot. Impact of KAF156/ganaplacide on *Plasmodium falciparum* gamétocytes *in vitro*.

RÉSUMÉ

Le paludisme, un problème de santé publique persistant malgré les efforts de lutte, continue de faire des centaines de milliers de morts par an. Face à la résistance croissante des parasites aux antipaludiques, il est crucial de développer de nouvelles interventions afin de contrôler la pathologie et prévenir sa transmission. Les gamétocytes sont les principaux responsables de la transmission du paludisme de l'homme vers le moustique, mettant en évidence la nécessité de cibler ces stades pour interrompre la chaîne de transmission du paludisme. Des recherches actives sont en cours pour identifier les molécules efficaces contre les gamétocytes et certains ont déjà montré des résultats prometteurs. La ganaplacide (KAF156), une molécule gamétocytocide prometteuse s'est révélée particulièrement efficace *in vitro*, *ex vivo* et lors d'études cliniques contre différentes espèces de *Plasmodium* y compris contre les souches de parasites multirésistantes. De plus, elle présente une nature chimique unique différente des antipaludiques existants. Cependant, le mécanisme d'action de la ganaplacide sur les gamétocytes demeure inconnu, constituant ainsi le cœur de la problématique scientifique de cette étude. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse est d'explorer les réponses des gamétocytes exposés à la ganaplacide et de comprendre le mécanisme d'action de cette dernière.

La production des gamétocytes *in vitro* est une étape clé pour étudier des interventions visant à bloquer la transmission du paludisme. Cette thèse propose dans une revue systématique une approche intégrative basée sur l'analyse de divers facteurs influençant la production des gamétocytes. Un protocole optimisé a été élaboré offrant une alternative pratique et efficace pour produire des gamétocytes matures et viables *in vitro*.

Les méthodes de microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB) ainsi que de Nanoparticles tracking analysis (NTA) ont été utilisées pour examiner les effets de la ganaplacide sur les gamétocytes et l'hémozoïne (Hz) de ces derniers, un produit de détoxification de l'hème. Les résultats suggèrent une possible interaction, directe ou indirecte, de la ganaplacide avec la formation de l'Hz. L'analyse NTA a révélé une augmentation de la taille des particules d'Hz issues des gamétocytes exposés à la ganaplacide, corroboré par les observations en MET et en MEB. De plus, la MET révèle une réduction des structures membranaires à l'intérieur des gamétocytes exposés à la ganaplacide.

En outre, cette étude s'est penchée sur le développement d'un protocole de cryopréservation des parasites, adapté aux contraintes techniques de l'Afrique subsaharienne. L'objectif de cette étude est d'assurer l'intégrité des échantillons issus d'étude clinique sur le terrain durant le processus de transfert dans le laboratoire de recherche pour les expériences *ex vivo*.

Cette thèse apporte une contribution en explorant l'impact de la ganaplacide sur les gamétocytes et en identifiant de possibles altérations chez les gamétocytes exposés. Toutefois, ces observations doivent être vérifiées avec des expériences supplémentaires. L'efficacité de la ganaplacide et son interaction potentielle avec l'Hz ouvrent des pistes passionnantes pour de futurs travaux de recherches.

Mots clés : Paludisme, *Plasmodium falciparum*, Gamétocytes, Hémozoïne, Ganaplacide, KAF156, NTA, MET

ABSTRACT

Malaria, a persistent public health problem despite extensive control efforts, continues to claim hundreds of thousands of lives annually. Given the increasing resistance of malaria parasites to antimalarial drugs, it is crucial to develop new interventions to control the disease and prevent its transmission. Gametocytes are the cornerstones of malaria transmission from humans to mosquitoes, highlighting the need to target these stages. Active research is ongoing to identify molecules effective against gametocytes, with some showing promising results. Ganaplacide (KAF156), one of the promising gametocytocidal molecules, has demonstrated significant efficacy *in vitro*, *ex vivo*, and in clinical studies against various *Plasmodium* species, including multidrug-resistant parasite strains. Moreover, it possesses a chemically unique nature distinct from existing antimalarials. However, the mechanism of action of ganaplacide on gametocytes remains unknown, constituting the core scientific challenge of this study.

In this context, the main objective of this thesis is to explore the responses of gametocytes exposed to ganaplacide and understand its mechanism of action. The production of gametocytes *in vitro* is a crucial step. This thesis provides an integrative approach based on the analysis of various factors influencing gametocytes production through a systematic review. An optimized protocol has been developed, offering a practical and efficient alternative for *in vitro* production of mature and viable gametocytes.

Transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), and nanoparticle tracking analysis (NTA) methods were employed to examine the effects of ganaplacide on gametocytes and hemozoin, a heme detoxification product. The results suggest a possible direct or indirect interaction of ganaplacide with hemozoin formation. NTA analysis revealed an increase in the size of hemozoin particles derived from gametocytes exposed to ganaplacide, corroborated by TEM and SEM observations. Additionally, TEM revealed a reduction in membranous structures within ganaplacide-exposed gametocytes.

Furthermore, this study addressed the development of a parasite cryopreservation protocol adapted to the technical constraints of sub-Saharan Africa. The objective is to ensure the integrity

of samples from field-based clinical studies during the transfer process to the research laboratory for *ex vivo* experiments.

This thesis contributes by exploring the impact of ganaplacide on gametocytes and identifying potential alterations in exposed gametocytes. However, these observations need further validation through additional experiments. The efficacy of ganaplacide and its potential interaction with hemozoin open exciting avenues for future endeavors.

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, Gametocytes, Hemozoin, Ganaplacide, KAF156, NTA, TEM

REMERCIEMENTS

Je remercie mon Dieu pour sa guidance et sa présence indéfectible tout au long de cette aventure intellectuelle.

Aux rapporteurs et membres du jury,

Pr Philippe LOISEAU

Pr Antoine BERRY

Pr Frédéric ARIEY

Dr Françoise BENOIT-VICAL

Pr Adriana MIELE

Malgré vos agendas chargés, vous avez accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail. Vos remarques et suggestions contribueront à améliorer non seulement la qualité de cette thèse, mais aussi mon esprit scientifique. Je vous en suis profondément reconnaissante.

À la Dr Françoise BENOIT-VICAL et au Pr Abdoulaye DJIMDE,

Vous m'avez accompagné depuis les premiers pas jusqu'à la conclusion de ce projet de thèse. Les discussions pertinentes, vos conseils et votre soutien durant les comités de suivi de thèse ont été d'une valeur inestimable. Je ne saurais donc vous remercier à la hauteur de votre contribution à l'accomplissement de cette thèse.

Au Professeur Stéphane PICOT,

Directeur de thèse exceptionnel, grâce à vous, j'ai découvert le monde de la recherche scientifique, un domaine passionnant que je désirais ardemment intégrer. L'une des raisons est d'approfondir ma compréhension du paludisme et contribuer à l'avancement des connaissances visant à son contrôle. Mon intérêt profond pour cette problématique est tout naturel, car je suis originaire du Togo, un pays d'Afrique de l'Ouest où le paludisme est une préoccupation majeure avec plus de 237 cas pour 1000 habitants.

Je me souviens encore de cet après-midi d'automne où j'ai franchi le seuil de votre bureau pour mon entretien de stage de master II. Votre proposition passionnante de travailler sur le

développement d'un outil de diagnostic non invasif a été une illumination pour moi. Mon aventure doctorale a commencé là, et votre présence constante et rigoureuse a été un pilier décisif. Votre confiance en moi et les responsabilités que vous m'avez confiées ont été autant d'encouragements. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes.

Je tiens également à vous adresser ma gratitude pour avoir été ma boussole dans les moments de perplexité et m'être ainsi permis de relever des défis intellectuels. Votre sagesse et votre expertise ont éclairé mon chemin. Votre culture de l'excellence m'a inspiré et motivé pour donner le meilleur de moi-même. Vous m'avez ouvert la voie à une aventure de recherche extraordinaire et je vous remercie infiniment.

À la Dr Anne-Lise Bienvenu,

Vos contributions vont au-delà de la sphère académique. Votre présence attentive tout au long de cette aventure a été d'un grand réconfort. Que Dieu vous bénisse pour le bien que vous m'avez apporté. Votre soutien scientifique, mais aussi moral dans les moments difficiles a largement contribué à l'aboutissement de ce travail. Je vous considère non seulement comme une source d'inspiration, mais aussi comme une personne dotée d'une grande générosité et d'une compréhension profonde.

À équipe Malaria Research Unit,

Je suis reconnaissante de l'environnement de travail stimulant et collaboratif que vous avez créé. Merci pour les discussions constructives, les idées et les échanges fructueux qui ont enrichi mon expérience de recherche.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance particulière à **Adeline LAVOIGNAT** et **Guillaume BONNOT**. Votre présence constante et votre assistance, tant sur le plan technique que moral, ont été d'un soutien inestimable. Dans les labyrinthes du labo, vos compétences et vos pas sûrs ont été facilitateurs pour mes expériences. Adeline, toi qui m'as initiée à la culture parasitaire, aux différentes règles de sécurité et d'organisation dans un labo de recherche, m'offrant ainsi une initiation solide. Avec toi, j'ai appris qu'un labo de recherche peut être bien ordonné loin des stéréotypes courants ! Régine FERREIRA, un grand merci pour ton soutien continu !

Inès KOUAKOU, Ibrahim BIN SAID, Victorien CHAKER et Blanche DELABIE quelle chance de vous avoir connu. Merci pour les moments partagés et les discussions passionnantes. Nos échanges autour des expériences et résultats parfois intrigants ont forgé entre nous des liens solides. Nos joies et nos défis partagés nous ont surtout fait avancer. Victorien, je guette toujours mon cours de plongée ! On pourrait dire que ma soif de connaissance est tout aussi grande que le monde sous-marin. NB : Surtout, ne me laisse pas en apnée !

À ma famille,

Je vous adresse un remerciement tout particulier. Vous avez été les témoins de nombreuses nuits blanches et de moments de frustration avec patience et compréhension. Vous êtes les gardiens de mon équilibre mental et je vous suis infiniment reconnaissante.

À toi **Iqbal**, je promets de consacrer du temps pour jouer au foot, lire des tonnes de livres et résoudre d'innombrables puzzles !

Merci, **Arafat** pour ta tendresse, ta simplicité, ta compréhension et ton soutien sans faille. Les nuits blanches que nous avons partagées sont devenues des moments inoubliables grâce à ta présence. Ta rigueur, ta discipline ta détermination au travail m'ont inspiré et stimulé. Je n'imaginai pas achever ma thèse avant toi, mais je suis convaincue que ton tour viendra bientôt et nous célébrerons ensemble de nombreuses années de recherche et d'écriture. Et qui sait, peut-être que mon expérience pourra-t-elle t'inspirer à ouvrir ton cabinet de rédaction et de relecture de thèse !

Cher père, ta confiance en moi a été un moteur puissant. Ta sagesse et tes conseils éclairés ont illuminé mon chemin depuis mon enfance. J'ai toujours en mémoire tes proverbes qui portent en eux le sens de la réussite et la recherche constante du bonheur. Je suis honorée de l'éducation que tu m'as prodiguée. Tu es le meilleur père du monde.

Chères sœurs Hawawou, Houssénatou, Samiratou OMOROU et chère maman, malgré la distance, votre soutien, vos prières et votre joie de vivre ont été une source constante d'encouragement pour moi. Je vous porte dans mon cœur avec amour.

À mon cher petit frère, étoile brillante dans mon ciel,

Je dédie cette thèse, fruit d'une symphonie de persévérance et de dévouement, tissée de jours de labeur acharné et de nuit de réflexion, elle est un hommage à ta mémoire. Emporté par l'implacable étreinte de l'au-delà en des jours d'été, ton départ soudain et douloureux a obscurci nos vies. Ton absence silencieuse et lourde de chagrin a créé en moi un vide profond. Ta jeunesse éclatante, à peine vingt printemps, résonne comme un rappel poignant de la fragilité de notre existence. Plus que de simples liens de sang, nous étions amis, complices et confidents à jamais liés. Nos projets, nos aspirations et nos rêves tissés ensemble dans l'étoffe du temps trouvent leur épanouissement dans cette contribution scientifique.

Alors que je franchissais les dernières étapes de ma thèse, ta présence fantomatique était à la fois ma fragilité et ma force, illuminant mes jours et teintant ce travail de la lueur de ton âme. De ta disparition prématurée, j'ai puisé une force insoupçonnée transformant la douleur en une détermination inébranlable. Ta mémoire se fond dans les pages de cette thèse. Elle infuse chaque idée, chaque résultat analysé et chaque mot façonné. J'aurais tant souhaité que tu sois présent, célébré ensemble cet aboutissement qui aurait été ta fierté.

La distance géographique, ce cruel intermédiaire, a privé nos cœurs d'une rencontre tant espérée entre toi et ton neveu, un lien qui aurait tissé des souvenirs indélébiles. Les échos de tes aspirations à nouer des liens fusionnels et à partager des moments uniques avec lui se mêlent aux regrets empreints de silence, un refrain qui accompagnera mes jours. À travers ces mots, je souhaite rattraper ces instants insaisissables et offrir à ton souvenir cette humble réalisation, témoignant de notre amour et de la connexion intemporelle qui persiste malgré la séparation physique.

Ainsi, dans l'ombre de ces mots imprimés, je célèbre ton existence brève, mais éblouissante, mon frère et ami précieux. Puisses-tu trouver dans ces pages un témoignage de notre amour éternel, un hommage à la personne exceptionnelle que tu fus, Abdou-Rahim OMOROU.

Chère famille ABI,

Merci pour votre soutien. Sarah Vaux, merci pour tes prières et ton soutien tout au long de cette aventure scientifique. Nos discussions passionnantes ont été à la fois un exercice de communication scientifique et une évasion bienvenue vers d'autres disciplines.

À mes amis et mes proches, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à mon cheminement académique, votre amitié et votre soutien moral m'ont aidé à surmonter les défis. Cette thèse n'aurait pas été possible sans la générosité, la patience et le soutien de nombreuses personnes exceptionnelles. Je vous suis profondément reconnaissante et honorée de vous avoir dans ma vie.

À la thèse elle-même, pour les montagnes russes émotionnelles et les moments de triomphe et de défaite. Tu m'as enseigné la résilience et la persévérance tel un professeur sévère, mais bienveillant.

Aux cafés et thés qui m'ont fourni la portion magique de caféine et de théine pour alimenter mes longues nuits de réflexion et d'écritures. Votre pouvoir de réveil était plus puissant que le sort d'un sorcier !

Enfin, à moi-même, pour avoir persisté avec ténacité à travers les doutes, les obstacles, sans jamais plier. Cette thèse est le fruit d'un voyage épique et captivant. À présent, un chapitre se termine, mais ouvre la porte à de nouvelles autres aventures qui s'annoncent palpitantes.

« *Ce que nous savons est une goutte, ce que nous ne savons pas est un océan* » Isaac Newton (1643-1727)

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	8
ABSTRACT.....	10
REMERCIEMENTS.....	12
TABLE DES MATIÈRES	17
TABLE DES FIGURES	21
TABLE DES TABLEAUX.....	21
Liste des abréviations.....	22
INTRODUCTION	24
PARTIE I : REVUE DE LITTÉRATURE	28
Chapitre I : Le paludisme.....	28
I. Épidémiologie et ampleur du problème du paludisme aujourd’hui	28
II. Les acteurs principaux du paludisme	30
II.1. Le vecteur : Anopheles	30
II.2. L’agent pathogène : <i>Plasmodium</i>	33
III. Biologie de <i>Plasmodium</i>	37
III.1. Cycle de vie complexe de <i>Plasmodium</i>	37
III.1.1. Cycle sporogonique chez le moustique.....	37
III.1.2. Cycle schizogonique chez l’homme.....	38
III.2. Métabolisme de <i>Plasmodium</i> spp.....	40
III.2.1. Digestion de l’hémoglobine	41
III.2.2. Métabolisme des acides aminés et protéines.....	42
III.2.3. Métabolisme du carbone central	42
III.2.4. Métabolisme lipidique.....	43
III.2.5. Métabolisme nucléotidique.....	43
IV. Paludisme et clinique	44
IV.1. Physiopathologie.....	44
IV.2. Signes cliniques.....	46
IV.2.1. Paludisme simple non compliqué.....	46
IV.2.2. Paludisme grave /sévère.....	47
IV.2.3. Paludisme asymptomatique.....	48
IV.3. Diagnostic du paludisme.....	50
IV.4. Prise en charge du paludisme.....	52
IV.4.1. Traitement du paludisme non compliqué.....	54

IV.4.2.	Traitement du paludisme grave/sévère.....	54
IV.4.3.	Traitement des formes sexuées	54
IV.5.	Prévention et surveillance	55
IV.5.1.	Mesures antivectorielles.....	55
IV.5.2.	Mesures antiparasitaires.....	56
IV.5.3.	Prévention vaccinale	60
V.	La résistance de <i>Plasmodium</i> aux antipaludiques.....	61
V.1.	Les causes de la survenue d'une résistance.....	61
V.2.	Mécanismes moléculaires de résistance.....	61
V.3.	Impact de la résistance aux antipaludiques sur la lutte contre le paludisme	63
V.4.	Stratégies de lutte contre la résistance	64
Chapitre II : Hémozoïne, entre formation, fonction et lutte antipaludique		67
I.	Structure et formation de l'hémozoïne.....	68
I.1.	Biochimie structurale de l'hémozoïne	68
I.2.	Discussion sur les étapes de la formation de l'hémozoïne.....	72
II.	Caractéristiques de l'hémozoïne selon les stades de développement et les espèces de <i>Plasmodium</i>	75
III.	Hémozoïne comme biomarqueur et cible thérapeutique.....	77
Chapitre III : Gamétocytes, clés de la transmission et de l'élimination du paludisme		80
I.	Généralité sur les gamétocytes.....	80
II.	Biologie des gamétocytes.....	81
II.1.	Facteurs déclenchant la production des gamétocytes.....	81
II.2.	Mécanismes moléculaires et épigénétiques régissant l'engagement des formes asexuées en gamétocytes.....	82
II.3.	Mode de différenciation des gamétocytes	84
II.4.	Sexe des gamétocytes et exflagellation.....	85
II.5.	Mécanismes physiologiques de maturation des gamétocytes	86
II.6.	Le métabolisme des gamétocytes.....	90
II.6.1.	Disparités métaboliques entre les gamétocytes et les stades asexués :	90
II.6.2.	Métabolisme énergétique :	90
II.6.3.	Métabolisme lipidique :	91
II.6.4.	Cycle cellulaire et réplication de l'ADN :.....	92
II.6.5.	Synthèse de l'ARN et digestion des protéines :	92
III.	Place des gamétocytes dans l'élimination du paludisme	92

III.1.	Implication de la densité des gamétocytes dans la dynamique de la transmission du paludisme	92
III.2.	Prévalence des porteurs de gamétocytes	93
III.3.	Patients asymptomatiques et gamétocytes submicroscopiques :	93
III.4.	Implication pour l'élimination du paludisme :	94
Chapitre IV :	Ganaplacide (KAF156), un espoir pour le blocage de la transmission du paludisme	96
I.	Stratégies de blocage de la transmission du paludisme	96
I.1.	Stratégies axées sur les vaccins « Transmission-Blocking Vaccines (TBV) »	96
I.1.1.	Principes et rôle des TBV :	96
I.1.2.	Cibles des vaccins bloquant la transmission	97
I.1.3.	Défis et perspective des TBV :	98
I.2.	Stratégie axée sur les médicaments « Transmission-Blocking Drugs (TBD) »	99
I.2.1.	Principe et place des TBD dans la lutte pour l'élimination du paludisme	99
I.2.2.	Antipaludiques existants avec une activité de blocage de la transmission :	100
I.2.3.	Nouvelles cibles et stratégies de recherche et développement des TBD	102
I.2.4.	Approche de réutilisation des médicaments existants pour le développement de nouveaux TBD	103
I.2.5.	Biobanques de molécules candidates et contributions des organisations non lucratives : Medecines for Malaria Venture (MMV) et Drugs for Neglected Diseases Initiatives (DNDi)	104
I.2.6.	Techniques de recherche et d'évaluation des molécules actives.....	105
I.2.7.	Nouvelles approches de formulation des médicaments	109
I.2.8.	Les TBD en cours de développement	110
II.	La Ganaplacide (KAF156), un schizonticide et gamétocytocide prometteur	111
II.1.	Découverte de la ganaplacide	111
II.2.	Biochimie de la KAF156	112
II.3.	Mode d'action de la ganaplacide (KAF156) et résistance	113
II.4.	Efficacité de la ganaplacide	114
II.5.	Développement clinique de la ganaplacide.....	114
PARTIE II :	RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.....	118
Objectifs et méthodologie de recherche		118
Chapitre I :	Étude sur la cryopréservation des parasites, garantir la qualité des échantillons cliniques pour des expériences <i>ex vivo</i>	119
I.	Matériel et méthodes.....	120
II.	Résultats.....	122
II.1.	Détermination du cryoprotecteur efficace.....	122

II.2.	Évaluation à -80°C de l'efficacité du cryoprotecteur à 28% de glycérol.....	124
II.3.	Évaluation de la condition de cryopréservation pendant de longues durées.....	125
II.4.	Évaluation de la capacité des parasites recouverts à produire les gamétocytes	125
III.	Conclusion	126
Chapitre II :	Production <i>in vitro</i> des gamétocytes de <i>Plasmodium falciparum</i>	128
Article 1 :	Protocols for <i>Plasmodium</i> gametocyte production <i>in vitro</i> : an integrative review and analysis.....	131
Chapitre III :	Impact de la ganaplacide sur les gamétocytes de <i>Plasmodium falciparum in vitro</i>	145
I.	Test d'évaluation de la sensibilité des gamétocytes aux antipaludiques : méthode microscopique	146
II.	Test d'évaluation de la sensibilité des gamétocytes aux antipaludiques : la méthode à la résazurine « Resazurin-based viability assay ».....	147
III.	Microscopie électronique pour l'analyse ultramicroscopique des gamétocytes et de l'hémozoïne.....	148
IV.	Nanoparticles tracking analysis pour l'analyse de l'hémozoïne	148
Article 2:	Nanoparticle-tracking analysis of natural hemozoin from <i>Plasmodium</i> parasite	150
Article 3 :	Impact of KAF156/ganaplacide on <i>Plasmodium falciparum</i> gamétocytes <i>in vitro</i>	170
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		195
BIBLIOGRAPHIE.....		203

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Répartition géographique de l'incidence du paludisme dans le monde.....	30
Figure 2: Répartition de l' <i>Anopheles stephensi</i> en Afrique	32
Figure 3: Schéma annoté de la microstructure de <i>Plasmodium falciparum</i> au stade mérozoïte...	34
Figure 4: Cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	40
Figure 5: Symptômes cliniques et pathologies associées au paludisme dans différents organes humains.....	50
Figure 6: Modèle de lien de causalité entre la résistance aux antipaludiques et l'augmentation de la transmission du paludisme.	64
Figure 7: Structure chimique de la molécule d'hème.....	68
Figure 8: Réaction de Fenton.....	68
Figure 9: Représentation d'un dimère d'hème dans une maille cristallographique de l'hémozoïne	70
Figure 10: Formation de la structure chimique de l'hémozoïne.....	71
Figure 11: Modèles du processus de cristallisation de l'hème par autocatalyse	73
Figure 12: Modèle de formation de l'hémozoïne à la surface interne de la vacuole digestive de trophozoïte de <i>Plasmodium falciparum</i>	74
Figure 13: Hémozoïne dans les gamétocytes de <i>Plasmodium falciparum</i>	79
Figure 14: Modèle du mécanisme épigénétique de la gamétocytogenèse.	84
Figure 15: Caractéristiques morphologiques des gamétocytes suivant leur stade de maturation.	88
Figure 16: Principe du test de viabilité à la résazurin.	107
Figure 17: Structure chimique de la ganaplacide/KAF156.....	112
Figure 18: Évaluation de l'efficacité des divers cryoprotecteurs	123
Figure 19: Efficacité du cryoprotecteur 28% glycérol à -80°C	124
Figure 20: Production in vitro de gamétocytes de Pf NF54 à partir de parasites cryopréservés à -20°C avec 28% glycérol pendant 30 jours.	125
Figure 21: Production in vitro des gamétocytes	130

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: caractéristiques morphologiques et structurelles des stades de maturation des gamétocytes.....	89
Tableau 2: Liste non exhaustive de molécules avec une action gamétocytocide et de blocage de transmission du paludisme.	110
Tableau 3: Évaluation de la durée de cryopréservation	125

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADMET	absorption distribution métabolisme excrétion et toxicité
ARN	acide ribonucléique
CI ₅₀	concentration inhibitrice moyenne
CMI	complexe membranaire interne
DDS	drug delivery system
DGA	dual gamete assay
DNDI	drugs for neglected diseases initiatives
EDCTP	european and developing countries clinical trials partnership
EDTA	2,2',2",2'''-(Ethane-1,2-diyl dinitrilo) tetracetic acid
EPA	exoprotéine A
ERO	espèce réactive de l'oxygène
Ex	exemple
G6PD	glucose 6-phosphate déshydrogénase
GDV	protéine de développement des gamétocytes
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GR	globule rouge
HDP	heme detoxification protein
HRP	histine rich protein
HTS	high-throughput screening
Hz	hémozoïne
LAMP	loop- mediated isothermal amplification
LDH	lactate déshydrogénase
LUM	luméfantrine
MDA	mass drug administration
MEB	microscope électronique à balayage
MET	microscope électronique à transmission
MFA	membrane feeding assay

MMV	medecine for malaria venture
MT	microtubule
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide-H
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-H
NAG	N-acétylglucosamine
NTA	nanoparticle tracking analysis
OMS	organisation mondiale de la santé
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PCR	polymerase chain reaction
PIB	produit intérieur brut
QBC	quantitative buffy coat
RESA	rings erythrocyte surface antigen
RPMI	Roswell park memorial institute
RSA	relation structure-activité
SDF	solid dispersion formulation
SMC	seasonal malaria chemoprevention
SNG	séquençage nouvelle génération
SP	sulfadoxine-pyrimétamine
STG	stratégie technique globale
TBD	transmission blocking drug
TBS	transmission blocking strategy
TCAMS	tres cantos antimalarial set
TDR	test de diagnostic rapide
TPI	traitement préventif intermittent
WANECAM	West African Network for Clinical Trials of Antimalarial drugs
WHO	world health organisation
WWARN	worldwide antimalarial resistance network

INTRODUCTION

Le paludisme, causé par le parasite *Plasmodium*, est transmis à l'homme par les piqûres de moustiques anophèles femelles infectés. Il est l'une des maladies infectieuses les plus répandues et les plus meurtrières au monde touchant particulièrement les populations vulnérables des régions tropicales et subtropicales notamment en Afrique subsaharienne. Le lourd tribut payé au paludisme ne se limite pas à son impact sur la santé humaine puisqu'il entraîne des conséquences socio-économiques considérables dans les régions affectées. Malgré des progrès louables dans les efforts de lutte et de prévention, le paludisme reste un redoutable défi de santé publique.

L'objectif ultime de la lutte contre le paludisme est son élimination. La stratégie technique globale (STG) de lutte contre le paludisme définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2015 et mise à jour en 2021 a défini un programme ambitieux. Son objectif est de parvenir à éliminer le paludisme d'ici 2030 dans au moins 35 pays dans lesquels la transmission était présente en 2015 et de réduire l'incidence de 90 %. Des progrès significatifs ont été réalisés ces dernières années comme on peut le voir avec la diminution du nombre de pays endémiques, passé de 108 en l'an 2000 à 84 en 2021. Ces progrès peuvent être attribués à deux stratégies clés : la lutte antivectorielle et le renforcement du diagnostic et du traitement rapide des personnes infectées (Hemingway et al., 2016; World Health Organization, 2012a). Dans cette deuxième stratégie, l'utilisation généralisée des combinaisons à base d'artémisinine de l'anglais « artemisinin-based combination therapy (ACT) » en tant que traitement de première intention du paludisme non compliqué a considérablement amélioré la prise en charge, sauvant ainsi de nombreuses vies. Cependant, le fardeau du paludisme dans le monde demeure alarmant.

Entre 2015 et 2021, le nombre de cas et de décès dus au paludisme a connu une hausse préoccupante. Le nombre moyen de cas a augmenté de 17 millions et le nombre de décès de 42 000. Seuls neuf pays ont été officiellement certifiés exempts de paludisme depuis 2015 (World Health Organization, 2022), un chiffre qui reste bien en deçà des objectifs fixés par la STG. Si la pandémie de COVID a joué un rôle dans l'augmentation de ces chiffres, la résistance des moustiques aux insecticides (Susanna & Pratiwi, 2021) et l'émergence des résistances aux antipaludiques sont des causes importantes.

Les ACT ont une action rapide et efficace sur les parasites asexués. Une récente étude montre un taux de clairance des parasites estimé à 99% après le traitement (Marwa et al., 2022). La perte d'efficacité de l'artémisinine a été documentée pour la première fois dans la région Asie du Sud-Est, précisément dans l'ouest du Cambodge en 2009 (Dondorp et al., 2009). Plus récemment, les marqueurs de résistance ont été identifiés en Afrique subsaharienne bien que leur impact sur l'efficacité des ACT dans cette région reste limité. Néanmoins, cette situation doit être considérée comme urgente, car une perte potentielle d'efficacité des ACT est à craindre dans les années à venir (Tumwebaze et al., 2022). Le problème des résistances ne se limite pas à l'échec du traitement, car il va au-delà en contribuant à l'augmentation de la transmission du parasite. Notamment, les études ont montré que les parasites résistants à l'artémisinine sont susceptibles de produire plus de gamétocytes comparés aux souches sensibles (Abdul-Ghani et al., 2014; Rajapandi, 2019). Par ailleurs, les patients traités avec des ACT sont susceptibles de présenter une augmentation de la densité de gamétocytes (Ouologuem et al., 2018; Sawa et al., 2013; WWARN Gametocyte Study Group, 2016). Étant donné que les gamétocytes, formes sexuées du parasite, sont responsables de la transmission du paludisme (Ippolito et al., 2017), cette augmentation du nombre de porteurs de gamétocytes représente une menace pour l'élimination du paludisme.

La stratégie de blocage de la transmission en ciblant les gamétocytes requiert l'utilisation d'antipaludiques spécifiquement actifs sur les gamétocytes (appelés gamétocytocides) ou inhibant leur fertilité. Actuellement, les 8-aminoquinolines, notamment la primaquine, sont les molécules reconnues pour leur efficacité contre les gamétocytes (Graves et al., 2018). Cependant, l'utilisation de la primaquine n'est pas systématique en raison de sa capacité à induire une hémolyse chez les personnes déficientes en glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD), un phénotype fréquent dans des zones de forte endémicité palustre (Bancone & Chu, 2021a; Nkhoma et al., 2009; Sudsumrit et al., 2022). Par conséquent, il devient impératif d'identifier de nouvelles molécules répondant au besoin de l'interruption de la transmission.

Des recherches en cours visent à mettre au point des molécules pouvant bloquer la transmission du paludisme en ciblant les gamétocytes (Birkholtz et al., 2022; Nilsson et al., 2015). Plusieurs molécules actives sur les gamétocytes ont été identifiées (Birkholtz et al., 2022). Il convient de souligner que ces molécules se distinguent par leur structure biochimique qui diffère de celle de l'artémisinine. Cette divergence est d'une grande importance dans la lutte contre

l'émergence de la résistance à l'artémisinine. Parmi ces molécules, la ganaplacide (KAF156), une molécule de la classe des imidazolopiperazines a démontré son efficacité contre les gamétocytes (Kuhlen et al., 2014; Nagle et al., 2012; T. Wu et al., 2011). Des tests de chimiosensibilité *in vitro* et *ex vivo* ainsi que les résultats des essais cliniques ont montré son efficacité sur les stades hépatiques, stades asexués et les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) et *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) avec des concentrations inhibitrices moyennes de l'ordre du nanomolaire (Kuhlen et al., 2014; Nagle et al., 2012; Ogutu et al., 2023; T. Wu et al., 2011). Le mode d'action de la ganaplacide n'est pas encore connu. Néanmoins, des études antérieures ont suggéré le réticulum endoplasmique (RE) comme son site d'action potentiel (LaMonte et al., 2020; Lim et al., 2016; Magistrado et al., 2016). Toutefois, pour bien exploiter son potentiel thérapeutique, il est essentiel de comprendre les mécanismes précis par lesquels la ganaplacide agit sur les gamétocytes, en particulier son influence potentielle sur l'hémozoïne (Hz).

L'Hz, un biocristal héminique, est un sous-produit de la digestion de l'hémoglobine par les parasites. Elle joue un rôle multiple dans la survie du parasite et dans la pathogenèse du paludisme (Dalapati & Moore, 2021). L'efficacité des molécules inhibant sa formation telles que la chloroquine (Kapishnikov et al., 2019; R. Singh et al., 2023) et l'artémisinine (Pandey et al., 1999; Witkowski et al., 2012) soulignent son rôle vital. L'Hz représente ainsi une cible intéressante à investiguer dans la recherche sur le mode d'action de nouveaux composés.

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse est d'étudier les propriétés gamétocytocides de la ganaplacide et d'explorer son impact sur les mécanismes moléculaires des gamétocytes. Cependant, l'une des contraintes techniques des recherches sur les gamétocytes est leur production *in vitro*. Des gamétocytes viables et infectieux en quantité suffisante sont nécessaires pour réaliser les expériences. Ces trois paramètres : viabilité, infectiosité et quantité sont souvent difficiles à obtenir rendant la production des gamétocytes délicate et laborieuse. Ainsi, un des objectifs secondaires de cette thèse est de comprendre les facteurs inhérents à la production de gamétocytes *in vitro* afin d'optimiser leur production.

Enfin, la ganaplacide en combinaison avec la luméfantrine est actuellement en phase d'essais cliniques (Bouwman et al., 2020; Koller et al., 2018, p. 156; Ogutu et al., 2023). Ces essais sont pilotés en Afrique par le projet West African Network for Clinical Trials of Antimalarial drugs

(WANECAM 2) financé par European & Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP) en collaboration avec Novartis. Cette thèse s'inscrit dans le cadre de ce projet dont l'objectif est d'évaluer l'efficacité et la propriété de blocage de transmission de la combinaison KAF156/Lumefantrine-solid dispersion formulation (SDF). Pour ce travail de thèse, il est prévu d'utiliser les échantillons issus d'études cliniques pour les expériences *ex vivo*, notamment avec les gamétocytes. Par conséquent, cette thèse a également pour objectif secondaire de mettre au point un protocole de cryopréservation des parasites, adapté aux contraintes techniques des zones aux ressources limitées et compatible avec la production de gamétocytes.

PARTIE I : REVUE DE LITTÉRATURE

Chapitre I : Le paludisme

I. Épidémiologie et ampleur du problème du paludisme aujourd'hui

Le paludisme est une parasitose due à un protozoaire du genre *Plasmodium* qui est transmis à l'homme par une piqûre de moustique infecté du genre anophèle. Dans de rares cas, il peut être transmis par transfusion sanguine ou transplantation d'organes (Gruell et al., 2017; Mace et al., 2022; Owusu-Ofori et al., 2013).

Le paludisme demeure un problème de santé publique d'autant que le nombre de victimes ne cesse d'augmenter ces dernières années malgré les efforts en cours. En 2021, plus de 247 millions de cas ont été enregistrés faisant plus de 619 000 décès dont plus de 70% sont des enfants de moins de 5 ans (World Health Organization, 2022). Les enfants et les femmes enceintes sont les plus vulnérables. L'incidence et la mortalité dues au paludisme ont régressé significativement jusqu'en 2015. Entre 2000 et 2015, le taux de mortalité du paludisme en Afrique subsaharienne a été réduit d'environ 57 % (Gething et al., 2016). Cependant depuis 2016, on constate une augmentation des cas. Plus de 5 millions de cas supplémentaires dans le monde en 2016 par rapport à 2015 et 15 millions de cas de plus en 2021 comparés à 2019 ont été rapportés. L'OMS estime que 87% de ces cas en plus soit 13,4 millions seraient dus à la pandémie de COVID. Cependant, il est important de souligner l'émergence des résistances des parasites aux dérivés de l'artémisinine qui sont utilisés en première intention pour le traitement du paludisme. À cela s'ajoute la résistance des moustiques aux insecticides. L'inefficacité croissante de ces mesures contribue à l'augmentation de l'incidence et de la mortalité due au paludisme. Par ailleurs, le déficit de fonds pour la lutte contre le paludisme est susceptible d'entraver la mise en œuvre des stratégies de lutte contre le paludisme. Ce qui peut contribuer à l'augmentation du nombre de cas de paludisme dans les pays endémiques (Cohen et al., 2012, 2022; Monroe et al., 2022).

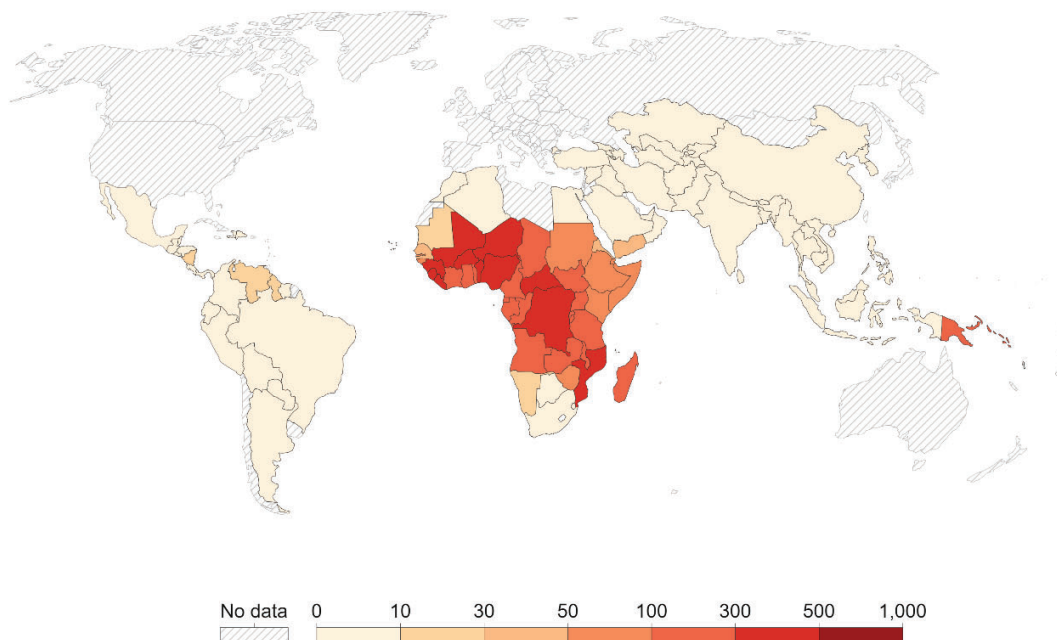
Il existe sans doute un lien entre le paludisme et le développement économique des pays endémiques (Chima et al., 2003; Gallup & Sachs, 2001; Sarma et al., 2019). Le coût du traitement

du paludisme et la mise en œuvre des méthodes de contrôle et de prévention du paludisme pèsent sur l'économie globale. Ainsi, il a été rapporté entre 1965 et 1995 que le produit intérieur brut (PIB) par habitant dans les zones endémiques était inférieur de 70% comparé aux zones non endémiques (Gallup & Sachs, 2001). En analysant 180 pays où le paludisme sévit, sur une période de 2000 à 2017, une étude a montré qu'une diminution de l'incidence du paludisme de 10% était corrélée à une augmentation du PIB par habitant, soit 1,9% en moyenne (Sarma et al., 2019). Bien que le paludisme ne soit pas la cause principale du statut économique de ces pays, il joue un rôle dans le retard de croissance économique des pays endémiques. Inversement, l'on peut être amené à penser que c'est le faible niveau économique qui est un facteur contribuant au maintien du niveau endémique dans ces pays. L'une des explications est l'insuffisance de ressources financières nécessaires pour la mise en œuvre efficace des moyens de lutte de contre le paludisme (Cohen et al., 2022; Monroe et al., 2022).

Le paludisme est une maladie principalement répartie dans les régions tropicales et subtropicales où le climat et les conditions environnementales sont favorables au développement du vecteur. Les pays en voie de développement dans ces régions sont les plus touchés. En 2021, c'est 84 pays répartis dans le monde qui sont répertoriés comme endémiques. Il s'agit principalement des pays de l'Afrique subsaharienne qui représentent plus de 95% des cas et 96% de décès dus au paludisme dans le monde (World Health Organization, 2022). L'Asie du Sud-Est représente environ 2% des cas dans le monde, la méditerranée orientale compte pour environ 2,5%, le Pacifique Occidental et l'Amérique du Sud comptent pour le reste (Figure 1). L'Europe est officiellement déclarée exempte de paludisme depuis 2015 (World Health Organization, 2022). Il faut noter que le nombre de pays endémiques dans le monde a diminué passant de 108 en l'an 2000 à 84 en 2021 (World Health Organization, 2022).

Incidence of malaria, 2020

Incidence of malaria is the number of new cases of malaria in a year per 1,000 population at risk.



Source: World Health Organization (via World Bank)

OurWorldInData.org/malaria • CC BY

1. Malaria: Malaria is a life-threatening disease caused by parasites that are transmitted through the bites of infected female *Anopheles* mosquitoes. There are five parasite species that cause malaria in humans. Two of these species – *P. falciparum* and *P. vivax* – pose the greatest threat. The first symptoms – fever, headache and chills – usually appear 10 to 15 days after the infective mosquito bite and may be mild and difficult to recognize as malaria. Left untreated, *P. falciparum* malaria can progress to severe illness and death within 24 hours.

Figure 1: Répartition géographique de l'incidence du paludisme dans le monde
(<https://ourworldindata.org/malaria>)

II. Les acteurs principaux du paludisme

II.1. Le vecteur : *Anopheles*

Le moustique du genre *Anopheles* est le vecteur et l'hôte définitif du *Plasmodium* spp. On compte plus de 465 espèces d'anophèles et 70 d'entre elles ont la capacité d'héberger et de transmettre *Plasmodium* à l'homme (Rossati et al., 2016). Parmi ces 70, 41 sont classés dans une catégorie de moustique ayant une capacité élevée de transmission du paludisme (Sinka et al., 2012).

La répartition spatio-temporelle de l'anophèle dans le monde est principalement liée aux conditions climatiques et aux activités humaines (Rossati et al., 2016; Villena et al., 2022). Le

moustique étant un organisme ectotherme, la température est un facteur déterminant pour son développement et sa survie (Villena et al., 2022). La présence de l'eau est aussi un facteur crucial, car le moustique pond ses œufs sur l'eau. Ces œufs génèrent ensuite des larves qui se développent en nymphes (Mouchet, 2004; Rossati et al., 2016). Les données expérimentales montrent que l'activité biologique des larves d'*Anopheles gambiae* (*An. gambiae*) est inhibée à une température moyenne de 16,5°C (Jepson et al., 1947). Par ailleurs, la variation de température dans une fourchette de 30 à 38°C n'a pas montré d'impact sur le développement optimal du moustique alors qu'un changement d'un degré dans la fourchette de 18 et 26°C peut augmenter de plus d'une semaine la durée de développement du moustique (Jepson et al., 1947). Au-delà de 40°C, on estime que le moustique vit moins d'un jour (Villena et al., 2022). Ce qui souligne l'importance de la température pour la survie des moustiques.

Les activités humaines comme la déforestation, l'agriculture avec les techniques d'irrigation assurent des conditions favorables au développement des moustiques (Mouchet, 2004; Rossati et al., 2016). Par ailleurs, les moustiques peuvent être présents dans des régions de basses températures d'une part parce qu'ils développent des mécanismes d'adaptation et d'autre part parce qu'ils peuvent se nicher à l'intérieur des habitations où la température est optimale comme le cas *An. gambiae* (Mouchet, 2004; Villena et al., 2022).

An. gambiae est l'espèce la plus répandue en Afrique et aussi *Anopheles arabiensis* (*An. arabiensis*). *Anopheles stephensi* (*An. stephensi*) est une espèce originaire d'Asie (Sinka et al., 2012). Cependant, l'on constate sa présence en Afrique subsaharienne où il a été détecté pour la première fois en 2012 à Djibouti. Depuis, on note une propagation d'*An. stephensi* en Afrique de l'Est et de l'Ouest notamment en Éthiopie, au Soudan, en Somalie, au Nigéria, au Ghana et au Kenya (Figure 2). Ce constat est inquiétant, parce qu'*An. stephensi* aurait une capacité de transmission plus élevée pour *P. falciparum* et *P. vivax* (Villena et al., 2022).

En effet, la fourchette de température optimale pour le développement des parasites est plus étendue chez *An. Stephensi* que chez *An. gambiae* ; 15°C - 37°C contre 19°C – 30°C pour *P. falciparum* par exemple (Villena et al., 2022). Par ailleurs, *An. Stephensi* semble prospérer en milieu urbain contrairement aux autres principaux vecteurs du paludisme (Mnzava et al., 2022). Par conséquent, il pourrait se répandre rapidement dans les villes africaines en expansion. Cette

évolution pourrait avoir un impact significatif sur l'incidence du paludisme (de Santi et al., 2021). En outre, *An. Stephensi* s'est avéré résistant à de nombreux insecticides couramment utilisés, rendant probablement plus compliqué son contrôle (Yared et al., 2020). La propagation d'*An. Stephensi* est l'une des quatre grandes menaces biologiques dont fait face la lutte contre le paludisme aujourd'hui (World Health Organization, 2023a). En réponse, l'OMS a lancé une nouvelle initiative visant à enrayer la propagation d'*An. stephensi* en Afrique. Cette initiative comprend le renforcement de la surveillance et des collaborations entre les acteurs, l'élaboration de lignes directrices et l'amélioration des échanges d'informations entre autres (World Health Organization, 2023b).

Spread of *Anopheles stephensi* in Africa

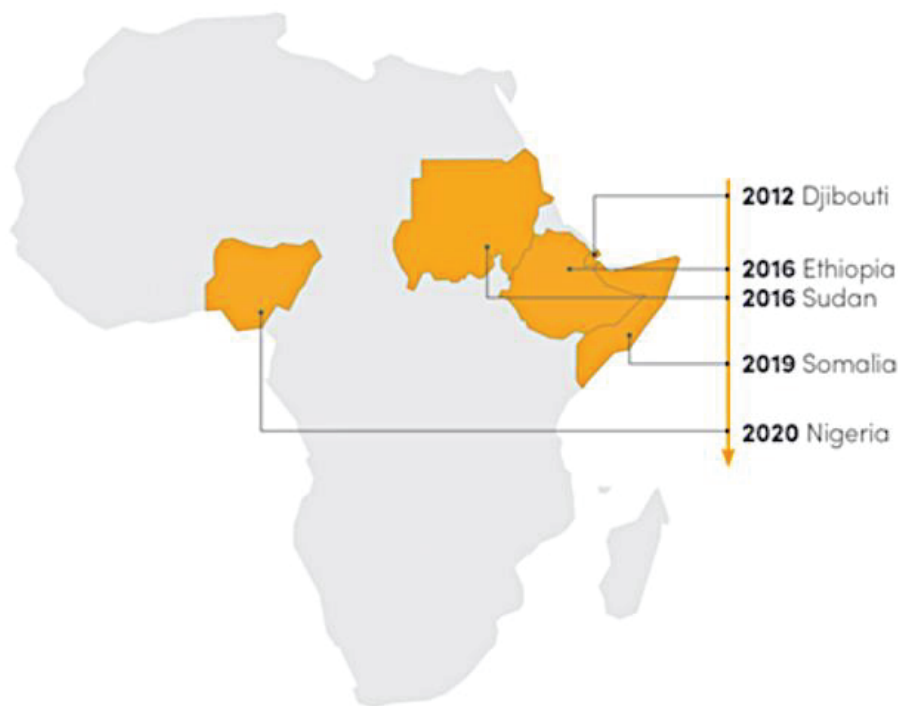


Figure 2: Répartition de l'*Anopheles stephensi* en Afrique
(<https://targetmalaria.org/wp-content/uploads/2022/12/image-11.png>)

La compétence de l'anophèle femelle à transmettre le parasite est déterminée par des facteurs complexes tels que sa pérennité, sa sensibilité ou sa tolérance vis-à-vis du parasite et aussi du niveau de contact avec l'hôte vertébré (Rossati et al., 2016). Le maintien de la vie du moustique pendant toute la durée de développement du parasite, dénommée cycle sporogonique, est un

facteur crucial pour que le moustique devienne un vecteur infectieux. Cette durée varie en fonction des espèces de parasites, de la température et d'autres facteurs abiotiques et biotiques. Par exemple, la durée du cycle sporogonique de *P. falciparum* est estimée à 10 jours à 30°C et à 20 jours à 20°C (Ohm et al., 2018). À des températures inférieures à 18°C, ce cycle peut s'étendre jusqu'à 56 jours. Or très peu de moustiques adultes survivent à cette durée (Rossati et al., 2016).

Par ailleurs, le développement du parasite peut être influencé par les conditions physiologiques du moustique y compris les réponses immunitaires du moustique et la compatibilité moléculaire entre le moustique et le parasite (Romoli & Gendrin, 2018; Tripet et al., 2008). À cela, s'ajoute la disponibilité de nutriments apportés par le sang des vertébrés qui peut influencer la capacité du moustique à soutenir le développement des sporozoïtes. Cette dernière dépend en partie de la qualité nutritionnelle du repas sanguin et de la fréquence de piqueur du moustique (Ohm et al., 2018).

Il n'est pas aisé de caractériser tous les facteurs intervenant dans la répartition des moustiques et dans leur capacité à héberger et à transmettre le parasite. Toutefois, il faut une compatibilité moustique-parasite et une adaptabilité biothermique à la fois pour le moustique et le parasite. Des recherches sur la biologie des moustiques sont encore plus nécessaires aujourd'hui alors qu'on fait face à une résistance croissante aux insecticides. La compréhension des mécanismes de résistance devrait faciliter la recherche et l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte antivectorielle.

II.2. L'agent pathogène : *Plasmodium*

Plasmodium est un parasite eucaryote unicellulaire (Figure 3) appartenant au sous-ordre des hémospodidés et à la famille des Plasmodidés (Antinori et al., 2012).

MEROZOITE

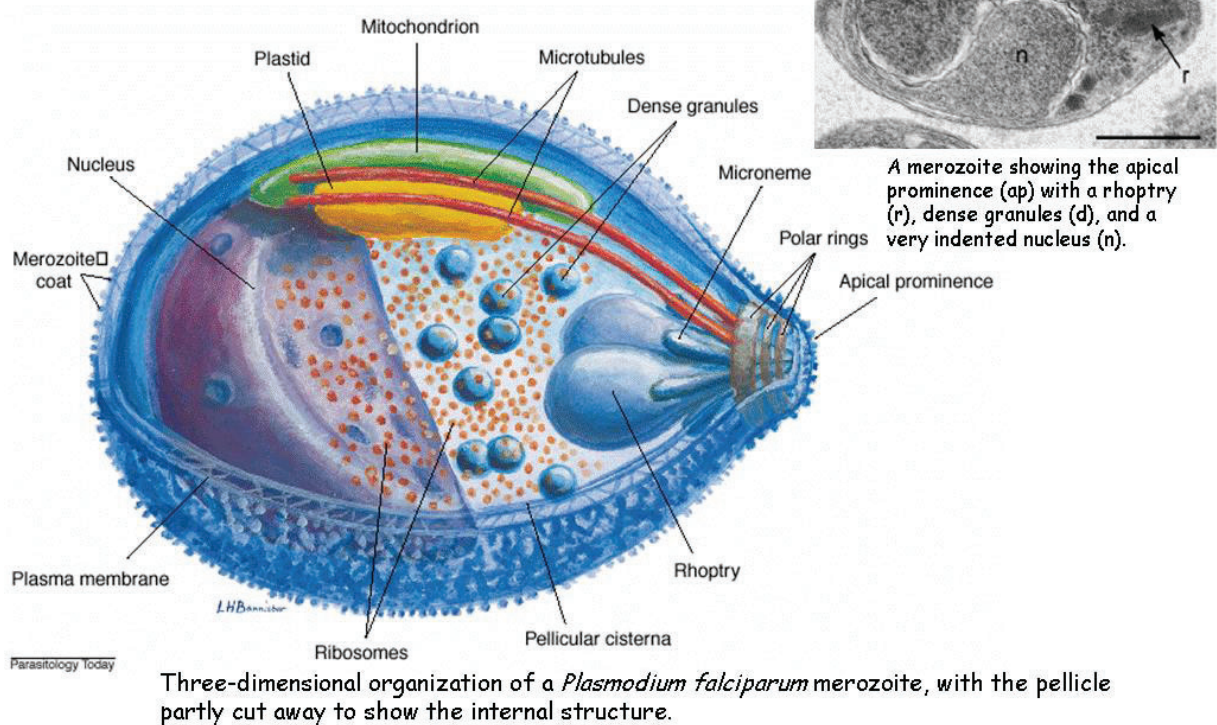


Figure 3: Schéma annoté de la microstructure de *Plasmodium falciparum* au stade mérozoïte
[\(merozoitepath.gif \(1024x768\) \(windows.net\)\)](#)

Le genre *Plasmodium* comprend plus de 250 espèces dont cinq sont responsables du paludisme chez l'homme : *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) *wallickeri* et *curtisi*. Par ailleurs, *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*), *Plasmodium cynomolgi* (*P. cynomolgi*) et *Plasmodium inui* (*P. inui*), à l'origine parasites des primates, peuvent également infecter l'homme. Dans cette partie, nous allons explorer les principales caractéristiques de chaque espèce de *Plasmodium* et leur répartition géographique en soulignant leur impact sur l'épidémiologie du paludisme.

P. falciparum prédomine en Afrique où il est à l'origine de plus de 90% des cas de paludisme (Snow et al., 2017; *World-malaria-report-2022*, s. d.). On le trouve dans les régions tropicales d'Amérique du Sud et d'Asie du Sud-Est où il prospère dans des climats humides et chauds. En effet, le cycle de développement de *P. falciparum* chez le moustique se fait à des

températures d'environ 18°C à 32°C (Amat-Roze, 2002; Rossati et al., 2016). Espèce la plus pathogène, *P. falciparum* est responsable de la majorité de la morbidité et de la mortalité liées au paludisme contribuant à plus de 90% des décès dus au paludisme dans le monde

P. vivax est l'espèce la plus répandue dans le monde. Elle est présente dans toutes les régions tropicales et subtropicales en particulier en Asie du Sud-Est, en Amérique du Sud et en Amérique Centrale. Cela peut s'expliquer par sa capacité à se développer dans une plage de température assez large de 16°C à 33°C (L'Episcopia et al., 2020; Picot, 2006; Rossati et al., 2016). Le paludisme à *P. vivax* est le deuxième plus important après celui à *P. falciparum*. Avec 2% des cas de paludisme dans le monde et 0, 3% en Afrique, *P. vivax* est le plus prévalent en Asie, avec plus de 40% des cas en 2021 (World Health Organization, 2022). La prévalence relativement faible en Afrique peut être attribuée à la présence d'individus du groupe sanguin Duffy-négatif, en l'occurrence en Afrique Centrale et de l'Ouest. Ce phénotype semble conférer une certaine résistance à l'infection à *P. vivax* (Carter, 2003). Bien qu'il soit considéré comme moins grave que *P. falciparum*, *P. vivax* peut néanmoins entraîner des complications, voir la mort surtout chez les enfants et les femmes enceintes qui sont les plus vulnérables (Douglas et al., 2014; Phyo et al., 2022; Picot & Bienvenu, 2009). La mortalité liée à *P. vivax* est favorisée par sa capacité à rester à l'état latent sous forme d'hypnozoïtes dans le foie pendant plusieurs années créant ainsi des rechutes. On estime que 79 à 96% des cas de *P. vivax* sont dus à l'activation des hypnozoïtes (Commons et al., 2020; Huber et al., 2021).

P. malariae est communément coexistant avec *P. falciparum*, du fait de son cycle de développement chez le moustique se faisant à une température minimale de 15°C. Il est réparti dans les régions tropicales et subtropicales avec une plus forte prévalence en Afrique subsaharienne estimée entre 15 à 30% (Fuehrer et al., 2022; Sutherland, 2016). On le retrouve également en Asie du Sud-Est, au Moyen-Orient et en Amérique du Sud et Centrale, mais avec une prévalence plus faible, environ 1 à 2% (Mueller et al., 2007). Les infections à *P. malariae* sont souvent asymptomatiques et le parasite peut persister chez l'homme pendant de longues périodes (Mueller et al., 2007; Sutherland, 2016). Les cas graves de paludisme à *P. malariae* sont rares et occasionnellement observés chez les enfants de moins de 10 ans souffrant d'infections chroniques (Langford et al., 2015).

P. ovale est principalement présent en Afrique de l'Ouest (Mueller et al., 2007). Sa présence a également été rapportée en Asie du Sud-Est, au Moyen-Orient et dans certains pays du Pacifique (Hawadak et al., 2021; Mueller et al., 2007). *P. ovale* est souvent présent dans les multiinfections avec d'autres espèces de *Plasmodium* et représente une très faible proportion des infections (1 à 2%) (Fuehrer et al., 2022). Cependant, sa prévalence peut être sous-estimée en raison de sa ressemblance morphologique avec *P. vivax*. Le paludisme causé par *P. ovale* est généralement asymptomatique, avec une faible parasitémie souvent en dessous de la limite de détection. Des analyses génomiques ont révélé deux espèces de *P. ovale* : *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* (Fuehrer et al., 2022; Mueller et al., 2007).

Enfin, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. inui* sont principalement localisés en Asie du Sud-Est notamment dans les zones forestières présentant un climat favorable à la vie du vecteur et la présence des primates intervenant dans le cycle de développement (Bourée, 2006; Mouchet, 2004). La Malaisie est la plus touchée par le paludisme zoonotique qui s'étend aux pays voisins comme l'Indonésie et les Philippines (Anstey et al., 2021; Mohammad et al., 2022). Le Paludisme à *P. knowlesi* est le plus fréquent parmi des infections zoonotiques. Il peut être asymptomatique ou symptomatique, avec des cas occasionnels de paludisme modéré à grave et de rares décès signalés (Anstey et al., 2021; Mohammad et al., 2022).

Les espèces zoonotiques posent un réel problème pour l'élimination du paludisme, car les stratégies existantes de lutte contre le paludisme humain ne sont pas tout à fait adaptées (Naserrudin et al., 2022). Les vecteurs de *P. knowlesi* ont des comportements plus ou moins différents des vecteurs du paludisme humain. On les retrouve dans les forêts, les champs et peuvent être à la fois endophage et exophage. En ce sens, l'utilisation des moustiquaires imprégnées ou des insecticides intra-domiciliaires pour contrôler la transmission s'avère être insuffisante (Mohammad et al., 2022). En outre, l'intervention de l'hôte singe dans le cycle de transmission vient complexifier le contrôle de *P. knowlesi*.

Ainsi, les espèces de *Plasmodium* présentent des distributions géographiques et des dynamiques de transmission différentes. Parmi elles, *P. falciparum* se démarque en tant qu'espèce la plus pathogène, responsable de la majorité de la morbidité et de la mortalité liées au paludisme, en particulier en Afrique subsaharienne. En parallèle, *P. vivax* est l'espèce la plus répandue et

contribue significativement aux cas de paludisme en particulier dans les régions hors Afrique, grâce à sa capacité unique à former des hypnozoïtes dans le foie, provoquant des rechutes et des complications. D'autres espèces, telles que *P. malariae* et *P. ovale* présentent des schémas de prévalence et des profils cliniques distincts qui semblent moins sévères que les deux premières espèces. En outre, les espèces zoonotiques comme *P. knowlesi* sont en émergence et tendent à compliquer les stratégies de lutte contre le paludisme. La compréhension des déterminants de cette diversité spatio-temporelle, la compréhension des caractéristiques et de la prévalence de chaque espèce est essentielle pour concevoir des interventions ciblées pour une efficacité des méthodes de lutte contre le paludisme.

III. Biologie de *Plasmodium*

III.1. Cycle de vie complexe de *Plasmodium*

Le cycle de vie de *Plasmodium* est un processus complexe alternant entre son vecteur moustique et son hôte vertébré. Il comprend un cycle sexué (sporogonie) se déroulant exclusivement chez l'anophèle femelle et un cycle asexué (schizogonie) chez l'homme (Figure 4). Le cycle de développement est similaire pour toutes les espèces de *Plasmodium* avec des variations dans la durée du cycle (Picot & Bienvenu, 2022). Dans cette partie, nous entrerons dans les détails de chaque phase du cycle de développement en mettant en évidence les principaux événements qui se produisent.

III.1.1. Cycle sporogonique chez le moustique

Dans le cycle de vie du parasite, le cycle sporogonique encore connu sous le nom de cycle sexué est la seule phase au cours de laquelle il se multiplie par méiose à l'intérieur des moustiques avant d'être transmis à l'homme par des piqûres de moustiques.

Le cycle sexué est initié lorsque l'anophèle femelle ingère des gamétocytes matures mâles et femelles alors qu'elle se gorge du sang d'un hôte infecté. À l'intérieur de l'intestin du moustique, les gamétocytes subissent un processus d'activation, déclenché par des conditions biophysiques

spécifiques comme la température basse (environ 20°C), le pH alcalin et des molécules essentielles comme l'acide xanthurénique (Dash et al., 2022). Les gamétocytes activés sont libérés de l'érythrocyte puis les mâles subissent trois cycles de réplication et donnent naissance à huit microgamètes flagellés, c'est l'exflagellation des gamétocytes mâles (Dash et al., 2022). Les gamétocytes femelles eux se différencient en macrogamètes prêts pour la fécondation. La fusion d'un microgamète avec un macrogamète forme un zygote diploïde qui subit une méiose et se différencie ensuite en ookinète polarisé et mobile. L'ookinète traverse la paroi intestinale du moustique, puis gagne sa cavité corporelle où il se développe en oocystes. Les sporozoïtes sont produits à l'intérieur de ces oocystes dans un sac appelé sporocyste après plusieurs séries de réplication. Arrivés à maturité, les sporozoïtes sont libérés dans la cavité corporelle du moustique. Ils finissent par migrer vers les glandes salivaires du moustique où ils sont stockés en attendant d'être transmis à l'hôte vertébré lors du prochain repas sanguin du moustique (Figure 4) (Dash et al., 2022; Picot & Bienvenu, 2022; Sato, 2021).

III.1.2. Cycle schizogonique chez l'homme

III.1.2.1. Phase hépatocytaire

Le cycle schizogonique également dit cycle asexué, commence lorsqu'un moustique infecté injecte des sporozoïtes dans le derme d'un hôte vertébré. Alors que certains sporozoïtes sont éliminés par la réponse de l'hôte, d'autres quittent la peau dans un délai de 1 h à 3 h (Cowman et al., 2016). Après avoir traversé les vaisseaux sanguins, ils accèdent à la circulation sanguine et ciblent les hépatocytes du foie. Grâce à leur motilité et au flux sanguin, ils arrivent aux hépatocytes qu'ils reconnaissent grâce à une multitude de signaux, dont les protéines de surfaces spécifiques qui interagissent avec des récepteurs hépatocytaires (Cowman et al., 2016). Parmi ces protéines, le Circumsporozoite Protein (CSP) se distingue par son importance. (Dundas et al., 2019). Ce qui en fait une cible privilégiée dans la recherche et développement de vaccins (de Almeida et al., 2021). Les récepteurs tels que l'Hépatocyte Growth Factor Receptor (HGFR), les Glycosaminoglycans (GAGs) et les constituants de la matrice extracellulaire interviennent dans la reconnaissance et dans la liaison du sporozoïte à l'hépatocyte (Dundas et al., 2019; Frevert et al., 1993; Shakibaei & Frevert, 1996). Cette liaison induit l'activation des voies de signalisation aussi bien chez le sporozoïte que dans l'hépatocyte favorisant l'invagination du sporozoïte dans la

vacuole parasitaire (Vaughan & Kappe, 2017). Toutefois, les mécanismes exacts de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes ne sont pas encore complètement connus. Une fois à l'intérieur des hépatocytes, les sporozoïtes se différencient en trophozoïtes puis en schizontes pré-érythrocytaires à travers une série de cycle de réplication. Les schizontes contiennent des milliers de mérozoïtes (estimés à 90 000 pour *P. falciparum*) qui sont libérés dans la circulation sanguine lorsque le mérosome, un sac qui les enveloppe, se rompt (Vaughan & Kappe, 2017). Les mérozoïtes hépatocytaires pénètrent rapidement les érythrocytes par endocytose, marquant le début de la phase intraérythrocytaire. Cependant en fonction de l'espèce, certains mérozoïtes peuvent rentrer dans les cellules hépatiques et rester dormants pendant des mois voire des années. C'est le cas de *P. vivax* et *P. ovale* (Picot & Bienvenu, 2022). Ces hypnozoïtes sont responsables des rechutes observées dans le paludisme à *P. vivax*.

III.1.2.2. Phase intraérythrocytaire/cycle asexué

Au cours du cycle intraérythrocytaire, les mérozoïtes se différencient en trophozoïtes puis se développent en schizontes érythrocytaires qui à leur tour libèrent de nouveaux mérozoïtes. Au stade schizonte, le noyau du trophozoïte a subi des séries de divisions successives engendrant plusieurs noyaux fils qui s'entourent de cytoplasme donnant naissance aux mérozoïtes. Ces derniers libérés dans le sang après rupture de la membrane érythrocytaire vont rapidement pénétrer les érythrocytes sains. Entre 16 à 20 mérozoïtes sont produits pendant la schizogonie érythrocytaire comparé à des milliers dans la phase hépatocytaire (Usui & Williamson, 2021). La durée du cycle intraérythrocytaire varie selon les espèces de *Plasmodium* : *P. knowlesi* nécessite seulement 24 h, *P. falciparum* requiert approximativement 48 h, *P. vivax* et *P. ovale* entre 48 h et 72 h et *P. malariae* à la durée la plus longue, 72 h (Sato, 2021). Ce cycle a un impact significatif sur la pathogénicité de chaque espèce (Milner, 2018). Par exemple, la courte durée du cycle de *P. knowlesi* explique en partie la forte parasitémie souvent observée chez les patients infectés (Anstey et al., 2021).

Après plusieurs cycles érythrocytaires et suivant les conditions micro-environnementales du parasite, une petite proportion (moins de 10%) des trophozoïtes se différencie en gamétocytes mâles et femelles préparant le terrain pour la transmission aux moustiques et la poursuite du cycle

de vie (Tadesse et al., 2019). La différenciation des formes asexuées en gamétocytes ainsi que leur biologie seront abordées dans le [chapitre III](#) sur les gamétocytes.

Le cycle de vie de *Plasmodium* implique une interaction complexe de mécanismes entre le vecteur moustique et l'hôte vertébré. Les processus de sporogonie et de schizogonie sont fondamentaux pour la transmission et la pathogenèse du paludisme. Les variations de la durée du cycle intraérythrocytaire entre les différentes espèces de *Plasmodium* jouent un rôle dans leurs manifestations cliniques et les complications distinctes chez les personnes infectées.

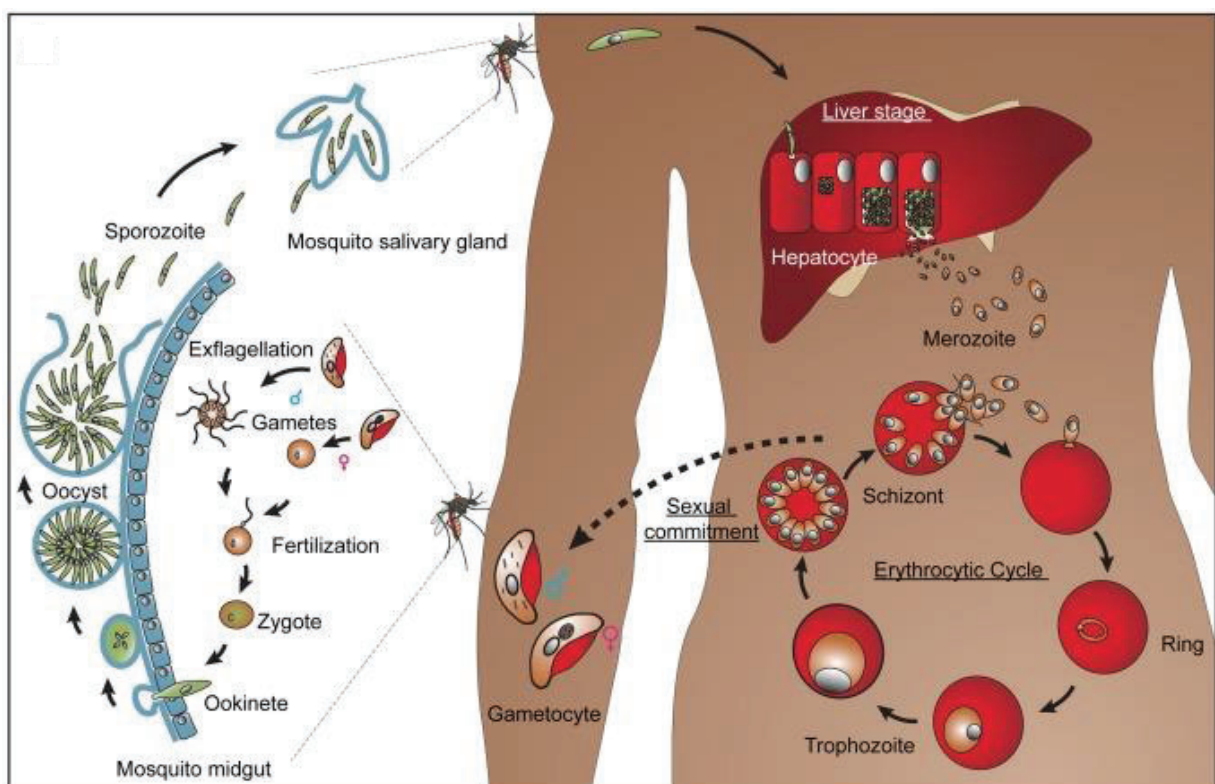


Figure 4: Cycle de vie de *Plasmodium*
(d'après Dixon & Tilley, 2021)

III.2. Métabolisme de *Plasmodium* spp

Plasmodium spp. se caractérise par une croissance rapide et une réplication continue dans les érythrocytes, ce qui suggère la présence d'un métabolisme actif avec d'importants besoins en nutriments. Le parasite s'approvisionne des nutriments essentiels comme des acides aminés, du glucose et des lipides à la fois dans l'érythrocyte qui l'abrite et dans le milieu extracellulaire

(Counihan et al., 2021). Le transport et la gestion efficace des nutriments sont étroitement régulés pour assurer les différents processus métaboliques comme la production d'énergie, la synthèse protéique, la synthèse des nucléotides, le métabolisme lipidique et la synthèse des macromolécules (Ex : glycoprotéines et glycolipides) (Cassera et al., 2011; Ginsburg, 2010; Sherman, 1977; Vial et al., 1990).

III.2.1. Digestion de l'hémoglobine

Pendant la phase érythrocytaire, environ 70 - 80% de l'hémoglobine érythrocytaire est ingéré par le parasite pour fournir les nutriments nécessaires à sa croissance (Francis et al., 1997). Le mécanisme d'ingestion de l'hémoglobine implique une internalisation dans des vésicules dérivées du cytotome, suivie d'une fusion avec la vacuole parasitophore du parasite (Counihan et al., 2021; Lazarus et al., 2008). Dans la vacuole digestive, une succession de réactions protéolytiques, impliquant des protéases aspartiques (les plasmepsines), des protéases à cystéine (la falcipaines), une métalloprotéase (falcilysine) et un pH acide de la vacuole compris entre 5.4 – 5.5, contribuent à la digestion de l'hémoglobine (Banerjee et al., 2002; Goldberg, 2005; Murata & Goldberg, 2003; Rosenthal, 2011). Les plasmepsines I et II initient la protéolyse en clivant l'hémoglobine en hème et en globine.

L'hème ferrique libérée peut servir de source de fer pour la synthèse des protéines contenant du fer, notamment les ribonucléotides réductases, le superoxyde dismutase, les cytochromes ainsi que la biosynthèse de novo de l'hème (Rosenthal et Meshnick, 1996). Par ailleurs, pour neutraliser la réactivité toxique des molécules d'hèmes libres, le parasite les polymérise en biocristaux insolubles appelés hémozoïne. Le processus de formation de l'Hz ainsi que ces différents rôles seront détaillés plus loin dans le [chapitre II](#) de la partie I. La globine, en outre, subit une hydrolyse en peptides et en acides aminés, facilitée par l'action de la falcipaine I et II, de la falcilysine et probablement de la dipeptidylpeptidase I et des aminopeptidases (Murata & Goldberg, 2003; Rosenthal, 2011).

III.2.2. Métabolisme des acides aminés et protéines

Plasmodium est limité dans sa capacité à synthétiser des acides aminés qui entre dans la production des protéines. Il dépend principalement de la dégradation de l'hémoglobine pour obtenir la majorité d'acides aminés dont il a besoin (Counihan et al., 2021; Francis et al., 1997). Cependant, tous les acides aminés essentiels à la réplication du parasite ne sont pas fournis par l'hémoglobine, comme l'isoleucine et la méthionine. Ces derniers sont importés du sérum humain par des voies de transport spécifiques (Counihan et al., 2021; Francis et al., 1997). En outre, certains acides aminés non essentiels peuvent être synthétisés de novo par le parasite en utilisant des précurseurs issus de la glycolyse. Par exemple, le 3-phosphoglycerate est utilisé dans la voie de synthèse de la serine qui elle-même est un précurseur de synthèse d'autres acides aminés comme la glycine et la cystéine (Ginsburg, 2010; Sherman, 1977). Le parasite peut aussi recycler les acides aminés en dégradant les protéines.

Le métabolisme de l'acide aminé est vital pour divers aspects de la survie du parasite, notamment la croissance, la défense antioxydante par le glutathion et la production d'énergie en complément du métabolisme central du carbone.

III.2.3. Métabolisme du carbone central

Le métabolisme du carbone central fait référence à un réseau de voies métaboliques primaire générant non seulement de l'énergie sous forme d'ATP ou de NADH, mais fournissant également les précurseurs pour le métabolisme lipidique, nucléotidique et autres (Ginsburg, 2010; Olszewski & Llinás, 2011).

La glycolyse est la principale voie métabolique et en raison de la nature microaérophile du parasite, la fermentation du glucose en acide lactique est importante (Olszewski & Llinás, 2011). D'autres voies comme, la voie des pentoses phosphate et principalement le cycle de l'acide tricarboxylique sont aussi présentes. Ces voies métaboliques sont rendues possibles par l'ingestion du glucose (principal précurseur) par des transporteurs spécifiques comme le GLUT1 situé sur la membrane érythrocytaire et le *P. falciparum* Hexose transporter (PfHT) situé sur la membrane plasmique du parasite (Jiang, 2022; Olszewski & Llinás, 2011). Par ailleurs, outre le glucose, le

fructose est le seul autre sucre qui peut être utilisé pour les métabolismes. Ceci a été révélé par une étude de cultures *in vitro* en présence de divers sucres. L'étude montre qu'en plus du glucose, seul le fructose permet de maintenir la culture, car assimilable par le parasite (Woodrow et al., 2000).

III.2.4. Métabolisme lipidique

Le parasite se répliquant rapidement, il a besoin d'importante quantité de lipides qui entre dans la biogenèse des structures membranaires. Les voies de synthèses des acides gras, des phospholipides et des lipides ont été identifiées chez le parasite (Tokumasu et al., 2021; Vial et al., 1990). Cependant, le cholestérol qui est l'un des lipides les plus importants chez le parasite ne peut pas être synthétisé de novo. Ce constat a été démontré par des études *in vitro* de synthèse de cholestérol chez *Plasmodium* (Cenedella et al., 1969; Vial et al., 1990) et corroboré par des études génomiques montrant que le *Plasmodium* ne possède pas de gènes codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse du cholestérol (M. J. Gardner et al., 2002; Guggisberg et al., 2014). Par conséquent, le cholestérol aussi bien que les lipoprotéines (High density lipoprotéines (HDL), low density lipoprotéines (LDL)) sont importés du milieu extracellulaire. Le processus de transport et d'utilisation du cholestérol fait encore l'objet de recherches (Maier & van Ooij, 2022). Il est intéressant de noter que des études ont révélé que la voie de synthèse des acides gras chez *Plasmodium* diffère de celle des humains (Tokumasu et al., 2021). Ceci en fait une cible potentielle pour les antipaludiques.

III.2.5. Métabolisme nucléotidique

Chez l'homme les nucléotides purines (adénosine, guanine) et pyrimidine (cytosine, uracile et thymine) peuvent être soit synthétisées de novo ou recyclées à partir de nutriments ou de l'ADN ou l'ARN dégradés. Contrairement à l'homme, *Plasmodium* ne possède que la capacité de synthèse de novo des pyrimidines, tandis que les purines proviennent des voies de recyclage via l'absorption de l'hypoxanthine et aussi de l'adénosine et de la guanosine de l'hôte (Krungkrai & Krungkrai, 2016; Reyes et al., 1982). La synthèse des nucléotides requiert diverses voies métaboliques et divers précurseurs dont quelques-uns proviennent des métabolites d'autres voies et certains sont

importés de l'hôte. Par exemple, le ribose-5 phosphate provenant de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphate sont des précurseurs de la synthèse des purines. Les nucléotides sont indispensables à la réplication du parasite et jouent un rôle essentiel dans la synthèse du matériel génétique (ADN, ARN), la production d'ATP et les processus de signalisation.

Ainsi, le métabolisme de *Plasmodium* est un réseau complexe de voies interconnectées, essentielles à sa survie et sa croissance. Certaines de ces voies sont spécifiques au *Plasmodium*. La bonne compréhension de ces processus pourra fournir des indications très utiles sur les cibles thérapeutiques potentielles pour les antipaludiques du futur. Certaines voies métaboliques sont déjà ciblées par les antipaludiques actuels, comme les inhibiteurs de la voie de synthèse des pyrimidines. L'atovaquone est un antipaludique inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), enzyme clé de la synthèse des pyrimidines (Boschi et al., 2019; Cassera et al., 2011). À mesure que les recherches se poursuivent, la découverte de voies métaboliques spécifiques au *Plasmodium* pourrait permettre la mise en place de nouvelles approches thérapeutiques.

IV. Paludisme et clinique

IV.1. Physiopathologie

La compréhension de la physiopathologie du paludisme nous entraîne dans un réseau complexe d'interactions moléculaires, de réponses immunitaires et de mécanismes cellulaires, dans lequel l'astucieux *Plasmodium* orchestre sa symphonie pathogène au sein de l'hôte humain. Dans cette partie, nous nous intéresserons aux mécanismes qui régissent la progression de l'infection vers le paludisme symptomatique, en explorant les facteurs du parasite qui interviennent et l'activation du système immunitaire.

Le *Plasmodium* contient divers facteurs activateur de la réponse immune de l'hôte, du stress oxydatif et de l'activation des cellules endothéliales qui libérés dans le sang lors de la schizogonie conduise à des pathologies du paludisme de divers degré de gravité (Milner, 2018; Moxon et al., 2020). L'un des principaux facteurs de virulence est l'Hz. L'Hz agit comme un facteur pyrogène activateur de la réponse immunitaire et déclenchant la production de médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines et chimiokines. Des études ont montré que l'Hz est

impliquée dans la modulation du système immunitaire, dans le dysfonctionnement des cytokines et dans l'inhibition de l'érythropoïèse engendrant une anémie sévère (Awandare et al., 2011; Bobade et al., 2019; Eugenin et al., 2019; Olivier et al., 2014; Skorokhod et al., 2010). En effet, la phagocytose de l'Hz par les monocytes peut induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires qui modulent le système immunitaire. Les impacts de l'Hz sur la physiologie humaine ne sont certainement pas tous mis en évidence et il faudra davantage de recherches en ce sens. L'interaction entre le parasite, l'Hz et le système immunitaire influe ainsi sur la gravité de la maladie (Pham et al., 2021).

Outre, l'Hz, l'hème libre libérée par suite de l'hémolyse produit des espèces réactives de l'oxygène qui induisent le stress oxydatif et une réponse pro-inflammatoire (Vasquez et al., 2021). D'autres facteurs dérivés du parasite comme les glycosylphosphatidylinositols (GPI) participent aussi à l'établissement et à la progression de la pathologie liée au paludisme. Les GPIs sont des glycolipides présents dans la membrane cellulaire des parasites. Ils provoquent des paludismes graves en induisant la production d'oxyde nitrique, de facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interleukine-1 par les macrophages et aussi l'activation de cellules endothéliales (Kapoor et al., 2018; Naik et al., 2000).

L'adhésion des érythrocytes à la paroi endothéliale est un autre aspect de la pathogenèse du paludisme. Les parasites expriment diverses protéines de surface, dont les adhésines (Esslinger et al., 1994). Le plus connu est le *P. falciparum* érythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) qui est impliquée dans la cytoadhérence de *P. falciparum* aux cellules endothéliales et à leur séquestration dans les tissus comme le foie ou la rate (Milner, 2018; Wahlgren et al., 2017). Ce mécanisme en plus de la formation de cluster d'érythrocytes médiée par la présence de knobs à la surface des érythrocytes infectés provoque une obstruction des microvaisseaux, une activation des cellules endothéliales engendrant la libération de cytokines pro-inflammatoires (Milner, 2018; Moxon et al., 2020). Parmi les adhésines de *P. falciparum* que sont le histine rich protéin 2 (HRP2), le Rings érythrocyte surface antigen (RESA) et le *Pf* érythrocyte membrane protein (PfEMP 1 et 2), les RESA participent à l'augmentation de la sécrétion des cytokines entraînant une augmentation de l'inflammation (Bourée, 2006; Picot et al., 1993). Ce mécanisme de cytoadhérence est spécifique à *P. falciparum* et est associé aux manifestations graves observées dans le paludisme à *P. falciparum*.

Donc, l'activation de cellules endothéliales et la libération simultanée de cytokines et chimiokines contribuent à l'aggravation du paludisme en particulier dans les infections à *P. falciparum* (Milner, 2018; Moxon et al., 2020).

IV.2. Signes cliniques

Les signes cliniques du paludisme sont divers allant des formes légères aux formes graves, en fonction des facteurs comme l'espèce plasmodiale en cause de l'infection et l'immunité de l'hôte. Nous présenterons les diverses manifestations cliniques qui découlent de la pathologie (Figure 5) et discuterons du paludisme asymptomatique.

La phase primaire de l'accès est caractérisée par la fatigue et les nausées. Cette phase précède l'accès palustre simple et correspond à l'inoculation et à la multiplication des parasites jusqu'à ce que leur densité clinique soit atteinte (Balaji et al., 2020a; Bourée, 2006; Mouchet, 2004). Cette densité dépend entre autres de l'immunité des sujets. Ainsi, les signes cliniques peuvent apparaître au-delà d'une densité estimée à 50 parasites/ μl chez les sujets non prémunis comparée à 10.000 parasites/ μl chez les sujets ayant eu plusieurs épisodes palustres. Ceci s'explique par le fait qu'ils ont acquis une immunité leur permettant de tolérer des charges parasitaires élevées (White, 2017).

IV.2.1. Paludisme simple non compliqué

L'accès simple est marqué par les épisodes de fièvres qui surviennent tous les trois ou quatre jours en fonction de l'espèce plasmodiale. L'apparition des signes cliniques coïncide avec le cycle de division parasitaire durant la schizogonie ou les mérozoïtes libérés vont infecter des hématies sains (Bourée, 2006; Mouchet, 2004; Yombi & Olinga, 2015). Ces épisodes se caractérisent par des frissons suivis d'une fièvre allant à 40°C, des maux de tête puis d'un moment de sudation et de fatigue générale. Ces paroxysmes sont souvent accompagnés de douleurs musculaires, des troubles gastro-intestinaux, de nausée et de vomissement. La lyse des hématies peut quant à elle conduire à l'apparition d'anémie.

À mesure que la maladie progresse, et en absence de traitement rapide et efficace, les patients peuvent développer des complications potentiellement mortelles, en particulier en cas d'infection à *P. falciparum*. Chez les enfants de moins de 5 ans, les personnes immunodéprimées ou les personnes non immunisées, le développement vers la forme grave peut être brutal compte tenu de leur immunité faible.

IV.2.2. Paludisme grave /sévère

Les complications du paludisme sont en effet une évolution de la pathologie touchant les organes ; notamment le cerveau (paludisme cérébral), le foie (jaunisse et dysfonctionnement hépatique), les poumons (détresse respiratoire), les reins (lésions rénales aiguës) et le sang (anémie sévère) (Balaji et al., 2020a; Bourée, 2006; Mouchet, 2004).

Le paludisme cérébral ou neuropaludisme compte pour plus de 50 % des complications (Balaji et al., 2020b). Les causes et les mécanismes précis impliqués sont toujours en cours d'investigations. Néanmoins, des études soulignent la séquestration des globules rouges infectés dans les microvaisseaux cérébraux comme facteur clé responsable du paludisme cérébral. Cette séquestration est associée à une forte réponse immunitaire, à une perméabilité accrue de la barrière hématoencéphalique et à une infiltration et/ou activation des leucocytes. L'interaction de ces derniers peut entraîner une hypoxie cérébrale et une altération du flux sanguin dans le cerveau contribuant à l'apparition des signes cliniques (Milner, 2018; Moxon et al., 2020). Ces signes se manifestent par des convulsions, une perte de conscience et d'autres anomalies neurologiques. Les complications peuvent entraîner le coma et la mort. Les enfants de moins de 5 ans dans les zones endémiques sont les plus vulnérables au paludisme cérébral. Des facteurs tels que l'immaturation de leur système immunitaire, et l'absence d'immunité acquise peuvent contribuer à leur vulnérabilité. En outre, l'immaturation de leur barrière hématoencéphalique peut être un facteur favorable à la séquestration des parasites et à l'augmentation de l'inflammation dans le cerveau (Balaji et al., 2020b; Milner, 2018; Moxon et al., 2020).

Tout comme les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes sont vulnérables au paludisme sévère dû en partie au niveau de performance diminué de leur système immunitaire. Parmi les facteurs qui influencent le paludisme gestationnel, les femmes enceintes subissent une

modulation de leur système immunitaire les prédisposant aux formes graves du paludisme (Balaji et al., 2020b; Milner, 2018). Par ailleurs, le paludisme placentaire est la conséquence de la cytoadhérence et de l'accumulation d'érythrocytes parasités dans le placenta (Aitken & Rogerson, 2022; Salanti et al., 2004). Cette cytoadhérence est médiée par la présence d'un variant d'antigène de surface appelé VAR2CSA (Salanti et al., 2004). Ces derniers se fixent à leur récepteur, la chondroïtine sulfate A, présente sur les cellules du placenta. Ainsi, cette séquestration d'érythrocytes parasités dans le placenta peut provoquer une inflammation et des lésions, entraînant des complications pour la mère et le fœtus, telles qu'une anémie chez la maman, un retard de croissance fœtal, une naissance prématurée et une mortalité (Balaji et al., 2020b; Milner, 2018; Moxon et al., 2020). Ceci explique l'importance de la bonne prise en charge et la nécessité d'intervention ciblée dans le contrôle du paludisme chez les femmes enceintes et les enfants.

IV.2.3. Paludisme asymptomatique

Le paludisme asymptomatique se caractérise par l'absence de signes cliniques malgré la présence et la réplication du parasite chez l'homme (Galatas et al., 2016). Bien que les mécanismes précis ne soient pas encore complètement compris, des études ont mis en évidence des facteurs clés associés au paludisme asymptomatique.

Les caractéristiques des espèces plasmodiales telles que leurs facteurs de virulence peuvent influencer le développement du paludisme asymptomatique. Différentes espèces de *Plasmodium* ont des capacités distinctes à échapper au système immunitaire et à moduler leurs interactions avec l'hôte. C'est l'exemple de *P. falciparum* avec sa propriété de cytoadhérence ou encore de *P. vivax* qui a une propension aux rechutes à travers ses hypnozoïtes (Galatas et al., 2016).

L'immunité de l'hôte et les facteurs génétiques jouent aussi un rôle important dans le développement du paludisme asymptomatique. Les personnes vivant dans des régions endémiques développent une immunité dite de prémunition contre le paludisme dû à l'exposition répétée au parasite. Cette immunité semble éviter l'apparition de signes cliniques (Bachmann et al., 2019; Doolan et al., 2009). Par ailleurs, des variations génétiques dans des séquences codant pour les

protéines de réponse immunitaire peuvent être associées à des différences de sensibilité au paludisme et au développement d'infections asymptomatiques (Guimarães et al., 2018).

Les conditions environnementales et l'intensité de la transmission du paludisme peuvent impacter l'apparition du paludisme asymptomatique. Dans les zones ou pendant les saisons de faible transmission, où les personnes sont moins exposées aux moustiques infectés, une plus grande proportion d'infection peut être asymptomatique. Ceci peut s'expliquer par une charge parasitaire plus faible et une réponse immunitaire plus modérée chez les personnes ayant déjà été exposées fréquemment et bénéficiant d'une immunité partielle (B. P. Gonçalves et al., 2017; Tadesse et al., 2018).

Le paludisme asymptomatique influe considérablement sur la transmission et l'élimination du paludisme. En effet les personnes asymptomatiques présentent une densité parasitaire faible souvent en dessous des limites de détection des méthodes traditionnelles de diagnostic, ce qui rend leur identification et leur traitement difficiles. Par conséquent, ils servent de réservoir pour le parasite et contribuent à sa transmission continue au sein de la population. Des études ont montré que la prévalence des gamétocytes était plus élevée chez les sujets asymptomatiques que symptomatique (Nguiragool et al., 2017; Tadesse et al., 2017; Touray et al., 2021). Cela souligne l'importance de cibler les porteurs sains pour des approches efficaces de contrôle et d'élimination du paludisme.

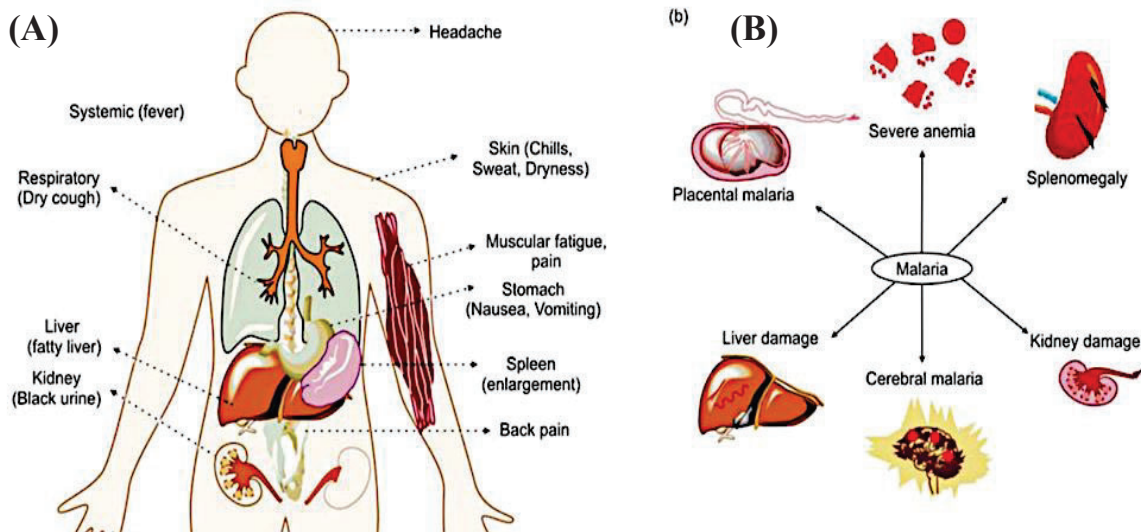


Figure 5: Symptômes cliniques et pathologies associées au paludisme dans différents organes humains
 (A) Symptômes les plus courants chez l'homme pendant le paludisme et (B) Le paludisme cause des dommages et affecte la physiologie des principaux organes de l'hôte. (d'après Balaji et al. 2020)

IV.3. Diagnostic du paludisme

Le diagnostic précis et rapide du paludisme revêt une importance fondamentale pour la lutte contre le paludisme. Il est un volet essentiel de la gestion et du contrôle du paludisme. Plusieurs techniques de diagnostic du paludisme sont disponibles. Elles comprennent des techniques directes telles que la microscopie ou la cytométrie en flux et les techniques indirectes comme les tests de diagnostic rapide (TDR) et les tests moléculaires (PCR, LAMP). Chaque méthode a ses avantages et ses limites, ce qui influence son applicabilité dans différents contextes. Nous passons ici en revue les différentes techniques de diagnostic du paludisme, leurs atouts et leurs limites en vue d'identifier les améliorations potentielles pour un diagnostic plus efficace du paludisme.

Parmi les méthodes directes, la microscopie reste la méthode standard pour le diagnostic du paludisme. Elle sert de référence pour la mise au point d'une nouvelle méthode de diagnostic. Le principe repose sur l'identification du *Plasmodium* dans un frottis sanguin ou une goutte épaisse coloré au GIEMSA. Cependant, cette méthode nécessite des microscopistes qualifiés capables de détecter et d'identifier avec précision les espèces plasmodiales sur la base de caractéristiques morphologiques spécifiques. Ce qui demande du temps d'analyse et est souvent sujet à des erreurs.

La limite de détection élevée (50-100 parasites/ μ l) et parfois la formation insuffisante des microscopistes conduits à des faux négatifs et erreurs d'identification des espèces (L. Slater et al., 2022; Tangpukdee et al., 2009). Afin d'améliorer cette méthode et de réduire les erreurs humaines, des techniques de coloration fluorescente telles que « Quantitative buffy coat (QBC) » ont été développées. Elle utilise un intercalant fluorescent, l'acridine orange qui se fixe sur l'ADN du parasite. La fluorescence en bleu de l'ADN est détectée sous microscope à fluorescence. Bien que cette technique soit efficace, il peut y avoir des interférences avec les ADN de l'hôte (Guy et al., 2007). Le « QBC » n'a pas été un succès commercial.

La cytométrie en flux est une méthode de diagnostic efficace et précis du paludisme (Picot et al., 2022). Elle combine les propriétés de fluorescence et de diffusion de la lumière pour détecter les érythrocytes infectés. Cependant, le coût associé à cette méthode est un frein pour son utilisation à grande échelle dans les pays endémiques.

En revanche, les tests de diagnostic rapide (TDR) sont largement utilisés dans les régions endémiques en raison de la rapidité de leurs résultats, généralement disponibles dans les 15 à 20 minutes, ainsi que de leur coût abordable. Les TDRs sont des tests immunochromatographiques ciblant des antigènes spécifiques de *Plasmodium* comme l'antigène HRP II (Histidine Rich Protein) ou LDH (Lactate déshydrogénase). Bien que les TDRs soient rapides et faciles à utiliser, la majorité ne permet pas l'identification des espèces plasmodiales. Par ailleurs, ils présentent des limites de détection élevée (supérieur à 200 parasites/ μ l) (L. Slater et al., 2022; Tangpukdee et al., 2009). L'une des menaces actuelles des TDRs est l'émergence des délétions du gène PfHRP II/III du *P. falciparum*, sachant qu'environ 80% des TDRs sont basés sur la détection de l'antigène HRP II (World Health Organization, 2022)

Les tests moléculaires sont les plus sensibles et les plus spécifiques avec une limite de détection parfois inférieure à 1-5 parasite/ μ l. Cependant, la PCR est confrontée aux problèmes de mutations génétiques. Une modification dans la séquence génique spécifiquement reconnue par les amorces aura un impact conséquent sur la performance du test.

La technique LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification) offre une approche moléculaire alternative avec une sensibilité similaire à la PCR (Tambo et al., 2018). Cette technique utilise le principe d'amplification de l'ADN. La différence avec la PCR réside dans la

méthode d'amplification de l'ADN. La PCR utilise la méthode classique d'amplification avec deux températures tandis que le LAMP amplifie l'ADN par déplacement de brin à température unique. Cela permet un temps d'exécution plus court, 30 min environ contrairement à 1 h pour la PCR. Elle est facile à réaliser et a une exigence simplifiée en matière d'équipement. Cette technique pourra être adaptée pour une utilisation de routine (Picot et al., 2020; Ponce et al., 2017).

Si les tests sérologiques peuvent indiquer des infections antérieures, ils sont très peu utilisés dans le diagnostic du paludisme. L'IFA (immunofluorescence Antibodies) est l'une de ces techniques qui ciblent spécifiquement les anticorps parasitaires. Par contre, elle requiert du temps et nécessite du matériel coûteux ainsi qu'un personnel qualifié (L. Slater et al., 2022; Tangpukdee et al., 2009).

Il existe d'autres techniques comme la spectrométrie de masse et d'autres basées sur les propriétés physico-chimiques de l'Hz. Ces méthodes sont encore au stade expérimental.

Les différentes méthodes de diagnostic du paludisme offrent des avantages et des inconvénients différents. La sélection de ces méthodes est fonction du contexte et des ressources disponibles. Parmi tous ces outils de diagnostic, la microscopie et les TDRs sont plus souvent utilisés en routine dans les zones endémiques tandis que les tests moléculaires offrent une sensibilité et une spécificité plus élevées pour des laboratoires bien équipés (Oyegoke et al., 2022; Tangpukdee et al., 2009). Les recherches en cours et les progrès des technologies de diagnostic sont essentiels pour répondre à la nécessité croissante de détecter les infections asymptomatiques et les réservoirs cachés du parasite. Une nouvelle génération de méthodes de diagnostic très précises, rapides et pratiques est nécessaire.

IV.4. Prise en charge du paludisme

Le traitement rapide et efficace du paludisme est essentiel pour réduire la morbidité et la mortalité liées à cette maladie. Les stratégies de traitement du paludisme ont évolué au fil du temps, en tenant compte de facteurs tels que la gravité de l'infection, la présence de parasites résistants et l'espèce de *Plasmodium* à l'origine de la maladie. Cette partie traite des approches actuelles du traitement du paludisme, y compris l'utilisation de combinaisons thérapeutiques à base

d'artémisinine (ACT), la gestion des cas simples et graves et les défis posés par la résistance aux antipaludiques.

Au début des années 2000, les ACT ont été adoptées en raison des échecs thérapeutiques et de la prédisposition des monothérapies à l'émergence des résistances. Les ACT associent un dérivé de l'artémisinine à un autre médicament, dont la demi-vie est généralement plus longue afin d'améliorer l'efficacité du traitement et de prévenir le développement de résistance. Les ACT sont le traitement de première intention du paludisme non compliqué à *P. falciparum*. Ces combinaisons sont généralement administrées par voie orale en dose unique journalière, ce qui favorise le respect de la posologie. Différentes ACT sont disponibles, et le choix adéquat dépend de divers facteurs tels que la performance globale de la combinaison en termes d'efficacité, de tolérance et de sécurité), la prévalence régionale des espèces plasmodiales et leur profil de résistance aux médicaments. Ce profil de résistance peut varier en fonction des régions et de l'espèce plasmodiale. En parallèle, la prise en compte de la prévalence des espèces plasmodiales dans une région donnée me semble importante, car certaines espèces peuvent présenter une sensibilité ou une résistance distincte vis-à-vis d'une ACT donnée. Par conséquent, l'adéquation du traitement à ces facteurs semble essentielle pour assurer une meilleure efficacité du traitement et réduire le risque de propagation de la résistance aux médicaments. En réponse à cette complexité, L'OMS émet des recommandations des ACT spécifiques pour différentes régions. Ces recommandations sont régulièrement examinées et actualisées en fonction des dernières preuves disponibles. Quelques exemples d'ACT couramment utilisées :

- artésunate combiné à la sulfadoxine-pyriméthamine, à l'amodiaquine ou à la méfloquine,
- arthemeter-luméfántrine,
- dihydroartémisinine-pipéraqúine,
- artésunate- pyronaridine

En Afrique subsaharienne, l'artemeter-Luméfántrine et l'artésunate-amodiaquine sont les plus utilisés.

IV.4.1. Traitement du paludisme non compliqué

Les ACT sont utilisées dans le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum*. Le traitement consiste en une cure d'au moins trois jours. Le traitement du paludisme causé par *P. vivax*, et *P. ovale* inclut une addition de primaquine ou de tafenoquine aux ACT pour le traitement des hypnozoïtes afin de prévenir les rechutes. Toutefois, l'utilisation de la primaquine est limitée en raison de son potentiel à provoquer l'hémolyse chez les patients présentant un déficit en G6PD. En outre, son utilisation n'est pas recommandée chez les femmes enceintes ou allaitantes et les enfants de moins de six mois (World Health Organization, 2022).

IV.4.2. Traitement du paludisme grave/sévère

En cas de complication, l'artésunate intraveineux est administré en intra-veineux (IV) à la dose de 2.4 mg/kg à l'admission, à 12 h et à 24 h puis 2.4 mg/kg 1 fois toutes les 24 h suivie d'une cure complète ACT pendant trois jours (WHO Guidelines for Malaria, 2022).

Chez les enfants de moins de six ans atteints d'un paludisme sévère et vivant en zone reculée où l'accès aux établissements de santé est limité, il est recommandé d'administrer un traitement initial à base d'artésunate par voie rectale jusqu'à ce qu'un traitement par voie intraveineuse soit disponible (de Carvalho et al., 2021). Allant dans le même sens, l'administration intranasale d'artésunate est également en cours d'exploration comme option de traitement avant le transfert des enfants (Kouakou et al., 2022).

IV.4.3. Traitement des formes sexuées

Les antipaludiques couramment utilisés en routine sont spécifiquement efficaces sur les parasites asexués et pas sur les gamétocytes, responsables de la transmission du paludisme. L'artémisinine ne semble efficace que sur des stades jeunes de gamétocytes (Dinko et al., 2023; WWARN Gametocyte Study Group, 2016). Pour une activité gamétocytocide complète, les 8-aminoquinoline (Ex :primaquine) sont nécessaires, car efficaces sur les formes matures de gamétocytes (Price et al., 1996).

Les traitements du paludisme ne cessent de se perfectionner pour faire face à la résistance et au besoin d'interrompre la transmission. Les ACT sont actuellement le pilier du traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* et les cas graves nécessitent de l'artésunate par voie intraveineuse suivi d'un traitement ACT complet. Les défis posés par la résistance aux dérivés d'artémisinine ainsi qu'à certaines de ses molécules partenaires sont un grand handicap pour l'élimination du paludisme. Par ailleurs, ceci souligne la nécessité de poursuivre les recherches et le développement de nouvelles stratégies de traitement du paludisme. Le développement de nouvelles combinaisons thérapeutiques à base de molécules autres que l'artémisinine semble important pour freiner la résistance. L'idéal serait de disposer de molécules efficaces sur tous les stades parasitaires, sur les souches résistantes et sur l'ensemble des espèces de *Plasmodium* humain. Des molécules prometteuses telles que la ganaplacide (KAF156) et la cipargamine (KAE609) sont en cours de développement clinique, ce qui laisse espérer une amélioration du traitement du paludisme à l'avenir. La ganaplacide sur laquelle repose ce travail de thèse a montré des résultats prometteurs lors d'études cliniques de phase I et II. Son entrée en phase III a été approuvée en 2022 (<https://www.mmv.org/news/novartis-and-medicines-malaria-venture-announce-decision-move-phase-3-study-novel>).

IV.5. Prévention et surveillance

Le paludisme est une interaction entre le moustique vecteur, le parasite et l'homme. Pour lutter contre la maladie, les stratégies de prévention et de contrôle du paludisme impliquent trois éléments interconnectés : la lutte antivectorielle (moustique-parasite), les mesures antiparasitaires (homme-parasite) et la vaccination (OMS, 2021; *WHO Guidelines for Malaria*, 2022). Ces mesures visent à réduire et à prévenir l'incidence du paludisme tout en limitant les cas graves. Cette section aborde les différentes stratégies employées et leur importance dans la prévention des cas de paludisme ainsi que les conséquences sur les populations touchées.

IV.5.1. Mesures antivectorielles

La lutte antivectorielle se concentre sur la prévention des piqûres de moustiques et la réduction des populations de moustiques incluant les stades larvaires. À l'échelle individuelle,

L'utilisation de moustiquaire imprégnée d'insecticide et des sprays d'insecticide intra-domiciliaire sont recommandés par l'OMS (*WHO Guidelines for Malaria*, 2022). En outre, d'autres méthodes telles que, les rideaux imprégnés, et les grillages aux portes et fenêtres peuvent contribuer à prévenir les piqûres de moustique. À l'échelle communautaire, des mesures antilarvaires ont été mises en œuvre. Elles impliquent l'élimination des sites de reproduction des larves par le biais de mesures comme le drainage des eaux stagnantes, le désherbage et l'utilisation des larvicides. Outre les méthodes chimiques, des approches biologiques utilisant des poissons larvivores et des bactéries telles que *Wolbachia* sont explorées pour contrôler les larves de moustiques. Cependant, la lutte antilarvaire est de moins en moins réalisée par les communautés locales (Guillaume Zango et al., 2023). Le développement de la résistance des moustiques aux insecticides, notamment ceux à base de pyréthroïde couramment utilisés dans la lutte antivectorielle, constitue un défi de taille (Enayati et al., 2020; Orondo et al., 2021; Susanna & Pratiwi, 2021).

IV.5.2. Mesures antiparasitaires

La lutte antiparasitaire intervient directement sur le parasite chez l'homme. Elle implique la chimioprophylaxie et le traitement préventif du paludisme en zone endémique.

IV.5.2.1. La chimioprophylaxie

La chimioprophylaxie est administrée aux personnes non immunes, ou à celles qui se rendent dans une zone endémique en provenance d'une zone non endémique. Elle consiste à prendre un antipaludique de prévention à intervalles réguliers afin de prévenir le développement des parasites et l'apparition de symptômes. Le traitement recommandé dépend du pays de destination, de la saison, de la durée du séjour et des risques individuels. L'atovaquone-proguanil (Malarone) est le plus utilisé compte tenu de son efficacité, mais coûte cher. La doxycycline est aussi recommandée dans les régions où la résistance à la chloroquine est présente, mais elle n'est pas adaptée aux femmes enceintes et aux enfants de moins de 8 ans en raison de ses effets secondaires. La méfloquine n'est presque plus utilisée en raison de sa toxicité. La primaquine s'utilise pour prévenir l'infection à *P. vivax*. Récemment, la tafénoquine a été approuvée pour son

utilisation en chimioprophylaxie sauf chez les enfants de moins de 16 ans et les personnes déficientes en G6PD (Berman, 2019; DeVos & Dunn, 2023).

Cependant, le coût lié au traitement (consultations et prix des antipaludiques) peut être un obstacle pour certaines personnes, en particulier dans les pays tels que la France où les antipaludiques en prévention ne sont pas pris en charge par l'assurance maladie. Ce qui peut entraîner une faible adhésion au traitement et augmenter le risque de paludisme d'importations. D'autres facteurs comme la complexité de certains schémas thérapeutiques, les effets secondaires des médicaments, le motif et la durée du voyage ou encore l'âge du voyageur peuvent entraver le respect de la chimioprophylaxie (Ahluwalia et al., 2020; Rodrigo et al., 2020; Walz et al., 2019). Ces facteurs ajoutés au fait que la résistance à certains antipaludiques peut varier en fonction des régions géographiques et de l'espèce plasmodiale sont quelques limites de l'efficacité de la chimioprophylaxie.

IV.5.2.2. Les traitements préventifs

Dans les zones endémiques, le traitement préventif consiste en un schéma thérapeutique complet administré à intervalle régulier de temps, généralement entre 4 et 6 semaines, afin de traiter des infections résiduelles et prévenir de nouvelles. Différentes mesures de traitement préventif ont été mises en place en fonction de la population cible et des conditions saisonnières (*WHO Guidelines for Malaria*, 2022).

IV.5.2.2.1. Le traitement préventif intermittent (TPI) chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes

Le traitement préventif intermittent est recommandé dans les zones de transmission modérée à élevée. En Afrique subsaharienne, le TPI a permis de réduire la mortalité et la morbidité dues au paludisme, en particulier dans les populations à risque telles que les femmes enceintes et les enfants. Le TPI a contribué à une réduction de 30% des cas cliniques de paludisme chez les enfants selon une étude de 2009 (Aponte et al., 2009). La sulfadoxine-pyrimétamine (SP) est actuellement le médicament recommandé pour le TPI, le schéma thérapeutique variant en fonction

de la population traitée. Chez les enfants et les nourrissons, la dose est dépendante du poids alors que chez la femme enceinte, elle est fonction de la durée gestationnelle. La recommandation récente de l’OMS concernant la posologie est d’au moins trois doses de SP à partir du deuxième trimestre de la grossesse.

IV.5.2.2.2. Le traitement préventif intermittent chez les enfants d’âge scolaire

Les enfants d’âge scolaire courent un risque élevé d’infection palustre et de complications cliniques connexes dont l’anémie. Par ailleurs, ils contribuent à la transmission du paludisme et constituent des réservoirs de parasites alimentant la chaîne de transmission (Coalson et al., 2016, 2018; Cohee et al., 2020, 2021). Le risque de prévalence du paludisme dans cette population est estimé à plus de 50 % (Cohee et al., 2021). Tout ceci montre la part non négligeable de cette population dans l’incidence du paludisme alors qu’elle a été longtemps écartée dans les stratégies intermittentes de traitement préventif. Ainsi l’OMS recommande, dorénavant un traitement préventif intermittent chez les enfants d’âge scolaire (5 à 15 ans). Diverses études évaluant l’efficacité du traitement ont été réalisées et ont confirmé une protection significative contre l’infection palustre et l’anémie dans ce groupe d’âge (Cohee et al., 2020, 2021; Maiga et al., 2020).

IV.5.2.2.3. Le traitement préventif saisonnier du paludisme

Initialement recommandé en 2012 chez les enfants de 3 à 59 mois, le traitement préventif saisonnier du paludisme de l’anglais « seasonal malaria chemoprevention (SMC) » implique l’administration des doses de SP et d’amodiaquine pendant les saisons de forte transmission du paludisme dans les zones endémiques, principalement en Afrique Subsaharienne. Le traitement recommandé à l’origine consistait à administrer quatre doses maximum à intervalle mensuel pendant une saison de transmission élevée (World Health Organization, 2012b). Cependant, ce schéma de traitement peut varier en fonction des paramètres individuels tels que le poids de l’enfant ainsi que des spécificités géographiques. Une étude récente suggère que les quatre doses peuvent être insuffisantes pendant les saisons allongées (M. Xu et al., 2023). Encore faut-il déterminer la durée moyenne et la durée allongée des saisons. Cette réflexion s’inscrit dans un

contexte où la transmission élevée varie considérablement d'une région à l'autre, nécessitant ainsi une approche flexible pour répondre aux besoins spécifiques. Ainsi, il est important de souligner que les préconisations ne sont pas figées, mais évoluent en fonction de l'examen constant des données scientifiques, des contextes locaux et des besoins. Ces ajustements tiennent compte de l'objectif d'optimiser l'efficacité du SMC en garantissant l'antipaludique adapté et la dose adéquate.

Le traitement préventif saisonnier du paludisme s'est avéré efficace pour réduire les cas cliniques chez les enfants avec une efficacité protectrice de 88 % observée sur 28 jours. La mise en œuvre du SMC au Burkina Faso et en Gambie a contribué à réduire respectivement de 42 % et 56 % le nombre de décès dus au paludisme dans les hôpitaux pendant les périodes de forte transmission (ACCESS-SMC Partnership, 2020).

IV.5.2.2.4. L'administration de masse d'antipaludique

L'administration de masse d'antipaludique de l'anglais "Mass Drug Administration (MDA)" vise à réduire la prévalence du paludisme en administrant des antipaludiques à l'ensemble d'une population. Selon l'OMS, la MDA peut être envisagée dans des régions approchant l'élimination du paludisme, dans les régions à faible transmission du paludisme et pour réduire la transmission de *P. vivax* (*Updated WHO Recommendations for Malaria Chemoprevention and Elimination*, 2022). Bien qu'efficace, la mise en œuvre de la MDA peut s'avérer contraignante en raison de contraintes logistiques et opérationnelles. L'OMS a mis en place un document avec des recommandations pratiques pour sa mise en œuvre (*Mass Drug Administration for Falciparum Malaria*, 2017).

IV.5.2.2.5. Le traitement préventif du paludisme après la sortie de l'hôpital chez les enfants

Le traitement préventif du paludisme après la sortie de l'hôpital est une stratégie de prévention du paludisme chez les enfants ayant reçu un traitement contre l'anémie sévère. Malgré leur rétablissement, ces patients courent le risque de réadmission et de mortalité (Madrid et al., 2019). L'OMS recommande ce traitement préventif en zone endémique afin de réduire la

réinfection et la réadmission de ces enfants vulnérables (*Updated WHO Recommendations for Malaria Chemoprevention and Elimination*, 2022).

Les différentes approches du traitement préventif contribuent ensemble à la réduction du paludisme. Cependant, les résistances à la sulfadoxine-pyrimétamine (SP) généralement utilisée en traitement préventif posent une réelle menace pour l'efficacité des mesures. De ce fait, le contrôle et le suivi de l'efficacité de ces stratégies à base de SP sont nécessaires ainsi que la recherche de nouvelles approches thérapeutiques. Par ailleurs, la prévention vaccinale se positionne comme étant une mesure efficace pour la prévention et la lutte contre l'élimination du paludisme.

IV.5.3. Prévention vaccinale

L'OMS a validé en 2021, l'administration du vaccin Mosquirix chez les enfants âgés de 5 mois et plus vivants en zone de moyenne et de forte transmission du paludisme (World Health Organization, 2021). Le schéma vaccinal consiste en une prise de quatre doses. Ce vaccin efficace seulement sur le *P. falciparum* a donné des résultats prometteurs durant les études pilotes. Il a été rapporté que le vaccin peut apporter une efficacité de plus de 47% contre le paludisme simple à grave dans les 12 mois suivants la troisième dose, avec une diminution progressive jusqu'à 46 mois après la troisième dose. Une quatrième dose de rappel permet d'accroître l'efficacité (Björkman et al., 2023; Nadeem et al., 2022; Syed, 2022).

La prévention et la surveillance sont importantes dans la lutte contre le paludisme. Les mesures antivectorielles et antiparasitaires, qui englobent le traitement préventif, la chimioprophylaxie et la vaccination contribuent de manière significative à la réduction de la morbidité et de la mortalité dues au paludisme. Il convient toutefois de faire face à des enjeux comme les résistances aux insecticides et aux antipaludiques ainsi que l'accès des populations à ces mesures. Par ailleurs, le diagnostic rapide et précis suivi d'un traitement rapide et adapté devra être facilement accessible afin de limiter la transmission et les cas graves de paludisme. Une approche globale et intégrée associée à l'éducation et à l'engagement communautaire est aussi importante pour atteindre les objectifs d'élimination du paludisme.

V. La résistance de *Plasmodium* aux antipaludiques

La résistance peut se définir par une survie ou une multiplication des parasites malgré l'administration et l'absorption d'un antipaludique à des doses définies, létales pour le parasite (*WHO Guidelines for Malaria*, 2022). L'émergence de parasites résistants résultant de l'utilisation a entraîné une diminution de l'efficacité de médicaments antipaludiques autrefois efficace. Dans cette partie, nous discuterons des causes et mécanismes de la résistance, son impact sur la lutte contre le paludisme et les mesures pour la contrer.

V.1. Les causes de la survenue d'une résistance

L'utilisation massive des antipaludiques dans la lutte contre le paludisme a conduit à l'émergence des parasites résistants (Ippolito et al., 2021; Klein, 2013; Menard & Dondorp, 2017; Ross & Fidock, 2019). Ainsi les divers antipaludiques tels que la chloroquine, la sulfadoxine-pyriméthamine et récemment les dérivées d'artémisinine ont vu leur efficacité diminuée après des années d'utilisation. Ce phénomène est attribué à la combinaison d'au moins deux facteurs que sont la pression de sélection et de la transmission de parasites résistants. En effet, lorsqu'une population importante de parasites est exposée à une pression médicamenteuse, les parasites sensibles sont éliminés, ce qui permet la transmission et la prolifération des parasites résistants survivants (Aminake & Pradel, 2013; Menard & Dondorp, 2017).

V.2. Mécanismes moléculaires de résistance

La résistance résulte de mutations génétiques spontanées de gènes spécifiques qui confèrent différents types de résistance. Celles-ci peuvent se présenter sous forme de mutations ponctuelles, de modifications de plusieurs loci ou de duplications de gènes (Menard & Dondorp, 2017). En effet, les mutations génétiques provoquent des changements phénotypiques qui peuvent impliquer plusieurs mécanismes simultanément, tels :

- Une expression accrue de la cible du médicament
- Une diminution de l'absorption du médicament

- Une modification de la structure chimique du médicament
- Une réduction de l'affinité de liaison du médicament en raison de changement structurel dans l'enzyme cible par exemple

Ces changements permettent aux parasites d'échapper aux effets du médicament et de poursuivre leur prolifération (Klein, 2013).

Les mécanismes moléculaires de la résistance de *P. falciparum* sont les plus étudiés par rapport aux autres espèces. Diverses mutations conférant la résistance de *P. falciparum* à divers antipaludiques ont été identifiées. Par exemple, les mutations dans le gène polymorphique *Pfcr* notamment la mutation de la lysine en position 76 en thréonine (K76T) et du gène *Pfmdr-1* en particulier la mutation d'asparagine en position 86 en tyrosine (N86Y), confèrent à eux deux une résistance de *P. falciparum* à la chloroquine (Mita et al., 2009). Le gène *Pfcr* code pour le transporteur de résistance à la chloroquine (*PfCRT*) tandis que le gène *pfmdr-1* code pour la pompe transmembranaire p-glycoprotéine multidrug résistance protein 1 (*PfMDR-1*), localisée dans la membrane de la vacuole digestive (Cowell & Winzeler, 2019). Quant à l'artémisinine, les mutations dans le gène *Kelch 13* ont été identifiées comme marqueurs de résistance. La protéine *K13* serait impliquée dans la réponse cellulaire au stress oxydatif (Cowell & Winzeler, 2019). Parmi la centaine de mutations qui ont été identifiées dans le gène *K13*, 10 ont été confirmées comme étant associées à une clairance parasitaire retardée. La mutation de l'acide aminé cystéine en position 580 en tyrosine soit C580Y est la plus documentée (Cowell & Winzeler, 2019; Dhorda et al., 2021). Par ailleurs, d'autres mutations dans divers gènes ont été associées à la résistance à l'artémisinine telles que les *Pfdd* (ferrodoxine), *Pfarps10* (protéine ribosomale S10 de l'apicoplaste), *pfmdr2* (protéine 2 de résistance aux médicaments multiples) et *Pfcr* (Cowell & Winzeler, 2019).

La résistance émergente de *P. vivax* aux antipaludiques est un sujet qui suscite de plus en plus d'inquiétude. Ce problème de résistance identifié dans les années 1980 (L'Episcopia et al., 2020), bien que moins marqué que celui de *P. falciparum* retient davantage l'attention. Les résistances à la chloroquine, à la SP et à la méfloquine ont été documentées (Barnadas, Ratsimbao, et al., 2008; Barnadas, Tichit, et al., 2008; Khim et al., 2014; L'Episcopia et al., 2020). Les recherches sur les marqueurs moléculaires de résistance de *P. vivax* ont identifié de potentiels gènes qui seraient impliqués dans ces résistances. Parmi ces marqueurs moléculaires potentiels, figurent les mutations du gène *Pvmdr-1*, *Pvcrt-o* et les mutations du gène du

dihydrofolate réductase (*Pvdhfr*) (Barnadas, Ratsimbasoa, et al., 2008; Brega et al., 2005; L'Episcopia et al., 2020; Marfurt et al., 2008). Le gène *Pvmdr1* a été associé à la résistance à la chloroquine avec la mutation Y976F (la plus documentée) ayant été identifiée comme un marqueur génétique possible. Concernant la mutation à la SP, des mutations dans le gène (*Pvdhfr*) ont été associées à la résistance à la pyriméthamine (Barnadas, Tichit, et al., 2008; Marfurt et al., 2008). Dans le cas de la résistance à la méfloquine, une étude s'est concentrée sur le *Pvmdr-1* (Khim et al., 2014).

Contrairement à *P. falciparum*, les mécanismes de résistance de *P. vivax* reste sous-explorés en raison de la complexité biologique de *P. vivax* caractérisée par ses formes hypnozoïtes induisant des rechutes et la difficulté de la culture *in vitro* de *P. vivax*. Une des majeures complications est de déterminer si la réapparition de *P. vivax* chez un patient après un traitement et due à un échec thérapeutique, à une réactivation des hypnozoïtes ou à une nouvelle infection. Par ailleurs, l'absence de méthodes normalisées pour étudier les mécanismes de résistances de *P. vivax* souligne la nécessité de recherches intensives sur le sujet.

L'émergence de la résistance aux antipaludiques était initialement limitée à certaines régions d'Asie, mais elle s'est maintenant étendue à d'autres régions du monde. Notamment, des études récentes ont identifié de nouveaux marqueurs de résistance à l'artémisinine en Inde, en Amérique du Sud et en Afrique subsaharienne (Mathieu et al., 2020; Owoloye et al., 2021; Priyadarshini, 2018). Certaines des mutations identifiées en Afrique seraient associées à une clairance parasitaire tardive *in vitro*. Notamment, la mutation R561H du gène *pfK13* identifiée au Rwanda et en Tanzanie et les mutations L263E, E431K et S769N du gène *pfatpase6* (Owoloye et al., 2021; Uwimana et al., 2020). La majorité des marqueurs tels que M476I, F446I, P553L du gène *pfK13* et d'autres mutations du gène *pfcoronine* et du gène *pfatpase6* n'ont pas encore d'impact sur l'efficacité de l'artémisinine (Iwuafor et al., 2023; Owoloye et al., 2021).

V.3. Impact de la résistance aux antipaludiques sur la lutte contre le paludisme

Les conséquences des résistances affectent les efforts en cours pour l'élimination du paludisme. Les parasites résistants semblent favoriser la transmission du paludisme (Figure 6).

Des études ont montré que les parasites résistants produisent beaucoup plus de gamétocytes qui sont particulièrement infectieux (Abdul-Ghani et al., 2014; Dhorda et al., 2021; Rajapandi, 2019). Cela contribue non seulement à l'augmentation de l'incidence du paludisme, mais surtout à la propagation de parasites résistants. Par ailleurs, l'impact de la résistance des parasites asexués sur la sensibilité des gamétocytes aux antipaludiques doit être pris en compte. En particulier en ce qui concerne la stratégie du blocage de la transmission du paludisme qui cible les gamétocytes.

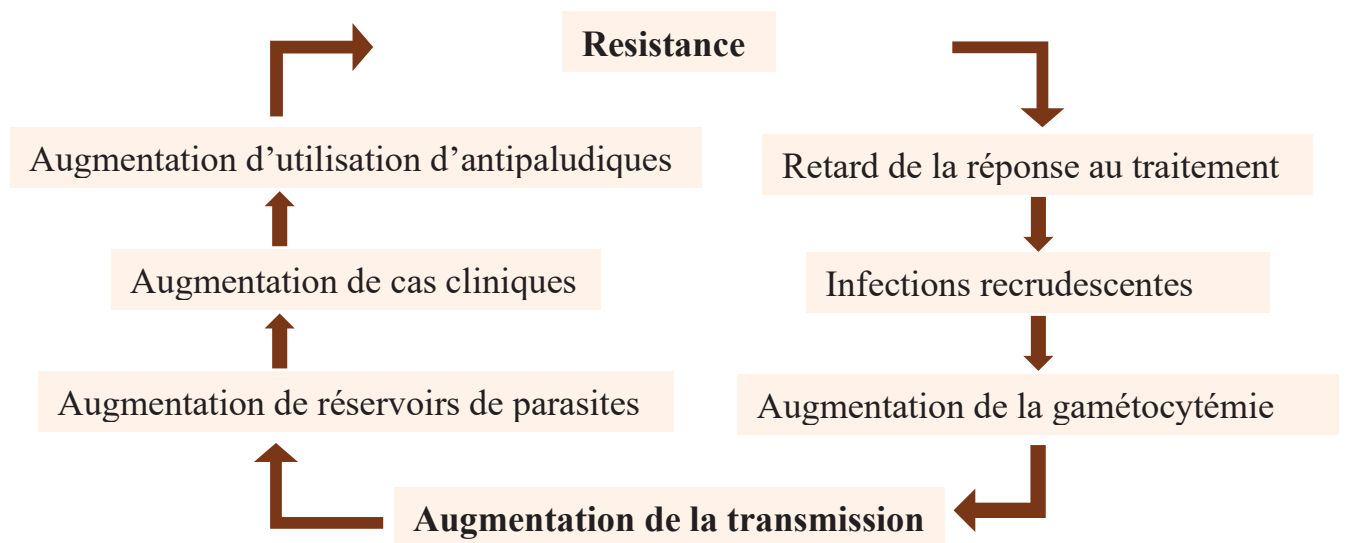


Figure 6: Modèle de lien de causalité entre la résistance aux antipaludiques et l'augmentation de la transmission du paludisme.
(Adapté de Dhorda et al., 2021)

V.4. Stratégies de lutte contre la résistance

Le contrôle et la prévention des résistances aux antipaludiques sont un défi pour l'élimination du paludisme. J'identifie trois importants axes de mesures pour limiter l'émergence des résistances : la surveillance et le suivi des résistances, le diagnostic et le traitement (diagnostic rapide et précis ainsi qu'une utilisation rationnelle des antipaludiques) et la recherche et développement de nouveaux antipaludiques (transmission blocking drugs) (Ippolito et al., 2021; Rasmussen et al., 2022).

La surveillance de la résistance en particulier par les méthodes moléculaires basées sur l'identification de marqueurs me semble cruciale pour les interventions rapides et des stratégies efficaces visant à limiter la propagation de la résistance (Picot et al., 2009). L'identification et le

suivi de marqueurs moléculaires de résistance tels que les mutations dans le gène K13 et coronine associées à la résistance à l'artémisinine (Azmi et al., 2023), permettent des stratégies adaptées pour limiter la propagation. Les autres méthodes de surveillance dont l'étude de l'efficacité thérapeutique clinique et les méthodes phénotypiques sont aussi utiles et complémentaires. Alors que la méthode clinique est basée sur l'identification d'un échec de traitement, la méthode phénotypique est quant à elle basée sur la réalisation de tests de chimiosensibilité *in vitro* ou *ex vivo* avec les parasites provenant de patients suspects (Ippolito et al., 2021). Cependant, les méthodes phénotypiques présentent des limites qui tiennent à plusieurs facteurs tels que la disponibilité de parasites viables en culture, les procédures techniques fastidieuses, la variabilité des résultats entre les laboratoires, la probable différence entre les conditions *in vitro* ou *ex vivo* et celles *in vivo*. Par conséquent, l'intégration des approches moléculaires, cliniques et phénotypiques est importante pour évaluer de manière précise la résistance aux antipaludiques.

Les stratégies de traitement efficaces sont essentielles pour prévenir les résistances. Des schémas thérapeutiques bien adaptés et respectés peuvent permettre de prévenir la sélection de parasites résistants. Face à la résistance aux ACT, des mesures innovantes ont été proposées afin de limiter les résistances et d'améliorer son efficacité. Il a été suggéré que l'augmentation de la durée de traitement à 5 jours ou encore l'utilisation de deux ACT différents durant le traitement de trois jours s'avère efficace pour limiter la résistance (Dhorda et al., 2021). Par ailleurs, les triples combinaisons à base d'artémisinine au lieu de double se sont révélées prometteuses pour réduire les résistances aux molécules partenaires (Dhorda et al., 2021; Rasmussen et al., 2022). C'est l'exemple de la combinaison dihydroartémisinine-piperaquine-mefloquine qui s'est avéré efficace en Thaïlande, au Cambodge et au Vietnam après que la dihydroartémisinine-piperaquine a été inefficace chez près de 50% des patients (Dhorda et al., 2021).

La recherche et le développement de nouvelles stratégies de traitement sont essentiels face à la résistance actuelle aux antipaludiques. De nouvelles molécules ayant des modes d'action et des structures chimiques différentes de celles qui sont sujettes aux résistances sont nécessaires pour limiter les résistances et garantir une efficacité durable des traitements du futur. Par ailleurs des recherches de nouvelles combinaisons de molécules ayant des cibles et des demi-vies différentes sont en cours.

Dans le prochain chapitre, nous nous pencherons sur la formation de l'Hz et nous verrons comment le parasite parvient à transformer les molécules d'hèmes toxiques en biocristaux.

Chapitre II : Hémozoïne, entre formation, fonction et lutte antipaludique

De petits pigments brun foncé ont été identifiés pour la première fois en 1717 par Lancisi dans les organes internes des patients atteints de paludisme aigu (Stiebler et al., 2011). Ces pigments sont appelés « hémozoïne ». L'Hz est un biocristal héminique produit dans la vacuole digestive de *Plasmodium* et d'autres parasites hématophages (Egan et al., 2002). Ce chapitre sur l'Hz, discutera de la biochimie, du mécanisme de formation de l'Hz en passant par son implication dans la pathogenèse du paludisme et son intérêt en tant que biomarqueur et cible thérapeutique important pour la lutte contre le paludisme.

L'Hz est formée en tant que mécanisme de détoxification pour neutraliser l'hème libre toxique provenant de la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole digestive (Dalapati & Moore, 2021). Cette toxicité de l'hème provient principalement de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Tripathy & Roy, 2015). L'hème est un complexe prosthétique avec un atome central de fer coordonné à quatre noyaux pyrole reliés entre eux par des ponts méthylènes (Figure 7). En effet, les facteurs enzymatiques et les conditions physico-chimiques, notamment le pH acide de la vacuole digestive contribuent à l'oxydation du fer ferreux (Fe^{2+}) de l'hème en fer ferrique (Fe^{3+}), participant donc à la génération d'ERO telles que les radicaux hydroxyles ($\bullet OH$ et $RO\bullet$), anion superoxyde ($O_2 \bullet^-$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la réaction de de Fenton (Pádua & Souza, 2020; Tripathy & Roy, 2015) (Figure 8). Le stress oxydatif causé par ces dernières peut inhiber des activités enzymatiques du parasite. Il peut également oxyder des acides nucléiques et perturber la membrane biologique du parasite, entraînant une perméabilité accrue de la membrane qui conduit à la mort du parasite (Herraiz et al., 2019; Pádua & Souza, 2020; Stiebler et al., 2011).

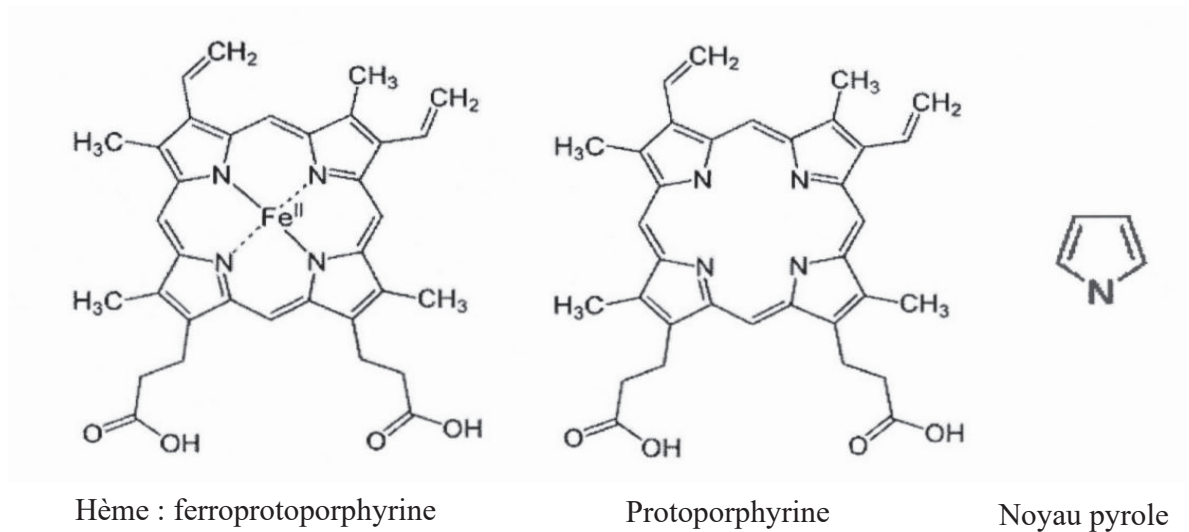


Figure 7: Structure chimique de la molécule d'hème
(d'après Maines, 1992)

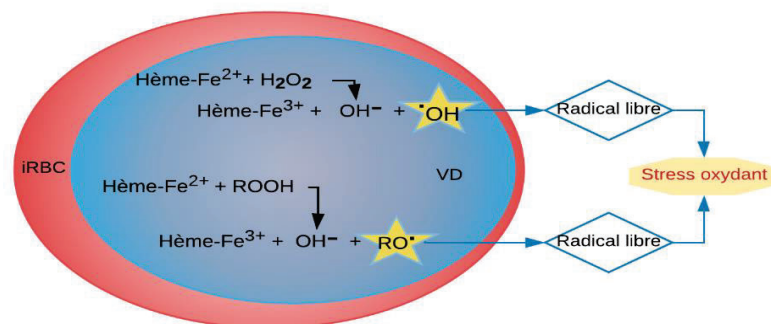


Figure 8: Réaction de Fenton

La réaction de Fenton se produit dans la vacuole digestive du parasite. Elle génère des radicaux libres induisant un stress oxydatif. iRBC : infected Red Blood Cell (globule rouge infecté). VD : Vacuole digestive du parasite.

I. Structure et formation de l'hémozoïne

I.1. Biochimie structurale de l'hémozoïne

La nature chimique de l'Hz a été un sujet de controverses depuis des décennies. Alors que certains chercheurs (Yamada et Sherman, 1979; Ashong et al., 1989 ; Goldie et al., 1990) lui donnent une nature hémoprotéique, pour d'autres l'Hz serait constituée uniquement d'hème (Fitch

et Kanjanangulpan, 1987). Ce n'est qu'en 1991 que les travaux de Slater et al. sur la structure chimique de la β -hématine, un homologue synthétique de l'Hz ont permis de statuer sur la structure de l'Hz naturelle (A. F. Slater et al., 1991). Ils ont montré pour la première fois que l'Hz est composée uniquement d'hème et non d'un ensemble d'hème-protéine.

La formation de l'Hz est similaire au processus de formation des cristaux, c'est-à-dire qu'il faut une unité de base (maille cristallographique ou unité structurale) qui s'empile ensuite dans le réseau cristallin. En ce sens, l'étude de la structure cristallographique du complexe Hz réalisée en 2000 par Pagola et al., a montré deux molécules d'hème dans l'unité structurale du cristal en utilisant la cristallographie aux rayons X (Pagola et al., 2000). Les deux molécules d'hème étaient reliées par une symétrie d'inversion assurant ainsi l'interaction entre le fer et le groupe carboxylique ionisé de l'hème réciproque (Dilanian et al., 2017; Egan, 2002; Pagola et al., 2000). Il a été suggéré que cette symétrie d'inversion est requise pour la formation du dimère d'hème (Pagola et al., 2000). Une étude récente réalisée en 2017 avec l'utilisation d'une technique nanocristallographique plus performante (la cristallographie sérielle femtoseconde (SFX) dans laquelle de petits cristaux sont éclairés par des impulsions de rayons X femtoseconde extrêmement brillante) vient corroborer ces résultats de l'an 2000 en identifiant la même structure élémentaire de l'Hz (Dilanian et al., 2017) (Figure 9). Pour former le cristal d'Hz, les dimères hémiques s'empilent dans le réseau cristallin par les liaisons hydrogène via leur deuxième groupe carboxylique non ionisé pour donner des unités parallèles d'hème caractéristique de la forme des cristaux d'Hz (Pagola et al., 2000). Le cristal en cours de formation est stabilisé par ces liaisons hydrogène.

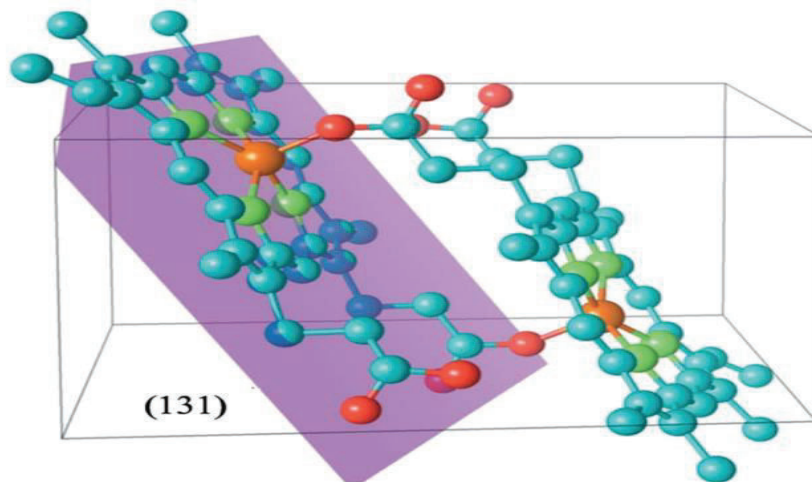


Figure 9: Représentation d'un dimère d'hème dans une maille cristallographique de l'hémozoïne
 Structure du dimère d'hème (structure élémentaire) dans l'unité structurale du cristal d'hémozoïne vue de face (131).
 Rouge, oxygène ; Orange, fer ; Vert, azote ; Bleu, carbone. (d'après Dilanian et al., 2017)

En résumé, d'un point de vue structural, la formation de l'Hz dans la vacuole digestive est fondée sur une dimérisation de molécules d'hèmes (ferriprotoporphyrine IX [Fe (III) PPIX]) grâce à deux liaisons ferro-carboxylate (Fe-OOC). L'ion ferrique (Fe^{3+}) d'un hème se lie avec l'oxygène du groupe carboxylique du propionyl ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{O}) - \text{O}$) de l'hème en face, et ce de façon réciproque. Les dimères se lient ensuite via leur groupe carboxylique (COOH) grâce à une liaison hydrogène $\text{COOH} - \text{OOC}$ (Figure 10).

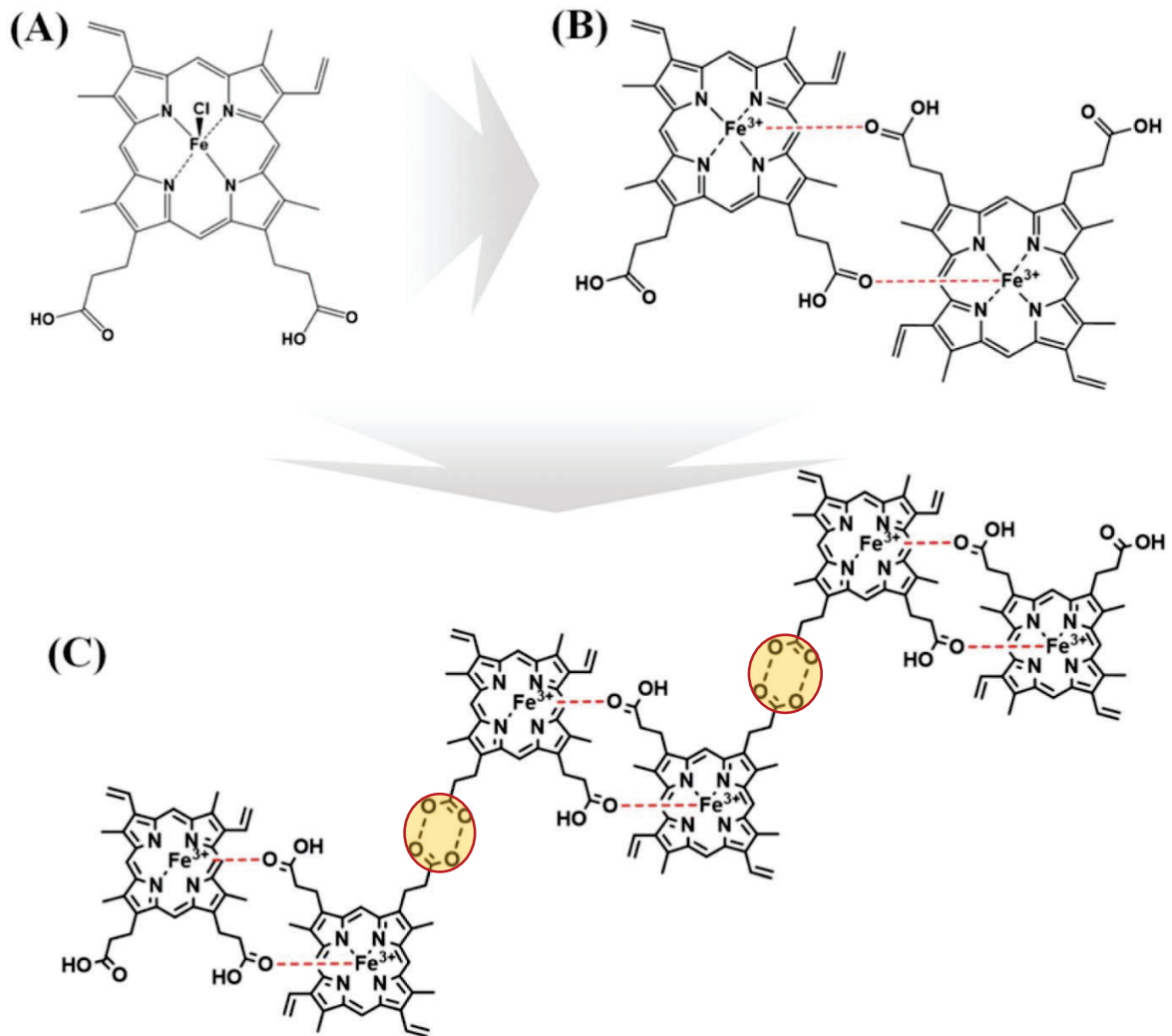


Figure 10: Formation de la structure chimique de l'hémozoïne

(A) une molécule d'hème. (B) Dimère d'hème. (C) structure de l'hémozoïne. Les dimères sont liés par des liaisons hydrogène à travers leur groupe COOH entouré en jaune sur la figure. Adapté de (d'après J. H. Lee et al., 2019)

I.2. Discussion sur les étapes de la formation de l'hémozoïne

Un modèle du processus de nucléation et d'élongation de l'Hz basé sur l'autocatalyse a été proposé par Stiebler en 2011 (Stiebler et al., 2011) (Figure 11-A). La première étape de la nucléation serait initiée par l' α -glucosidase, contrairement à Hempelmann qui pense que la première étape serait plutôt l'élimination de l'eau de l'aquaferriprotoporphyrine IX, effectuée probablement par les lipides (Hempelmann, 2007). La deuxième étape serait assurée par la surface des lipides membranaires sur laquelle se fixerait un dimère d'hème qui favoriserait la croissance du cristal. Ensuite, les petits cristaux libérés dans la vacuole continueraient leur extension par autocatalyse.

Contrairement à Stiebler, Hoang soutient la thèse que la formation de l'Hz serait plutôt spontanée à l'interface eau-lipide du fait des conditions physico-chimiques favorables. Dans un premier temps, les molécules d'hème s'accumuleraient à la surface des particules lipidiques neutres où commence la nucléation du cristal. Ensuite, le cristal s'allongerait parallèlement à cette interface le long d'un axe C limité par la courbure de la particule lipidique. Ce qui justifierait la reproductibilité de la morphologie structurelle et de la taille des cristaux d'Hz (Figure 11-B). Ils expliquent ce mécanisme par le fait que les lipides neutres contiennent des glycérides qui sont hautement polaires. Ils peuvent s'autoassembler grâce à leur tête polaire à l'interface aqueuse exposant ainsi les groupes OH et les électrons qui peuvent interagir avec l'hème. Les groupes OH ou $-(C=O)-O-$ des lipides joueraient donc un rôle crucial dans la formation de l'Hz (Hoang et al., 2010).

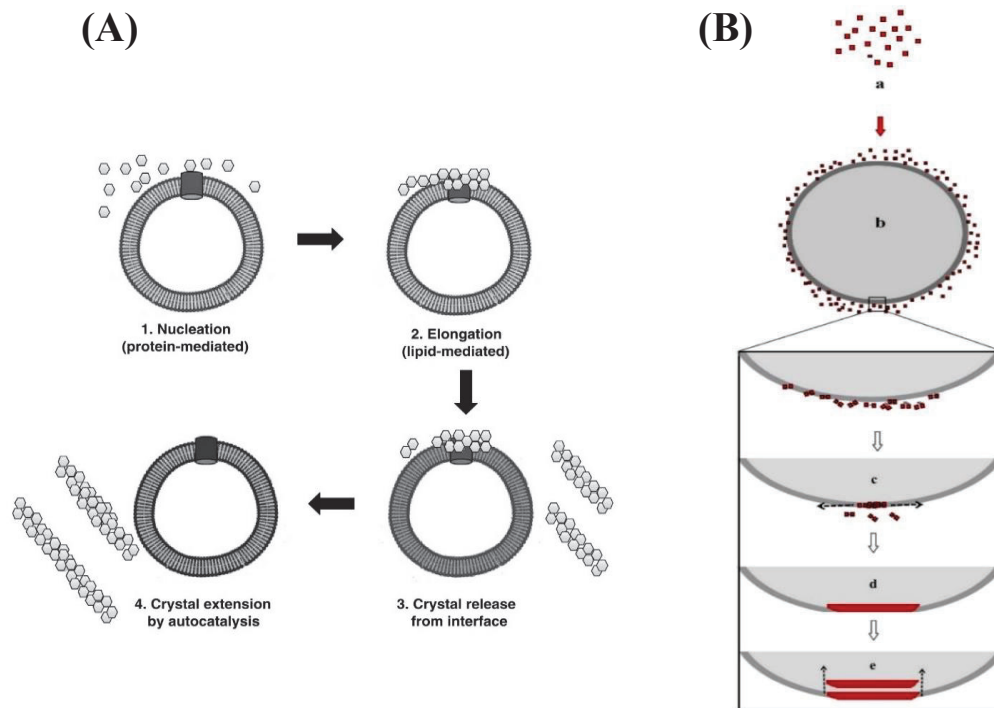


Figure 11: Modèles du processus de cristallisation de l'hème par autocatalyse

(A) Modèle du processus de cristallisation de l'hème par autocatalyse (Stiebler et al., 2011). Modèle proposé 1. Étape de nucléation médiée par les protéines ; 2. étape d'élongation induite par les lipides à la surface des interfaces hydrophiles-hydrophobes ; 3. libération des cristaux de Hz naissants des interfaces hydrophiles-hydrophobes ; 4. extension des cristaux de Hz par autocatalyse. (B) Modèle du mécanisme de formation de l'hémozoïne (hoang et al., 2010). L'hème libre (a) libéré par la dégradation de l'hémoglobine s'accumule à l'interface du corps lipidique neutre dans la vacuole digestive de *P. falciparum* (b). La nucléation se produit à l'interface et l'élongation du cristal s'étend le long de l'interface (c) jusqu'à ce que la courbure du corps lipidique empêche l'élongation du cristal (d). La nature hydrophobe du cristal mature (e) favorise son transport à l'intérieur du corps lipidique, ce qui conduit à un empilement de cristaux alignés.

À la différence de Stiebler et Hoang qui ont travaillé avec l'homologue synthétique de l'Hz (la β -hématine), Kaphisnikov et al. ont utilisé l'Hz naturelle *in situ* dans les parasites qui ont été vitrifiés avant les observations. Les méthodes de tomographie et de microscopie à fluorescence aux rayons X ont été utilisées pour élucider le mécanisme. Ils proposent que la protéine de détoxification de l'hème de l'anglais « Heme Detoxification Protein (HDP) » catalyse la dimérisation des monomères d'hème avant la nucléation. La nucléation de l'Hz se ferait à la surface interne de la vacuole digestive sur un film lipidique d'acylglycérol adsorbé sur ou intégré à la membrane phospholipidique de la vacuole digestive (Figure 12). Les auteurs ont proposé que les dimères d'hème produits par HDP se lient aux cristaux d'Hz existants ou forment de nouveaux

cristaux par nucléation hétérogène dans un environnement aqueux au niveau du feuillet interne de la membrane de la vacuole digestive. Il se peut aussi que d'autres lipides interviennent dans le processus (Kapishnikov et al., 2012, 2017, 2021). Par ailleurs, leurs résultats ont montré que la cristallisation de l'Hz se ferait à une vitesse de 10^4 hèmes/s, vitesse correspondante à la dimérisation de l'hème par la protéine HDP. Ces résultats viennent renforcer la thèse du rôle principal de la HDP dans la synthèse de l'Hz (Gupta et al., 2022; Jani et al., 2008)

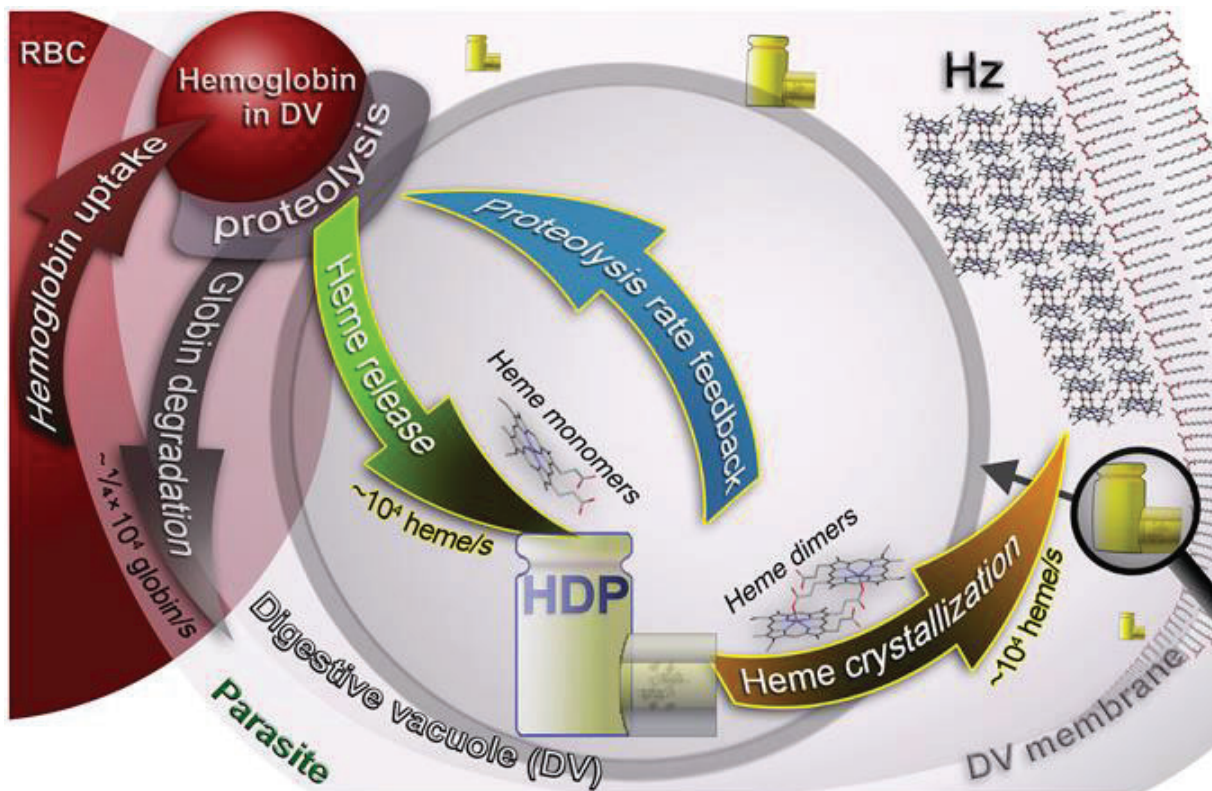


Figure 12: Modèle de formation de l'hémozoïne à la surface interne de la vacuole digestive de trophozoïte de Plasmodium falciparum

Les différentes flèches représentent les processus de la formation de l'Hz. La flèche brune indique la cristallisation de l'hème in vivo qui se produit à une vitesse d'environ $\sim 10^4$ hème/s selon les résultats de Kapishnikov et al. Cette vitesse est similaire au taux de dimérisation de l'hème mesuré in vitro pour la protéine de détoxification de l'hème (HDP), suggérant que la HDP joue un rôle principal dans la cristallisation de l'hème. La flèche verte représente la digestion de l'hémoglobine et la dimérisation de l'hème qui devraient se produire à un rythme égal à celui de la cristallisation de l'hème pour éviter une surproduction de monomères et de dimères d'hème. La flèche bleue est une proposition d'un mécanisme de rétroaction entre la cristallisation et la protéolyse pour contrôler la vitesse de la digestion de l'hème. La flèche grise indique la dégradation de la globine. Chaque molécule d'hémoglobine contient quatre monomères d'hème et une globine, ainsi la vitesse de dégradation de la globine serait $1/4$ de celle de la libération des monomères d'hème. RBC, Red blood cell (globule rouge) ; DV, Digestive vacuole (Vacuole digestive); cercle rouge en haut à gauche, hémoglobine ; fiole jaune, HDP (Kapishnikov et al., 2017).

En somme, ces études amènent à imaginer que : (1) l'Hz est formée dans la vacuole digestive du parasite à une interface eau-lipide, impliquant ainsi les structures lipidiques ; (2) les conditions physico-chimiques telles que le pH acide, la diminution de la tension de surface (l'hydrophobicité) favoriseraient la nucléation; (3) l'Hz se formerait à la surface des particules ou de membrane lipidique; (5) il est plausible que les protéines jouent un rôle dans la dimérisation des molécules d'hèmes ou dans l'acheminement des molécules d'hèmes vers les lipides ; (6) les molécules d'hèmes pourraient être attirées vers la surface des lipides par des forces électrostatiques; (7) les cristaux s'allongeraient le long des particules lipidiques grâce à des liaisons hydrogène entre les dimères d'hème ou l'élongation pourrait se produire de la surface lipidique vers la lumière de la vacuole (Hempelmann, 2007; Hoang, Ncokazi, et al., 2010; Hoang, Sandlin, et al., 2010; Kapishnikov et al., 2012, 2017, 2021). Les avancées techniques ainsi que les futures recherches permettront d'approfondir notre compréhension de ce processus fascinant.

II. Caractéristiques de l'hémozoïne selon les stades de développement et les espèces de *Plasmodium*

Les caractéristiques de l'Hz, un produit secondaire du processus nutritionnel de *Plasmodium*, dépendent à la fois de l'espèce du parasite et de son stade de maturation.

Les différentes espèces de *Plasmodium* infectant l'homme semblent avoir des variations dans la morphologie de l'Hz avec des différences subtiles, d'après l'étude de Noland (Noland et al., 2003). L'analyse au MEB de l'Hz extraite de différentes espèces a révélé que l'Hz de *P. vivax* a tendance à être plus grand tandis que l'Hz de *P. falciparum* et *P. ovale* présentent une forme plus ou moins carrée et que *P. malariae* arbore des faces lisses et plates caractéristiques de *P. falciparum*. De façon générale, ces espèces partagent une morphologie cuboïdale régulière et plate avec des différences de taille minimales (Noland et al., 2003). Cependant, des facteurs méthodologiques tels que la purification de l'Hz et la technique d'observation et d'analyse peuvent introduire des biais. L'analyse de l'Hz dans son contexte d'origine, *in situ* dans les parasites peut potentiellement réduire les biais d'interprétations.

Les différents stades de développement du *Plasmodium* ont des besoins nutritionnels et des profils métaboliques distincts (Gulati et al., 2015; Hanssen et al., 2012; MacRae et al., 2013) et donc des caractéristiques de l'Hz distinct . Les premiers stades (rings) commencent à digérer l'hémoglobine, libérant de l'hème libre toxique. Ces derniers vraisemblablement vont commencer le processus de cristallisation en Hz. Ainsi, à ce stade, la quantité d'Hz produite est relativement faible par rapport aux stades ultérieurs. Cette quantité peut être en dessous de la limite de détection avec la microscopie optique, ce qui potentiellement justifie son absence dans les rings observés sur frottis mince coloré au Giemsa (Jamjoom, 2017). Au fur et à mesure que les parasites se développent, ils digèrent activement l'hémoglobine. En conséquence, une plus grande quantité d'Hz est produite comparée au stade rings. L'Hz des trophozoïtes est couramment observée au microscope optique, car ils seraient à un niveau détectable. Au stade final de développement asexué, les schizontes, la quantité d'Hz est relativement à son plus haut niveau, en raison de l'accumulation d'une partie de l'Hz précédemment formée et de la digestion importante de l'Hz nécessaire pour les mécanismes cellulaires.

La distribution des cristaux d'Hz est un paramètre qui diffère les stades de maturation du *Plasmodium*. Par exemple, une étude utilisant la tomographie à rayons X doux a observé des cristaux d'Hz situés côte à côte à proximité de la surface interne de la membrane de la vacuole digestive dans les trophozoïtes jeunes. En revanche, dans les trophozoïtes âgés, une fraction importante d'Hz a été trouvée dans la lumière de la vacuole digestive. En utilisant la microscopie tridimensionnelle, cette même équipe de recherche a identifié des différences entre Hz des trophozoïtes jeunes et des schizontes. L'étude a révélé pour les trophozoïtes jeunes, une vacuole digestive aplatie, en forme de disque avec de nombreux cristaux d'Hz répartis autour de la surface interne tandis que dans les parasites au stade schizonte, la vacuole digestive s'est gonflée pour prendre une forme plus sphérique avec de grands cristaux remplissant l'intérieur et de petits cristaux se trouvant le long de la limite (Kapishnikov et al., 2012, 2021).

Dans les gamétocytes, l'Hz apparaît plus grand comparé aux stades asexués. Dans nos observations au microscope optique sur des frottis sanguins, il semble y avoir une quantité d'Hz faible dans les stades jeunes I à III comparée aux stades matures IV à V (Figure 13). Cependant, la production d'Hz serait au point mort dans ces derniers stades en raison d'un faible métabolisme, de l'arrêt de la digestion de l'hémoglobine et aussi de la présence très réduite de la protéine l'HRP

II par rapport aux stades jeunes. L'HRP II interviendrait dans le processus de formation de l'Hz (Canning & Sinden, 1975; Hayward et al., 2000; Sinden et al., 1978). Cela soulève des questions intrigantes concernant la présence d'une quantité substantielle d'Hz dans ses stades matures de gamétocytes malgré l'absence apparente de conditions et d'éléments nécessaire à la production de l'Hz. Rares sont les études sur l'Hz des gamétocytes (Hanssen et al., 2012; Jamjoom, 2017; Orjih, 2012). Vu l'importance de ces stades dans les interventions visant à bloquer la transmission du paludisme, davantage de recherche devrait être réalisée dans le but d'élucider les mécanismes de formation de l'Hz et leurs caractéristiques en particulier chez les gamétocytes matures. Ces connaissances pourront ensuite aider à identifier de potentielles molécules gamétocytocides qui peuvent interférer avec ce mécanisme.

III. Hemozoïne comme biomarqueur et cible thérapeutique

La présence de l'Hz dès le début de la phase érythrocytaire et sa durée de vie prolongée même après le traitement (Frita et al., 2012), fait d'elle un biomarqueur intéressant pour le diagnostic, le traitement et le suivi du paludisme. En tant que cible thérapeutique, la formation de l'Hz joue un rôle crucial. Des molécules antipaludiques telles que la chloroquine utilisée depuis plusieurs décennies interfèrent avec la biominéralisation de l'Hz dans la vacuole digestive (Herraiz et al., 2019; Sullivan, 2017). Par ailleurs, on pense que les dérivés endoperoxydes d'artémisinine interfèrent avec la formation de l'Hz. L'artémisinine peut interagir avec l'hème en formant un complexe, empêchant ainsi sa cristallisation (Egan, 2008; Hong et al., 1994; Meshnick et al., 1991; Pandey et al., 1999). Il a été suggéré que les protéines intervenant dans la cristallisation sont aussi la cible de certains antipaludiques (Bridgford et al., 2018; Pandey et al., 1999).

De nouvelles molécules à activité inhibitrice de la formation de l'Hz sont en cours de recherche et de développement depuis l'apparition des résistances à la chloroquine. Par exemple, les composés à base d'indole, tels que cryptolépine, les flinderoles, l'isosungucine et la cipargamine (actif sur les gamétocytes) semble avoir divers modes d'action dont l'inhibition de la formation de l'Hz par une voie autre que celle de la chloroquine (Surur et al., 2020). Par conséquent, la recherche du mode d'action de la ganaplacide en étudiant l'Hz paraît judicieuse.

Le décryptage du mécanisme de formation de l'Hz occupe une place très importante dans la recherche de molécules efficaces contre le paludisme. La poursuite des recherches sur l'exploration des interactions liées à l'Hz pourra permettre de développer de nouvelles interventions ciblant les processus en lien avec sa formation et sa stabilité.

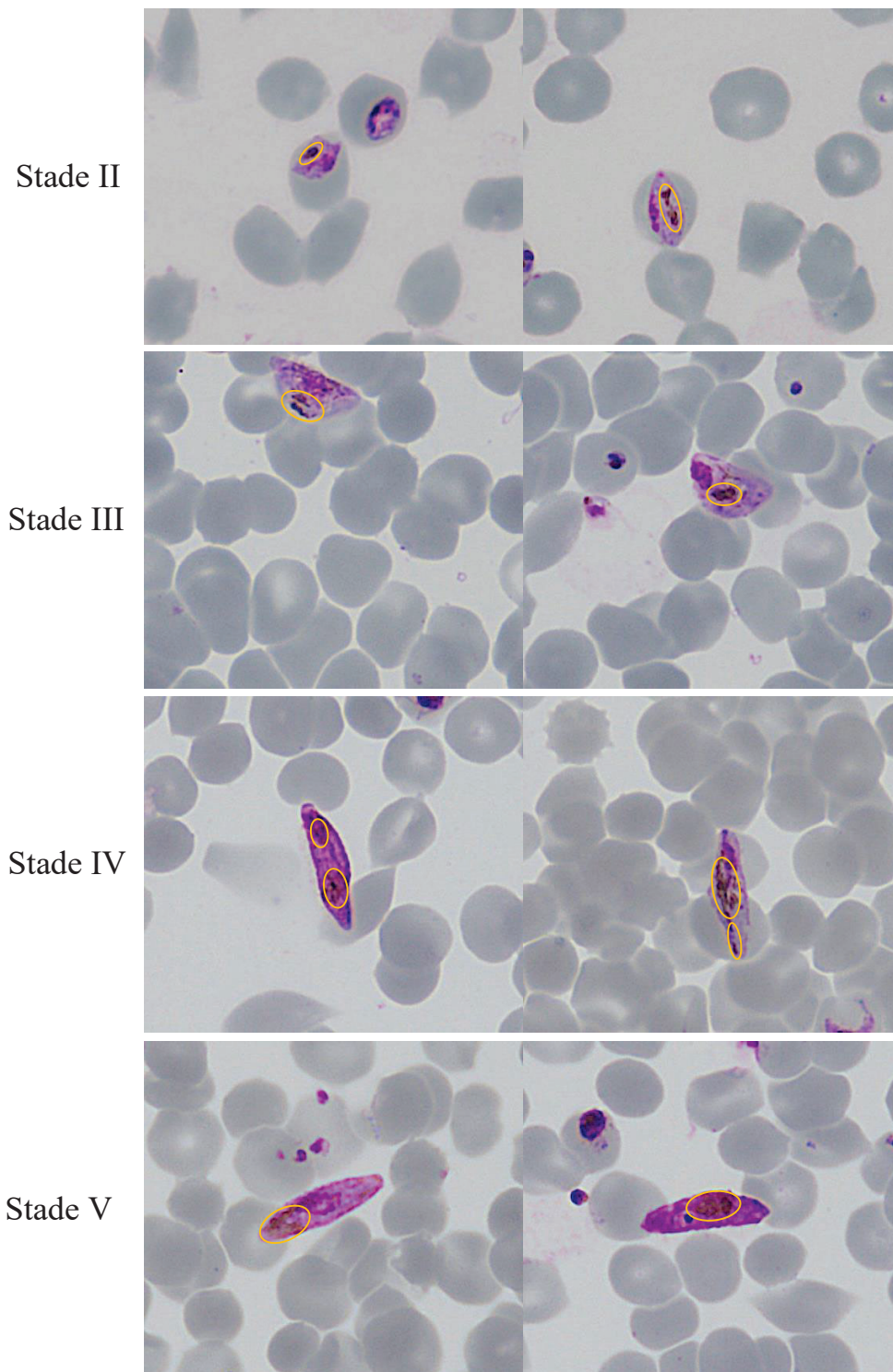


Figure 13: Hémozoïne dans les gamétocytes de *Plasmodium falciparum*
 Observation microscopique des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* colorés au Giemsa à un grossissement de 100x. L'hémozoïne, encerclée en jaune, semble plus abondante dans les stades matures IV à V par rapport aux stades jeunes II à III.

Chapitre III : Gamétocytes, clés de la transmission et de l'élimination du paludisme

Les gamétocytes sont responsables de la transmission du *Plasmodium* de l'homme au moustique chez qui la reproduction sexuée se déroule assurant la continuité du cycle de vie du parasite. Ils sont en quelque sorte le pont entre le cycle asexué chez l'homme et le cycle sexué chez le moustique. Ce rôle de pont entre les deux hôtes en fait une cible parfaite pour bloquer la transmission du paludisme. Dans cette partie, nous discuterons de la biologie des gamétocytes et de leur rôle dans l'élimination du paludisme.

I. Généralité sur les gamétocytes

Les gamétocytes proviennent de la différenciation des stades asexués. Moins de 10% des parasites asexués s'engagent dans la forme sexuée (Tadesse et al., 2019) et ils représentent environ 5% de la population des parasites au cours d'une infection (Collins et al., 2018; Reuling et al., 2018; Sinden, 1983). L'engagement des parasites asexués en gamétocytes est un processus complexe impliquant divers facteurs internes et externes au parasite qui seront discutés en détail dans ce chapitre. Une fois différenciés, les jeunes gamétocytes immatures migrent du sang vers des organes internes tels que la moelle osseuse ou la rate, où ils subissent un processus de maturation. Par la suite, les gamétocytes matures réintègrent le sang périphérique (Day et al., 1998; Picot & Bienvenu, 2022). Le temps d'apparition des gamétocytes *in vivo*, leur durée de maturation ainsi que leur durée de vie varient en fonction de l'espèce plasmodiale. Alors que ces durées sont considérablement allongées chez l'espèce *P. falciparum*, elles sont nettement raccourcies chez les autres espèces comme *P. knowlesi* et *P. vivax*. Dans le cas de *P. falciparum*, les gamétocytes peuvent apparaître dans le sang périphérique entre 8 et 12 jours après le premier cycle érythrocytaire. Leur maturation du stade I à V prend environ 9 à 12 jours. Leur durée de vie dans le sang périphérique varie de quelques jours à plusieurs semaines avec une demi-vie d'environ 2,4 jours (Collins et al., 2018; Reuling et al., 2018; Sinden, 1983). Certaines études suggèrent qu'ils peuvent persister dans le sang jusqu'à un mois après la disparition des stades asexués (Bousema et al., 2010).

En revanche, les gamétocytes de *P. vivax* émergent dans le sang périphérique environ 3 jours après l'apparition des stades asexués avant même qu'apparaissent les symptômes cliniques du paludisme (Picot & Bienvenu, 2022; Sinden, 1983; Talman et al., 2004; Vallejo et al., 2016a). Leur développement s'étale sur deux à trois jours et ils ne survivent que trois jours en moyenne. Cependant, leur production est continue, par vague de cinq jours et persiste aussi longtemps que dure l'infection (Picot & Bienvenu, 2022; Vallejo et al., 2016a).

En ce qui concerne les gamétocytes de *P. knowlesi*, on estime qu'ils apparaissent dans le sang environ 1,5 jour après le premier cycle érythrocytaire, ce qui correspond à leur durée de maturation. Cependant, leur durée de vie reste très brève puisqu'ils ne dureraient que quelques heures. Cette courte durée de vie serait compensée par leur production quasi quotidienne facilitée par le cycle érythrocytaire relativement rapide de 24h (Armistead et al., 2018).

II. Biologie des gamétocytes

II.1. Facteurs déclenchant la production des gamétocytes

In vivo, *Plasmodium* est soumis aux diverses modifications de son environnement auxquelles il doit s'adapter. Les gamétocytes représentent en quelque sorte une réponse de survie pour les parasites lorsque les formes asexuées sont confrontées à des conditions engageant leur survie. Ainsi, l'une des hypothèses de l'induction de la gamétocytogenèse est que les parasites détectent divers signaux provenant du microenvironnement grâce des récepteurs internes et/ou externes (Bousema & Drakeley, 2011; Dyer & Day, 2000; Josling et al., 2018; Schneider & Reece, 2021). Ces signaux activent des voies de signalisation et de transduction conduisant à l'expression de gènes spécifiques de la gamétocytogenèse.

Divers facteurs tels que l'augmentation de la densité parasitaire, l'anémie, le stress thermique (fièvre), l'immunité de l'hôte, l'augmentation des fréquences de piqûres de moustiques ou l'utilisation de certains antipaludiques comme la chloroquine, la SP, l'artémisinine sont autant de facteurs qui seraient corrélés à la gamétocytogenèse *in vivo* (Josling et al., 2018; Peatey et al., 2009; Portugaliza et al., 2020; Schneider et al., 2006; Schneider & Reece, 2021). Une étude transversale de 512 patients atteints de paludisme causé par *P. falciparum* a montré qu'une

parasitémie élevée était corrélée à une charge gamétocytaire élevée (Nacher et al., 2002). Ce constat a été confirmé par des études *in vitro* de production de gamétocytes (Carter & Miller, 1979; Dyer & Day, 2000). Lorsqu'on ajoute un milieu de culture à forte densité dans une culture normale de formes asexuées, on constate une augmentation du taux de conversion des formes asexuées en gamétocytes (Brancucci et al., 2015; Chou et al., 2018). D'ailleurs, l'une des études montre par analyse transcriptomique une augmentation de l'expression de gènes associés à la gamétocytogenèse (Chou et al., 2018). Cela suggère d'une part que certains facteurs solubles libérés par les parasites sont des signaux d'induction de la gamétocytogenèse, d'autre part que la réponse à ces signaux serait dépendante de leur concentration dans le microenvironnement. Cette concentration seuil qui serait atteinte lorsque la parasitémie est élevée.

Par ailleurs, la simulation *in vitro* des conditions physiologiques qui ont été ciblées comme inducteur de la gamétocytogenèse a montré une augmentation de la production des gamétocytes *in vitro* (Carter & Miller, 1979; Portugaliza et al., 2020; Roncalés et al., 2012; Trager et al., 1999; Wadi et al., 2021). Des études récentes ont également identifié des facteurs moléculaires spécifiques comme les changements dans les métabolites de la biogenèse lipidique et les niveaux de lysophosphatidylcholine ou en choline, impliqués dans l'induction de la gamétocytogenèse (Brancucci et al., 2015, 2017; Filarsky et al., 2018). Cependant, ces signalisations requièrent une investigation plus approfondie.

II.2. Mécanismes moléculaires et épigénétiques régissant l'engagement des formes asexuées en gamétocytes

Les mécanismes épigénétiques et moléculaires impliqués dans la gamétocytogenèse sont complexes et ne sont pas encore totalement élucidés. Cependant, des recherches récentes ont mis en lumière certaines modifications épigénétiques et des voies moléculaires impliquées dans ce processus (Brancucci et al., 2014; Coleman et al., 2014; Kafsack et al., 2014; Sinha et al., 2014).

La différenciation de la forme asexuée en gamétocyte est régulée au niveau épigénétique par la répression ou l'induction de gènes spécifiques. L'activation du processus épigénétique est initiée par des signaux cellulaires eux-mêmes activés par des facteurs moléculaires et d'autres du microenvironnement. En particulier la diminution de la lysophosphatidylcholine (LysoPC) a été

identifiée comme signal moléculaire qui active la régulation des gènes impliqués dans la gamétocytogenèse (Brancucci et al., 2017). Cependant, le mécanisme par lequel le signal est transduit reste encore inconnu. La lysoPC originaire du sérum de l'hôte intervient dans le développement des formes asexuées en approvisionnant en phosphatidylcholine (PC) nécessaire pour la formation des membranes du parasite. En effet, la LysoPC génère de la choline via l'hydrolyse par la glycérophosphodiesterase (GDPD) qui subit ensuite des réactions de phosphorylation pour former le PC (Ramaprasad et al., 2022). Ainsi lorsqu'on déplete le milieu de culture des parasites en LysoPC et qu'on le supplémente avec un analogue de choline, on remarque une diminution voir un arrêt de croissance des parasites (Brancucci et al., 2017; Ramaprasad et al., 2022) montrant l'importance de la LysoPC dans le développement des parasites.

Les modifications des histones, la méthylation de l'ADN et les ARN ont été impliqués dans la régulation de l'expression des gènes spécifiques (Brancucci et al., 2014; M. F. Duffy et al., 2012; Miao et al., 2010). Voici une proposition du processus au regard des connaissances sur le sujet: le processus épigénétique implique l'activation de la protéine de développement des gamétocytes (GDV-1) après la transduction du signal (Filarsky et al., 2018). L'expression de GDV-1 est sous le contrôle de son ARN anti-sens. GDV-1 exprimée active à son tour l'expression du facteur de transcription des apicomplexes spécifique des gamétocytes (PfAP2-G). Son expression est généralement réprimée par l'action coopérative de l'histone désacétylase 2 (HDA2), la marque H3K9me3 de l'hétérochromatine et de la protéine d'hétérochromatine 1 (HP1) (Brancucci et al., 2014; Coleman et al., 2014; Kafsack et al., 2014; Sinha et al., 2014). En effet, la protéine GDV1 se fixe sur sa cible HP1 et la dissocie du locus *apg2-g*. Ce qui permet l'expression de PfAP2-G qui agit alors comme un interrupteur transcriptionnel principal, activant l'expression des protéines impliquées dans la différenciation et dans la maturation des gamétocytes. La Figure 14 montre de façon schématique un modèle du processus épigénétique de la gamétocytogenèse.

Récemment, le facteur de transcription PfAP2-G2 a été suggéré comme impliqué dans la différenciation des gamétocytes en régulant l'expression de gènes spécifiques de gamétocyte chez les formes asexuées. L'inhibition de son expression a entraîné une diminution de production et de maturation des gamétocytes d'environ 95% avec un impact considérable sur les gamétocytes mâles (Y. Xu et al., 2020). Des protéines telles que la Pfs16, Pfpeg3, Pfpeg 4 et la Pfg27 sont les quelques protéines spécifiques des gamétocytes qui sont exprimées durant tout le stade de maturation

(Pfs16) et durant le stade II et III (Pfpeg3, Pfpeg4) (Baker, 2010). Il a été suggéré que la Pfs 16 intervient dans la maturation des gamétocytes, leur transmission au moustique et leur fertilité (Kongkasuriyachai et al., 2004).

En résumé, la LysoPc active l'expression de GDV1 qui à son tour active le PfAP2-G au niveau épigénétique. La PfAP2-G induit une cascade d'expression de protéines qui sont essentielles pour la différenciation, la gamétocytogenèse et aussi la gamétogenèse. Des recherches futures permettront d'identifier d'autres mécanismes et les protéines impliquées dans la gamétocytogenèse.

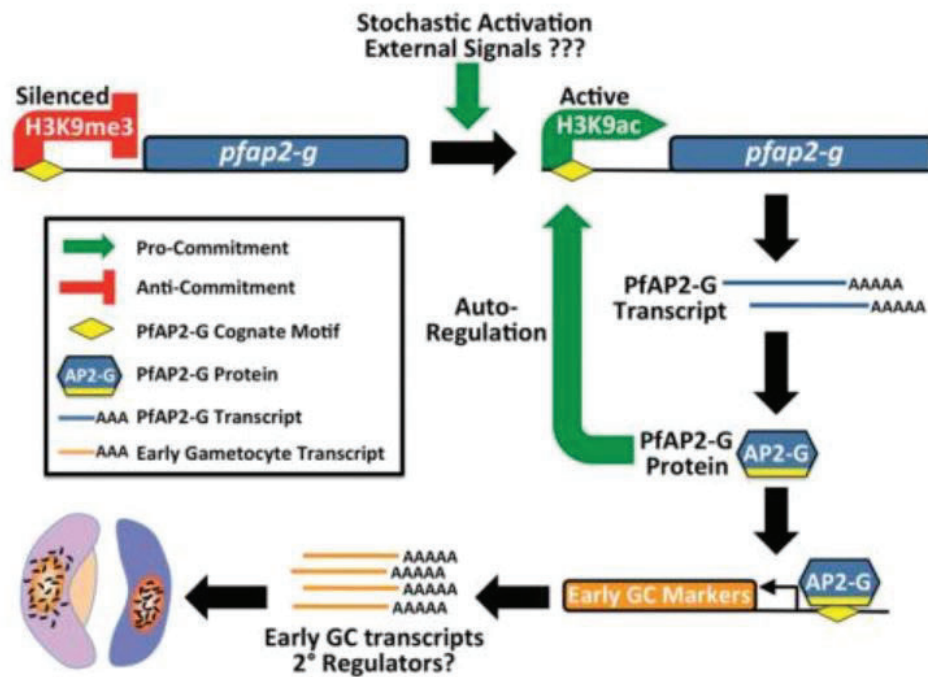


Figure 14: Modèle du mécanisme épigénétique de la gamétocytogenèse. (d'après Kafsak et al., 2014)

II.3. Mode de différenciation des gamétocytes

Deux modes de différenciation des gamétocytes ont été rapportés. Il a été proposé que les gamétocytes se produisent soit dans un même cycle érythrocytaire soit dans le prochain cycle

(Bruce et al., 1990; Carter & Miller, 1979). Récemment, une étude propose ce qui suit : la différenciation des gamétocytes dépend du rétrocontrôle négatif de PfAP2-G régulé par son niveau seuil (Bancells et al., 2019). Selon que la quantité de AP2-G nécessaire pour la différenciation soit atteinte au stade mérozoïtes ou schizontes, la différenciation des gamétocytes peut se faire dans le même cycle érythrocytaire ou dans le cycle suivant (Bancells et al., 2019; Bruce et al., 1990). Lorsque la différenciation a lieu dans le même cycle, un mérozoïte génère un gamétocyte mâle ou femelle. Dans l'autre scénario, le schizonte produit des gamétocytes de même sexe.

II.4. Sexe des gamétocytes et exflagellation

La distribution du sexe des gamétocytes est un processus régi par divers facteurs impliquant une régulation épigénétique et l'expression de gènes spécifiques.

Le ratio gamétocyte mâle/femelle est biaisé en faveur des femelles avec environ 3 – 5 gamétocytes femelles contre un gamétocyte mâle (Gbotosho et al., 2011; Tadesse et al., 2019). La détermination du sexe des gamétocytes a probablement lieu en même temps que l'activation de la gamétocytogenèse. Cependant, le moment exact où la détermination du sexe a lieu n'est pas entièrement compris (Silvestrini et al., 2000). Il se peut qu'une interaction complexe entre les voies de signalisation, l'expression des gènes et les facteurs inductibles contribue au processus de détermination du sexe. Diverses hypothèses ont été émises sur les facteurs impliqués, notamment la diversité génétique des clones durant une infection et l'assurance d'une gamétogenèse optimale chez le moustique (Hamilton, 1967; Mitri et al., 2009; Reece et al., 2008; Silvestrini et al., 2000; Tadesse et al., 2019).

Lors de la gamétogenèse, un gamétocyte mâle génère environ huit microgamètes flagellés tandis qu'un gamétocyte femelle se différencie en un seul macrogamète (Dash et al., 2022). La disparité observée dans la production des gamètes peut être la raison de la prédominance des gamétocytes femelles. Il faut aussi noter que les gamétocytes mâles ont une durée de vie limitée comparée aux femelles (Neal, 2011; Tadesse et al., 2019; Talman et al., 2004). Par ailleurs, des études suggèrent que le sexe-ratio peut varier en fonction de la diversité génétique des parasites. La co-présence de clones variés au cours d'une infection et la théorie de la sélection naturelle et

de la répartition des sexes suggèrent que la proportion de gamétocytes mâles augmente avec la diversité génétique. Ceci pour augmenter la chance de fertilité d'un clone parmi plusieurs concurrents (Hamilton, 1967). Cette prédiction a été démontrée par une étude durant laquelle les souris étaient infectées par plusieurs clones de *P. chabaudi*. Les résultats ont montré une augmentation des gamétocytes mâles en fonction de la diversité génétique (Reece et al., 2008).

En outre, des conditions micro-environnementales, notamment une forte densité des formes asexuées, une faible gamétocytemie, l'anémie et une augmentation de l'immunité de l'hôte, ont été associées à des changements dans le ratio sexe des gamétocytes (A. Gardner et al., 2003; Mitri et al., 2009; Ramiro et al., 2011; Reece et al., 2008; Tadesse et al., 2019). Par exemple, l'on pense que l'anémie a un impact sur l'exflagellation des gamétocytes mâles, ce qui conduit à une production plus élevée de gamétocytes mâles en tant que mécanisme compensatoire. Au contraire, une gamétocytemie élevée semble augmenter les gamétocytes femelles (Mitri et al., 2009; Ramiro et al., 2011; Reece et al., 2008). Cependant, les mécanismes exacts qui sous-tendent la régulation de la détermination du sexe restent insaisissables.

II.5. Mécanismes physiologiques de maturation des gamétocytes

Le développement des gamétocytes implique cinq stades de maturation chacun étant caractérisé par des traits physiologiques et morphologiques distincts. Chaque stade nécessite environ deux jours pendant lesquels s'effectue la croissance et la réorganisation des structures du cytosquelette des gamétocytes (Dixon & Tilley, 2021). Sur le plan morphologique, le stade I est indifférenciable des trophozoïtes de forme sphérique. La différence avec les stades asexués commence au stade II mature où le gamétocyte s'étire d'un côté et commence par prendre une forme ovale. Au stade III, cet étirement s'étend et confère une forme de "D" aux gamétocytes. À ce stade, le rapport longueur largeur est de 2 :1. Ensuite, le gamétocyte s'allonge davantage aux extrémités pointues et devient rigide avec un rapport de taille de 4 :1. Le gamétocyte occupe tout l'érythrocyte qui forme une protubérance appelée « Laveran's bib ». À ce stade, commence à distinguer les gamétocytes mâles des femelles sur la base des cristaux d'Hz qui restent groupés chez les femelles et dispersés chez le mâle. Les extrémités pointues s'arrondissent au stade V, le gamétocyte perd sa rigidité et adopte une forme de banane dite falciforme avec un rapport 3 :1. En

sommes, d'un diamètre d'environ 1 µm au stade I, le gamétocyte finit par avoir une taille d'environ 10 µm de long sur environ 5 µm de large et occupe plus de 50% de l'érythrocyte (Figure 15-A,B) (Dixon et al., 2012; Sinden, 1982). L'imagerie 3D en temps réel des gamétocytes en circulation, suggère que seuls les stades I et V peuvent circuler dans le sang périphérique vu la petitesse des stades I et la plasticité du stade V rendu possible par l'organisation de son cytosquelette (De Niz et al., 2017).

Les modifications de structure et de forme sont orchestrées par des éléments du cytosquelette comme les microtubules (MTs) et le complexe membranaire interne (CMI). Ces deux structures rentrant dans la maturation des gamétocytes et conférant différentes formes caractéristiques de chaque stade seraient déterminantes pour le développement du gamétocyte. L'arrêt de la maturation des gamétocytes à la suite de l'inhibition de la formation du complexe CMI souligne le rôle crucial du CMI (Clements et al., 2022; Parkyn Schneider et al., 2017).

Au cours du stade I de maturation, le CMI provenant du réticulum endoplasmique est observable en microscopie électronique haute résolution comme des points sous la membrane plasmique du parasite. Au fur et mesure du développement, le CMI forme 13 disques continus au stade II et s'allongent davantage au stade III. Pendant ces stades se forme un réseau dense de microtubules à un pôle qui s'étend latéralement au stade III. Au stade IV, des bandes de CMI couvrent la surface du gamétocyte. Aussi, les microtubules se répartissent uniformément le long du gamétocyte formant une structure en forme de cage autour. Enfin au stade V, les microtubules se dissocient entraînant la perte de rigidité du gamétocyte. Le CMI occupe complètement le gamétocyte avec des plaques de CMI intercalées d'une suture protéique intervenant dans la stabilité du CMI (Figure 15-C) (De Niz et al., 2017; Dearnley et al., 2012; Dixon et al., 2012; Dixon & Tilley, 2021; Rashpa & Brochet, 2022). Ces protéines jouent un rôle important dont celui de l'interaction entre les structures du cytosquelette avec la membrane plasmique ou encore avec le complexe actine-myosine. Par exemple, les protéines alvéolines semblent intervenir dans la liaison du CMI aux MTs sous-pelliculaire via la formation de structures filamenteuses (Kumar et al., 2019). Outre le CMI et les MTs, l'actine est aussi impliquée dans le processus de développement des gamétocytes avec le F-actine qui sert de support aux MTs en extension et par la même occasion participe à leur stabilisation.

Le tableau 1, résume les différences morphologiques et structurales entre les différents stades de maturations et entre les gamétocytes femelles et mâles.

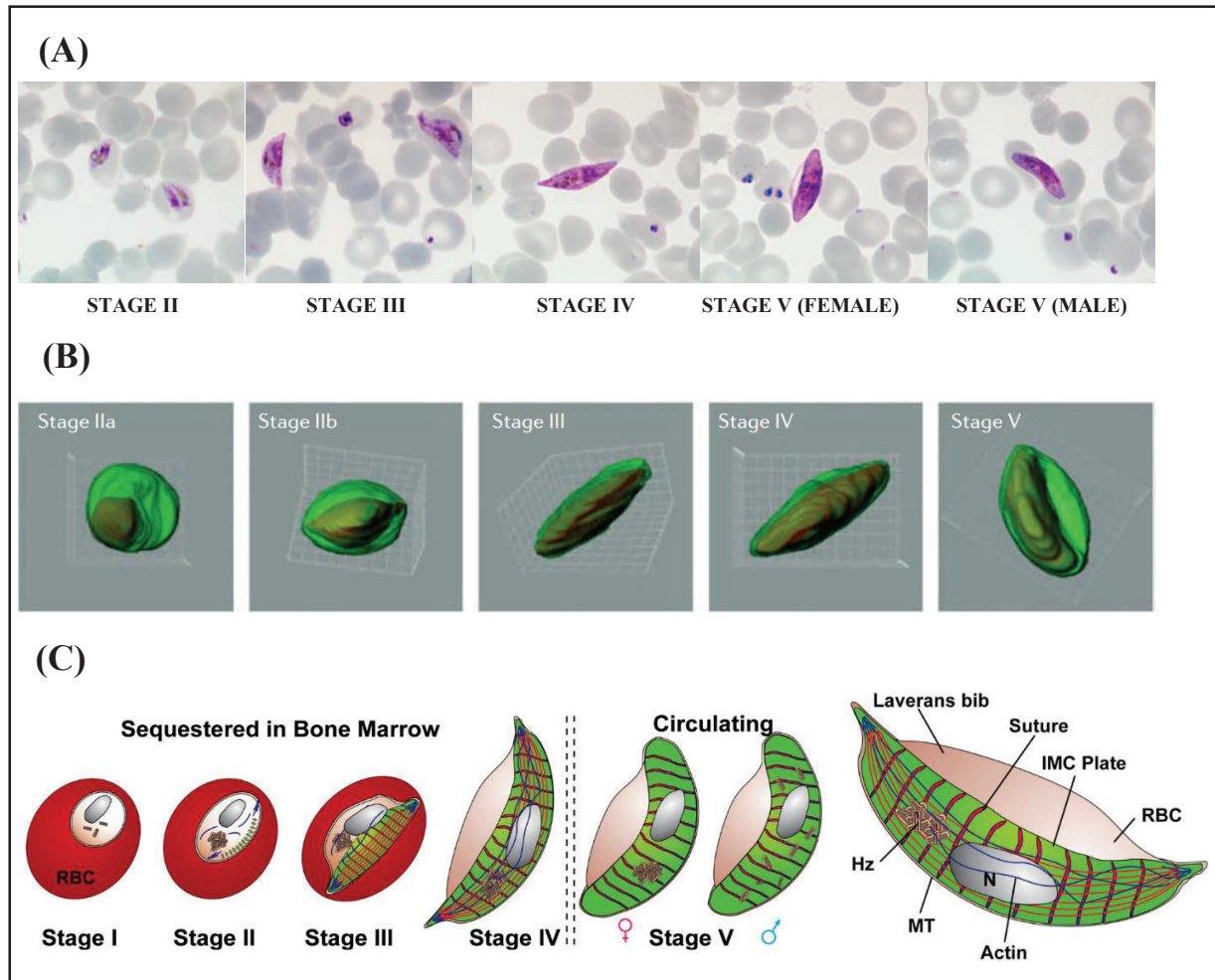


Figure 15: Caractéristiques morphologiques des gamétocytes suivant leur stade de maturation

(A) gamétocytes de stade II à V vue au microscope optique sur frottis sanguin coloré au GIEMSA. (B) Image issue d'une analyse 3D. La différenciation morphologique du parasite entraîne une déformation considérable du globule rouge de l'hôte, qui passe d'une forme discoïdale à une ellipse allongée au fur et à mesure que le gamétocyte mûrit du stade II au stade V. (De Niz et al., 2016). (C) Modèle de la dynamique du complexe de membre interne (en vert) au cours de la maturation des gamétocytes.

Les plaques de CMI sont déposées sous forme de 13 structures en forme de disque sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique du parasite. Ces plaques servent d'échafaudage pour la formation des microtubules. Au fur et à mesure que le parasite se développe, les plaques s'étendent par l'ajout d'une nouvelle membrane sur leurs bords antérieurs. Le réseau de microtubules (filaments rouges) s'aligne sur ces plaques et entraîne l'élongation du parasite. Ces plaques continuent à se développer jusqu'au stade IV du développement. Au stade V, le réseau de microtubules est désassemblé, mais le Complexe Membranaire Interne (CMI) reste en périphérie du parasite. (Dixon et Tilley, 2021)

Tableau 1: caractéristiques morphologiques et structurales des stades de maturation des gamétocytes.

Stade	Caractéristiques morphologiques	Caractéristiques structurales
Stade rings	Identiques aux rings de formes asexués.	
Stade I	Identiques aux trophozoïtes de formes asexués. Formes sphériques	Formation du CMI qui apparait sous forme d'une ligne de point d'un côté de la membrane plasmique
Stade II	Forme légèrement allongée en forme de citron	CMI est sous forme de 13 structures continues en forme de disque. Formation de réseau dense de microtubules à l'extrémité pointue avec un faisceau de microtubules qui s'étend dans le cytoplasme
Stade III	Forme "D" avec la longueur faisant environ deux fois la largeur	Extension du CMI sur le l'extrémité pointue, prolongation latérale du réseau de MT, élongation du noyau, augmentation de la taille de la vacuole digestive
Stade IV	Forme allongée avec des extrémités pointues ; la longueur fait environ quatre fois la largeur	CMI devient épais et enveloppe le gamétocyte ; MTs continues et uniformément réparties dans le cytoplasme formant un réseau dense aux extrémités pointues du gamétocyte
Stade V	Forme de banane avec les extrémités arrondies.	Dissociation des microtubules, le CMI couvre le gamétocyte et les bandes de CMI sont séparées par des sutures protéiques
Gamétocytes femelles	Hémozoïne condensée Couleur violet après coloration GIEMSA	Plus de ribosome, de réticulum endoplasmique et de corps osmophile comparé au gamétocyte mâle, mitochondrie plus grande.
Gamétocytes mâles	Hémozoïne dispersée Couleur rose après coloration GIEMSA	Noyau plus large que celui des femelles, réduction de ribosome

CMI : Complexe Membranaire Interne ; MTs : microtubules

II.6. Le métabolisme des gamétocytes

Les gamétocytes présentent des caractéristiques métaboliques distinctes de celles des formes asexuées, particulièrement orientées vers la production et la libération des gamètes nécessaires à la transmission du paludisme. Ce métabolisme est dynamique au sein des stades de maturation, avec les premiers stades présentant un métabolisme plus élevé que les stades matures. Leur séjour dans un environnement riche en nutriment chez l'homme puis dans un environnement avec des ressources limitées (moustique) résulte en une adaptation particulière de leur métabolisme. Ces adaptations impliquent des changements dans le métabolisme énergétique, et l'utilisation des nutriments, le gamétocyte doit adapter son métabolisme pour assurer son développement et sa maturation.

II.6.1. Disparités métaboliques entre les gamétocytes et les stades asexués :

Les disparités métaboliques entre gamétocytes et stade asexués semblent être régulées au niveau épigénétique. Cette régulation a des influences sur l'expression des gènes et le niveau de protéines nécessaires à la différenciation, à la maturation et au métabolisme spécialisé des gamétocytes. Une étude protéomique a identifié plus de 1289 protéines chez *Plasmodium* dont 305 seraient spécifiquement exprimées chez les gamétocytes, le reste des protéines serait partagé entre les gamétocytes et les autres stades érythrocytaires. (Lasonder et al., 2002, 2016). Au total, 900 protéines ont été identifiées chez les gamétocytes (Baker, 2010; Talman et al., 2004). Cette variation du profil protéomique se traduit évidemment par des variations métaboliques. Ainsi, les principaux métabolismes : glucidique, lipidique, énergétique (production d'ATP) sont présents chez les gamétocytes, mais à des niveaux de fonctionnement différents.

II.6.2. Métabolisme énergétique :

Le métabolisme du carbone central dérivé du glucose ou de la glutamine de l'hôte est présent à la fois chez les stades asexués et les gamétocytes (MacRae et al., 2013). Cependant, le niveau de fonctionnement des principales voies, notamment la glycolyse et le cycle de l'acide tricarboxylique, diffère entre les deux stades.

Contrairement aux formes asexuées qui dépendent fortement de la glycolyse pour produire de l'ATP, les gamétocytes produisent principalement de l'énergie via le cycle de l'acide tricarboxylique et la respiration mitochondriale en utilisant principalement le glucose comme source de carbone. Une étude comparant le catabolisme du glucose et de la glutamine chez les formes asexuées et les gamétocytes de *P. falciparum* a montré une augmentation du catabolisme du glucose via le cycle de l'acide tricarboxylique chez le gamétocyte (MacRae et al., 2013).

Une approche omic dite de "Complexome profiling" qui interroge la composition des complexes de protéines soutient ces résultats, révélant jusqu'à 40 fois plus de protéines liées à la chaîne respiratoire et aux voies métaboliques connexes dans les gamétocytes de *P. falciparum*. Au contraire, les protéines impliquées dans la glycolyse sont réduites dans les gamétocytes (Evers et al., 2021). De plus, les gamétocytes surexpriment le cytochrome b tandis que leurs mitochondries présentent une morphologie allongée avec des crêtes tubulaires qui sont absentes chez les formes asexuées (Okamoto et al., 2009). Ces caractéristiques mitochondriales contribuent probablement à l'optimisation des fonctions mitochondriales chez les gamétocytes.

II.6.3. Métabolisme lipidique :

Les gamétocytes présentent un métabolisme lipidique accru, essentiel à leur développement. Les lipides forment les composants de leur membrane plasmique, du complexe de membrane interne et de la bicouche lipidique en partie responsable des remodelages morphologiques au cours du développement. Cette augmentation du métabolisme est régulée au niveau transcriptomique par l'augmentation de l'expression de gènes associés à la biosynthèse des acides gras de type II et du lipoate synthèse (Okamoto et al., 2009). La composition lipidique des gamétocytes est caractérisée par des niveaux élevés d'esters de cholestérol, de diacylglycérol et triacylglycérol ainsi que des corps osmiophiles riches en acides gras. Ces lipidiqes servent potentiellement de réserves d'énergie pour la biosynthèse de protéines et de phospholipides pendant la gamétogenèse chez le moustique (van der Watt et al., 2022).

II.6.4. Cycle cellulaire et réplication de l'ADN :

Les gamétocytes matures semblent être bloqués à la phase G₀, alors que la réplication de l'ADN, un processus constant chez les formes asexuées, semble se produire qu'aux premiers stades de la maturation (stade I à III). Une étude sur la quantification de l'ADN en utilisant la technique de l'incorporation de l'hypoxanthine radiomarquée [H³] hypoxanthine a montré une absence de réplication de l'ADN des gamétocytes matures de *P.berghei* (Raabe et al., 2009).

II.6.5. Synthèse de l'ARN et digestion des protéines :

Les gamétocytes matures semblent connaître une réduction drastique de la synthèse d'ARN, de la synthèse des protéines et de la digestion de l'hémoglobine. Plusieurs publications soutiennent la thèse selon laquelle, vers le sixième jour de développement des gamétocytes, ceux-ci arrêteraient la synthèse d'ARN ainsi que la synthèse de protéines et la digestion de l'hémoglobine (Baker, 2010; Canning & Sinden, 1975; Sinden et al., 1978). Ce mécanisme assez intrigant des gamétocytes serait une sorte de maintien d'énergie et de ressources nécessaires à la poursuite de leur développement dans un environnement complètement différent où les ressources seraient limitées.

Les adaptations métaboliques des gamétocytes ont une importance capitale pour leur survie, leur transmission et la gamétogénèse qui s'ensuit chez les moustiques. La plupart des voies métaboliques des gamétocytes n'ont pas été décrites, et une bonne compréhension s'avère nécessaire pour le développement des stratégies de blocage de la transmission du paludisme ciblant les gamétocytes.

III. Place des gamétocytes dans l'élimination du paludisme

III.1. Implication de la densité des gamétocytes dans la dynamique de la transmission du paludisme

L'intensité de la transmission est un paramètre qui dépend essentiellement de la densité des gamétocytes et aussi de leur infectiosité (Alemayehu, 2023; Koepfli & Yan, 2018). La densité

de gamétocytes ou le taux de portage correspond à la quantité de gamétocytes matures présents dans le sang périphérique d'une personne. Il faut souligner que les gamétocytes immatures sont séquestrés dans les tissus comme la moelle osseuse et donc la quantité réelle de gamétocytes peut être plus importante que l'estimation fournie par les diverses méthodes d'évaluation.

Parmi les méthodes de détermination de la densité parasitaire, les méthodes moléculaires notamment la RT-qPCR sont les plus sensibles, tandis que la microscopie est la moins sensible (Koepfli & Yan, 2018). Cependant, la microscopie reste la méthode la plus utilisée sur le terrain. Ce qui peut fausser les estimations de la prévalence de porteurs de gamétocytes. Un paramètre pourtant important pour l'adaptation des stratégies de lutte contre le paludisme.

III.2. Prévalence des porteurs de gamétocytes

Le nombre de porteurs de gamétocytes est variable en fonction des études et de la population cible (Alemayehu, 2023; Bousema & Drakeley, 2011; Koepfli & Yan, 2018; Lamptey et al., 2018). Une étude réalisée au Ghana dans une zone de faible transmission a évalué le nombre de porteurs de gamétocytes en utilisant la RT-PCR du marqueur *pfs25* des gamétocytes en plus de l'identification de l'anticorps *pfs230* spécifique des gamétocytes. L'étude rapporte une prévalence de gamétocytes submicroscopique de plus de 17% chez les adultes. Cette valeur était plus élevée chez les enfants et les femmes enceintes soit 39,5 % et 29,7 % respectivement (Lamptey et al., 2018). Parallèlement, une étude multicentrique utilisant la RT-qPCR pour évaluer le nombre de porteurs de gamétocytes dans des zones à intensité de transmission variée fait état de plus de 44 % - 94% de porteur de gamétocytes de *P. falciparum* et de 23% - 72% pour *P. vivax* (Koepfli et al., 2021). Ces chiffres illustrent la prévalence considérable des gamétocytes. Ce qui constitue une menace pour l'élimination du paludisme si l'on ajoute à cela l'émergence des résistances aux antipaludiques qui pourraient augmenter ces chiffres.

III.3. Patients asymptomatiques et gamétocytes submicroscopiques :

Les patients asymptomatiques et les porteurs de gamétocytes à un taux submicroscopique jouent un rôle essentiel dans la transmission du paludisme. Les patients asymptomatiques sont

susceptibles d'être porteurs de gamétocytes pendant de longues périodes, allant de plusieurs semaines à plusieurs mois, constituant ainsi des réservoirs humains de gamétocytes qui participent à la propagation du paludisme (Alemayehu, 2023; Andolina et al., 2023; Koepfli et al., 2021). Dans les infections asymptomatiques, la densité de moustiques infectés par les gamétocytes semble proportionnelle au nombre de moustiques qui deviennent effectivement infectieux (Rek et al., 2022) en raison du sexe-ratio mâle qui semble favoriser une fécondation optimale des macrogamètes (Mitri et al., 2009). Les stratégies d'élimination portent une attention particulière sur la lutte contre ces réservoirs d'infection (malERA Refresh Consultative Panel on Characterising the Reservoir and Measuring Transmission, 2017).

III.4. Implication pour l'élimination du paludisme :

Le rôle significatif des gamétocytes dans la transmission du paludisme les place au centre des efforts de lutte contre le paludisme. La densité des gamétocytes matures dans le sang périphérique de l'hôte influence l'intensité de la transmission du paludisme (Bradley et al., s. d.; Churcher et al., 2013; Lamptey et al., 2018). Cependant, la relation entre la quantité de gamétocytes dans le sang et l'infection du moustique semble complexe et non linéaire (Bradley et al., s. d.; Churcher et al., 2013). Des études ont montré que même de faibles densités de gamétocytes parfois aussi peu que 0,3 gamétocyte / μ L peuvent permettre une infection réussie des moustiques (Meerstein-Kessel et al., 2018). Ces faibles densités de gamétocytes sont courantes dans les cas de gamétocytémies submicroscopiques et potentiellement chez les porteurs asymptomatiques, bien que des recherches aient trouvé que ces derniers peuvent présenter des densités plus importantes que les patients symptomatiques (Vallejo et al., 2016b). Par conséquent, la détection précise des porteurs de gamétocytes et la compréhension des facteurs influençant leur densité et leur infectivité sont importantes pour concevoir des stratégies efficaces.

En outre, la densité des gamétocytes peut servir d'indicateur de la résistance aux antipaludiques, ajoutant une dimension supplémentaire à leur importance dans la gestion du paludisme (Abdul-Ghani et al., 2015).

Ainsi, le contrôle efficace des gamétocytes est impératif pour interrompre la transmission du paludisme. Cela implique entre autres, une identification rapide et précise des porteurs en particulier les patients asymptomatiques ainsi que la mise en place de mesures visant à réduire leur prévalence.

Chapitre IV : Ganaplacide (KAF156), un espoir pour le blocage de la transmission du paludisme

I. Stratégies de blocage de la transmission du paludisme

Le terme “transmission blocking strategies (TBS)” fait référence aux approches visant à empêcher la transmission du parasite de l’homme aux moustiques et/ou du moustique à l’homme (D. Gonçalves & Hunziker, 2016; Yu et al., 2022). Les approches visant à interrompre la transmission du parasite de l’homme aux moustiques ciblent spécialement les gamétocytes en empêchant leur développement, leur survie ou leur infectiosité (D. Gonçalves & Hunziker, 2016; Sinden, 2017; Yu et al., 2022). Elles incluent la recherche et le développement de médicaments et vaccins qui ont pour but de bloquer la transmission.

I.1. Stratégies axées sur les vaccins « Transmission-Blocking Vaccines (TBV) »

I.1.1. Principes et rôle des TBV :

Les vaccins bloquant la transmission du paludisme constituent une approche intéressante pour renforcer les efforts d’élimination du paludisme. Contrairement aux vaccins traditionnels qui ciblent les stades hépatocytaires (vaccins préventifs) ou érythrocytaires asexués (vaccins curatifs) chez l’homme, les vaccins bloquant la transmission du paludisme doivent être capables de cibler plusieurs stades du parasite chez l’homme y compris les gamétocytes et le stade sexué chez le moustique (Dinglasan & Jacobs-Lorena, 2008). Ce double ciblage s’avère essentiel pour prévenir la transmission du paludisme et limiter l’émergence des résistances, car il interrompt le développement sexué chez les moustiques.

Les progrès récents de la protéomique, de la génomique et des disciplines connexes ont permis de comprendre certains des mécanismes biologiques qui régissent le développement du *Plasmodium* (Ngwa et al., 2013; Pegoraro & Weedall, 2021; Volkman et al., 2012). Ceci a conduit à l’identification de certaines molécules (Keleta et al., 2021) favorisant ainsi de nouvelles stratégies vaccinales bloquant la transmission du paludisme (P. E. Duffy & Patrick Gorres, 2020; El-Moamly & El-Sweify, 2023). Les TBV sont supposés induire chez l’homme les anticorps qui

ciblent des molécules essentielles pour le développement sexué afin d'inhiber leurs mécanismes fonctionnels. Par conséquent, l'inhibition du développement sexué réduit le nombre de moustiques infectieux, ce qui contribue à la diminution de la transmission du paludisme.

I.1.2. Cibles des vaccins bloquant la transmission

Les recherches sur les TBV sont principalement axées sur les protéines de surface des stades sexués chez le moustique. La Pfs25 et la Pfs28 font partie des premières protéines à être étudiées en vue de la formulation des TBV (P. E. Duffy & Patrick Gorres, 2020; Y. Wu et al., 2008; Yu et al., 2022). Ces protéines sont exprimées à la surface de la macrogamète, à la surface du zygote et de l'ookinète. Bien que les mécanismes moléculaires précis de leur implication restent à clarifier, il a été suggéré qu'elles interviennent dans la motilité et l'adhésion des ookinètes aux cellules épithéliales. Ces étapes seraient importantes pour le déplacement à travers la barrière épithéliale de l'intestin du moustique (Baton & Ranford-Cartwright, 2005; Tomas et al., 2001).

Les recherches sur les vaccins à antigène Pfs25 sont en cours pour optimiser leur immunogénicité, leur efficacité, leurs propriétés pharmacologiques, et leur tolérance. En effet, le premier essai clinique de phase 1 conduit entre 2005 et 2007 avec Pfs25 formulé avec l'adjuvant Montanide ISA51 s'est montré réactogène et moins immunogène (Y. Wu et al., 2008). Loin d'être eux-mêmes antigéniques, les adjuvants induisent des réponses immunitaires optimales et efficaces à des antigènes spécifiques, améliorant ainsi l'efficacité des vaccins. Il a été suggéré que le Montanamide ISATM, une émulsion eau-huile, améliore le taux d'anticorps spécifiques en créant un dépôt au site d'injection, favorisant une libération lente de l'antigène et une réponse immunitaire prolongée (Melssen et al., 2022; van Doorn et al., 2015). Des recherches ultérieures ont exploré diverses approches d'ingénierie moléculaire, de choix d'adjuvants et de protéines de combinaisons. Notamment, en associant la protéine Pfs25 avec IMX313, une protéine structurée en multiples sous-unités, une nanoparticule a été créée. Cette nanoparticule semble améliorer l'immunogénicité lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec le vaccin RTS, S/AS186 lors des tests chez les souris (Brod et al., 2018). Par ailleurs, la Pfs25 couplée à l'exoprotéine A (EPA) détoxifiée de *Pseudomonas aeruginosa* (Pfsé(-EPA)) formulé avec l'adjuvant Ahyrogel® d'une part et la formulation de Pfs25 couplée à la protéine de l'enveloppe du virus de la mosaïque de

luzerne d'autre part sont les quelques innovations du vaccin à Pfs25 qui sont en cours d'essais cliniques (Keleta et al., 2021, 2021; D. Gonçalves & Hunziker, 2016; Yu et al., 2022; P. E. Duffy & Patrick Gorres, 2020).

La Pfs25 est loin d'être la seule cible des TBV. D'autres protéines impliquées dans la fertilité des gamètes et dans le développement du zygote sont les cibles d'autres vaccins TBV en cours d'exploration. La Pfs48/45 est une protéine qui semble inhiber la fertilité des microgamètes tandis que la Pfs230 et le disulfide isomérase seraient indispensables pour l'activation et la fertilité des gamétocytes mâles (P. E. Duffy & Patrick Gorres, 2020; El-Moamly & El-Sweify, 2023; Keleta et al., 2021; Yu et al., 2022). Ces protéines sont exprimées chez les gamétocytes mâles et femelles de *P. falciparum*. Bien que ces cibles soient prometteuses pour les TBVs, la formulation de leur vaccin s'avère rude en raison de leur taille et des problèmes de repliements dus à leur constitution en acide aminé entre autres (P. E. Duffy, 2022; P. E. Duffy & Patrick Gorres, 2020; S. K. Singh et al., 2017). Néanmoins, les efforts ont permis de formuler un vaccin Pfs230 qui est entré en phase I d'essai clinique (Healy et al., 2021; Keleta et al., 2021; S. K. Singh et al., 2021). Des recherches supplémentaires sur la structure biochimique de ces protéines sont nécessaires pour optimiser la conception des vaccins, car les résultats actuels montrent une immunogénicité limitée.

I.1.3. Défis et perspective des TBV :

En somme, la stratégie des vaccins bloquant la transmission du paludisme se montre prometteuse pour l'élimination du paludisme. Cependant, leur développement se heurte à de multiples contraintes telles que : la complexité du cycle de vie du parasite, la nécessité de vaccin efficace contre plusieurs souches, le risque d'évasion immunitaire par le parasite, le besoin d'un vaccin à immunité longue durée, et la nécessité d'induire une immunité à la fois chez l'homme et chez le moustique. De plus, l'homme n'exprime pas ces protéines cibles ce qui entraîne une absence d'immunité humorale (Keleta et al., 2021). Cependant, les efforts de recherche en cours prennent en compte ces contraintes en essayant par exemple de cibler les protéines les plus adaptées et les plus pertinentes ou encore en optimisant les formulations vaccinales.

Si les stratégies ciblant les stades parasitaires chez le moustique telles que les TBV semblent être les stratégies de prédilection pour interrompre le cycle de transmission (Yu et al.,

2022), celles des molécules ciblant les stades de transmission chez l'homme sont tout aussi importantes, voir indispensable. L'émergence des résistances aux antipaludiques et les contraintes de la mise au point des TBV, font que les médicaments bloquant la transmission du paludisme de l'anglais « Transmission-Blocking Drugs » (TBD) sont nécessaires et viennent compléter les TBV dans lutte contre le paludisme.

I.2. Stratégie axée sur les médicaments « Transmission-Blocking Drugs (TBD) »

Ici, nous traiterons en particulier de l'importance de médicaments bloquant la transmission du paludisme. Nous aborderons les principes qui régissent les TBD, leur valeur potentielle dans la lutte contre le paludisme, les antipaludiques existants ayant une activité de blocage de la transmission et les défis associés au développement de nouveaux antipaludiques. En outre, nous nous pencherons sur les nouvelles cibles et les approches de recherches et de développement ainsi que le rôle des outils moléculaires et technologiques pour les TBD du futur. Nous nous attarderons aussi sur l'importance des efforts déployés par des organisations telles que Medecine for Malaria Venture (MMV) et Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi) pour faire progresser la recherche sur les antipaludiques.

I.2.1. Principe et place des TBD dans la lutte pour l'élimination du paludisme

Les TBD sont des médicaments envisagés pour cibler les stades sexués, notamment les gamétocytes afin de prévenir la transmission du paludisme. Contrairement aux antipaludiques classiques qui ciblent les stades asexués responsables du paludisme chez l'homme, les TBD peuvent agir à la fois sur les stades sexués et asexués du parasite. Ils peuvent tuer les stades sexués, inhiber leur activation chez le moustique et les rendre stériles. Ceci souligne leur rôle dans la réduction des parasites résistants. Les mécanismes moléculaires de la gamétocytogenèse commencent par être compris. Mais de nouvelles découvertes pourraient potentiellement ouvrir des perspectives de développement de TBD qui peuvent agir en amont en empêchant l'activation de gènes impliqués dans la gamétocytogenèse. Par ailleurs, l'intégration des TBD dans la

chimio prophylaxie peut être un moyen intéressant notamment pour limiter les réservoirs de gamétocytes, ces patients asymptomatiques peut-être responsables de plus de 80% des transmissions (Rek et al., 2022).

I.2.2. Antipaludiques existants avec une activité de blocage de la transmission :

I.2.2.1. *La primaquine*

Connue pour son efficacité pour réduire la transmission du paludisme à *P. falciparum* et *P. vivax*, la primaquine est le seul TBD recommandé par l’OMS. La primaquine exerce une action létale sur les gamétocytes matures et il a été suggéré qu’elle les rendait également infertiles (Chotsiri et al., 2022). Le mécanisme d’action précis de cette molécule de la famille des 8-aminoquinolines n’est pas entièrement élucidé, mais on pense qu’elle génère des espèces réactives de l’oxygène qui induisent une toxicité oxydative en interférant avec la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie (Chotsiri et al., 2022; Kiszewski, 2010; Vale et al., 2009). En effet, la primaquine serait métabolisée par les enzymes hépatiques (Chotsiri et al., 2022) et ce sont ses métabolites hydroxylés qui seraient responsables de son efficacité (Vale et al., 2009). Une étude récente a suggéré que la primaquine est plutôt métabolisée par une enzyme du cytochrome P450, la CYP2D6, pour produire les métabolites hydroxylés générant des ERO (Camarda et al., 2019). Cependant, la réactivité de certains des métabolites pose un problème pour l’utilisation systématique de la primaquine. Le 5-hydroxyprimaquine et le 6-méthoxy-8-aminoquinoléine sont des métabolites qui peuvent induire une anémie hémolytique grave en oxydant le glutathion en disulfure de glutathion (Kiszewski, 2010). Chez les patients qui sont déficients en G6PD le risque d’hémolyse est élevé. En effet, le G6PD intervient dans la détoxification des ERO et la production de NADPH, ce dernier joue un rôle dans l’intégrité membranaire des érythrocytes. Sous l’action des ERO générées par les métabolites de primaquine, et faute de G6PD, la membrane des érythrocytes est dénaturée conduisant à l’hémolyse (Banccone & Chu, 2021b; Chu et al., 2018; Douglas et al., 2023). Au-delà de cette limite, la primaquine à une durée de vie très courte amenant parfois à des schémas thérapeutiques lourds allant jusqu’à 14 jours de traitement quotidien (Chotsiri et al., 2022; Kiszewski, 2010; Vale et al., 2009). Des recherches supplémentaires doivent être menées pour améliorer l’efficacité de la primaquine et réduire ses effets secondaires. Par

exemple, utiliser les métabolites de la primaquine les plus efficaces peut être une alternative (Bates et al., 1990).

I.2.2.2. L'artémisinine

L'artémisinine et ses dérivés ont montré des propriétés de blocage de la transmission du paludisme (Abay, 2013). Les recherches ont montré qu'elle agit sur les gamétocytes de stade jeune, mais moins sur les gamétocytes matures qui sont transmissibles au moustique (Adjalley et al., 2011; S. Duffy & Avery, 2013; Lelièvre et al., 2012; Peatey et al., 2009). Dans la mesure où les patients traités avec l'artémisinine peuvent avoir des gamétocytes matures et être infectieux, la propriété de blocage de transmission de l'artémisinine est limitée.

L'artémisinine est un sesquiterpène lactone avec un groupe peroxide (Ivanescu et al., 2015). On retrouve ce composé principalement dans la plante *Artemisia annua*. Divers mécanismes d'action de l'artémisinine ont été rapportés. Il a été suggéré que son groupe peroxyde est essentiel pour son activité antipaludique (Egwu et al., 2021, 2022). Ce groupe clivé sous l'action du fer présent dans l'hémoglobine génère des ERO qui sont délétères pour le parasite (Suresh & Haldar, 2018). Des études ont également suggéré que l'artémisinine et ses dérivés interfèrent avec la formation de l'Hz et interagissent avec les protéines impliquées dans la digestion de l'hémoglobine (Bridgford et al., 2018; Egan, 2008; Hong et al., 1994; Meshnick et al., 1991; Pandey et al., 1999). Ces actions de l'artémisinine et ses dérivées entravent diverses fonctions du parasite conduisant finalement à sa mort. Cette action rapide et multicible peut expliquer leur remarquable efficacité sur les parasites asexués (Ouji et al., 2018).

Ainsi selon le principe des médicaments et le stade de maturation des gamétocytes, la sensibilité des gamétocytes n'est pas la même. Les gamétocytes matures sont potentiellement plus sensibles aux médicaments qui induisent une toxicité, car il se peut que leur état métabolique ne leur permette pas d'éliminer efficacement les toxines. En outre, leur activité métabolique réduite pourrait expliquer l'efficacité limitée des antipaludiques ciblant les voies métaboliques. Cependant, les deux approches, inhibition de métabolisme ou de fonctions protéiques et induction de toxicité directe sont importantes et leur exploration mutuelle devrait être envisagée. La combinaison de molécules induisant une toxicité et ciblant le métabolisme peut entraîner une action synergique et une efficacité améliorée sur les stades asexués et sexués. Toutefois, des recherches approfondies

sont essentielles pour optimiser ces approches combinées. C'est là qu'intervient l'intérêt des techniques innovantes de recherche de cibles thérapeutiques et d'évaluation des molécules candidates.

I.2.3. Nouvelles cibles et stratégies de recherche et développement des TBD

Le défi permanent pour les futures TBD est de cibler à la fois les stades asexués et les gamétocytes, d'être efficace sur plusieurs espèces de *Plasmodium* ainsi que sur les clones résistants. Le progrès des techniques d'identification des TBD tels que les études *in silico* et le criblage à haut débit sont d'un grand intérêt pour répondre à ce besoin. À cela s'ajoute une amélioration des connaissances sur les mécanismes biologiques.

I.2.3.1. Ciblage de protéines spécifiques impliquées dans la gamétocytogenèse

La génomique, la transcriptomique et la protéomique ont considérablement aidé en fournissant des informations sur les mécanismes de production et de développement des gamétocytes ainsi que leur activation en gamètes (Brancucci et al., 2014; Coleman et al., 2014; Filarsky et al., 2018; Kafsack et al., 2014; Sinha et al., 2014).

Le ciblage des protéines associées à ces processus biologiques peut offrir une approche prometteuse pour interrompre la transmission du paludisme. Les protéines comme la GDV1 et la Pfs16 impliquées respectivement dans l'induction de la gamétocytogenèse et possiblement dans la maturation, la transmission et la fertilité des gamétocytes font partie des cibles en cours d'étude (Berry et al., 2009; Kongkasuriyachai et al., 2004; Yahiya et al., 2021). La Pfs48/45 et Pfs 230 et la Pfs50 sont également des cibles idéales qui peuvent être explorées.

I.2.3.2. Exploration des voies métaboliques spécifiques

Le métabolisme des gamétocytes est assez différent des parasites asexués et certaines voies métaboliques sont absentes chez l'homme. Le ciblage de voies métaboliques spécifiques, telles que celles impliquées dans le métabolisme des lipides peut s'avérer intéressant pour le développement de nouveaux TBD (Tran et al., 2016).

I.2.3.3. Utilisation de techniques moléculaires et de technologies pour l'identification des cibles

Les techniques de séquençage nouvelle génération (SNG) et le profilage transcriptomique sont quelques outils moléculaires qui ont révolutionné la génomique et la transcriptomique (Anamika et al., 2016; Mutz et al., 2013; Pervaiz et al., 2017) facilitant, entre autres, l'identification de cibles.

Le SNG permet un séquençage haut débit extensif et rapide pour déterminer l'ordre des nucléotides dans les génomes ou des régions cibles dans l'ADN ou l'ARN (Pervaiz et al., 2017). Le profilage transcriptomique est capable d'indiquer le niveau de régulation des gènes, leurs caractéristiques de régulation et les mécanismes moléculaires intervenant dans les fonctions biologiques (Anamika et al., 2016; Casamassimi et al., 2017).

Les techniques d'ingénierie moléculaire comme le CRISPR-Cas9, facilitent également les études génomiques permettant d'étudier la fonction de gènes spécifique (Boltryk et al., 2021; M. C. Lee & Fidock, 2014). Ils permettent d'identifier de nouveaux gènes cibles potentiellement impliqués dans l'induction, le développement et la transmission des gamétocytes ainsi que de leur différenciation en gamète.

Par ailleurs, les techniques de spectrométrie en masse (SM), de la résonance magnétique nucléaire (RMN) et de la bio-informatique ont permis des avancées dans la protéomique et métabolomique grâce à l'identification des protéines et des voies métaboliques (Izak et al., 2018; Lamour et al., 2014; Lindner et al., 2019; Spicer et al., 2019).

Ensemble, ces technologies contribuent de façon intégrative à l'identification et à la validation des cibles thérapeutiques. Une fois la cible identifiée il faudra déterminer la/les molécule(s) potentielle(s) capable(s) d'interagir avec elle.

I.2.4. Approche de réutilisation des médicaments existants pour le développement de nouveaux TBD

La réutilisation ou le « repositionnement » des médicaments de l'anglais « Drugs repurposing » est une approche visant à étudier les médicaments existants approuvés pour le

traitement d'autres maladies afin d'identifier leur activité potentielle de blocage de la transmission du paludisme (Pessanha de Carvalho et al., 2021). Cette approche présente plusieurs avantages dont la disponibilité du médicament. Le criblage des composées approuvées pour le traitement d'autres pathologies permet d'identifier rapidement et de manière économique de potentiels TBD.

Ainsi, divers médicaments ont été évalués pour leur efficacité potentielle sur les gamétocytes, notamment les anciens antipaludiques (atovaquone), les antibiotiques (azithromycine) (Fontinha et al., 2020) ou encore les antirétroviraux (Alisporivir) (Chaurasiya et al., 2022). Une étude a identifié les inhibiteurs de la protéase du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) comme des molécules qui peuvent bloquer la différenciation du zygote en ookinète (Goulielmaki et al., 2018).

I.2.5. Biobanques de molécules candidates et contributions des organisations non lucratives : Medecines for Malaria Venture (MMV) et Drugs for Neglected Diseases Initiatives (DNDi)

Medecines for Malaria Venture (MMV) et Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) sont deux organisations à but non lucratif créées en 1999 et en 2003 respectivement dans le but premier de lutter contre le paludisme et d'autres maladies négligées (*DNDi – Best Science for the Most Neglected*, 2019; *mmv.org/about-us*, 2023). Ces organisations fonctionnent selon un modèle de partenariats de développement de produits (PDP) et jouent un rôle important dans la recherche, la découverte, le développement et l'accessibilité de nouveaux antipaludiques en particulier dans les régions endémiques. MMV vise à lutter contre le paludisme à travers la découverte, le développement et la mise à disposition de nouveaux médicaments antipaludiques efficaces et accessibles aux populations en zones endémiques (*mmv.org/our-work/research-and-development*, 2023).

MMV a créé une chimiothèque de composés et de molécules susceptibles de cibler efficacement les parasites à différents stades de leur cycle de vie (Van Voorhis et al., 2016). Cette chimiothèque connue sous le nom de « MMV malaria Box » représente une ressource très utile pour les chercheurs dans le domaine de la découverte d'antipaludique.

Le libre accès à la Malaria Box de MMV permet aux chercheurs de diverses institutions et de divers domaines d'accéder à ces molécules et de les utiliser, ce qui contribue au criblage de tout un éventail de molécules (S. Duffy et al., 2017; Reader et al., 2021; Ruecker et al., 2014), accélérant ainsi l'identification de molécules antipaludiques prometteuses. En outre, la centralisation des données sur les composés dans la Malaria Box peut encourager la collaboration et le partage de connaissances et de ressources entre les chercheurs, favorisant ainsi une approche synergique dans la recherche de thérapies antipaludiques efficaces. Ce dernier étant important pour lutter contre les dégâts humains causés par le paludisme et de tendre vers son élimination.

La création des chimiothèques telles que la MMV Malaria Box, le global Health Diversity Library (GHCDL), qui compte plus de 68 000 composés différents des antipaludiques déjà connus (Abraham et al., 2020) ; le Tres Cantos Antimalarial Set (TCAMS) qui comprend plus de 13 000 molécules validées pour leur efficacité sur les différentes souches de *P. falciparum* (Cabrera, 2019) et les efforts de la DNDi reflètent l'engagement collectif de la communauté scientifique à lutter contre le paludisme.

I.2.6. Techniques de recherche et d'évaluation des molécules actives

i. Techniques de criblage phénotypiques et axées sur les cibles

Le criblage est une technique utilisée couramment pour découvrir de nouvelles molécules d'intérêt. Le criblage peut être phénotypique : dans cette approche, des chimiothèques de molécules synthétiques ou de produits naturels sont analysées sur les cellules ou organismes afin d'identifier des substances intéressantes sans une connaissance préalable des cibles (Kiriiri et al., 2020). Le criblage axé sur une cible consiste à identifier une/des cible(s) biologique(s) impliquée(s) dans un processus pathologique et sélectionné les composés pour identifier ceux qui modulent l'activité de la cible, souvent à l'aide de techniques de criblage à haut débit (Kiriiri et al., 2020).

Le criblage à haut débit de l'anglais High throughput screening (HTS) est un processus de découverte de médicaments qui permet de tester de façon automatisée de grandes chimiothèques afin d'identifier ceux qui ont un effet sur le développement des parasites. Ces tests permettent d'identifier les « Hits » qui sont les molécules qui ont montré une activité sur la cible durant les

tests. Ces « Hits » subissent alors d'autres études ultérieures conduisant à l'identification d'une molécule principale « lead ». Cette dernière est soumise aux études qui analysent la relation structure-activité (SAR) améliorant l'efficacité, la sélectivité et les propriétés pharmacocinétiques par des modifications successives de groupement chimique. Les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques examinent l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et la toxicité (ADMET) de la molécule à travers des expériences *in vitro* et *in vivo* (Kiriiri et al., 2020). Dans le cas des TBDs, les Hits sont testés pour leur activité sur les gamétocytes en plus des stades asexués.

Cependant, les HTS sont limités dans leur capacité à montrer que les molécules identifiées sont susceptibles de bloquer la transmission du parasite. Il faudrait des tests pour évaluer l'efficacité sur les gamétocytes et l'inhibition du cycle sexué chez le moustique qui témoigne effectivement du blocage de la transmission.

1.2.6.1. Méthodes d'évaluation de la viabilité et de l'infectiosité des gamétocytes

- Test microscopique basé sur l'analyse morphologique et le comptage des gamétocytes après coloration au Giemsa. Bien que moins coûteux, ce test est difficile à adapter au HTS.
- Test de viabilité basé sur le lactate déshydrogénase (pLDH): c'est un test colorimétrique mesurant l'activité du lactate déshydrogénase produit dans les gamétocytes viables à travers une réaction transformant le formazan de couleur jaune en tétrazolium de couleur bleue (D'Alessandro et al., 2013; Roncalés et al., 2012). Bien que sensibles et adaptables au HTS, la persistance du pLDH même après la mort du parasite, et la faible glycolyse (réaction libérant du pLDH) chez les gamétocytes matures sont les quelques limites.
- Alamar blue assay / résazurin assay : C'est un test de viabilité couramment utilisé pour mesurer la capacité métabolique des cellules ou organismes vivants. Il mesure par fluorescence ou colorimétrie la réduction du résazurine en résorufine fluorescent de couleur rose via la chaîne respiratoire mitochondriale. Il peut être adapté au HTS. Cependant la libération du NADH /NADPH provenant des érythrocytes peut interférer avec le signal des

parasites.(Forkuo et al., 2017; Reader et al., 2015; Tanaka et al., 2013; Tanaka & Williamson, 2011)

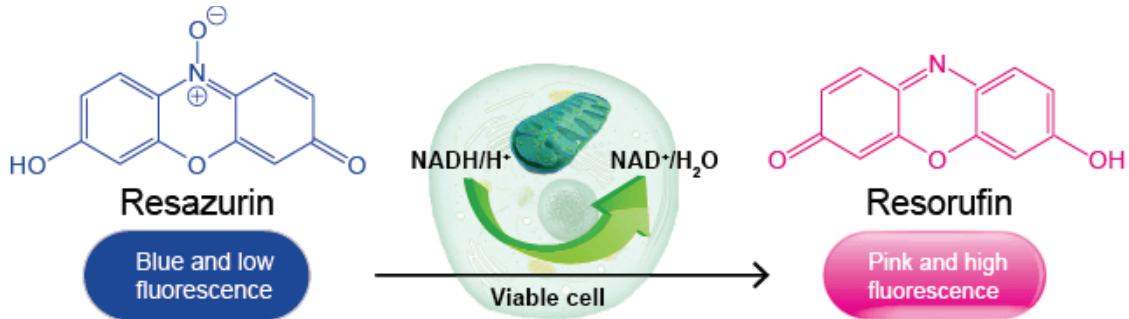


Figure 16: Principe du test de viabilité à la résazurin.

(<https://www.creative-bioarray.com/upload/image/Resazurin-Cell-Viability-Assay-1.png>)

- Test moléculaire basé sur la quantification par RT-PCR d'ARN messagers spécifiques de gamétocytes matures. Ce test présente une sensibilité et une spécificité élevées, mais semble contraignant à adapter au HTS (Bahamontes-Rosa et al., 2016).
- La méthode de bioluminescence à l'ATP implique la mesure de la quantité de lumière de l'oxyluciférine émise par la réaction luciférine-luciférase en présence du cofacteur clé, l'ATP. La quantité de lumière est proportionnelle à la quantité d'ATP présente, indicatrice de la viabilité des gamétocytes. Ce test est moins sensible avec une faible spécificité, car il ne fait pas de différence entre l'ATP intracellulaire et extracellulaire qui peut provenir des parasites morts. Il est adaptable au HTS, mais requiert la purification des gamétocytes (Lelièvre et al., 2012).
- La méthode "SYBR Green with CyQUANT background suppressor" est un test de viabilité qui utilise l'intercalant fluorescent d'ADN, le SYBR Green, et un suppresseur de bruit de fond provenant des cellules non gamétocytaires afin de détecter que la fluorescence des gamétocytes viables. Ce test est sensible, spécifique et adaptable au HTS, cependant il faut se méfier de la présence résiduelle de bruit de fond issu des liaisons non spécifiques du SYBR Green (Sanders et al., 2014).

- Test de viabilité utilisant la fluorescence ou la luminescence avec les parasites transgéniques qui expriment un marqueur fluorescent ou luminescent au stade gamétocyte. L'intérêt ici est qu'on peut évaluer l'efficacité d'une molécule chez les différents stades et différents sexes spécifiquement en mettant le rapporteur sous le contrôle de gènes spécifiques. En plus, il n'est pas nécessaire d'avoir une culture purifiée de gamétocytes. Ce test est sensible, spécifique et adaptable au HTS, mais l'on peut se poser la question de l'impact de la différence entre les parasites transgéniques et les sauvages sur la sensibilité aux médicaments (Buchholz et al., 2011; S. Duffy & Avery, 2013; Lucantoni et al., 2013, 2016; Peatey et al., 2011a; D. M. Plouffe et al., 2016).

Ces méthodes permettent de déterminer si les gamétocytes sont vivants ou pas, mais ne permettent pas de savoir s'ils sont fonctionnellement viables, c'est-à-dire s'ils peuvent se différencier en gamète. Il est possible qu'une molécule rende infertile un gamétocyte l'empêchant de se différencier en gamète sans pour autant le tuer. Des méthodes d'analyse permettent de déterminer la viabilité fonctionnelle ou l'infectiosité des gamétocytes.

- Le test d'exflagellation des gamétocytes implique l'induction de l'exflagellation des gamétocytes mâles mature en présence de l'acide xanthurénic et d'une température d'environ 20°C. Les centres d'exflagellation sont comptés sous un microscope à contraste de phase ou fond blanc et le nombre d'exflagellation est un indicateur de la viabilité des gamétocytes. Cette méthode limitée aux gamétocytes mâles peut être techniquement difficile, car nécessitant du temps, des conditions précises et une expertise pour induire et compter avec précision les centres d'exflagellation. Son automatisation peut être contraignante (Colmenarejo et al., 2018; Delves et al., 2016).
- Le dual gamète assay (DGA) est une méthode récente qui utilise l'activation de la gamétogenèse mâle et femelle pour évaluer la propriété gamétocytocide et de blocage de la transmission d'un composé. Le test mesure l'exflagellation des gamétocytes mâles et la détection de la protéine de surface Pfs25 spécifique des macrogamètes (Delves et al., 2013, 2018; Ruecker et al., 2014). La méthode a été semi-automatisée pour une application au HTS ce qui a permis son utilisation pour cribler la malaria Box de MMV (Ruecker et al., 2014), puis récemment la chimiothèque TCAMS (Miguel-Blanco et al., 2017). Comparé à la méthode

conventionnelle, le « membrane feeding assay (MFA) » semble plus efficace, plus rapide et il permet d'évaluer l'efficacité des composés en fonction du sexe des gamétocytes.

- Le MFA est une technique standardisée et de référence qui est utilisée pour évaluer la propriété de blocage de la transmission d'un composé. La méthode consiste à nourrir les moustiques anophèles avec une culture ou un sang de patient contenant des gamétocytes exposés à des médicaments. La transmission effective est mesurée en disséquant l'intestin moyen du moustique et en comptant les oocystes. La dissection des glandes salivaires et la mesure des sporozoïtes permettent d'évaluer tout le processus de la transmission et du développement des gamétocytes chez le moustique (Miura et al., 2016, 2019). Cette méthode est techniquement contraignante. La détection des oocystes ou des sporozoïtes a été améliorée en utilisant les parasites bioluminescents (Munro & McMorran, 2022; Vos et al., 2015).

I.2.7. Nouvelles approches de formulation des médicaments

Dans le but d'optimiser la biodisponibilité *in vivo* des médicaments et d'assurer une administration ciblée sur des sites spécifiques, de nouveaux systèmes d'administration de médicament de l'anglais « Drug delivery system (DDS) » ont constitué une avancée significative. Ces systèmes se basent sur l'utilisation de transporteur (vecteur) qui encapsule le médicament. Certains vecteurs peuvent même posséder des anticorps à leur surface dirigés contre la cible permettant une administration plus ciblée du médicament. Les nanovecteurs comme les liposomes, les dérivés dendritiques sont utilisés (Fan et al., 2022; Movellan et al., 2014; Zeng et al., 2022) .

Un exemple notable de cette innovation est une étude qui a évalué l'efficacité d'une formulation de décoquinate encapsulé dans un vecteur liposomal pour la chimioprophylaxie longue durée chez les souris. La formulation a été administrée par voie intramusculaire et les souris ont ensuite été inoculées avec *Plasmodium berghei* ANKA 868 exprimant la luciférase. Les résultats de cette étude ont montré que la formulation offrait une protection durable contre le paludisme et notamment qu'elle présentait une cinétique de libération lente de décoquinate qui était détectable dans le sang jusqu'à 180 jours après l'administration (Zeng et al., 2022).

Par rapport aux médicaments traditionnels, les DDS sont susceptibles d'améliorer l'efficacité des antipaludiques, de réduire les effets secondaires tout en optimisant leur profil pharmacocinétique et pharmacodynamique.

I.2.8. Les TBD en cours de développement

Les recherches actives sur les TBD avec l'appui des techniques de pointe, favorise l'identification de nombreuses molécules prometteuses dont certaines ont montré leur efficacité sur les stades asexués et sexués. Le Tableau 2 résume quelques-unes de ces molécules qui sont en phase de découverte, en phase préclinique et en phase clinique. La ganaplacide est l'une des molécules en phase II/III d'essai clinique. Elle fera l'objet de la partie suivante.

Tableau 2: Liste non exhaustive de molécules avec une action gamétocytocide et de blocage de transmission du paludisme.

Molécules	Classe chimique	Phase de R&D	Cible parasitaire	Ref
Ganaplacide (KAF156)	Imidazolopiperazine	Phase 2 Clinique	Sporozoïtes, Asexués et gamétocytes	(Kuhlen et al., 2014; Nagle et al., 2012; T. Wu et al., 2011)
Ciparmagin (KAE609)	Spiroindolone	Phase 2 Clinique	Asexués et gamétocytes	(McCarthy et al., 2021; Ndayisaba et al., 2021)
Artefenomel (OZ439)	Endoperoxide	Phase 2 Clinique	Asexués et gamétocytes, gamete/oocyste	(Phyo et al., 2016); NCT02431650
Methylene blue	Phenothiazine	Phase 2 Clinique	Asexués et gamétocytes	(Abd-Rahman et al., 2021; Wadi et al., 2018)
Tafenoquine	8-aminoquinoline	Phase 2 Clinique	Asexués et gamétocytes	(Abd-Rahman et al., 2021) NCT04609098
M5717 (DDD498)	Quinoline-4-carboxamide	Phase 2 Clinique	Sporozoïtes, Asexués et gamétocytes	(Abd-Rahman et al., 2021; Sun et al., 2014)

MMV390048	2-Aminopyridine	Phase 2 Clinique	Sporozoïtes, Asexués et gamétocytes	(Abd-Rahman et al., 2021; Mohammed et al., 2023; Paquet et al., 2017)
SJ733	Tetrahydroisoquinoline	Phase 1 Clinique	Asexués et gamétocytes	(Abd-Rahman et al., 2021; Sun et al., 2014)
P218	Pyrimidine	Phase 1 Clinique	Sporozoïtes, Asexués et gamétocytes gamète/oocyste	(Abd-Rahman et al., 2021; Sun et al., 2014)
MMV183	Pantothenate	Préclinique	Asexués et gamétocytes	(Schalkwijk et al., 2019)
ML324	Benzamide	Découverte/test <i>in vitro</i>	Sporozoïtes, Asexués et gamétocytes	(Reader et al., 2021)
BRD1095	Bicyclic azetidine	Découverte/test <i>in vitro</i>	Asexués et gamétocytes	(Kato et al., 2016)
DDD0103588 1	Sulfonamide	Découverte/test <i>in vitro</i>	Gamétocytes, gamète/oocyste	(Delves et al., 2018; Yahiya et al., 2021)
Epoxomicin, thiostrepton		Découverte/test <i>in vitro</i>	Asexués et gamétocytes	(Aminake et al., 2011)
TM2-115		Découverte/test <i>in vitro</i>	Asexués et gamétocytes	(Malmquist et al., 2012, 2015)

II. La Ganaplacide (KAF156), un schizonticide et gamétocytocide prometteur

La ganaplacide est une molécule de la famille des imidazolopiperazines. Son efficacité sur les sporozoïtes, les formes asexuées et les gamétocytes a été démontrée lors d'études *in vitro* et d'études cliniques. Dans cette partie, nous aborderons sa découverte, sa biochimie, son efficacité sur les différents stades parasitaires, son développement clinique, son mode d'action et les mécanismes de résistance.

II.1. Découverte de la ganaplacide

La ganaplacide a été découverte par Novartis en 2008 à la suite de criblage à haut débit de près de 2 millions de molécules en utilisant le test phénotypique de croissance parasitaire des

formes asexuées (SYBRGreen assay) (D. Plouffe et al., 2008). Des études d'optimisation ultérieures dont les analyses "relation structure-activité (RSA)" ont conduit à une molécule hautement active sur les stades asexués et gamétocytaires de *P. falciparum* et *P. vivax* y compris les clones multirésistants (Nagle et al., 2012; D. Plouffe et al., 2008; T. Wu et al., 2011).

II.2. Biochimie de la KAF156

Le nom chimique de la ganaplacide/KAF156 est le 2-amino-1-[3-(4-fluoroanilino)-2-(4-fluorophenyl)-8,8-diméthyl-5,6-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-7-yl]éthanone. Cette molécule de familles des imidazolopiperazines possède une masse moléculaire de 411,4 g/mol et sa formule chimique est C₂₂H₂₃F₂N₅O.

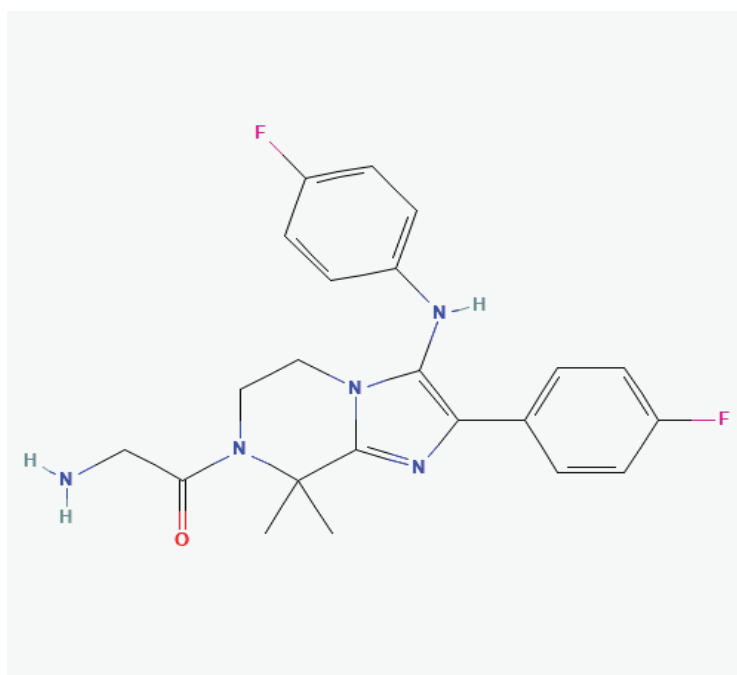


Figure 17: Structure chimique de la ganaplacide/KAF156
(Ref: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Les imidazolopiperazines, sont constituées d'un groupe imidazole fusionné à un groupe pipérazine. Leur structure particulière est différente de celle des antipaludiques existants comme les aminoquinolines (chloroquine, primaquine) ou les endo-peroxydes (artémisinine). Et cette

structure joue un rôle important dans leur efficacité comme l'indiquent les études RSA (Nagle et al., 2012; T. Wu et al., 2011).

II.3. Mode d'action de la ganaplacide (KAF156) et résistance

Le mode d'action précis de la ganaplacide n'est pas entièrement compris, mais certaines propositions des mécanismes impactés ont été rapportées.

Dans une étude récente réalisée sur le mode d'action de la GNF179 (analogue de la ganaplacide) en utilisant des approches biochimiques, il a été suggéré qu'elle interfère avec le processus de maturation et de transport des protéines dans le réticulum endoplasmique (LaMonte et al., 2020). Par ailleurs, lorsqu'on localise la GNF179 dans le parasite, on remarque qu'elle colocalise avec le réticulum endoplasmique (ER). Ces résultats viennent appuyer les connaissances sur les possibles voies ciblées par la ganaplacide.

En effet, des études génomiques de sélection de résistance ont identifié des modifications dans les gènes codant pour trois transporteurs transmembranaires localisés dans le RE : le transporteur de l'amine cyclique (*Pfcarl*), le transporteur de l'UDP-galactose (*Pfugt*) et le transporteur de l'acétyl CoA (*Pfact*) (Kuhlen et al., 2014; LaMonte et al., 2020; Lim et al., 2016). Ces trois protéines sont potentiellement impliquées dans le processus de maturation des protéines. L'orthologue de PfCARL chez la levure serait impliqué dans la préservation des polypeptides contre la dégradation. Le PfACT semble intervenir indirectement dans le repliement des protéines alors que le PfGUT est potentiellement impliqué dans l'importation de sucres dans le RE. L'inhibition des protéines orthologues de PfGUT chez les vers et les plantes induit un stress du RE (LaMonte et al., 2020; Lim et al., 2016).

Les fonctions possibles de ces protéines dans l'homéostasie et le fonctionnement du RE ainsi que la localisation du GNF179 dans le RE sont des preuves qui laisse à croire que la ganaplacide exerce son action en ciblant le RE. Ces résultats ouvrent des pistes pour des recherches plus approfondies. Il faudra davantage de recherche pour mieux cerner son mode d'action. L'exploration d'autres fonctions essentielles de la survie du parasite comme le métabolisme de l'Hz semble aussi importante à explorer.

II.4. Efficacité de la ganaplacide

Les études *in vitro* de chimiosensibilité ont montré que la ganaplacide est efficace sur les formes hépatocytaires, les formes asexuées et les formes sexuées du parasite. L'étude de Kuhen et al. est l'une de ces études qui a exploré l'efficacité de la ganaplacide sur diverses variables. L'étude a montré une activité schizonticide de la ganaplacide avec une concentration inhibitrice moyenne (CI₅₀) allant de 6 à 17,4 nM contre les souches sensibles et résistantes de *P. falciparum*. Les CI₅₀ étaient d'environ 6 nM pour le clone résistant W2, 10 nM pour le clone chloroquine sensible 3D7, et *Plasmodium berghei*. En outre, la ganaplacide a démontré une activité schizonticide contre les souches de *P. vivax* et *P. falciparum* potentiellement résistantes provenant de régions endémiques. Par ailleurs, la ganaplacide a inhibé la maturation et la viabilité des gamétocytes chez les moustiques, ce qui indique des propriétés potentielles de blocage de la transmission. La ganaplacide s'est montrée efficace sur les gamétocytes âgés à une CI₅₀ de 4 nM et bloque la transmission à un EC99 de 500 nM. En outre, l'étude révèle que la ganaplacide inhibe la maturation des formes hépatocytaires (Kuchen et al., 2014; Nagle et al., 2012; T. Wu et al., 2011). La ganaplacide peut servir ainsi d'agent prophylactique puisqu'il protège contre la maturation des sporozoïtes lorsqu'il est administré avant l'infection. En effet, lorsqu'on administre une dose de 10mg/Kg de ganaplacide à une souris, 2h avant infection par les sporozoïtes, l'on observe une action protectrice qui est due à l'inhibition de la maturation des sporozoïtes.

Les propriétés antipaludiques multistades, multiespèces et multiclones y compris les clones résistants d'une part et les propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de la KAF156 d'autre part font d'elle une molécule prometteuse pour la prévention, le traitement et le blocage de la transmission du paludisme.

II.5. Développement clinique de la ganaplacide

Plusieurs études cliniques de la ganaplacide comprenant des essais de phases I et II sur le traitement du paludisme non compliqué ont été réalisées. Les résultats concluants obtenus au regard de l'efficacité, la sécurité, la tolérance et les propriétés pharmacocinétique de la KAF156 (Kublin et al., 2020; Ogutu et al., 2023; White et al., 2016) ont conduit Novartis et Medecines for

Malaria Venture (MMV) à valider en novembre 2022 la décision de passer à l'étude clinique de phase III (*Novartis and Medicines for Malaria Venture announce decision to move to Phase 3 study for novel ganaplacide/lumefantrine-SDF combination in adults and children with malaria*, 2022). Ceci marque la première fois en deux décennies qu'un nouveau composé antipaludique atteint ce stade (Chen & Ishengoma, 2023; Ogutu et al., 2023).

Une première étude clinique contrôlée randomisée en double aveugle a été menée pour évaluer la sécurité, la tolérance et les propriétés pharmacocinétiques de la ganaplacide chez 70 hommes adultes. L'impact de l'alimentation sur l'absorption a été également évalué. L'étude a porté sur différentes concentrations et dosages, un groupe recevant une dose unique de 10 à 1200 mg et un autre groupe recevant des doses multiples avec des concentrations allant de 60 à 600 mg. Les résultats pharmacocinétiques ont montré que la KAF156 pouvait être administrée soit en dose unique, soit en doses multiples, avec une bonne tolérance et des effets secondaires minimes tels que maux de tête, diarrhée, douleurs abdominales et vertiges. Cependant, des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la dose optimale (Leong et al., 2014).

Par la suite, une étude de phase II a été menée en Asie chez les personnes infectées par *P. vivax* d'une part et *P. falciparum* d'autre part. L'efficacité d'une dose unique de 800 mg et d'une multidose de 400mg pendant trois jours a été évaluée. La ganaplacide a montré son efficacité sur *P. vivax* et *P. falciparum* avec une demi-vie de 44 +/- 8,9 h. La durée de la clearance parasitaire moyenne a été de 45 h pour le traitement en dose multiple et de 49 h pour la dose unique chez les patients infectés par *P. falciparum*. Cependant, les 33% des patients traités avec la dose unique ont connu une rechute. La clearance parasitaire a été de 24 h pour *P. vivax* lors d'un traitement multidose. En résumé, la ganaplacide administrée en dose unique ou en multidose s'est révélée efficace contre *P. vivax* et *P. falciparum* avec des effets secondaires mineurs et une demi-vie adaptée pour le traitement du paludisme, bien qu'inférieure à celle de l'artémisinine (ART). Cette étude a également montré l'efficacité de la ganaplacide contre les gamétocytes et les souches résistantes portant des mutations dans le gène K13 associé à la résistance à l'ART, ainsi que des mutations dans le *Pfmdr* et *Pfcr* associées à la résistance aux aminoquinolines (White et al., 2016).

Compte tenu de la nécessité, de limiter la résistance, l'utilisation de combinaisons d'antipaludiques est requise pour les traitements du paludisme. Dans ce contexte, des études *in vitro* et *in silico* ont initialement identifié la pipéraquline comme partenaire potentiel de la ganaplacide. Les deux molécules sont des substrats et en même temps inhibitrices de la CYP3A4 (Leong et al., 2018). Le CYP34 est une enzyme du cytochrome P450 qui joue un rôle important dans le métabolisme de nombreux médicaments (Pérez-del Palacio et al., 2017). Les données *in vitro* et *in silico* ont montré une interaction négligeable entre la ganaplacide et la pipéraquline en termes de pharmacocinétique, suggérant qu'elles peuvent être combinées sans que leur pharmacocinétique soit altérée. Par conséquent, une étude clinique de phase I a été lancée pour évaluer l'interaction pharmacocinétique, la sécurité et tolérabilité de la combinaison KAF156-pipéraquline chez des sujets sains. Un premier groupe a reçu 800 mg de KAF156 + 1280 mg de pipéraquline, un deuxième groupe a reçu 800 mg de KAF156 en dose unique et un troisième groupe a reçu 1280 mg de pipéraquline en dose unique. Les résultats ont révélé des effets secondaires non significatifs et le profil de sécurité de la combinaison était similaire pour les molécules prises individuellement. Cependant, l'administration combinée a conduit à une augmentation de la concentration maximale relative à la biodisponibilité des molécules dans l'organisme (Leong et al., 2018).

Outre la pipéraquline, la luméfántrine a été identifiée comme un partenaire potentiel de la ganaplacide. Utilisé en combinaison avec l'artéméthér, depuis plusieurs années, la luméfántrine de nature cristalline présente, une structure chimique, des propriétés physicochimiques et un mode d'action comparable aux antipaludiques de la famille des aryl-aminoalcool dont la quinine, la méfloquine et l'halofántrine (Ezzet et al., 2000). La luméfántrine agit sur le mécanisme de détoxification de l'hème en formant un complexe avec celui-ci. Ce qui entraîne l'accumulation d'hème toxique, un stress oxydatif, la dégradation de la membrane cellulaire qui conduit à la mort du parasite (Sanchez et al., 2008). Cependant, la principale limitation de la luméfántrine réside dans sa faible solubilité en milieu aqueux et sa disponibilité orale variable et faible. Ainsi une nouvelle formulation dite de « solid dispersion formula (SDF) » a été mise au point pour résoudre ces problèmes. La SDF est une stratégie chimique qui convertit une substance cristalline peu soluble en milieu aqueux en substance amorphe dans un support hydrophile ou amphiphile augmentant ainsi sa solubilité et sa biodisponibilité (Takale et al., 2022). Cette nouvelle

formulation de la luméfantrine est dénommée LUM-SDF. Actuellement, la combinaison KAF156/LUM-SDF est en phase 2 d'essai clinique en Afrique et en Asie (*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03167242 , NCT04546633*). C'est une étude multicentrique, randomisée et ouverte, visant à déterminer la dose efficace et tolérable de la KAF156/LUM-SDF pour le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* chez l'adulte et l'enfant. L'étude évalue l'efficacité, la sécurité, la tolérabilité et la propriété de blocage de la transmission du paludisme de la KAF156/LUM-SDF. Une étude de phase IIb menée chez les adultes et adolescents a donné des résultats prometteurs. La réponse au traitement avec KAF156/LUM-SDF en prise unique pendant trois jours était similaire à celle de l'artémether-luméfantrine administré en deux doses pendant trois jours. Une deuxième étude chez les enfants de 6 à 18 mois est en cours. En Afrique ces études sont dirigées par le projet WANECAM II dont fait partie le laboratoire dans lequel s'effectue cette thèse. Le laboratoire est chargé d'évaluer *in vitro* et *ex vivo* l'efficacité de la KAF156/LUM-SDF.

En conclusion, la ganaplacide s'est révélée prometteuse en tant que schizonticide et gamétocytoicide contre plusieurs espèces de *Plasmodium* et les souches résistantes. Sa structure chimique particulière d'imidazol-pipérazine et les thérapies combinées avec la luméfantrine l'ont positionné comme un potentiel antipaludique de grande valeur. Les essais cliniques ont démontré son efficacité, sa sécurité et sa tolérance, ce qui en fait un candidat prometteur pour la prévention, le traitement et le blocage de la transmission du paludisme. Bien que le mode d'action exact reste mal connu, les cibles potentielles de la ganaplacide dans le RE méritent d'être étudiées plus en détail. Dans l'ensemble, la ganaplacide offre des perspectives intéressantes dans la lutte contre le paludisme et son élimination.

PARTIE II : RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

Objectifs et méthodologie de recherche

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier les propriétés gamétocytocides de la ganaplacide et d'explorer son impact sur les mécanismes moléculaires des gamétocytes. Les objectifs secondaires visent à : élaborer un protocole de production optimal des gamétocytes et à développer un protocole de cryopréservation des gamétocytes. En raison de la pandémie de COVID-19, les expériences *ex vivo* à partir d'échantillons cliniques qui ont été prévues n'ont pas pu être réalisées parce que les essais cliniques ont été retardés. Ainsi, ce travail de thèse a été orienté principalement vers l'exploration des réponses phénotypiques et moléculaires des gamétocytes du clone NF54 de *Plasmodium falciparum* exposés à la ganaplacide afin de comprendre le mécanisme d'action de cette dernière.

Le travail a été divisé en trois chapitres. Un premier chapitre a été consacré au développement du protocole de cryopréservation des parasites dans l'objectif de l'adapter aux échantillons cliniques. Ensuite, nous avons entamé l'étude sur les gamétocytes. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur l'optimisation de la production des gamétocytes *in vitro*. L'objectif du chapitre 2 a été de comprendre la biologie des gamétocytes, d'identifier les facteurs intervenant dans l'induction de la gamétocytogenèse et d'identifier les paramètres nécessaires pour une culture des gamétocytes *in vitro*. L'objectif a été de développer un protocole optimal de production des gamétocytes *in vitro*. Dans le troisième chapitre, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'impact de la ganaplacide sur les gamétocytes. Puisque nous explorons l'impact de la ganaplacide sur l'Hz, l'objectif a aussi été d'évaluer la plus-value et l'efficacité de la technique Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) à analyser l'Hz.

Chapitre I : Étude sur la cryopréservation des parasites, garantir la qualité des échantillons cliniques pour des expériences *ex vivo*

Afin de garantir la disponibilité d'échantillons cliniques, de qualité optimale pour les expériences *ex vivo* notamment celles impliquant des gamétocytes, nous avons commencé notre projet par la mise en place d'un protocole de cryopréservation. La nécessité de transporter les échantillons vers le labo avant d'induire les gamétocytes découle de plusieurs raisons. L'une des principales raisons est le maintien de la viabilité et de l'infectiosité des gamétocytes. Les gamétocytes sont très sensibles aux changements environnementaux. Ainsi les modifications biophysiques résultant des processus de congélation/décongélation pourraient compromettre l'intégrité biologique des gamétocytes. Bien que certaines études aient montré que les gamétocytes cryopréservés peuvent être décongelés sans perte significative de leur quantité et peuvent poursuivre avec succès le cycle sexué chez le moustique. (Peatey et al., 2011b; Shaw-Saliba et al., 2016), leur niveau d'infectiosité est réduit comparé aux gamétocytes non cryopréservés (Demanga et al., 2017; Keister & Kaslow, 1994). En outre, la cryopréservation des gamétocytes est plus contraignante que celle des stades asexués. Par ailleurs, il est important de garantir des résultats reproductibles. Or, si les gamétocytes sont induits avant le transport, des variations dans la densité des gamétocytes et d'autres facteurs pourraient survenir et compromettre nos résultats. Il convient de souligner qu'au-delà des contraintes techniques associées à leur production, les gamétocytes sont par nature produits en quantité infime. Par conséquent, il est judicieux d'induire les gamétocytes au labo dans des conditions contrôlés pour les expériences *ex vivo*.

L'étude clinique KAF156/LUM-SDF avec WANECAM 2 s'effectue en Afrique subsaharienne. Donc ce protocole de cryopréservation doit prendre en compte les contraintes liées aux conditions environnementales et à la disponibilité du matériel sur le terrain telles que l'azote liquide ou les super congélateurs.

Pour assurer une conservation optimale des fonctions biologiques des parasites, il est en principe recommandé de les conserver à des températures extrêmement basses, telles que celles atteintes par l'azote liquide (-195°C) ou à défaut à des températures autour de -80°C, mais pendant une durée limitée. Les essais cliniques dans les régions endémiques se déroulent souvent dans les zones isolées ou rurales qui ne disposent pas souvent de l'équipement spécialisé et les ressources

nécessaires pour conserver les échantillons à de telles températures. En revanche, les congélateurs à -20°C sont relativement courants et peuvent être retrouvés dans ces zones. Par conséquent, la température de -20°C pourrait constituer une alternative pratique pour la conservation des parasites jusqu'à ce que l'accès à des équipements capables de maintenir des températures plus froides devienne disponible.

Cette évaluation implique des facteurs tels que la durée de conservation et la compatibilité de la cryopréservation à -20°C avec nos besoins expérimentaux en particulier sa capacité à soutenir la production des gamétocytes. Nous avons développé des essais afin de déterminer les conditions optimales de cryopréservation en modulant plusieurs paramètres. Des paramètres tels que la température de cryopréservation, le type de cryoprotecteur, la concentration des cryoprotecteurs ont été testés. Les cryoprotecteurs de type intracellulaire comme le glycérol ou le DMSO ainsi que ceux extracellulaires comme le Hestar 200 ont été explorés. Cette étude a conduit à l'établissement d'un protocole de conservation de parasite qui peut être adapté aux échantillons cliniques.

I. Matériel et méthodes

Dans un premier temps, trois cryoprotecteurs ont été testés : un premier à 28% de glycérol (MC), un second à 57% de glycérol (Glycerolyte 57X (Gly)) et un troisième à 2% de DMSO (Cryostore CS2 (Cryos)). Mais avant de passer aux expérimentations, nous avons éliminé certains cryoprotecteur comme le Hestar 200 sur la base d'analyse bibliographique. Les cryoprotecteurs ont été mélangés à une culture asynchrone de *P. falciparum* NF54 à 50% d'hématocrite puis placés au congélateur pendant une durée 24h. Après décongélation, le taux de recouvrement des parasites a été déterminé en faisant le rapport de la parasitémie après décongélation sur la parasitémie avant décongélation. Les parasites récupérés après décongélation ont été mis en culture pour évaluer leur viabilité. Cette première phase nous a permis d'identifier un potentiel cryoprotecteur adapté pour le -20°C . Bien que cette étude ne concerne pas le -80°C , nous avons vérifié l'efficacité de ce cryoprotecteur à -80°C . Dans un second temps, sachant que les échantillons cliniques ne seront pas congelés pendant 24h, il a fallu vérifier l'efficacité de congélation avec le cryoprotecteur identifié pendant de longues durées de cryopréservation soit 15, 30, 45 et 60 jours. Les expériences

ont été répliquées trois fois avec deux essais indépendants. Dans un troisième temps, les gamétocytes ont été induits avec les parasites récupérés.

Culture des parasites

Les parasites PfNF54 ont été cultivés dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complété avec 25mM de HEPES, 50µg/mL de gentamicine, 0,1 mM d'hypoxanthine, 20 mM de NaHCO₃ et 0,5% d'Albumax II dans des globules rouges O+ à 5% d'hématocrite. Le milieu de culture est remplacé chaque 24h et un frottis quotidien permet de suivre la culture. Le frottis réalisé à partir de concentré d'érythrocytes parasité a été coloré au Giemsa dilué au 1/10 dans du PBS pendant 20min. Les frottis ont été observés au microscope optique puis les érythrocytes parasités et non parasités sont comptés sur un certain nombre de champs. La parasitémie est déterminée en faisant le rapport des érythrocytes parasité sur le total des érythrocytes compté multiplié par 100. La parasitémie a été également déterminée au cytomètre en flux avec le Sysmex XN31.

Préparation des cultures pour la cryopréservation

La culture a été centrifugée, puis l'hématocrite de la culture a été fixé à 50% environ pour s'aligner avec l'hématocrite (ht) normal *in vivo*. Dans un cryotube de 2 mL, 500 µL de culture de NF54 à 50% d'ht plus 500 µL de cryoprotecteur ajouté goutte à goutte a été mélangé. Le mélange a été congelé immédiatement à -20°C

Décongélation des parasites et remise en culture

Le cryotube sorti du congélateur a été immédiatement mis au bain-marie pendant une minute. Ensuite, le contenu du cryotube a été dilué dans 10 mL de NaCl à 3,5% puis centrifugé à 500g pendant 5 minutes. Le culot a été lavé dans 15mL de milieu de culture puis remis en culture afin d'évaluer la viabilité et la croissance des parasites après décongélation. La parasitémie est déterminée quotidiennement.

Production des gamétocytes

Ces derniers parasites ont été utilisés pour produire les gamétocytes. Lorsque la parasitémie de la culture est comprise entre 5% et 10% avec plus de 90% de trophozoïtes, du N-acétyl-glucosamine est ajouté à la culture à une concentration finale de 50mM pendant trois jours. Le milieu de culture est changé tous les jours ouvrables jusqu'à maturation des gamétocytes.

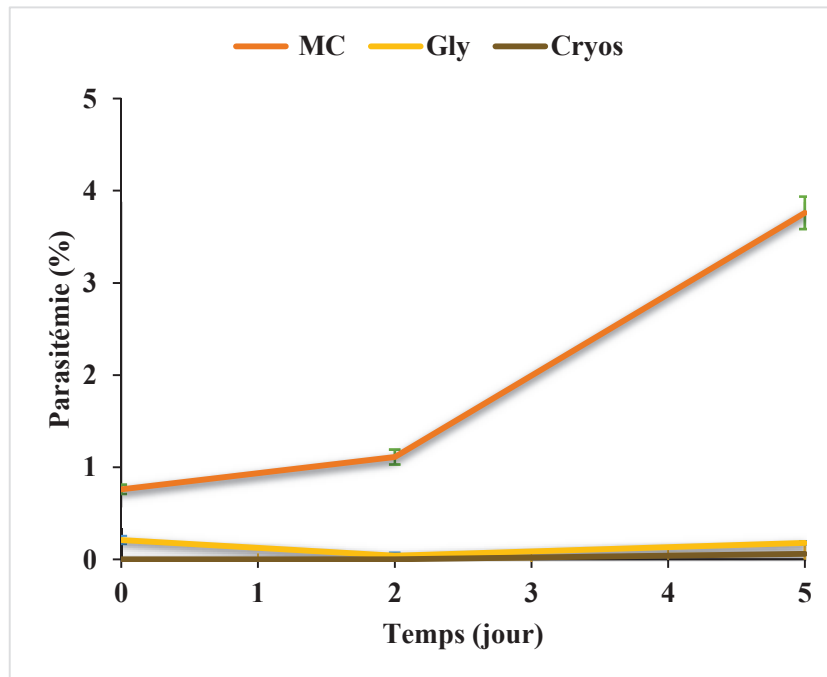
Ce protocole de production de gamétocyte a été par la suite amélioré. Confère [chapitre II](#) de la partie II sur la production de gamétocytes.

Analyse des données

Frottis et lecture de la parasitémie suivant le protocole déjà établi au labo. (Voir MOP2011-09 et MOP2012-06). Calcul du taux de recouvrement des parasites et analyse de la croissance des parasites au cours du temps.

II. Résultats

II.1. Détermination du cryoprotecteur efficace

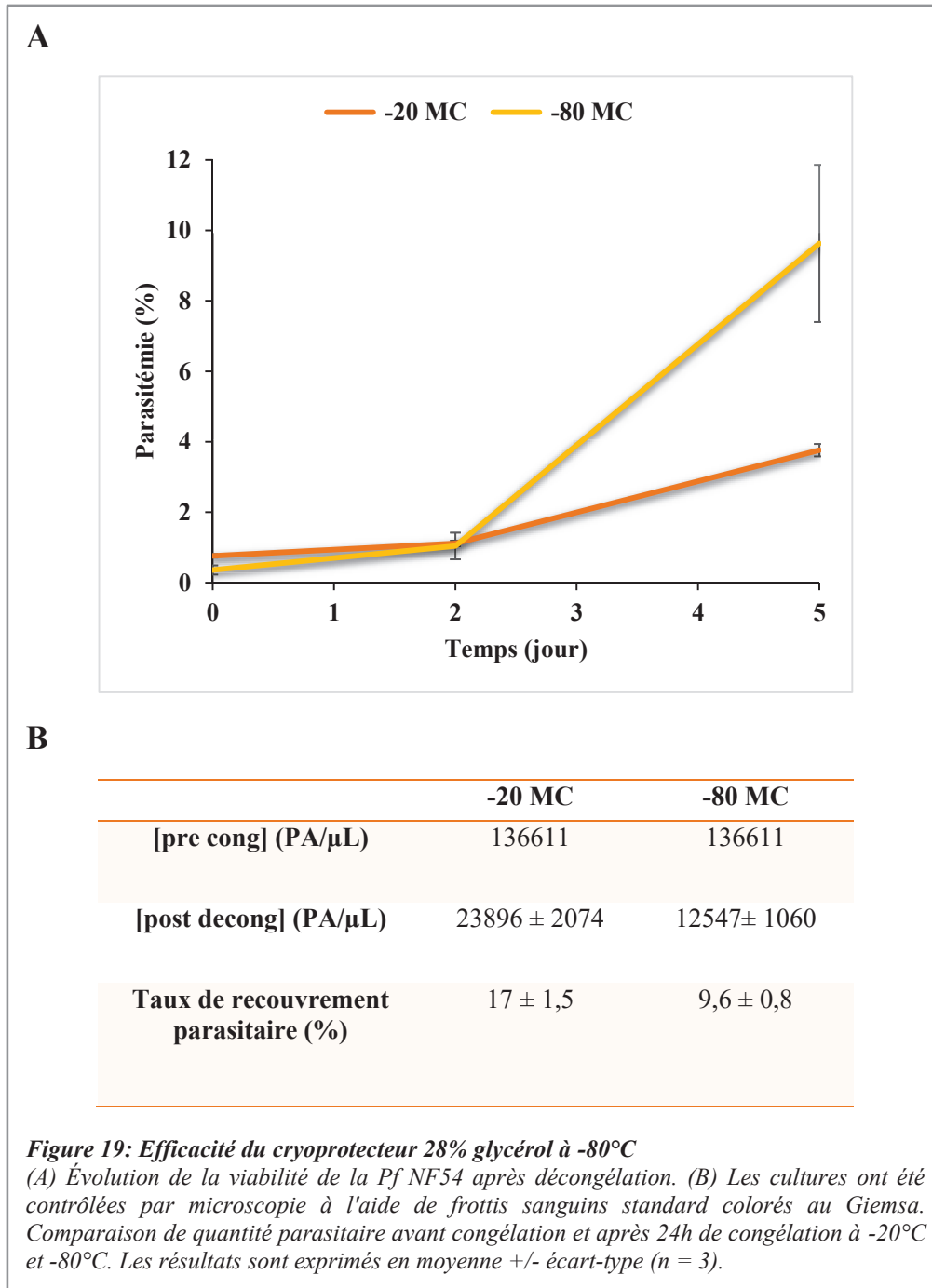
A**B**

	28% glycérol (MC)	57% glycérol (Gly)	2% DMSO (Cryos)
[pre cong] (PA/ μ L)	136611	136611	136611
[post decong] (PA/ μ L)	23896 \pm 2074	8864 \pm 215	2646 \pm 850
Taux de recouvrement parasitaire (%)	17 \pm 1,5	6 \pm 0,2	2 \pm 0,6

Figure 18: Évaluation de l'efficacité des divers cryoprotecteurs

(A) les parasites congelés avec 28% glycérol, 57% glycérol et 2% DMSO sont remis en culture puis la viabilité est évalué en déterminant la parasitémie au cours du temps par microscopie sur frottis sanguins colorés au Giemsa. (B) le tableau résume la parasitémie avant et le taux de recouvrement des parasites après 24h de congélation avec divers cryoprotecteurs. Les parasitémies ont été mesurées au cytomètre en flux Sysmex XN31. Les résultats représentent la moyenne de trois replicats +/- écart-type ($n = 3$).

II.2. Évaluation à -80°C de l'efficacité du cryoprotecteur à 28% de glycérol



II.3. Évaluation de la condition de cryopréservation pendant de longues durées

Tableau 3: Évaluation de la durée de cryopréservation

Les parasites *PfNF54* ont été cryopréservés à -20°C avec le cryoprotecteur 28% glycérol pendant des durées variables de 1 à 60 jours. La parasitémie a été déterminée au cytomètre en flux Sysmex XN31 avant et après décongélation. Le taux de recouvrement correspond au pourcentage de parasite récupéré après la congélation.

	1 jr	15 jrs	30 jrs	45 jrs	60 jrs
[pre cong] (PA/ μL)			136611		
[post decong] (PA/ μL)	23896 \pm 2074	10938 \pm 1195	5914 \pm 1509	7818 \pm 1864	3077 \pm 604
Taux de recouvrement parasitaire (%)	17 \pm 1,5	8 \pm 0,9	4 \pm 1,1	6 \pm 1,0	2 \pm 0,4

II.4. Évaluation de la capacité des parasites recouverts à produire les gamétocytes

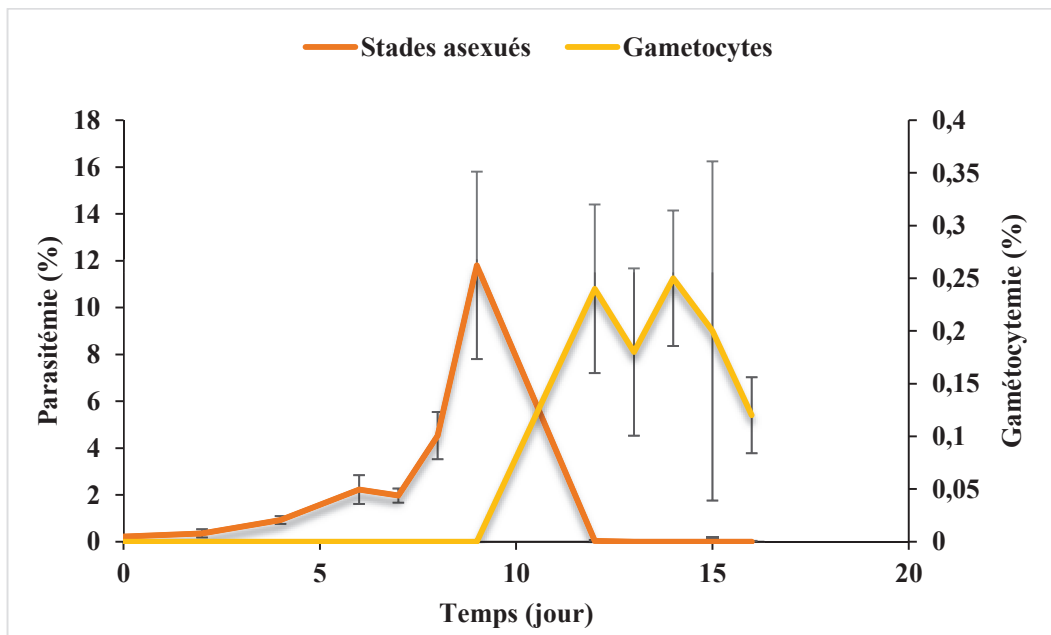


Figure 20: Production in vitro de gamétocytes de *Pf NF54* à partir de parasites cryopréservés à -20°C avec 28% glycérol pendant 30 jours.

Le J0 correspond au jour de décongélation et de remise en culture des parasites. Les parasites ont été cultivés dans du RPMI complétement avec 25mM de HEPES, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicine, 0,1 mM d'hypoxanthine, 20 mM de NaHCO_3 et 0,5% d'Albumax II dans des globules rouges O+ à 5% d'hématocrite. À une parasitémie de ~ 11,8% (88% trophozoïtes) du N-acétyl-glucosamine à une concentration finale de 50mM a été rajouté à la culture pendant 3 jours. La parasitémie et la gamétocytemie sont déterminées au microscope sur frottis sanguin. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type ($n = 3$)

III. Conclusion

À l'issue de ces expériences, la cryopréservation avec le glycérol 28 % à -20°C pendant une durée maximale de 30 jours ont été retenues comme la condition optimale. Les parasites cryopréservés dans ces conditions sont capables de soutenir la production des gamétocytes. L'expérience avec le -80°C suggère que le glycérol 28% peut être adapté au -80°C.

[Ci-dessous](#) un protocole de cryopréservation des échantillons cliniques validé avec Novartis



KALUMA Procedure n# _____

Blood samples preparation and freezing for phenotyping assays

Version	Nature of change	Date
1	Initial version	July 21 st , 2022
Written by		Reviewed by
Roukayatou OMOROU		Pr Stephane Picot
Approved by		
Date : July 20 th , 2022		Date : July 21 st , 2022
		Date : July 21 st , 2022

Preparation of cryotube at the site (can be done in advance or directly before procedure):

- Add 1mL of 57X Glycerol (sterile) to the supplied 4 mL cryotube (Simport® Ref: T301-4A)
- If done in advance: store at +4C for a max. of 6 months

Objective: to collect 1ml of fresh blood samples from included patient and immediately store at minus 80°C for phenotyping tests

Principle: Add 1 ml of whole blood collected on EDTA to prefilled 4ml cryotubes and freeze.

Method:

1. Remove previously pre-filled cryotube from fridge or pre-fill an empty cryotube
2. Use blood sample collected with EDTA vacutainer
3. Collect (sterile) 1ml of whole blood with a syringe from the vacutainer tube
4. Add drop by drop 1mL of blood sample to the cryotube while homogenizing with a pendulum movement
5. Identify the cryotube by indicating the anonymization code, date of collection and date of cryopreservation (if different)
6. Freeze immediately at -80°C

Contact: Stephane Picot: stephane.picot@univ-lyon1.fr ; stephane.picot@chu-lyon.fr

Chapitre II : Production *in vitro* des gamétocytes de *Plasmodium falciparum*

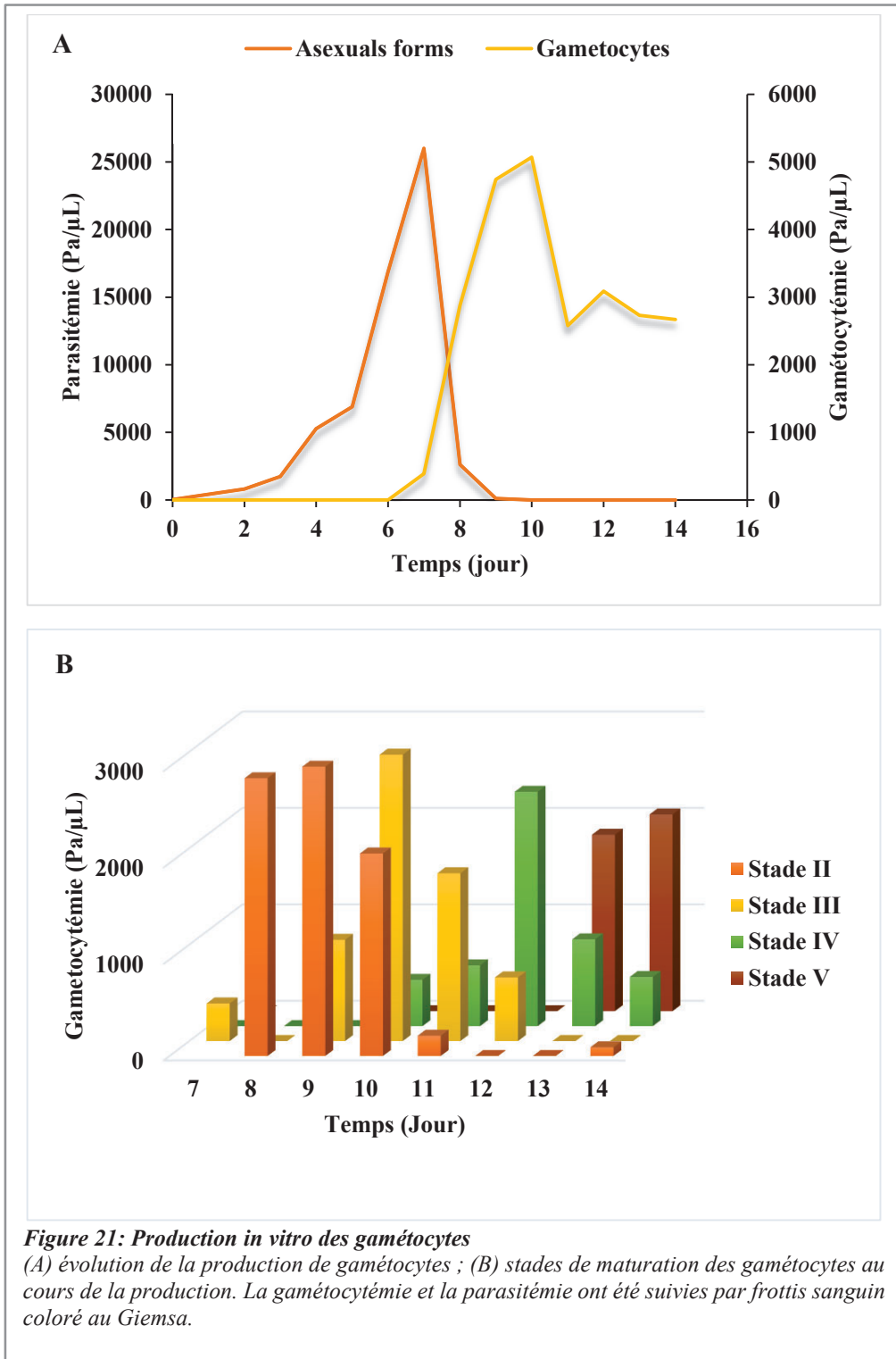
Les gamétocytes sont indispensables pour les expériences de cette thèse. Ainsi nous devons en disposer de façon continue pour les expérimentations. Cependant, seul un très faible nombre de parasites asexués se différencie en gamétocytes (< 10%) (Tadesse et al., 2019), et seule une fraction d'entre eux arrivent à maturité. Ainsi ce chapitre aborde le problème de l'obtention constante et consistante de gamétocytes matures et viables dans les cultures *in vitro*. Les questions clés qui constituent le fil conducteur de cette étude sont les suivantes : quels sont les facteurs biologiques nécessaires pour induire la différenciation des stades asexués en gamétocytes ? Quelles sont les conditions de culture optimales ? Comment les différents paramètres tels que la densité des parasites asexués, le taux d'hématocrite, la composition du milieu de culture, les changements de milieux de culture influencent-ils la production des gamétocytes ? Quels sont les protocoles de production des gamétocytes *in vitro* qui ont été publiés et quelle méthode ont-ils utilisée pour parvenir à quel rendement ? En examinant de façon intégrative les méthodologies existantes, nous visons à identifier les tendances, les lacunes et les approches innovantes de production de gamétocytes *in vitro*. Ce travail approfondi sur la production des gamétocytes *in vitro* a conduit à la publication d'un article de revue intitulé : Protocols for *Plasmodium* gametocyte production *in vitro* : an integrative review and analysis.

Omorou R, Bin Sa'id I, Delves M, Severini C, Kouakou YI, Bienvenu AL, Picot S. Protocols for *Plasmodium* gametocyte production *in vitro*: an integrative review and analysis. Parasit Vectors. 2022 Dec 5 ;15(1) :451. Doi : 10.1186/s13071-022-05566-3. PMID : 36471426 ; PMCID : PMC9720971.

Grâce à plusieurs expériences et des ajustements itératifs, nous avons réussi à mettre au point une méthode reproductible pour générer des gamétocytes matures et viables. L'analyse morphologique au microscope optique et le test d'exflagellation des gamétocytes mâles ont été utilisés pour évaluer la qualité et la quantité de gamétocytes produits. Cette réussite a été cruciale pour la réalisation d'expériences ultérieures.

Méthode de production de gamétocytes de *P. falciparum in vitro*

La culture débute avec un clone fraîchement décongelé. Le milieu de culture est constitué de RPMI complétement avec 25mM de Hepes, 50µg/mL de gentamicine, 0,1 mM d'hypoxanthine, 20 mM de NaHCO₃ et 10% de pool de sérum humain AB+. Les globules rouge O+ frais de moins de 14 jours post-prélèvement sont utilisés compte tenu de la durée allongée de production des gamétocytes (14 jours en moyenne). L'hématocrite initial de la culture est fixé à 5%. La culture est suivie tous les jours y compris le week-end et jour férié avec un changement de milieu et un frottis sanguin pour déterminer la parasitémie. Lorsque la culture atteint les 5% de parasitémie avec des schizontes, le volume de la culture est doublé avec uniquement du milieu sans les globules rouges, puis le milieu est changé deux fois par jour jusqu'à ce que la parasitémie dépasse les 10% avec plus de 90% de rings. C'est l'étape cruciale d'induction qui est basée sur la simulation de l'anémie et la forte parasitémie qui sont deux facteurs favorables à la gamétocytogenèse. Ceci stipule que plus la densité des stades asexués est élevée plus la quantité de gamétocytes sera importante. Ensuite, du N-acétyl-glucosamine à une concentration finale de 50 mM est ajouté au milieu pendant quatre jours pour éliminer les parasites asexués. À la fin du traitement au NAG, le volume de culture est rapporté au volume initial. La culture est entretenue tous les jours jusqu'à maturation des gamétocytes du stade I au stade V qui nécessite entre 7 à 12 jours (Gardiner & Trenholme, 2015; Gautret & Motard, 1999). Ce protocole nécessite en moyenne deux semaines pour obtenir des gamétocytes matures. La représente un profil de production de gamétocytes au cours du temps.



Article 1 : Protocols for *Plasmodium* gametocyte production *in vitro*: an integrative review and analysis

Roukayatou Omorou , Ibrahim Bin Sa'id , Michael Delves , Carlo Severini , Yobouet Ines Kouakou , Anne-Lise Bienvenu , Stephane Picot

REVIEW

Open Access



Protocols for *Plasmodium* gametocyte production in vitro: an integrative review and analysis

Roukayatou Omorou^{1*}, Ibrahim Bin Sa'ïd^{1,2}, Michael Delves³, Carlo Severini⁴, Yobouet Ines Kouakou¹, Anne-Lise Bienvenu^{1,5} and Stephane Picot^{1,6}

Abstract

Background: The production of *Plasmodium* gametocytes in vitro is a real challenge. Many protocols have been described, but few have resulted in the production of viable and infectious gametocytes in sufficient quantities to conduct research on—but not limited to—transmission-blocking drug and vaccine development. The aim of this review was to identify and discuss gametocyte production protocols that have been developed over the last two decades.

Methods: We analyzed the original gametocyte production protocols published from 2000 onwards based on a literature search and a thorough review. A systematic review was performed of relevant articles identified in the PubMed, Web of Sciences and ScienceDirect databases.

Results: A total 23 studies on the production of *Plasmodium* gametocytes were identified, 19 involving in vitro *Plasmodium falciparum*, one involving *Plasmodium knowlesi* and three involving ex vivo *Plasmodium vivax*. Of the in vitro studies, 90% used environmental stressors to trigger gametocytogenesis. Mature gametocytemia of up to 4% was reported.

Conclusions: Several biological parameters contribute to an optimal production in vitro of viable and infectious mature gametocytes. The knowledge gained from this systematic review on the molecular mechanisms involved in gametocytogenesis enables reproducible gametocyte protocols with transgenic parasite lines to be set up. This review highlights the need for additional gametocyte production protocols for *Plasmodium* species other than *P. falciparum*.

Keywords: *Plasmodium* spp, Malaria, Gametocyte, In vitro, Ex vivo, Protocols, Transmission-blocking

Background

The massive efforts implemented in recent years to control malaria have avoided approximately 1.7 billion malaria cases and 10.6 million malaria-related deaths worldwide [1]. However, these estimates in the most

recent World Malaria Report (2021) are 241 million cases and over 627,000 deaths [2]. A considerable asset in the fight against malaria was provided by the malaria control and elimination strategies that have been implemented, notably the Global technical strategies for malaria 2016–2030 (GTS) adopted in 2015 [3]. The greatest achievements were obtained in symptomatic malaria cases based on the test, treat and track strategy scaled up a decade ago by WHO. More recently, additional attention has been given to asymptomatic malaria, since there

*Correspondence: roukayatou.omorou@etu.univ-lyon1.fr

¹ Malaria Research Unit, UMR 5246 CNRS-INSA-CPE-University Lyon1, University of Lyon, 69100 Villeurbanne, France
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

is a large body of evidence indicating that asymptomatic parasite carriers have a significant impact on the odds of malaria transmission [4]. Children and adults may harbor sexual forms circulating in the blood for weeks without fever or symptoms, providing an undetected reservoir of malaria parasites. In the path leading toward malaria elimination, this reservoir is a major challenge that needs to be met, particularly given that most of the antimalarial drugs have a limited effect against gametocytes [5, 6]. Although first-line artemisinin-based combination therapies (ACTs) show partial activities against gametocytes [7–9], their effects on mature gametocytes are limited [10, 11]. As a result, the number of studies focusing on gametocytes have increased significantly over the past decade [12]. Research ranging from in-depth understanding of gametocyte biology to the development of drugs, vaccines or diagnostic techniques have a common thread: the need for the reproducible and reliable production of viable gametocytes in vitro.

Gametocytes are the cornerstone of parasite transmission from humans to mosquitoes [13]. The time of their appearance in the peripheral blood after a first erythrocytic cycle is estimated to be 7–15 days for *Plasmodium falciparum*, and shorter for other *Plasmodium* species (1–3 days) [14–17]. There are five (I–V) morphological stages of maturation [18]. The factors associated with gametocyte carriage are complex and not fully understood [19]. Human genetic background, environmental aspects, including climate factors, asexual parasitemia, allelic divergence in specific genes of *Plasmodium* strains, fever or hematopoiesis may all have an impact on sexual differentiation commitment, gametocyte maturation and viability and, ultimately, transmission to mosquitoes [19, 20]. It is not surprising that the successful production of viable gametocytes in vitro may have only some of these factors in common and thus additional factors related to experimental conditions may be required.

In 1976, Trager and Jensen first reported *P. falciparum* continuous culture in human red blood cells (RBCs) [21]. However, while this method allows the occasional appearance of gametocytes, it rarely results in mature and viable gametocytes being obtained. Between the late 1970s and end of the 1990s, various groups of researchers developed protocols to produce sexual stages in vitro [22–28], but reproducibility still remains challenging [29, 30]. The commitment of asexual forms into gametocytes varies widely depending on the *Plasmodium* clone and gametocytogenesis induction method [31, 32]. Studies have shown that the microenvironmental conditions of the parasite, such as high parasitemia, drop in hematocrit, nutrient starvation and lactic acid concentration, are important factors affecting the success of the protocol [33–35]. A genetic analysis indicated that sexual

transcripts increased under conditions of high versus low parasitemia [36]. Taken together, these parameters complexified the reproducibility and reliability of gametocyte production in vitro. Extensive protocols were published in 2015, providing a comprehensive approach to the parameters required for routine in vitro culture of *P. falciparum* gametocytes [31, 37].

In this review, we aimed to identify and compare the most recent gametocyte production protocols to favor the dissemination of in vitro tests for drug susceptibility of *P. falciparum* sexual stages. The same approach was used to review protocols for other *Plasmodium* species, although data on the latter remain scarce.

Methods

An integrative and systematic methodology was used to collect and review published articles on the production of in vitro *Plasmodium* spp. gametocytes. The Preferred Reporting Items of Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA) checklist 2020 (<https://prisma-statement.org/>) was used for this purpose.

Eligibility criteria

Studies relevant to the research question were selected according to pre-established criteria. To be eligible, the study had to be published from 2000 onwards, be available and present an original in vitro *Plasmodium* spp. gametocyte production protocol. We defined an original protocol as a new method of in vitro gametocyte production that has been developed and tested. Studies that reported ex vivo protocols for *Plasmodium vivax* gametocyte culture were also eligible.

Search strategy

Our initial approach was to obtain large-scale data on the study subject. To obtain a fairly complete list of research conducted on gametocytes production in vitro, we used the following search terms: “Gametocyte” AND “Plasmodium”. We used VOSviewer software to generate a term map to analyze the co-occurrence and the relatedness of these two terms, which then allowed us to check the reliability of the query terms. In July 2022, we queried three databases, namely PubMed, Web of Sciences and ScienceDirect, and performed manual searches on the web search engine to gather data. The following query equations were generated: (i) on PubMed/MEDLINE: (((Gametocyte*) AND (Plasmodium) AND (Gametocyte*[Title/Abstract]) AND (Plasmodium[Title/Abstract]))); filters, from 2000–2022; (ii) on Web of Science (WoS): (((((ALL=(gametocyte*) AND ALL=(Plasmodium) AND TI=(gametocyte*) AND TI=(Plasmodium) AND AB=(gametocyte*) AND AB=(Plasmodium) AND PY=(2000–2022)))))); (iii) on

ScienceDirect: Advanced search, title, abstract and key-words “Gametocyte” AND “Plasmodium”; filters, from 2000 to 2022.

Study selection, data collection and data analysis

The selection process and data collection were performed by the first author (RO) and checked by two other authors (IBS and YIK). Data from the online query were imported in the reference manager Zotero (version 5.0.96.3). Duplicate articles were eliminated. The first screening was based on title and key words. The first author then analyzed the title and abstract of each article resulting from the query so as to select only those articles in which gametocytes were produced in vitro and ex vivo for the *P. vivax* species. Finally, the full text was screened to include studies that met the inclusion criteria.

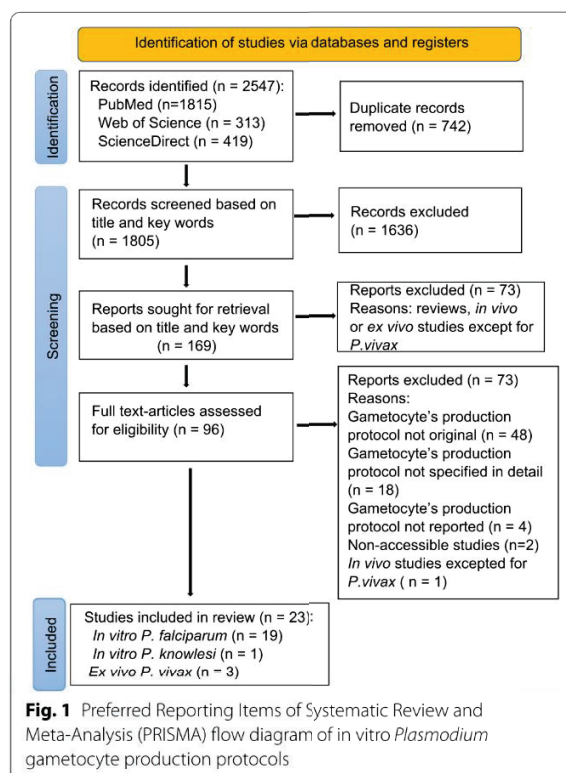
Data extraction and management

The first author (RO) screened the full text of included articles to retrieve data of interest. The data collected included information on: gametocytogenesis induction; starting parasitemia; *Plasmodium* strain or clone; synchronous or asynchronous asexual culture; culture medium; adjuvants, N-acetylglucosamine (NAG) or any other similar components used to eliminate asexual forms after induction; duration of the protocol; final gametocytemia count; conversion rate (CR); and viability of gametocytes. The parameters investigated were productivity (quantity of gametocyte produced, CR, viability, protocol duration), reproducibility (number of replicates performed, external/internal validation,) and feasibility (as a qualitative parameter). Excel software (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) was used to generate graphs.

Results

Selection process

The online search yielded 2547 results. After the removal of duplicates, 1805 papers were screened for eligibility. First screening of these 1805 papers based on title and key words led to the exclusion of 1636 articles. The 169 remaining studies were screened based on title and abstract; of these, 73 were excluded because they were either in vivo or ex vivo studies (except for *P. vivax*) or reviews. The remaining 96 articles were assessed for inclusion by screening the full text. Ultimately, 23 studies met the inclusion criteria and were included in this review: 19 on *P. falciparum*, three on *P. vivax* and one on *P. knowlesi*. The details of the search process are presented in the PRISMA flow-chart shown in Fig. 1. The 23 articles included in this review are listed in Table 1.



Characteristics of the studies

The gametocyte production protocols that were developed in the studies listed in Table 1 are presented here so that they can be produced by others. Most of the studies (96%, 22/23) were performed within the last 10 years. Relevant parameters of the review protocols of in vitro gametocyte production are summarized in Table 2.

Plasmodium parasites

In the studies included in this review, the NF54 strain and the 3D7 clone were the most commonly used strains for in vitro experiments with *P. falciparum* (53%, 10/19) followed by the FCR3 [38] and W2 [39] clones. Parasites adapted from clinical isolates were rarely tested [30, 40]. Transgenic lines derived from the NF54 and 3D7 clones were also used to produce gametocytes. Such transgenic lines contain a fluorescent protein that is under the control of the expression of a gametocyte-specific protein leading to accurate and easy-to-perform quantification of gametocytes. These include *Pf2004/164-tdTom* [41], *NF54-gexp02-Tom*, *E5-gexp02-Tom* and *NF54-10.3-Tom* [42]. All of these parasite lines expressed the fluorescent reporter tdTomato under the control of the promoter of the sexual stage-specific gene *gexp02* (PF3D71102500). The 164/GFP P2G12 line [29], NF54-pfs16-LUC-GFP

Table 1 Studies included in the review

Year of publication	First author	Title	Journal	References
2007	Fivelman	Improved synchronous production of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocytes in vitro	Mol Biochem Parasitol. 154:119–23	[54]
2011	Buchholz	A high-throughput screen targeting malaria transmission stages opens new avenues for drug development	J Infect Dis. 203:1445–53	[29]
2012	Lelièvre	Activity of clinically relevant antimalarial drugs on <i>Plasmodium falciparum</i> mature gametocytes in an ATP bioluminescence “Transmission Blocking” Assay	PLoS One. 7:e35019	[39]
2012	Roncalés	Comparison and optimization of different methods for the in vitro production of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocytes	J Parasitol Res. 2012:927148	[32]
2013	Saliba	Production of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocytes in vitro	Method Mol Biol. 923:17–25	[48]
2015	Brancucci	An assay to probe <i>Plasmodium falciparum</i> growth, transmission stage formation and early gametocyte development	Nat Protoc. 10:1131–42	[41]
2015	Reader	Nowhere to hide interrogating different metabolic parameters of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocytes in a transmission blocking drug discovery pipeline towards malaria elimination	Malar J. 14:213	[31]
2015	Vera	Purification methodology for viable and infective <i>Plasmodium vivax</i> gametocytes that is compatible with transmission-blocking assays	Antimicrob Agents Chemother. 59:6638–41	[51]
2016	Delvesl	Routine in vitro culture of <i>P. falciparum</i> gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions	Nature Protocols. 11:1668–80	[37]
2016	Duffy	Large-scale production of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocytes for malaria drug discovery	Nat Protoc. 11:976–92	[43]
2017	Demanga	The development of sexual stage malaria gametocytes in a wave bioreactor	Parasit Vectors. 10:216	[38]
2018	Armisteadl	Infection of mosquitoes from in vitro cultivated <i>Plasmodium knowlesi</i> H strain	Int J Parasitol. 48:601–10	[47]
2018	Pathak	Cryogenically preserved RBCs support gametocytogenesis of <i>Plasmodium falciparum</i> in vitro and gametogenesis in mosquitoes	Malar J. 17:457	[68]
2018	Rangel	Enhanced ex vivo <i>Plasmodium vivax</i> intraerythrocytic enrichment and maturation for rapid and sensitive parasite growth assays	Antimicrob Agents Chemother. 62:e02519-17	[52]
2019	Tanakal	Polyunsaturated fatty acids promote <i>Plasmodium falciparum</i> gametocytogenesis	Biol Open. 8:bio042259	[55]
2020	Portugaliza	Artemisinin exposure at the ring or trophozoite stage impacts <i>Plasmodium falciparum</i> sexual conversion differently	Elife. 9: e60058	[42]
2020	West	Lactic acid supplementation increases quantity and quality of gametocytes in <i>Plasmodium falciparum</i> culture	Infect Immun. 89: e00635-20	[50]
2020	Llorà-Batlle	Conditional expression of PfAP2-G for controlled massive sexual conversion in <i>Plasmodium falciparum</i>	Sci Adv. 6:eaa25057	[46]
2021	Wadi	Investigation of factors affecting the production of <i>P. falciparum</i> gametocytes in an Indian isolate	3 Biotech. 11:55	[30]
2021	Boltryk	CRISPR/Cas9-engineered inducible gametocyte producer lines as a valuable tool for <i>Plasmodium falciparum</i> malaria transmission research	Nat Commun. 12:4806	[45]
2021	Ridgway	Sex-specific separation of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocyte populations	Bio Protoc. 11:e4045	[44]
2022	Ramos	Viability and infectivity of <i>Plasmodium vivax</i> gametocytes in short-term culture	Front Cell Infect Microbiol. 11:676276	[53]
2022	Dinko	Generation of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocytes in vitro with specific consideration for field isolates	Method Mol Biol. 2470:121–32	[40]

line [43], 3D7HT-GFP [39] and 3D7gACBG2-GFP [44] expressed the fluorescent reporter green fluorescent protein (GFP). Inducible gametocytogenesis lines

have also been developed. E5 gametocyte-inducible line (E5ind line) is a subclone of 3D7 that contains conditional activation construct AP2-G-DD. Even though this

Table 2 Characteristics of the included studies

References	<i>Plasmodium</i> strain/ clone ^a	Starting parasitemia (%)	Starting hematocrit (%)	Medium (%)	Type of human serum	NAG	Synchronicity	Induction principle ^b	CR (%)	Mature gametocyte (%)	Viability	Infectivity
[54]	3D7A	2	5	10 HS/5 HS + 0.25 Alb	Pooled AB+	Yes	Sorbitol	Stress (1, 2)	10–30	NA	Yes	Yes
[29]	P2G12 164/GFP	1	1	1 Alb	NA	No	Sorbitol percoll	Stress (1)	NA	NA	Not tested	Not tested
[39]	3D7A, NF54, W2, Dd2, 3D7HI-GFP	0.2	12	15 Alb, then 10 Alb	NA	Yes	Sorbitol	Stress (1, 3)	NA	1–2	Yes	Not tested
[32]	3D7, NF54, Dd2, FCR3, W2, HB3	0.75	2	10 HS	Pooled AB+	No	Sorbitol	Stress (4)	11–23	~1.2	Not tested	Not tested
[48]	3D7A, NF54	3–5	4	10 HS	O+	Yes	Sorbitol percoll/No	Stress (1)	NA	NA	Not tested	Not tested
[41]	PF2004/164-tdTom	0.3	2.5	10 HS	NA	No	Sorbitol	Stress (1, 2)	14–24	NA	Not tested	Not tested
[31]	3D7, NF54, FCR3, W2, HB3, 7G8	0.5	6	0.5 Alb	NA	Yes	No	Stress (1, 3)	~33	4	Yes	Not tested
[37]	NF54	1	4	10 HS	Pooled A+	No	No	Stress	NA	~2.5	Yes	Yes
[43]	NF54 ^{pf16-LUC-GFP}	3	5	5 HS + 0.25 Alb	AB+	Yes	Sorbitol MACS	Stress (1)	11–33	–	Not tested	Not tested
[38]	3D7, FCR3	0.8–1.1	6	10 HS	NA	Yes	Sorbitol	Stress (1)	NA	~0.1–0.3	Yes	Yes
[68]	NF54	0.6–1	5	10 HS	Pooled A+	No	No	Stress	NA	NA	Yes	Yes
[55]	NF54, 3D7	0.1	6	10 HS/0.5 Alb + PUFAs	A+/O+	Yes	No	Stress (1)	NA	~1	Not tested	Not tested
[42]	NF54-gexp02-Tom, E5-gexp02-Tom, and NF54-10.3-Tom	1.5	3	0.5 Alb + 2 mM choline/10 HS	NA	Yes	Sorbitol percoll	Stress, 5 mM DHA for 3 h	40	NA	Yes	Yes
[50]	NF54	0.5	4	10 HS	O+	Yes	No	Stress + lactic acid	NA	3	Not tested	Yes
[46]	E5-PFAP2-G-DD	NA	4	0.5 Alb/10 HS	NA	Yes	Sorbitol percoll	Condition	90	NA	No	No
[30]	RKL-9 (Rourkela, Odisha)	0.5	10	10 HS	AB+	Yes	Sorbitol	Stress (1)	NA	NA	Not tested	Not tested
[45]	NF54/GP1 GDV1-GFP-DD	1.5	5	10 HS	AB+	Yes	Sorbitol	Condition	75	4	Yes	Yes
[44]	3D7-gACBG2-GFP	3–5	4	~2 HS + 0.3 Alb	Pooled O+	Yes	Sorbitol MACS	Stress	NA	NA	Not tested	Not tested
[40]	PF field isolates	2–3	3	10 HS + 0.5 Alb	Pooled O+	Yes	Sorbitol MACS	Stress (2)	NA	NA	Yes	Not tested
[47]	<i>P. knowlesi</i> PKH/FZ8	1	0.2/2	10% Rhesus pooled sera		Yes	Sorbitol percoll	Stress (1)	NA	<0.05	Not tested	Yes

The “Protocol-type” articles and some studies did not report quantitative gametocyte data. In these articles, the authors state that the methods were validated either by viability assays or by quantitative measurements Alb Albumax II, CR conversion rate, DHA dihydroartemisin HS human serum, NA not available, NAG N-acetylglucosamine, PUFAs polyunsaturated fatty acids, Sorbitol/MACS MacConkey Agar with Sorbitol

^a For studies that use multiple *P. falciparum* strains, if the authors specify, the gametocytemia and CR reported correspond to the underlined strain

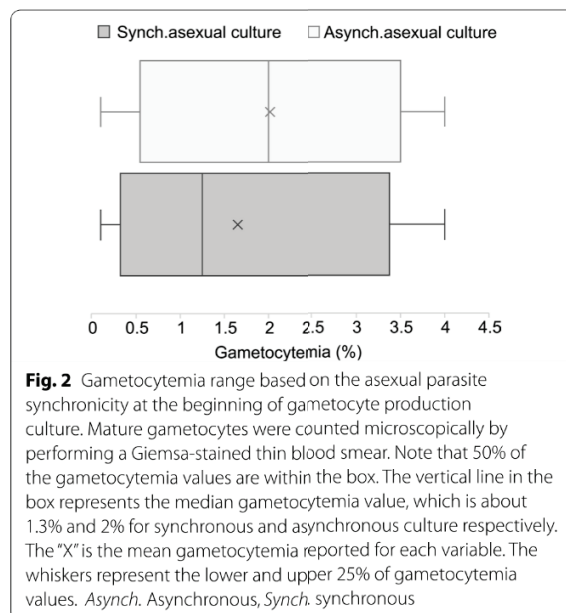
^b All stress-based gametocytogenesis induction uses high parasitemia as a stress factor. Code: (1) drop in hematocrit; (2) parasite conditioned medium; (3) nutrient starvation; (4) lysed uninfected red blood cells

line supported a high production of gametocytes, the gametocytes were not infectious to mosquitoes. *Plasmodium falciparum* NF54 clone was genetically modified with a conditional activation construct GDV1-GFP-DD (*Pf*NF54/iGFP1) [45, 46]. The reported *P. falciparum* transgenic lines are summarized in Table 3. Three studies showed data on *P. vivax* ex vivo gametocyte culture, and one study was using *Plasmodium knowlesi* for in vitro gametocyte production. This latter study showed for the first time that infectious gametocytes of *P. knowlesi* could be produced in vitro with a highly synchronized culture, although the production was low.

Synchronization

For most of the protocols, asexual parasites were synchronized or purified at a late maturation stage (15/20 protocols) at the beginning of the experiments. Sorbitol treatment was used in 7/15 studies, while other methods were successfully tested: schizont enrichment by flotation in 1% gelatin [38], both sorbitol treatment and Percoll density gradient [29, 42, 46–48], magnetic columns (MACS) based on paramagnetic propriety of hemozoin [49] or a combination of sorbitol + MACS [40, 43, 44]. Both synchronous and asynchronous culture support gametocytogenesis (Fig. 2). Gametocytemia refers to the quantity of mature gametocytes produced, and some of the gametocytes in the studies were assessed for viability and infectivity (Table 2). Of the five protocols that used asynchronous culture, gametocytemia was between 2.5% and 4% [31, 32, 37, 50]. Demanga et al. [38] obtained a production of mature gametocytes of between 0.1% and 0.3% for both synchronous and asynchronous culture. Synchronous cultures (15/20 protocols) showed gametocytemia ranging from 1% to 3%, with a CR ranging from 11 to 40% [42]. Conditional gametocytogenesis induction provided 4% gametocytemia with 75% CR [41, 43].

Plasmodium vivax in vitro continuous cultures have not been achieved so far. As an alternative, ex vivo cultures of gametocytes have been set up by optimizing the



enrichment method of clinical isolates and culture conditions. Gametocytes from *P. vivax* clinical isolates were successfully cultured for 48 h after being purified using a Percoll gradient, KCl Percoll gradient or MACS after leukodepletion [51–53]. The addition of KCl to the Percoll gradient was thought to minimize dehydration of cells applied to the gradient [52]. However, Percoll gradient enrichment seemed to preserve parasite viability compared to MACS, with MACS showing higher enrichment. The use of Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) culture medium improved parasite survival [52]. When compared to Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640, IMDM is more concentrated in amino acids, vitamins, glucose and some inorganic salts.

Table 3 *Plasmodium falciparum* transgenic lines reported to date

	Gametocyte fluorescent lines		Gametocyte sex-specific fluorescent lines	Gametocytes inducible lines
	tdTomato fluorescent reporter	GFP fluorescent reporter		
<i>Pf</i> transgenic lines	<i>Pf</i> 2004/164.tdTom [41] NF54-GgexpO2.Tom [42] E5-gexpO2.Tom [42] NF54-10.3-GFP [42]	P2G12_164/GFP [29] NF54.pfs16-Luc-GFP [43] 3D7HT-GFP [39]	3D7 gABCG2-GFP [44]	E5-pfAP2-/G-DD [46] NF54/iGFP1 GDV1-GFP-DD [45]

GFP Green fluorescent protein, *Pf Plasmodium falciparum*

Hematocrit

The hematocrit is one of the parameters that widely varies across protocols. The hematocrit at culture initiation was reported by various authors to be 12% [39], 6% (3/20), 5% (4/20), 4% (6/20), 3% (3/20), 2% [32] and 0.2% [47]. A rapid decrease in hematocrit was used as a stress-based induction principle, leading to a reduction from 12% to 6% [39], from 6% to 3% (2/20), then 1.25% for 1 day; subsequent reductions to 2.5% [43], 2% [29] have been reported. As well as hematocrit, cultures had parasitemia ranging from 0.1% to 0.5% (7/20) and from 0.6% to 1% (6/20) and to > 1% (6/20).

Culture medium

The basic culture medium most commonly reported for use in in vitro protocols was RPMI-1640+HEPES+sodium bicarbonate+L-glutamine/or glucose and often an antibiotic (gentamicin). Studies reported the addition to this basic medium of either 10% human serum or AlbuMax II (1% or 0.5% or 15%; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [29, 31, 38, 39] or a mixture of serum (5%)+AlbuMax II (0.25%) [29, 43, 44, 54, 55] or a mixture of serum (10%)+AlbuMax II (0.5%) [40]. AB+ and O+ pooled human sera were the most reported blood type used, followed by A+. IMDM+10% human AB+serum was used for ex vivo *P. vivax* culture [52, 53]. Culture in the presence of 10% human serum is commonly used, and the corresponding mature gametocytemia ranges from 0.1% to 3% with stress-based induction and is 4% with conditional gametocytogenesis induction. When gametocytes were produced in the presence of AlbuMax II, Reader et al. [31] (0.5% Albumax II) and Lelièvre et al. [39] (10% Albumax II) reported 4% and 1-2% gametocytogenesis, respectively, when using stress-based induction. Serum +AlbuMax II mixture (5% human serum+0.25% AlbuMax II) has been used to achieve CR of 11–33% [43]. Incubation conditions of cultures were almost similar for all of these studies.

Productivity of gametocytes

We screened the number and viability of gametocytes produced to assess protocols' efficiency. Gametocytemia is usually calculated as the number of gametocytes per 100 RBCs. The CR relates to the proportion of ring forms that lead to gametocytes after their induction (but does not report on whether the gametocytes are capable of continued development to maturity). The CR is estimated as the number of stage II gametocytes that appear in culture 2 days after the appearance of the ring forms. The CR can thus be expressed by the following formula [23]:

$$\text{Conversionrate} = \frac{\text{no. of stageII gametocytes per 100 RBCs counted 48h after ring forms}}{\text{no. of ring forms per 100 RBCs on day0 prior to stageII gametocytes}} \times 100$$

We found that the time required for *P. falciparum* gametocyte production in vitro was approximately equal for all protocols, ranging from 12 to 16 days with an average of 14 days.

For *P. vivax*, the productivity is relative to the rate of gametocyte purification or enrichment. The KCl Percoll density enrichment method provided an average enrichment about 50-fold of parasites (asexual+sexual forms) [52], while the Percoll 60 purification method yielded an average (\pm standard deviation) of 81.6% (\pm 30.50%) and the Percoll 45 method resulted in an average of 44.15% (\pm 33.88%) recovery of gametocytes from clinical isolates [51]. *Plasmodium vivax* ex vivo parasites were cultured for 48 h [52].

Induction of gametocytogenesis

The production of gametocytes in vitro requires induction factors, which are either molecular or environmental. Most of the included studies (18/20) used environmental stress factors to trigger gametocytogenesis. The most frequently mentioned natural factors were high parasitemia (all included studies), sudden drop in hematocrit [29–31, 39, 43, 55], conditioned medium from parasites' culture that contained metabolites and secreted stress factors [29, 40, 43, 54] and nutrient starvation [31]. Adjuvants added were lactic acid [50], fatty acid [55], chloroquine and dihydroartemisin (DHA) [42]. Two studies reported a conditional gametocytogenesis induction principle using a transgenic gametocyte-inducible line. The expression of a gene involved in gametocytogenesis is conditioned by an external factor. The presence or absence of this factor will induce gametocytogenesis and thus gametocyte production in vitro. Llorà-Batlle et al. [46] developed a conditional expression of the *Pf* AP2-G transcription factor while Boltryk et al. [45] established a conditional overexpression of the sexual commitment factor GDV1. GDV1 and *Pf* AP2-G are nuclear proteins known to be master regulators of sexual commitment [45, 46].

Gametocytemia and gametocyte viability

The standard method for determining parasitemia is microscopy and involves counting gametocytes on Giemsa-stained smears. However, other techniques, such as flow cytometry [29, 41, 42] and fluorescence microscopy, have been reported. Lelièvre et al. [39] used the Neubauer chamber to count gametocytes following the purification process. The viability of gametocytes is assessed by using the exflagellation assay of mature male gametocytes (gametogenesis induction). While only viable gametocytes can be converted into gametes, it

may be that not all gametocytes are infectious. To assess the infectivity of gametocytes, the standard membrane feeding (SMFA) test is used. SMFA involves feeding mosquitoes with a mature gametocyte culture and then evaluating the production of oocysts in the mosquitoes. Only infectious gametocytes will produce oocysts [56]. The following factors promote the induction of gametogenesis: a decrease in temperature, an increase in pH and the presence of the mosquito factor xanthurenic acid [57]. While a female gametocyte develops into a single macrogamete, one male *P. falciparum* gametocyte generates eight flagellated and motile microgametes [58]. Among the reported protocols, only one did not yield viable gametocytes [46] (Table 2).

Discussion

In the present study, we reviewed and systematically analyzed recently optimized gametocyte production protocols. Nineteen articles on in vitro gametocyte production for *P. falciparum*, published between 2000 and 2022, three articles on *P. vivax* and one articles on *P. knowlesi*, were included in this systematic review. Very little data were available for *P. vivax* due to the lack of standardized protocols for easy long-term cultures which precludes the possibility of producing significant amounts of gametocytes for in vitro tests. *Plasmodium vivax* gametocytes were obtained ex vivo for one cycle of maturation after Percoll density or MACS enrichment of clinical isolates. Only one paper reported the production of *P. knowlesi* sexual forms leading to a low number of gametocytes (0.05%) [47]. Importantly, these gametocytes were infectious to mosquitoes and generated oocysts with a low reproducibility rate (~50%) [47].

The in vitro production of viable gametocytes is a complex and multifactorial process, but the complexity of gametocytogenesis in vivo is probably much greater, with many host factors that could influence the sexual CR [59]. It is not a straightforward given that the multiple factors affecting in vivo gametocytogenesis could be the same as those required for in vitro gametocyte induction and survival. The analysis presented was focused only on in vitro factors. Many factors favoring gametocytes culture were identified, including the propensity of the parasite for gametocytogenesis, the biological conditions of culture (parasitemia, hematocrit, medium and synchronization) and the factors triggering the induction of the sexual commitment.

Several *P. falciparum* clones/strains are known for their propensity to produce gametocytes in vitro, and the NF54 strain is representative of these culture-adapted parasites [32, 37]. Nevertheless, it is well-known that clones lose their ability to produce gametocytes as the number of in vitro passages increase, probably related

to the deletion of genes or the repression of promoters necessary for sexual development, allowing them to out-compete the gametocyte-competent clones in the population. The number of freeze–thaw and asexual cycles before sexual commitment in the studies reviewed here is almost impossible to determine, but it may be a confounding factor to keep in mind for comparison between methods. To overcome these obstacles related to clones and to increase the production of gametocytes, transgenic lines containing fluorescent proteins under the control of the promoter of the sexual stage-specific gene have been used, allowing the development of easy-to-perform gametocyte readout for drug screening assays [29, 39, 41–43]. High CRs of 90% [46] and 75% [45] were achieved with the conditional gametocytogenesis induction principle compared to 10–40% using the stress-based induction principle. However, the protocol that reported a CR of 90% produced gametocytes that were non-infectious to mosquitoes due to a defect in exflagellation.

The biological conditions for in vitro culture have a significant impact on the CR and the harvest of viable stage V gametocytes. While the basic medium is almost always the same, it may be supplemented with different factors at various concentrations, leading to important differences in the final result.

Supplementation of the culture medium with either human serum [46, 60], AlbuMax II [29, 31, 39] or a combination of both in different proportions [40, 43, 54] was reported in the included studies. Supplementation with 10% human serum supplementation is commonly used to produce gametocytes in vitro. It has been speculated that post-2012 batches of AlbuMax II would no longer be suitable for use as a complete serum substitute because a reduced growth of asexual parasites was observed with these batches. This reduced growth would be expected to result from a modification in the lipid composition of AlbuMax II [43]. Supplementation with 10% human serum may provide a high gametocyte production but may be subject to the huge differences among serum samples depending on the donor's factors. AlbuMax II is a cheaper but less effective serum substitute, and the cornerstone of this discrepancy may be linked to lipid composition and concentration. Gametocyte maturation may require less lipid than asexual forms. However, the requirement for specific lipids is higher during gametocyte maturation [55, 60, 61]. A comparative study of the lipid composition of a basic medium supplemented with 0.5% AlbuMax II versus 10% human serum showed that AlbuMax II contains less lipids [55], mainly polyunsaturated fatty acids (PUFAs). About 1.5- to twofold more gametocytes were produced using 10% human serum, compared to 0.5% AlbuMax II. This difference was corrected when the medium with AlbuMax

II was supplemented with PUFAs [55]. The protocols that we reviewed here showed a similar range of gametocytemia across the three categories of basic medium supplementation.

The reported starting parasitemia was different across protocols, probably due to culture conditions and, importantly, the growth profile, which is strain specific. The starting parasitemia must be adjusted according to the infectivity rate of parasites so as to reduce the time required to obtain the parasitemia necessary for the production of gametocytes. Indeed, the longer the culture duration, the greater the reduction in the quantity of mature gametocytes, in part due to the lysis of RBCs. RBCs have a limited life span and are the cornerstone of the maturation of the gametocyte they host. The most recently collected RBCs at the beginning of the culture would thus be important to consider. It is therefore advisable that RBCs for the first day of induction be between 3 and 10 days post-collection [43, 54]. Storage of RBCs at 4 °C for up to 2 weeks does not appear to hinder the success of gametocyte culture [37].

Synchronous or asynchronous asexual culture allows gametocyte production with no significant difference in productivity (Table 2). However, synchronous gametocyte cultures are important for performing certain parasite stage-dependent studies in proteomics, transcriptomics and drug screening.

It is also important to consider the cost, duration and practicability of the selected protocol. A protocol with several synchronization steps using a culture medium supplemented with human serum will be more time-consuming and costly than a protocol with an asynchronous culture in the presence of the AlbuMax II/serum. Therefore, protocols should be carefully chosen according to the experiments to be performed with gametocytes, and probably according to the skills and facilities, with the ultimate goal to produce sufficient viable and infective gametocytes.

Based on evolutionary theory, it has been suggested that the parasite differentiates into sexual forms when it detects stress factors in its environment [62]. It has also been considered that a subpopulation of circulating parasites commits to sexual differentiation at each cycle, thereby providing a continuous supply of gametocytes for transmission through mosquito bites [19]. This latter option probably occurs more frequently in areas of peri-annual transmission where there are frequent mosquito's bites. While significant progress has been made in the comprehension of sexual conversion in vivo, it is still impossible to predict the occurrence of gametocytogenesis during malaria infection [59]. The induction of the molecular mechanism leading to the expression of the transcriptional factor *PfAP2-G* in asexual parasites is a

critical triggering step to produce gametocytes [63–66]. It is suggested that *Pfap2-g* is mainly expressed at the ring and late schizont stages [67]. Thus, gametocytes differentiation can occur in the same or next replication cycle according to the level of AP2-G protein [63, 67]. Stress-based induction by environmental factors was used in the majority of studies involving *P. falciparum* (18/20). These factors include high parasitemia, drop in hematocrit, nutrient starvation, addition of parasite-conditioned medium, lactic acid or drugs. Conditional induction was used with the two reported *P. falciparum* gametocyte-inducible transgenic lines.

Whether it is the gametocyte count or the CR, these two methods of calculation would present a bias. The CR is calculated as the ratio of gametocytes compared to the number of rings counted 48 h before. However, some earlier gametocytes will not mature, resulting in a lower number of mature gametocytes at the end of culture. Conversely, gametocytemia is expressed as the number of gametocytes at the end of culture compared to the number of RBCs (number of gametocyte/number of RBC). In this case, the issue of RBC lysis occurs throughout the production period, as the RBCs are consumed in asexual cycles and also age and become more fragile. Thus, when gametocytes reach maturity, there are far fewer RBCs than earlier in the culture, and this tends to lead to an overestimation of the real gametocyte number in the culture. Therefore, both methods would overestimate the quantity of gametocytes produced. An alternative would be to estimate the quantity of gametocytes as the number of gametocytes per microliter of culture medium. This would dispense with variables and also provide an accurate measurement of the quantity of gametocyte biomass produced.

Conclusions

Several biological parameters contribute to a more optimal production of viable and infectious mature gametocytes. Insights into the molecular mechanisms involved in gametocytogenesis have made it possible to produce gametocytes with transgenic parasite lines. These protocols would appear to be more reliable and robust. However, the question of viability and infectivity of these gametocytes remains to be studied. It is worth highlighting that extensive efforts have been made to develop reliable methods to produce gametocytes in vitro and ex vivo which would in turn allow further studies aimed at better understanding this life stage of *Plasmodium* and developing specific tools, such as malaria transmission-blocking drugs and vaccines. Furthermore, there is a need for additional gametocyte production protocols for non-falciparum *Plasmodium* species. A joint effort should be made by the community of scientists involved

in malaria control studies to standardize *Plasmodium* cultures for gametocytes; this will represent a real turning point in bridging the knowledge gap on the biology of all plasmodia.

Abbreviations

ACTs: Artemisinin-based combination therapies; CR: Conversion rate; DHA: Dihydroartemisinin; GFP: Green fluorescence protein; GTS: Global technical strategies for malaria; IMDM: Incomplete Iscove's modified Dulbecco's medium; MACS: Magnetic columns; NAG: N-acetylglucosamine; PRISMA: Preferred reporting items of systematic review and meta-analysis; PUFAs: Polyunsaturated fatty acids; RBCs: Red blood cells; RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium; SMFA: Standard membrane feeding assay.

Acknowledgements

This article was produced by WANECAM 2, which is part of the EDCTP2 program supported by the European Union (Grant Number RIA2017T-2018 WANECAM-2). The views and opinions of authors expressed herein do not necessarily state or reflect those of EDCTP. IBS thanks the Cooperation Office for Science & Technology, French Embassy in Indonesia, Kemenag-LPDP (Ministry of Religious Affairs & Endowment Fund for Education of Indonesia and Institut National des Sciences Appliquées (INSA) de Lyon. The authors thank Prof. Abdoulaye Djimé and Françoise Benoit-Vical for helpful discussions

Author contributions

RO performed the bibliographic search, collected and analyzed the data and wrote the first draft. MD, CS, SP and ALB reviewed the paper. IB and YIK checked the accuracy of the data and reviewed the paper. ALB and SP launched the study, prepared the study design, analyzed data and references, wrote and edited the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

RO was supported by a grant from EDCTP (Grant Number RIA2017T-2018 WANECAM-2). MD is funded by an MRC Career Development Award Fellowship. IBS was supported by a grant from Ministry of Religious Affairs (MORA) Scholarship 5000 Doktor and supported by Kediri State Islamic Institute (IAIN) Indonesian Republic.

Availability of data and materials

All data are available upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Malaria Research Unit, UMR 5246 CNRS-INSA-CPE-University Lyon1, University of Lyon, 69100 Villeurbanne, France. ²Institut Agama Islam Negeri (IAIN) Kediri, 64127 Kota Kediri, Jawa Timur, Indonesia. ³Department of Infection Biology, Faculty of Infectious Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1A 7HT, UK. ⁴Dipartimento Di Malattie Infettive, Istituto Superiore Di Sanità, Rome, Italy. ⁵Service Pharmacie, Groupe Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ⁶Institut de Parasitologie Et Mycologie Médicale, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

Received: 28 September 2022 Accepted: 2 November 2022
Published online: 05 December 2022

References

1. Bill & Melinda Gates Foundation. Malaria. Bill & Melinda gates Foundation. 2022. <https://www.gatesfoundation.org/our-work/programs/global-health/malaria>. Accessed 23 Jan 2022.
2. WHO. World malaria report. 2021. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2021-global-briefing-kit-fre.pdf?sfvrsn=8e5e915_23&download=true. Accessed 23 Jan 2022.
3. WHO. Global technical strategy for malaria, 2016–2030. 2015. <https://www.who.int/docs/default-source/documents/global-technical-strategy-for-malaria-2016-2030.pdf>. Accessed 23 Jan 2022.
4. Sumner KM, Freedman E, Abel L, Obala A, Pence BW, Wesolowski A, et al. Genotyping cognate *Plasmodium falciparum* in humans and mosquitoes to estimate onward transmission of asymptomatic infections. *Nat Commun*. 2021;12:909.
5. Goncalves D, Hunziker P. Transmission-blocking strategies: the roadmap from laboratory bench to the community. *Malar J*. 2016;15:95.
6. Nilsson SK, Childs LM, Buckee C, Marti M. Targeting human transmission biology for malaria elimination. *PLoS Pathog*. 2015;11:e1004871.
7. Bretscher MT, Griffin JT, Hugo P, Baker M, Ghani A, Okell L. A comparison of the duration of post-treatment protection of artemether-lumefantrine, dihydroartemisinin-piperaquine and artesunate-amodiaquine for the treatment of uncomplicated malaria. *Malar J*. 2014;13:1.
8. Ippolito MM, Johnson J, Mullin C, Mallow C, Morgan N, Wallender E, et al. The relative effects of artemether-lumefantrine and non-artemisinin antimalarials on gametocyte carriage and transmission of *Plasmodium falciparum*: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2017;65:486–94.
9. West African Network for Clinical Trials of Antimalarial Drugs (WANECAM). Pyronaridine-artesunate or dihydroartemisinin-piperaquine versus current first-line therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomised, multicentre, open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial. *Lancet*. 2018;391:1378–90.
10. Graves PM, Gelband H, Garner P. Primaquine or other 8-aminoquinoline for reducing *P. falciparum* transmission. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008152.pub3>.
11. Mehra N, Bhasin VK. In vitro gametocytocidal activity of artemisinin and its derivatives on *Plasmodium falciparum*. *Jpn J Med Sci Biol*. 1993;46:37–43.
12. Beavogui AH, Djimé AA, Gregson A, Toure AM, Dao A, Coulibaly B, et al. Low infectivity of *Plasmodium falciparum* gametocytes to *Anopheles gambiae* following treatment with sulfadoxine-pyrimethamine in Mali. *Int J Parasitol*. 2010;40:1213–20.
13. Picot S, Bienvenu A-L. *Plasmodium*. In: Rezaei N, editor. *Encyclopedia of infection and immunity*. Amsterdam: Elsevier; 2022.
14. Day KP, Hayward RE, Dyer M. The biology of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Parasitology*. 1998;116:595–109.
15. Eichner M, Diebner HH, Molineaux L, Collins WE, Jeffery GM, Dietz K. Genesis, sequestration and survival of *Plasmodium falciparum* gametocytes: parameter estimates from fitting a model to malariatherapy data. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95:497–501.
16. Sinden RE. Sexual development of malarial parasites. *Adv Parasitol*. 1983;22:153–216.
17. Talman AM, Domarle O, McKenzie FE, Arie F, Robert V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2004;3:24.
18. Hawking F, Wilson ME, Gammage K. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1971;65:549–59.
19. Usui M, Williamson KC. Stressed out about *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:790067.
20. Usui M, Prajapati SK, Ayanful-Torgby R, Acquah FK, Cudjoe E, Kakany C, et al. *Plasmodium falciparum* sexual differentiation in malaria patients is associated with host factors and GDV1-dependent genes. *Nat Commun*. 2019;10:2140.
21. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193:673–5.
22. Carter R, Ranford-Cartwright L, Alano P. The culture and preparation of gametocytes of *Plasmodium falciparum* for immunochemical, molecular, and mosquito infectivity studies. *Methods Mol Biol*. 1993;21:67–88.

23. Carter R, Miller LH. Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Bull World Health Organ.* 1979;57:37–52.
24. Ifediba T, Vanderberg JP. Complete *in vitro* maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Nature.* 1981;294:364–6.
25. Petmitr P, Pongvilairat G, Wilairat P. Large scale culture technique for pure *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1997;28:18–21.
26. Ponnudurai T, Meuwissen JH, Leeuwenberg AD, Verhave JP, Lensen AH. The production of mature gametocytes of *Plasmodium falciparum* in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76:242–50.
27. Schneweis S, Maier WA, Seitz HM. Haemolysis of infected erythrocytes—a trigger for formation of *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Parasitol Res.* 1991;77:458–60.
28. Smalley ME. *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis *in vitro*. *Nature.* 1976;264:271–2.
29. Buchholz K, Burke TA, Williamson KC, Wiegand RC, Wirth DF, Marti M. A high-throughput screen targeting malaria transmission stages opens new avenues for drug development. *J Infect Dis.* 2011;203:1445–53.
30. Wadi I, Deora N, Nath M, Sinha A. Investigation of factors affecting the production of *P. falciparum* gametocytes in an Indian isolate. *3 Biotech.* 2021;11:55. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02586-7>.
31. Reader J, Botha M, Theron A, Lauterbach SB, Rossouw C, Engelbrecht D, et al. Nowhere to hide: interrogating different metabolic parameters of *Plasmodium falciparum* gametocytes in a transmission blocking drug discovery pipeline towards malaria elimination. *Malar J.* 2015;14:213.
32. Roncalés M, Vidal-Mas J, Leroy D, Herreros E. Comparison and optimization of different methods for the *in vitro* production of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *J Parasitol Res.* 2012;2012:927148.
33. Beri D, Balan B, Tatu U. Commit, hide and escape: the story of *Plasmodium* gametocytes. *Parasitology.* 2018;145:1772–82.
34. Brancucci NMB, Gerdt JP, Wang C, de Niz M, Philip N, Adapa SR, et al. Lysophosphatidylcholine regulates sexual stage differentiation in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell.* 2017;171:1532–1544. e15.
35. Dyer M, Day KP. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today.* 2000;16:102–7.
36. Chou ES, Abidi SZ, Teye M, Leliwa-Sytek A, Rask TS, Cobbold SA, et al. A high parasite density environment induces transcriptional changes and cell death in *Plasmodium falciparum* blood stages. *FEBS J.* 2018;285:848–70.
37. Delves MJ, Straschil U, Ruecker A, Miguel-Blanco C, Marques S, Dufour AC, et al. Routine *in vitro* culture of *P. falciparum* gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions. *Nat Protoc.* 2016;11:1668–80.
38. Demanga CG, Eng JW, Gardiner DL, Roth A, Butterworth A, Adams JH, et al. The development of sexual stage malaria gametocytes in a wave bioreactor. *Parasit Vectors.* 2017;10:216.
39. Lelièvre J, Almela MJ, Lozano S, Miguel C, Franco V, Leroy D, et al. Activity of clinically relevant antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* mature gametocytes in an ATP bioluminescence “transmission blocking” assay. *PLoS ONE.* 2012;7:e35019.
40. Dinko B, Tackie R, Henriques G, Stewart L, Sutherland C. Generation of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro* with specific considerations for field isolates. *Methods Mol Biol.* 2022;2470:121–32.
41. Brancucci NMB, Goldowitz I, Buchholz K, Werling K, Marti M. An assay to probe *Plasmodium falciparum* growth, transmission stage formation and early gametocyte development. *Nat Protoc.* 2015;10:1131–42.
42. Portugaliza HP, Miyazaki S, Geurten FJ, Pell C, Rosanas-Urgell A, Janse CJ, et al. Artemisinin exposure at the ring or trophozoite stage impacts *Plasmodium falciparum* sexual conversion differently. *Elife.* 2020;9:e60058.
43. Duffy S, Loganathan S, Holleran JP, Avery VM. Large-scale production of *Plasmodium falciparum* gametocytes for malaria drug discovery. *Nat Protoc.* 2016;11:976–92.
44. Ridgway MC, Cihalova D, Maier AG. Sex-specific separation of *Plasmodium falciparum* gametocyte populations. *Bio Protoc.* 2021;11:e4045.
45. Boltryk SD, Pässecker A, Alder A, Carrington E, van de Vegte-Bolmer M, van Gemert G-J, et al. CRISPR/Cas9-engineered inducible gametocyte producer lines as a valuable tool for *Plasmodium falciparum* malaria transmission research. *Nat Commun.* 2021;12:4806.
46. Llorà-Batlle O, Michel-Todó L, Witmer K, Toda H, Fernández-Becerra C, Baum J, et al. Conditional expression of PfAP2-G for controlled massive sexual conversion in *Plasmodium falciparum*. *Sci Adv.* 2020. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz5057>.
47. Armistead JS, Moraes Barros RR, Gibson TJ, Kite WA, Mershon JP, Lambert LE, et al. Infection of mosquitoes from *in vitro* cultivated *Plasmodium knowlesi* H strain. *Int J Parasitol.* 2018;48:601–10.
48. Saliba KS, Jacobs-Lorena M. Production of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. *Methods Mol Biol.* 2013;923:17–25.
49. Bates AH, Mu J, Jiang H, Fairhurst RM, Su X. Use of magnetically purified *Plasmodium falciparum* parasites improves the accuracy of erythrocyte invasion assays. *Exp Parasitol.* 2010;126:278–80.
50. West R, Sullivan DJ. Lactic acid supplementation increases quantity and quality of gametocytes in *Plasmodium falciparum* culture. *Infect Immun.* 2020;89:e00635–720.
51. Vera O, de BritoBrelas P, Albrecht L, Martins-Campos KM, Pimenta PFP, Monteiro WM, et al. Purification methodology for viable and infective *Plasmodium vivax* gametocytes that is compatible with transmission-blocking assays. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:6638–41.
52. Rangel GW, Clark MA, Kanjee U, Lim C, Shaw-Saliba K, Menezes MJ, et al. Enhanced *ex vivo* *Plasmodium vivax* intraerythrocytic enrichment and maturation for rapid and sensitive parasite growth assays. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62:e02519-e2617.
53. Ramos GQ, Baia-da-Silva DC, Lacerda MVG, Monteiro WM, Lopes SCP. Viability and infectivity of *Plasmodium vivax* gametocytes in short-term culture. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:67276.
54. Fivelman QL, McRobert L, Sharp S, Taylor CJ, Saeed M, Swales CA, et al. Improved synchronous production of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;154:119–23.
55. Tanaka TQ, Tokuoka SM, Nakatani D, Hamano F, Kawazu S, Wellem TE, et al. Polyunsaturated fatty acids promote *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *Biol Open.* 2019;8(7):bio042259. <https://doi.org/10.1242/bio.042259>.
56. van der Kolk M, De Vlas SJ, Saul A, van de Vegte-Bolmer M, Eling WM, Saurewein RW. Evaluation of the standard membrane feeding assay (SMFA) for the determination of malaria transmission-reducing activity using empirical data. *Parasitology.* 2005;130:13–22.
57. Dash M, Sachdeva S, Bansal A, Sinha A. Gametogenesis in *Plasmodium*: delving deeper to connect the dots. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:877907.
58. Hitz E, Balestra AC, Brochet M, Voss TS. PfMAP-2 is essential for male gametogenesis in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep.* 2020;10:11930.
59. Baker DA. Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 2010;172:57–65.
60. Gulati S, Ekland EH, Ruggles KV, Chan RB, Jayabalasingham B, Zhou B, et al. Profiling the essential nature of lipid metabolism in asexual blood and gametocyte stages of *Plasmodium falciparum*. *Cell Host Microbe.* 2015;18:371–81.
61. Tran PN, Brown SHJ, Rug M, Ridgway MC, Mitchell TW, Maier AG. Changes in lipid composition during sexual development of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2016;15:73.
62. Schneider P, Reece SE. The private life of malaria parasites: strategies for sexual reproduction. *Mol Biochem Parasitol.* 2021;244:11375.
63. Bruce MC, Alano P, Duthie S, Carter R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology.* 1990;100:191–200.
64. Josling GA, Williamson KC, Llinás M. Regulation of sexual commitment and gametocytogenesis in malaria parasites. *Annu Rev Microbiol.* 2018;72:501–19.
65. Josling GA, Russell TJ, Venezia J, Orchard L, van Biljon R, Painter HJ, et al. Dissecting the role of PfAP2-G in malaria gametocytogenesis. *Nat Commun.* 2020;11:1503.
66. Kafack BFC, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, Campino SG, et al. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature.* 2014;507:248–52.
67. Bancells C, Llorà-Batlle O, Poran A, Nötzel C, Rovira-Graells N, Elemento O, et al. Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Microbiol.* 2019;4:144–54.

68. Pathak AK, Shiao JC, Thomas MB, Murdock CC. Cryogenically preserved RBCs support gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro and gametogenesis in mosquitoes. *Malar J.* 2018;17:457.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Cette revue apporte une analyse approfondie des protocoles récemment optimisés pour la production *in vitro* des gamétocytes de *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. knowlesi*. Bien que des progrès significatifs aient été réalisés dans la compréhension de la gamétocytogenèse amenant à l'utilisation de parasites transgéniques avec des facteurs inductibles moléculaires dans la production *in vitro* des gamétocytes de *P. falciparum*, l'obtention de gamétocytes viables et infectieux reste un défi en particulier pour les autres espèces de *Plasmodium*. Divers facteurs, dont la souche du parasite elle-même, les méthodes d'induction, les conditions physico-chimiques de culture ont une incidence sur le taux de production et la maturation des gamétocytes. Les cultures synchrones ou asynchrones n'ont pas d'impact significatif sur la productivité, cependant la culture synchrone semble utile pour des études expérimentales spécifiques. Malgré leur complexité, les progrès réalisés dans la production *in vitro* de gamétocytes contribueront de manière significative aux études sur les stratégies de blocage de la transmission du paludisme et sur la biologie des gamétocytes.

Chapitre III : Impact de la ganaplacide sur les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* *in vitro*

Bien que la ganaplacide ait montré un potentiel prometteur dans son efficacité contre les gamétocytes, son mode d'action exact n'est pas encore élucidé. Des études antérieures ont suggéré qu'elle cible les composants spécifiques du *Plasmodium* en particulier les protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique telles que le PfCARL, PfGUT, PfACT. L'étude suggère que la ganaplacide pourrait exercer son action en inhibant le trafic des protéines et en provoquant une expansion du RE (LaMonte et al., 2020; Lim et al., 2016; Magistrado et al., 2016). Le RE et ces protéines transmembranaires seraient essentielles pour divers processus cellulaires notamment le repliement, la maturation et le transport des protéines, la translocation intracellulaire de petites molécules y compris des métabolites et des médicaments ou encore la synthèse des lipides (Foguim et al., 2019; Schwarz & Blower, 2016). Les lipides étant essentiels pour la formation de l'Hz, mécanisme vital pour les parasites. Nous avons donc cherché à comprendre davantage sur le mode d'action de la ganaplacide. Notre objectif a été d'examiner les mécanismes par lesquels la ganaplacide interfère avec le développement et la survie du gamétocyte en étudiant les éventuels altérations ou changements physiologiques et biologiques des gamétocytes. Précisément, nous avons évalué la production et les caractéristiques de l'Hz des gamétocytes sous l'action de la ganaplacide.

Dans un premier temps, l'efficacité de la ganaplacide sur les gamétocytes *in vitro* a été évaluée. Cela a impliqué d'une part de déterminer les conditions du test de chimiosensibilité et d'autre part la mise au point d'une méthode d'évaluation de l'efficacité des molécules. Les gamétocytes matures ont une durée de vie courte ainsi, il a été déterminé la durée d'incubation appropriée permettant de limiter la mort naturelle des gamétocytes tout en assurant l'action des drugs.

Différentes méthodes d'évaluation des tests de chimiosensibilité ont été explorées. Après d'intenses analyses de faisabilité, d'adaptabilité et d'efficacité, nous avons choisi deux méthodes différentes que sont la microscopie et le test de viabilité à la résazurine. La microscopie a été

adoptée comme méthode pour évaluer la sensibilité des gamétocytes *in vitro* pour des raisons qui seront expliquées dans les lignes suivantes.

I. Test d'évaluation de la sensibilité des gamétocytes aux antipaludiques : méthode microscopique

Cette méthode offre plusieurs avantages notamment l'observation directe de la morphologie des gamétocytes dans les frottis colorés au Giemsa. Au-delà de l'analyse qualitative, elle permet une analyse quantitative de la densité des gamétocytes. En examinant minutieusement les échantillons colorés, nous avons pu discerner diverses caractéristiques morphologiques indiquant la viabilité des gamétocytes. Plus précisément, les gamétocytes sains présentaient un profil cellulaire légèrement incurvé avec des extrémités arrondies. Cette forme était accompagnée d'un noyau visiblement distinct, une caractéristique essentielle qui contribue à la définition de la normalité du parasite. En outre, l'évaluation du rapport longueur/largeur a fait apparaître un rapport d'approximativement 4 :1 pour les gamétocytes de stade IV et 3 :1 pour les stades V, un signe distinctif important. Néanmoins, nous sommes conscients des limites inhérentes à cette méthode notamment celle de l'évaluation morphologique. Bien que ces indices visuels fournissent des informations précieuses sur l'état des gamétocytes, ils ne sont pas systématiquement en corrélation avec la vitalité biologique ou fonctionnelle sous-jacente des gamétocytes. La subjectivité associée au comptage manuel, la sensibilité réduite à de faibles densités font également partie des limites. Reconnaissant la variabilité potentielle inhérente aux évaluations microscopiques et dans le but d'améliorer la fiabilité de nos résultats, nous avons adopté une approche rigoureuse impliquant l'examen des frottis à trois moments distincts. Ceci dans le but de limiter les divergences potentielles et de garantir la cohérence et la reproductibilité des résultats.

La complexité liée à la relation entre caractéristiques morphologiques et viabilité souligne la nécessité de disposer de méthodes complémentaires permettant d'évaluer directement la viabilité. Pour répondre à ce besoin, nous avons intégré dans la méthodologie le test de viabilité métabolique basé sur la résazurine.

II. Test d'évaluation de la sensibilité des gamétocytes aux antipaludiques : la méthode à la résazurine « Resazurin-based viability assay »

Cette méthode exploite les propriétés d'oxydoréduction de la résazurine, un composé de fluorescence négligeable et de couleur bleue qui est réduit en résorufine hautement fluorescente de couleur rose par les cellules métaboliquement actives. La fluorescence mesurée fournit une mesure directe de la quantité de cellules viables. La perméabilité de la résazurine à travers la membrane cellulaire permet sa réduction irréversible par des oxydoréductases NAD(P)H, FADH₂ intracellulaires, ce qui conduit à la formation de la résorufine. Il est important de noter que le spectre de fluorescence de la résazurine diffère de celui de la résorufine. La fluorescence émise peut être stable pendant 48h, ce qui garantit une fenêtre de détection intéressante. Cette méthode est polyvalente, offrant la possibilité d'être utilisée à la fois comme méthode colorimétrique et comme une méthode basée sur la fluorescence. Ce qui permet de l'utiliser dans divers contextes expérimentaux. Par ailleurs, sa nature semi-automatique simplifie l'acquisition des données, lui conférant un avantage pratique. Ces différentes caractéristiques ont motivé le choix de cette méthode. Cependant, il faut reconnaître le risque d'interférences colorimétriques lorsqu'on utilise des molécules colorées comme le bleu de méthylène et la possibilité d'une diminution de la fiabilité lorsque les molécules telles que la chloroquine ciblent le métabolisme redox.

Le protocole de la méthode résazurine consiste à mélanger le réactif PrestoBlue® prêt à l'emploi avec les échantillons de culture de gamétocytes incubés ou non avec les molécules à tester. Le réactif est convenablement dilué à une concentration d'un 10^{ième} (10µL de réactif dans 90µL de milieu). L'incubation se fait à l'abri de la lumière pendant 2h à 37°C et 5% de CO₂. Après incubation, 70 µL de surnageant sont transférés dans les puits d'une microplaque dédiés puis la fluorescence est mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et d'émission de 610 nm avec le lecteur de plaque Multimode Tristar2 LB 942 (Berthold Technologies, Germany). À des fins de calibration, un contrôle réactif correspondant aux globules rouges non parasités ajustés à l'hématocrite de la culture est inclus. Les mesures de fluorescence sont normalisées avec le blanc réactif. Pour valider la fiabilité et la robustesse du test, un rapport signal/bruit de deux ou plus (S/B ≥ 2) représente un seuil acceptable (Reader et al., 2015). Ainsi, une analyse de divers paramètres fondamentaux a été effectuée telles que :

- la concentration du réactif PrestoBlue®,

- la densité parasitaire
- la durée d'incubation
- le volume réactionnel
- l'hématocrite de la culture
- la mesure de la fluorescence sur le surnageant, le tapis cellulaire ou l'entièreté du mélange cellule – milieu.

Malgré nos efforts, aucune configuration des paramètres testés n'a permis d'obtenir un rapport signal/bruit autour de 2. Le bruit de fond élevé résultant des globules rouges compromet la capacité à détecter avec précision le signal spécifique des gamétocytes. Par conséquent, le test à la résazurine n'a pas été concluant et la nécessité d'avancer a justifié l'abandon de cette approche.

III. Microscopie électronique pour l'analyse ultramicroscopique des gamétocytes et de l'hémozoïne

Nous avons utilisé la microscopie électronique à transmission pour observer et analyser les caractéristiques microstructurales des gamétocytes normaux et exposés à la ganaplacide y compris les caractéristiques de leur Hz.

IV. Nanoparticles tracking analysis pour l'analyse de l'hémozoïne

Le NTA est une technique permettant de visualiser en temps réel et d'analyser les particules en suspension liquide (*Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) | Malvern Panalytical*, s. d.). Elle se base sur les propriétés de diffusion de la lumière et du mouvement brownien pour obtenir la taille des nanoparticules dans une suspension liquide donnée. La taille qui correspond au diamètre hydrodynamique des particules est calculée à partir de l'équation de Stokes-Einstein, qui établit un lien entre la taille des particules et leur coefficient de diffusion. Il tient compte de la taille, de la forme et de la charge de surface des particules ainsi que de la viscosité et de la température du liquide. Le coefficient de diffusion est calculé en suivant le mouvement brownien des particules (Dragovic et al., 2011; Filipe et al., 2010).

Cette technique a été initialement utilisée pour l'analyse des microvésicules. Cependant, la technique est polyvalente et est utilisée dans un large éventail d'applications telles que la toxicologie des nanoparticules, la recherche sur les nanocarriers pour l'administration et la

délivrance des médicaments ou encore le développement de vaccins (*Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) | Malvern Panalytical*, s. d.). Le NTA a été utilisé dans la recherche sur le paludisme notamment dans les études sur les microvésicules extracellulaires libérées pendant l'infection palustre (Abou Karam et al., 2022; Antwi-Baffour et al., s. d.; Opadokun et al., 2022; Toda et al., 2020). C'est la première fois que le NTA est utilisé pour mesurer l'Hz.

L'Hz extraite de ces parasites a été observée au microscope électronique à balayage et analysée avec la technique « Nanoparticle tracking Analysis ». Pour s'assurer de l'efficacité du NTA à analyser l'Hz, une étude de preuve de concept a été réalisée. Différents clones et espèces de *Plasmodium* issus de cultures et de patients ainsi que de diverses sources d'échantillons, notamment des échantillons de salive et de sang ont été utilisés pour cette étude. L'Hz a été extraite de ces échantillons suivant le même protocole, utilisé depuis longtemps au labo MRU, puis passée au NTA. Cette présente étude sur l'analyse de l'Hz naturelle avec le NTA est une première. Les résultats de cette étude ont été communiqués dans un article soumis au journal « Acta Tropica » le 25 juillet 2023.

En analysant les caractéristiques et la distribution de l'Hz, notre objectif a été de comprendre les mécanismes spécifiques qui déterminent l'action du médicament. Conjointement, ces différentes techniques ont montré que la ganaplacide a un impact potentiel sur la biocristallisation de l'Hz des gamétocytes. Les résultats ont montré une augmentation de la taille et de la quantité de l'Hz sous l'action de la ganaplacide. Cette étude sur l'impact de ganaplacide sur les gamétocytes a fait l'objet d'un article soumis au « Journal of Antimicrobial and Chemotherapy », mais refusé depuis. Les améliorations et les expériences complémentaires qui ont été faites à la suite de ce refus sont décrites plus loin.

Article 2: Nanoparticle-tracking analysis of natural hemozoin from *Plasmodium* parasite

Roukayatou Omorou^{1,*}, Blanche Delabie¹, Adeline Lavoignat¹, Victorien Chaker¹, Guillaume Bonnot¹, Karim Traore², Anne-Lise Bienvenu^{1,3}, Stephane Picot^{1,4}

¹ Univ Lyon, Malaria Research Unit, UMR 5246 CNRS-INSA-CPE-University Lyon1, 69100 Villeurbanne, France.

²Malaria Research and Training Center, University of Sciences, Techniques and Technologies, Bamako, Mali.

³ Service Pharmacie, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, 69004 Lyon.

⁴Institute of Parasitology and Medical Mycology, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, 69004 Lyon, France.

*Corresponding author: roukayatou.omorou@univ-lyon1.fr

Univ Lyon, Malaria Research Unit, UMR 5246 CNRS-INSA-CPE-University Lyon1, 69100 Villeurbanne, France

RO: roukayatou.omorou@univ-lyon1.fr

BD: blanche.delabie@cpe.fr

AL: adeline.lavoignat@univ-lyon1.fr

VC: vico.chaker@laposte.net

GB: guillaume.bonnot@univ-lyon1.fr

KT: Karim@icermali.org

ALB: anne-lise.bienvenu@univ-lyon1.fr

SP: stephane.picot@univ-lyon1.fr

Abstract :

Background: Hemozoin is a byproduct of hemoglobin digestion crucial for parasite survival. It forms crystals that can be of interest as drug targets or biomarkers of malaria infection. However, hemozoin has long been considered as an amorphous crystal of simple morphology. Studying the consequences of biomineralization of this crystal during the parasite growth may provide more comprehensive evidence of its role during malaria.

Objectives: This study aimed to investigate the interest of nanoparticles tracker analysis for measuring the concentration and size of hemozoin particles produced from different parasite sources and conditions.

Methods: Hemozoin was extracted from several clones of *Plasmodium falciparum* both asexual and sexual parasites. Hemozoin was also extracted from blood samples of malaria patients and from saliva of asymptomatic malaria carriers. Nanoparticles tracking analysis (NTA) was performed to assess the size and concentration of hemozoin.

Results: NTA data showed variation in hemozoin concentration, size, and crystal clusters between parasite clones, species, and stages. Among parasite clones, hemozoin concentration ranged from 131 to 2663 particles/infected red blood cell (iRBC) and size ranged from 149.6 ± 6.3 nm to 234.8 ± 40.1 nm. The mean size was lower for *Plasmodium vivax* (176 ± 79.2 nm) than for *Plasmodium falciparum* (254.8 ± 74.0 nm). Sexual NF54 parasites showed a 7.5-fold higher concentration of hemozoin particles (28.7 particles/iRBC) compared to asexual parasites (3.8 particles/iRBC). In addition, the mean hemozoin size also increased by approximately 60% for sexual parasites. Compared to *in vitro* cultures of parasites, blood samples showed low hemozoin concentrations.

Conclusions: This study highlights the potential of NTA as a useful method for analyzing hemozoin, demonstrating its ability to provide detailed information on hemozoin characterization. However, further research is needed to adapt the NTA for hemozoin analysis.

Keywords: Malaria; *Plasmodium*; Hemozoin; Nanoparticle Tracking Analysis

1. Introduction

The malaria death toll decreased from 22 to 16 per 10,000 population between 1900 and 1997, but the percentage of deaths which were due to malaria increased from 6 to 9% during the same period [1]. During the beginning of twenty-first century, malaria deaths were reduced until 2019, and then approximately stabilizing since the last three years [2]. To reduce the mortality, an integrative approach is needed [3,4], including the implementation of the test/treat/track strategy (TTT strategy) promoted years ago by the WHO [5]. One of the candidate targets is hemozoin (Hz), well-known for more than a century as a malaria pigment [6]. Hz can be considered with interest for each step of the TTT strategy. First, Hz accumulation has been associated with both activation and inhibition of the host inflammatory responses [7–9] and the pathophysiology of malaria [10,11]. Second, the degradation of hemoglobin into globin and heme during the metabolism of *Plasmodium* parasite requires a detoxification process to convert heme into Hz crystals [12]. This detoxification process had provided a powerful drug target for quinolines and more recent antimalarial drugs [13,14]. Third, due to its physical properties and its accumulation during the cycles of *Plasmodium* parasites growth, Hz has been considered as a potential biomarker for the diagnosis of malaria [15–17]. On the way toward malaria elimination, Hz may thus gain a renewed interest for diagnosis, treatment, and surveillance of malaria, consistent with the TTT strategy. However, the biomineralization process of Hz particles is incompletely depicted while extensive researches were conducted [18]. The size, shape and physical properties of natural Hz produced *in vivo* are highly versatile depending on parasite stage and maturation [16], on parasite species [19,20] and on the effect of drugs used to treat or prevent malaria. Based on these observations, it can be considered that a powerful tool able to measure and follow the Hz particles formation in diverse conditions may provide additional knowledge on this biomarker of *Plasmodium* growth.

A vast array of technological methods was developed to detect Hz, including laser desorption mass spectrometry [21], magneto-optical test [22], photo-acoustic nanobubbles [23], and magnetic resonance relaxometry [24]. In most of these cases, the aim of these methods was to use Hz as a biomarker for malaria diagnosis or surveillance, considering the target as a crystal with homogenous biophysical properties, whereas heterogeneity of Hz was observed between avian and mammalian *Plasmodium* species [20] and between asexual and sexual forms [25].

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) provides high-resolution analysis for the measurement of concentration and size distribution of nanoparticles in liquid suspensions [26]. Indeed, NTA is tracking individual particles through Brownian motion, and it could be an option for the characterization of size and shape of natural Hz extracted from *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). This study aims to evaluate the efficacy and the added value of NTA for the analysis of Hz properties from different parasite sources and different *in-vitro* and *ex-vivo* conditions.

2. Material and Methods

2.1. Parasites from culture and human samples

P.falciparum clones NF54 and 7G8 were obtained from the Malaria Research and Reference Resource Center (MR4), while 3D7 and W2 were provided by Worldwide Antimalarial Resistance Network (WWARN). The clones were cultured continuously in complete media consisting of Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 with phenol red, 25 mM of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) pH 7.4, 2 mM of L-glutamine, 2.1 g/L of sodium bicarbonate, 0.025 g/L of hypoxanthine, 20 µg/mL of gentamicin, 0.5 % of Albumax II and 5% O⁺ erythrocytes. The culture was incubated at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. The cultures were maintained at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. Daily medium change and periodic monitoring of parasitemia were performed. Synchronization of the parasite culture was achieved by treating the

culture with a 5% sorbitol solution mixed with compacted RBC for 10 minutes, selectively lysing mature-stage parasites and enabling the establishment of synchronized ring-stage cultures.

Gametocytes were cultured *in vitro* as previously described with minor modifications [27,28]. Freshly thawed *P. falciparum* strain NF54 maintained in 5% O⁺ erythrocytes collected within 14 days was used to initiate gametocyte cultures. Daily medium changes and parasitemia monitoring were conducted. Gametocytogenesis was induced by adding twice the culture volume when parasitemia reached over 10% with over 90% of young trophozoites. A final concentration of 50 mM N-acetyl-D-glucosamine (NAG) was added for four consecutive days to eliminate asexual parasites. Hz particles were then extracted.

Surplus material from venous blood samples already collected on two EDTA tubes from malaria patients was used after being de-identified. Microscopic examination allowed the identification of *Plasmodium* species and the determination of parasitemia recorded as the number of infected red blood cells (RBCs) with asexual parasites compared to non-infected RBCs. Considering the non-interventional nature of the study and the use of anonymized and non-sensitive data, ethics approval and formal consent were not required. Saliva samples were collected using a dedicated device (Sarstedt, Marmay, France) from five asymptomatic volunteers with blood parasitemia at Bamako University, Mali, as part of another study on malaria diagnosis, with ethical clearance obtained from local authorities (Faculty of Medicine of Bamako). These saliva samples were kept frozen at -20°C before use. The results from the experimental protocol were not used for patient diagnosis and no therapeutic action was conducted based on these experimental results.

2.2. Hemozoin extraction

Hz was obtained from either 500 μL of infected red blood cells (iRBCs) pellet after 5 minutes centrifugation at 500xg for parasites culture and human blood samples, or 500 μL of saliva samples. The iRBCs were rinsed two times using Phosphate-buffered saline (PBS). The cells were then lysed by 10% saponin solution in PBS for 15 minutes at 37°C. Subsequently, the solution was washed thrice with cold PBS. Hz was extracted at 55°C during 1 hour in a lysis buffer (50 mM trisHCL (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol chlorohydrate), 10 mM EDTA (2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diylidinitrilo) tetracetic acid), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 10 mg/mL proteinase K [29]. Following centrifugation, the resulting preparation was washed twice with PBS-EDTA and once with distilled water. The extracted and purified Hz was kept in distilled water as samples of 200 μL .

2.3. Nanoparticle tracking analysis

Nanoparticle Tracking Analyser (NanoSight NS300, Malvern Panalytical LTD, Worcester, UK) measures the light scattered by the particles moving under Brownian motion. The NTA software (Nanosight NTA V3.4 software) simultaneously identifies and tracks the center of each particle, and determines the average distance traveled by each particle in the x and y planes to determine the diffusion coefficient of the particles (Dt).

$$D_t = \frac{1,37d^2}{\pi^2t}$$

Considering the temperature of the sample (T) and the viscosity of the solvent (η), the hydrodynamic equivalent diameter of the sphere (d_h) of the particles can be calculated using the Stokes-Einstein equation.

$$D_h = \frac{K_bT}{3\pi\eta d_h}$$

100 μL of Hz extracts were diluted with 400 μL of water to allow injection of 500 μL in the NTA. This dilution factor was determined after preliminary experiments to optimize parameters. The injection of samples into the NanoSight NS300 instrument was done with a syringe pump speed of

70, a camera level at 12 and 15-50 particles per frame, as recommended. Three 60-second videos were captured with the CMOS camera using the Blue405 laser. The laser module chamber temperature was set at 25°C.

3. Results

Hz extracted from *P. falciparum* cultures and from blood or saliva of patients was successfully detected using the NTA. Differences in concentration and size of Hz crystals were observed according to parasite clones and species, parasite stages, and parasite obtained from *in vitro* culture or samples from patients. Detailed data on Hz size and concentration from clones and blood samples are presented in Table 1. Additionally, the figure 1 shows the size distribution profile of Hz particles from clones.

Table 1

Analytical description of hemozoin particles isolated from *Plasmodium falciparum* clones and blood from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* fresh samples from infected patients. The concentration of Hemozoin particles was standardized according to hematocrit, number of parasites per μL and proportion of trophozoites and schizonts (maturation ratio). The normalized particles/parasite value is the number of Hemozoin particles weighted by the maturation ratio.

<i>Plasmodium</i>	<i>Pf</i> 3D7	<i>Pf</i> NF54	<i>Pf</i> 7G8	<i>Pf</i> W2	<i>Pf</i> patient	<i>Pv</i> patient
Mean size (nm)	200.2 \pm 1.5	234.8 \pm 40.1	209.5 \pm 7.4	149.6 \pm 6.3	254.8 \pm 74.0	176 \pm 79.2
Hz ($\times 10^6$ particles/ μL)	32.50	1.17	5.29	3.39	0.003	0.0068
Parasitemia (pa/ μL)	12200,00	8900,00	5500,00	5200,00	165060	5043

Troph. (%)	67,00	89,00	72,00	75,00	99	85
Schz. (%)	33,00	11,00	28,00	25,00	1	15
Maturation Ratio (T/S)	2,03	8,09	2,57	3,00	99	5.67
H_z (particles/iRBC)	2663,93	131,46	961,82	651,92	0.02	1.19
H_z normalized (particles/parasite)	5408,59	1063,64	2473,25	1955,77	11.79	6.74

Pf: *Plasmodium falciparum*, *Pv*: *Plasmodium vivax*, H_z: Hemozoin, Troph.: Trophozoites, Schz.: Schizonts, T/S: Trophozoites/schizonts, iRBC: infected Red Blood Cell

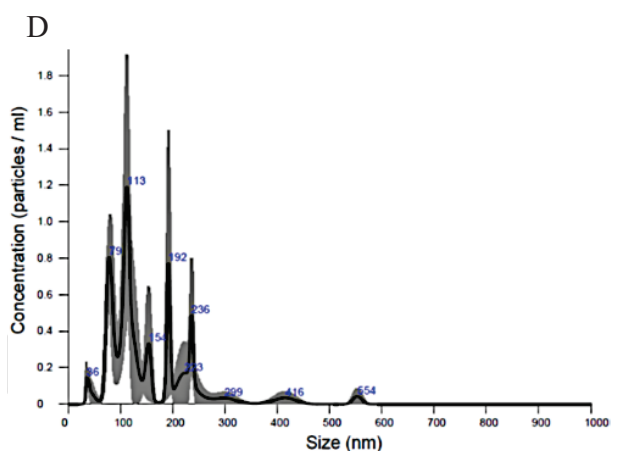
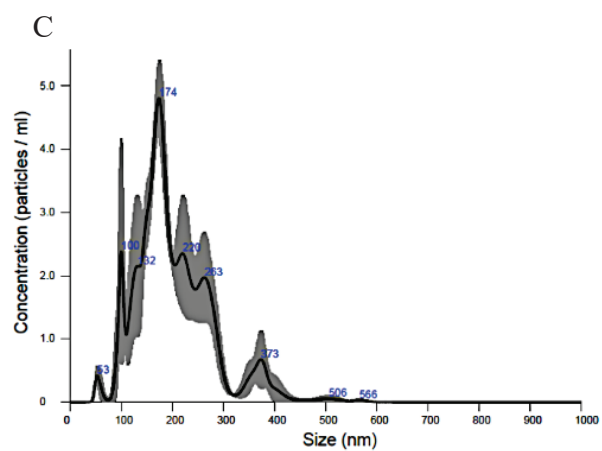
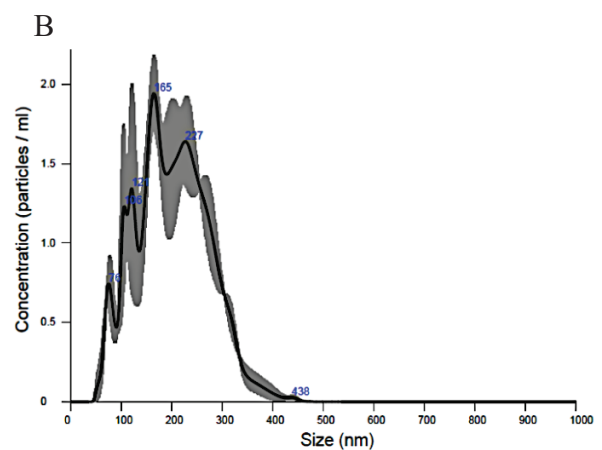
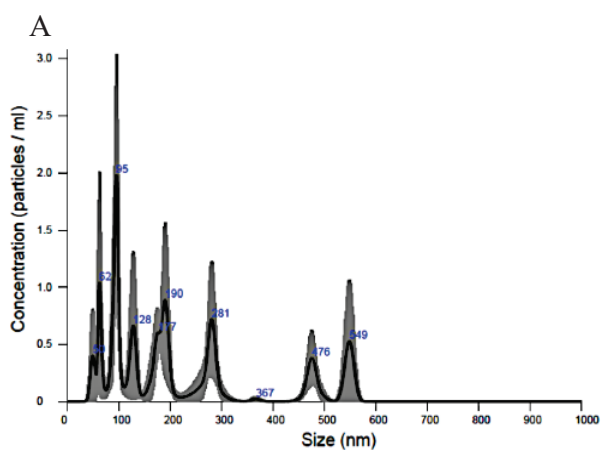


Fig. 1. Particles size distribution profiles of hemozoin extracted from different clones of *Plasmodium falciparum* culture. (A) *Pf*NF54; (B) *Pf*3D7 ; (C) *Pf*7G8 ; (D) *Pf*W2. (A) and (B) are chloroquine sensitive clones whereas (C) and (D) are chloroquine resistant clones. The parasitemia of the cultures was in the range of 1% to 4%. The graphs were provided by Nanoparticle tracking analysis software. Black line represents mean of three measures, gray zone indicates standard deviation, and blue number represents size of particles peak.

While the parameters for Hz extraction were identical for each sample tested, there was a large difference in the rate of particles per iRBC, ranging from 131 to 2663 particles/ iRBC. Since the number of Hz particles per parasite rely on the maturation stage, with more particles in schizontes than in trophozoites, a maturation ratio was applied to weight the impact of maturation on the link between Hz concentration and parasitemia. Based on this, the concentration of particles was limited to a range of approximately 1000 to 5000 particles per parasite among the four *P. falciparum* clones. The total amount of Hz particles was indirectly linked to the number of parasites in each sample, but there was no direct correlation between the number of particles and the parasitemia.

The rate of particles/parasite among the four cultivated *in vitro* clones was higher for the chloroquine sensitive ($IC_{50}=25nM$) 3D7 clone (5408 particles/parasite) than with the chloroquine resistant 7G8 ($IC_{50}=470nM$) and W2 ($IC_{50}=460nM$) clones (2473 and 1955 particles/parasite, respectively) (Table 1). Surprisingly, the chloroquine sensitive ($IC_{50}=26nM$) clone NF54 showed a lower amount of Hz produced in these conditions (1063 particles/parasite). The mean size of the particles was almost identical between 3D7, NF54 and 7G8 clones (200.2 ± 1.5 , 234.8 ± 40.1 and 209.5 ± 7.4 nm, respectively) and smaller for W2 (149.6 ± 6.3 nm). Cluster of Hz particles sizes were observed with peaks ranging from approximately 50 to 600 nm. The number of these peaks per

sample, from 5 to 9 for each clone, can be considered as a marker of polydispersity of the Hz particles in solution.

Hz was extracted from fresh blood samples collected from *P. falciparum* and *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) infected patients (Table 1). The concentration of Hz particles obtained from blood samples was low compared to *in vitro* culture of parasites, and the mean size of the particles was lower for *P. vivax* (176 ± 79.2 nm) than for *P. falciparum* (254.8 ± 74.0 nm) (Figure 2).

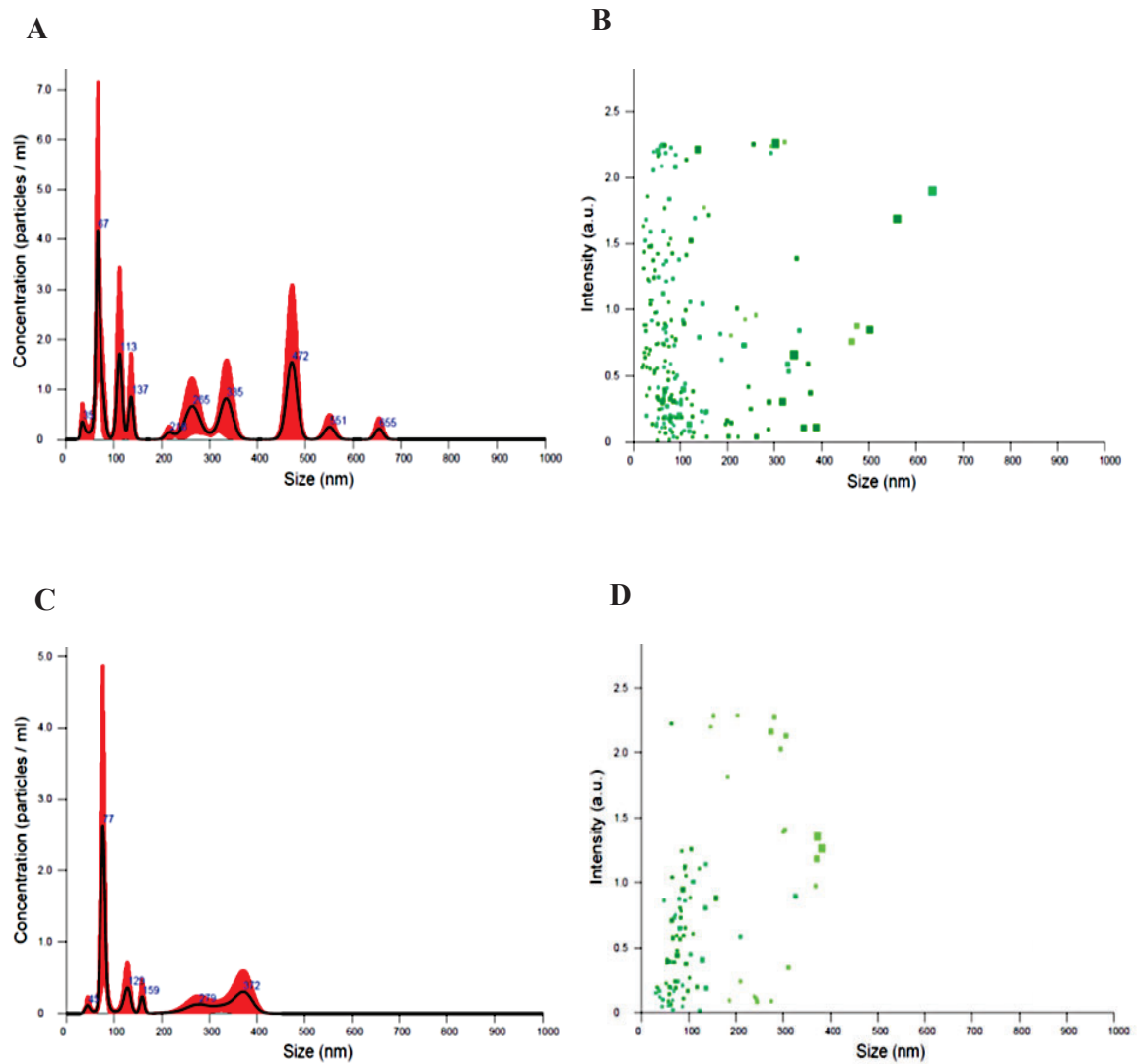


Fig. 2. Particles size distribution profiles of hemozoin extracted from fresh whole blood of patients infected with (A) and (B) *Plasmodium falciparum* (165060 parasites / μ L) and (C) and (D) *Plasmodium vivax* (5043 parasites / μ L), regular output from an NTA reading. (A) and (C) particles size plotted against concentration (black line: mean of three measures, red zone: standard deviation, blue number: size of particles peak). (B) and (D) 2D scattergram of size versus light scattered.

Using NF54 clone, it was possible to compare the production of Hz by asexual and sexual parasites obtained *in vitro* from the same parasites batch. The concentration of Hz particles increased from 3.8 to 28.7 particles/iRBC for asexual and sexual parasites, respectively. The mean Hz size also increased by approximately 60%, from 239.7 ± 4.5 to 361.2 ± 50.9 nm.

Hz was also extracted from five saliva samples collected from malaria patients. The mean concentration of Hz in saliva was $61.3 \pm 89.2 \times 10^4$ particles/ μ L (ranging from 5.9 ± 89.2 to $218 \pm 8.6 \times 10^4$ particles/ μ L). The concentration in these samples was associated with a large standard deviation between samples, as for the blood parasitemia of these asymptomatic patients from endemic area, ranging from 125 to 2875 parasites/ μ L. The particles medium size in saliva was 163.8 ± 51.5 nm, ranging from 89.8 to 197.4 nm.

4. Discussion

The fight against malaria requires a constant pipeline of new drugs, hopefully against new targets. However, really new drug targets are scarce and sometimes new effective drugs are developed without definitive evidence of their mode of action. Many “Achille’s heels” of the malaria parasite were considered as a drug target, including plasmepsins [30] apicoplast [31], binding proteins involved in host cell invasion [32], and aquaglyceroporin [33]. But the most successful of these weak

points is clearly the malaria pigment [34], targeted by quinolone drugs [13,35] and required for activation of antimalarial endoperoxides such as artemisinins [36,37]. Thus, Hz metabolism has been extensively studied with the aim of testing the effect of various drugs on its mineralization and the potential of this byproduct as a biomarker of malaria infection. One of the main drawbacks of many of these studies was the use of synthetic β hematin as a surrogate for natural Hz [38,39]. There is now evidence that the biomineralization or biocrystallization of Hz is a complex process leading to a multidimensional product that can be highly impacted by environmental factors [40–42]. Chemical synthesis of β hematin cannot reproduce this complexity, leading to the wrong assertion that Hz is a homogenous crystal. Thus, new tools for simple and accurate Hz quantification and particles analysis are needed to facilitate further studies on this natural crystal. Different technological methods were used for particles analysis in monodispersed systems without accurate numeration [43–45]. Considering the bio-crystallization complexity of Hz *in vivo*, a method allowing reproducible counting and sizing of polydisperse particles in suspension is required. The nanotracker analysis is a recent technology widely used for microvesicles detection, including during malaria [46–50]. This method requires that the targeted particles are circulating in suspension using a syringe pump through a sample chamber illuminated by a 405 nm laser beam at a controlled temperature of 25°C. The Brownian motion and the light scattering are visualized via optical microscope and captured by a CMOS camera. The software takes a video file to identify and track the center of particles and calculate the average distance moved by each particle. The Stokes-Einstein equation allows determination of particle size individually, irrespective of the others. The aim of this study was to test the feasibility of nanotracker analysis of Hz particles isolated from parasites in different *in-vitro* and *ex-vivo* conditions.

Hz production among asexual stages of *P. falciparum* clones showed a 1 to 5 folds concentration between NF54 and 3D7. The latter is a well-known clone highly adapted to *in vitro* culture, showing a rapid growth rate in standard conditions. This capability can be linked to higher Hz metabolism than clones with a lower fitness. As expected, the amount and size of Hz particles significantly increased during the maturation process from asexual to sexual stages.

Using NTA for natural Hz study allowed to provide baseline information on the biocrystallization of this product from different *Plasmodium* clones maintained *in vitro*. The number of Hz particles per asexual parasite was in the range of 1000 to 5000, which is much higher than expected by microscopic observation of parasites on thin blood films. It should be noticed that Hz crystals were not dispersed by NaOH or other solvent treatment, meaning that the polydispersed biocrystallization observed probably started with a high number of different nucleation sites. It is of interest to note that extracellular vesicles released by *P. falciparum* 3D7 and NF54 iRBCs have been previously characterized using NTA [49] and were in the same range than Hz particles observed here.

These data provided evidence that the number of Hz particles cannot be strictly correlated to the number of parasites, as demonstrated here by the huge range of concentration observed in the particles/parasite ratio. A maturation ratio was also introduced to reduce the impact of schizontes compared to early trophozoites on the amount of Hz particles produced in a single iRBC. Hz biocrystallization reflects more the metabolism of the parasite and the polydispersity in Hz crystal construction than a strict correlation with the parasitemia.

One of the limitations of this study is the low number of blood and saliva samples from patients tested, but the aim was only to test the technical feasibility of the method with human samples, and not to use this method as a standard measurement of Hz from *ex vivo* samples. The low amount of Hz

particles measured from fresh blood samples of *P. vivax* and *P. falciparum* malaria may be related to the trapping of Hz particles into white blood cells and their diffusion among kidneys, spleen, and other tissues during the infection *in vivo*. Surprisingly, the amount of Hz particles detected in saliva from asymptomatic patients was high, confirming previous evidence that saliva could be an interesting body fluid for malaria study [51,52].

5. Conclusions

This is the first demonstration that nanoparticle tracking analysis provide accurate information on the amount and size of native hemozoin particles from different *Plasmodium* responsible for malaria. However, more research is needed to adapt the NTA to direct human samples analysis. Here is the proof-of-concept that natural hemozoin can be used as a tool for improving basic knowledge of one of the most central products of the malaria parasites.

Ethics approval and consent to participate.

Not applicable

Funding

RO was supported by a grant from EDCTP (grant number RIA2017T-2018 WANECAM-2).

Credit authors statement

Roukayatou OMOROU: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization. **Blanche Delabie:**

Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization. **Adeline Lavoignat**: Investigation, Resources. **Victorien Chaker** : Investigation. **Guillaume Bonnot**: Investigation. **Karim Traore**: Validation, Investigation, editing. **Anne-Lise Bienvenu**: Validation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization. **Stephane Picot**: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This article was produced by WANECAM 2 which is part of the EDCTP2 program supported by the European Union grant number RIA2017T-2018 WANECAM-2. The views and opinions of authors expressed herein do not necessarily state or reflect those of EDCTP. Part of this study (saliva sampling) was supported by the Eurostars-Eureka project Ref: 8966.

References

- [1] R. Carter, K.N. Mendis, Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria, *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2002) 564–594. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.564-594.2002>.
- [2] World malaria report 2022, (n.d.). <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022> (accessed January 31, 2023).

- [3] M.E. Kruk, A.D. Gage, N.T. Joseph, G. Danaei, S. García-Saisó, J.A. Salomon, Mortality due to low-quality health systems in the universal health coverage era: a systematic analysis of amenable deaths in 137 countries, *Lancet Lond. Engl.* 392 (2018) 2203–2212. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31668-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31668-4).
- [4] E. Macarayan, I. Papanicolas, A. Jha, The quality of malaria care in 25 low-income and middle-income countries, *BMJ Glob. Health.* 5 (2020) e002023. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2019-002023>.
- [5] World Health Organization, Test, treat, track: scaling up diagnostic testing, treatment and surveillance for malaria, World Health Organization, 2012. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337979> (accessed June 20, 2023).
- [6] L.M. Coronado, C.T. Nadovich, C. Spadafora, Malarial hemozoin: From target to tool, *Biochim. Biophys. Acta.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.009>.
- [7] M.N. Lima, R.J.R.X. Freitas, B.A.B.R. Passos, A.M.G. Darze, H.C. Castro-Faria-Neto, T. Maron-Gutierrez, Neurovascular Interactions in Malaria, *Neuroimmunomodulation.* 28 (2021) 108–117. <https://doi.org/10.1159/000515557>.
- [8] D.J. Perkins, T. Were, G.C. Davenport, P. Kempaiah, J.B. Hittner, J.M. Ong'echa, Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis, *Int. J. Biol. Sci.* 7 (2011) 1427–1442. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1427>.
- [9] S.S. Shah, D.A. Fidock, A.S. Prince, Hemozoin Promotes Lung Inflammation via Host Epithelial Activation, *MBio.* 12 (2021) e02399–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02399-20>.
- [10] R. Grande, C. Boschetti, Intracytoplasmic hemozoin (malarial pigment) in a case of severe, aparasitemic *Plasmodium falciparum* malaria, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84 (2011) 509. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0687>.
- [11] B. Moiz, S.S. Ali, Intraleucocytic haemozoin—a biomarker for severe malaria, *Br. J. Haematol.* 172 (2016) 313. <https://doi.org/10.1111/bjh.13806>.
- [12] T.J. Egan, Haemozoin formation, *Mol. Biochem. Parasitol.* 157 (2008) 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.005>.
- [13] D.J. Sullivan, Theories on malarial pigment formation and quinoline action, *Int. J. Parasitol.* 32 (2002) 1645–1653. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00193-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00193-5).
- [14] T. Hänscheid, T.J. Egan, M.P. Grobusch, Haemozoin: from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator, *Lancet Infect. Dis.* 7 (2007) 675–685. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70238-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70238-4).
- [15] V. Baptista, M.S. Costa, C. Calçada, M. Silva, J.P. Gil, M.I. Veiga, S.O. Catarino, The Future in Sensing Technologies for Malaria Surveillance: A Review of Hemozoin-Based Diagnosis, *ACS Sens.* 6 (2021) 3898–3911. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c01750>.
- [16] P.A. Zimmerman, R.E. Howes, Malaria diagnosis for malaria elimination, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 28 (2015) 446–454. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000191>.
- [17] C. Lawrence, J.A. Olson, Birefringent hemozoin identifies malaria, *Am. J. Clin. Pathol.* 86 (1986) 360–363. <https://doi.org/10.1093/ajcp/86.3.360>.
- [18] K.Y. Fong, R.D. Sandlin, D.W. Wright, Identification of β -hematin inhibitors in the MMV Malaria Box, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 5 (2015) 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.05.003>.
- [19] J.M. Pisciotta, P.F. Scholl, J.L. Shuman, V. Shualev, D.J. Sullivan, Quantitative characterization of hemozoin in *Plasmodium berghei* and *vivax*, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 7 (2017) 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.02.001>.

- [20] G.S. Noland, N. Briones, D.J. Sullivan, The shape and size of hemozoin crystals distinguishes diverse *Plasmodium* species, *Mol. Biochem. Parasitol.* 130 (2003) 91–99. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00163-4](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00163-4).
- [21] P.A. Demirev, Mass spectrometry for malaria diagnosis, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4 (2004) 821–829. <https://doi.org/10.1586/14737159.4.6.821>.
- [22] D.M. Newman, J. Heptinstall, R.J. Matelon, L. Savage, M.L. Wears, J. Beddow, M. Cox, H.D.F.H. Schallig, P.F. Mens, A magneto-optic route toward the in vivo diagnosis of malaria: preliminary results and preclinical trial data, *Biophys. J.* 95 (2008) 994–1000. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.128140>.
- [23] E.Y. Lukianova-Hleb, K.M. Campbell, P.E. Constantinou, J. Braam, J.S. Olson, R.E. Ware, D.J. Sullivan, D.O. Lapotko, Hemozoin-generated vapor nanobubbles for transdermal reagent- and needle-free detection of malaria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 900–905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316253111>.
- [24] W.K. Peng, T.F. Kong, C.S. Ng, L. Chen, Y. Huang, A.A.S. Bhagat, N.-T. Nguyen, P.R. Preiser, J. Han, Micromagnetic resonance relaxometry for rapid label-free malaria diagnosis, *Nat. Med.* 20 (2014) 1069–1073. <https://doi.org/10.1038/nm.3622>.
- [25] El-Shoura SM, Al-Amari OM, *Falciparum* malaria in naturally infected human patients: I. Ultrastructural differences between malaria pigments in intraerythrocytic asexual and sexual forms, *J. Morphol.* (1993) 201–206.
- [26] M.N. Longjohn, S.L. Christian, Characterizing Extracellular Vesicles Using Nanoparticle-Tracking Analysis, *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 2508 (2022) 353–373. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_23.
- [27] M.J. Delves, U. Straschil, A. Ruecker, C. Miguel-Blanco, S. Marques, A.C. Dufour, J. Baum, R.E. Sinden, Routine *in vitro* culture of *P. falciparum* gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions., *Nat. Protoc.* 11 (2016) 1668–1680. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.096>.
- [28] R. Omorou, I. Bin Sa'id, M. Delves, C. Severini, Y.I. Kouakou, A.-L. Bienvenu, S. Picot, Protocols for *Plasmodium* gametocyte production *in vitro*: an integrative review and analysis, *Parasit. Vectors.* 15 (2022) 451. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05566-3>.
- [29] N. Basilico, C. Tognazioli, S. Picot, F. Ravagnani, D. Taramelli, Synergistic and antagonistic interactions between haemozoin and bacterial endotoxin on human and mouse macrophages, *Parassitologia.* 45 (2003) 135–140.
- [30] J.N. Burrows, D. Soldati-Favre, Targeting Plasmepsins-An Achilles' Heel of the Malaria Parasite, *Cell Host Microbe.* 27 (2020) 496–498. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.015>.
- [31] K. Kadian, Y. Gupta, H.V. Singh, P. Kempaiah, M. Rawat, Apicoplast Metabolism: Parasite's Achilles' Heel, *Curr. Top. Med. Chem.* 18 (2018) 1987–1997. <https://doi.org/10.2174/1568026619666181130134742>.
- [32] M.E. Patarroyo, M.P. Alba, C. Reyes, R. Rojas-Luna, M.A. Patarroyo, The Malaria Parasite's Achilles' Heel: Functionally-relevant Invasion Structures, *Curr. Issues Mol. Biol.* 18 (2016) 11–19.
- [33] L.Y. Chen, Does *Plasmodium falciparum* have an Achilles' heel?, *Malar. Chemother. Control Elimin.* 3 (2014) 114. <https://doi.org/10.4172/2090-2778.1000114>.
- [34] S. Kapishnikov, E. Hempelmann, M. Elbaum, J. Als-Nielsen, L. Leiserowitz, Malaria Pigment Crystals: The Achilles' Heel of the Malaria Parasite, *ChemMedChem.* 16 (2021) 1515–1532. <https://doi.org/10.1002/cmde.202000895>.

- [35] K.N. Olafson, M.A. Ketchum, J.D. Rimer, P.G. Vekilov, Mechanisms of hemozoin crystallization and inhibition by the antimalarial drug chloroquine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 4946–4951. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501023112>.
- [36] C.L. Hartwig, A.S. Rosenthal, J. D'Angelo, C.E. Griffin, G.H. Posner, R.A. Cooper, Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of *Plasmodium falciparum* malaria parasites is endoperoxide-dependent, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 322–336. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.10.015>.
- [37] W. Ma, V.A. Balta, R. West, K.N. Newlin, O.Š. Miljanić, D.J. Sullivan, P.G. Vekilov, J.D. Rimer, A second mechanism employed by artemisinins to suppress *Plasmodium falciparum* hinges on inhibition of hemozoin crystallization, *J. Biol. Chem.* 296 (2020) 100123. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016115>.
- [38] A.F. Slater, W.J. Swiggard, B.R. Orton, W.D. Flitter, D.E. Goldberg, A. Cerami, G.B. Henderson, An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 325–329.
- [39] S. Pagola, P.W. Stephens, D.S. Bohle, A.D. Kosar, S.K. Madsen, The structure of malaria pigment beta-haematin, *Nature.* 404 (2000) 307–310. <https://doi.org/10.1038/35005132>.
- [40] S. Kapishnikov, A. Weiner, E. Shimoni, P. Guttman, G. Schneider, N. Dahan-Pasternak, R. Dzikowski, L. Leiserowitz, M. Elbaum, Oriented nucleation of hemozoin at the digestive vacuole membrane in *Plasmodium falciparum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 11188–11193. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118120109>.
- [41] S. Kapishnikov, A. Weiner, E. Shimoni, G. Schneider, M. Elbaum, L. Leiserowitz, Digestive vacuole membrane in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: relevance to templated nucleation of hemozoin, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 29 (2013) 14595–14602. <https://doi.org/10.1021/la402545c>.
- [42] J.M. Matz, B. Drepper, T.B. Blum, E. van Genderen, A. Burrell, P. Martin, T. Stach, L.M. Collinson, J.P. Abrahams, K. Matuschewski, M.J. Blackman, A lipocalin mediates unidirectional heme biomineralization in malaria parasites, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117 (2020) 16546–16556. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001153117>.
- [43] I. Fescenko, A. Laraoui, J. Smits, N. Mosavian, P. Kehayias, J. Seto, L. Bougas, A. Jarmola, V.M. Acosta, Diamond Magnetic Microscopy of Malarial Hemozoin Nanocrystals, *Phys. Rev. Appl.* 11 (2019) 034029. <https://doi.org/10.1103/PhysRevApplied.11.034029>.
- [44] A. Orbán, Á. Butykai, A. Molnár, Z. Pröhle, G. Fülöp, T. Zelles, W. Forsyth, D. Hill, I. Müller, L. Schofield, M. Rebelo, T. Hänscheid, S. Karl, I. Kézsmárki, Evaluation of a novel magneto-optical method for the detection of malaria parasites, *PloS One.* 9 (2014) e96981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096981>.
- [45] C. Campbell, T.D. O'Sullivan, Quantitative diffuse optical spectroscopy for noninvasive measurements of the malaria pigment hemozoin, *Biomed. Opt. Express.* 11 (2020) 5800–5813. <https://doi.org/10.1364/BOE.401771>.
- [46] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates, *Pharm. Res.* 27 (2010) 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.
- [47] B. Demeule, S. Messick, S.J. Shire, J. Liu, Characterization of Particles in Protein Solutions: Reaching the Limits of Current Technologies, *AAPS J.* 12 (2010) 708–715. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9233-x>.

- [48] P.-Y. Mantel, A.N. Hoang, I. Goldowitz, D. Potashnikova, B. Hamza, I. Vorobjev, I. Ghiran, M. Toner, D. Irimia, A.R. Ivanov, N. Barteneva, M. Marti, Malaria infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system, *Cell Host Microbe*. 13 (2013) 521–534. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.009>.
- [49] L. Khowawisetsut, S. Vimonpatranon, K. Lekmanee, H. Sawasdipokin, N. Srimark, K. Chotivanich, K. Pattanapanyasat, Differential Effect of Extracellular Vesicles Derived from *Plasmodium falciparum*-Infected Red Blood Cells on Monocyte Polarization, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 2631. <https://doi.org/10.3390/ijms24032631>.
- [50] T.F. Pais, H. Ali, J. Moreira da Silva, N. Duarte, R. Neres, C. Chhatbar, R.C. Acúrcio, R.C. Guedes, M.C. Strano Moraes, B. Costa-Silva, U. Kalinke, C. Penha-Gonçalves, Brain endothelial STING1 activation by *Plasmodium*-sequestered heme promotes cerebral malaria via type I IFN response, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119 (2022) e2206327119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2206327119>.
- [51] D. Tao, B. McGill, T. Hamerly, T. Kobayashi, P. Khare, A. Dziedzic, T. Leski, A. Holtz, B. Shull, A.E. Jedlicka, A. Walzer, P.D. Slowey, C.C. Slowey, S.E. Nsango, D.A. Stenger, M. Chaponda, M. Mulenga, K.H. Jacobsen, D.J. Sullivan, S.J. Ryan, R. Ansumana, W.J. Moss, I. Morlais, R.R. Dinglasan, A saliva-based rapid test to quantify the infectious subclinical malaria parasite reservoir, *Sci. Transl. Med.* 11 (2019) ean4479. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan4479>.
- [52] L.A.S. Nunes, S. Mussavira, O.S. Bindhu, Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review, *Biochem. Medica*. 25 (2015) 177–192. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.018>.

Article 3 : Impact of KAF156/ganaplacide on *Plasmodium falciparum* gamétocytes *in vitro*

Roukayatou Omorou^{1, *}, Blanche Delabie¹, Adeline Lavoignat¹, Victorien Chaker¹, Guillaume Bonnot¹, Christelle Fabrer-Boulé², Lucie Geay², Anne-Lise Bienvenu^{1,3}, Stephane Picot^{1,4}.

¹ Univ Lyon, Malaria Research Unit, UMR 5246 CNRS-INSA-CPE-University Lyon1, 69100 Villeurbanne, France.

² Univ Lyon1, Centre Technologique des Microstructures, 69100 Villeurbanne, France.

³ Service Pharmacie, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, 69004 Lyon.

⁴ Institute of Parasitology and Medical Mycology, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, 69004 Lyon, France.

*Corresponding author. E-mail: roukayatou.omorou@univ-lyon1.fr Tel: +33472431394 / +33472431009

Univ Lyon, Malaria Research Unit, UMR 5246 CNRS-INSA-CPE-University Lyon1, 69100 Villeurbanne, France

Abstract

Background: The sexual stages of the *Plasmodium* parasite, gametocytes, are a major target to block malaria transmission. Ganaplacide (KAF156) has shown efficacy against gametocytes. However, the underlying mechanism of action remains unclear.

Objectives: This study aimed at further investigating the impact of ganaplacide on gametocytes by focusing on hemozoin.

Methods: *Plasmodium falciparum* stages were exposed *in vitro* to ganaplacide. After hemozoin extraction, nanoparticles tracking analysis (NTA) were performed to assess size and concentration of hemozoin. Scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were used to examine hemozoin and gametocytes ultrastructure.

Results: Ganaplacide exhibited an antimalarial efficacy against gametocytes, with an IC_{50} value of 34.27 ± 14.57 nM. NTA showed an unexpected increase in size of hemozoin crystals after exposure to ganaplacide. TEM confirmed increased size and clustering of hemozoin within vacuoles, accompanied by a reduction in identifiable membrane structures, including the endoplasmic reticulum (ER). SEM confirmed expansion of hemozoin crystals.

Conclusions: This study demonstrated for the first time that efficacy of ganaplacide on *Plasmodium falciparum* gametocytes could be mediated by interference with heme biomineralization.

Introduction

Malaria is killing more than half-million people per year since decades. It is caused by different species of the genus *Plasmodium*, a parasite that invades red blood cells and causes devastating effect on multi-organ functions. This mosquito-borne disease is, still in 2023, a major public health threat in endemic areas, mostly located in Africa, where the highest number of cases and death are registered.¹ Regulation of malaria should be based on vector control, prompt access to diagnostic testing for suspected cases, and treatment of confirmed cases with effective artemisinin-based combination therapy (ACT). This should be completed by preventive interventions for high-risk groups in areas of moderate to high malaria transmission such as seasonal malaria chemoprevention, intermittent preventive treatment for pregnant women and school children, and perennial malaria chemoprevention for children. But, most of these interventions are mainly targeting the asexual stages of the parasite, whereas one important reservoir of *Plasmodium* in asymptomatic carriers is gametocytes.² Thus, targeting gametocytes is a major objective to reduce malaria transmission. The gametocytocidal activity of a drug may confer transmission blocking activity which is of utmost importance in the way towards malaria elimination. Direct evidence of gametocytes killing *in vitro* is often limited, whilst frequently expected in a new drugs development process.

Ganaplacide is a first-in-class compound belonging to the imidazolopiperazines class developed by Novartis Institute for Tropical Diseases (NITD) following a high-throughput screening of the Novartis compound library by the Genomics Institute of the Novartis Research Foundation (GNF).³⁻⁸ Ganaplacide, when combined with an anti-malarial partner drug, could offer a much needed new treatment for malaria, including in areas where resistance to ACTs is emerging.⁹ A fixed-dose formulation with Lumefantrine-Solid Dispersion Formulation (LUM-SDF) as a partner drug is

currently evaluated amongst the WANECAM 2 network in west Africa (<https://www.wanecam.org/fr/accueil>).

Ganaplacide inhibits the erythrocytic replication life cycle stages (blood stages) of the two main causative agents of human malaria, *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) and *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), both at low nanomolar concentrations *in vitro*.³ In addition, imidazolopiperazines have an activity on liver stage models of *Plasmodium* infection, conferring causal prophylactic protection in animal infection models.^{3,7} Interestingly, ganaplacide is equally potent against drug-sensitive and drug-resistant malaria strains.³ Ganaplacide tested against six artemisinin-resistant *P. falciparum* isolates from Thailand and Cambodia showed very low IC₅₀ for asexual and sexual stages.⁹ Moreover, the inhibition of gametocytes maturation *in vitro* was demonstrated with a decrease in stage V gametocytes and inhibition of exflagellation and oocyst formation in mosquitoes.³

The mechanism of action of ganaplacide is still being characterized, but may be related to the *P. falciparum* cyclic amine resistance locus (*Pfcarl*).^{11,12} Based on the central role of heme detoxification in antimalarial drug's efficacy, including artemisinins as recently demonstrated,¹³ we assumed that ganaplacide might also impact the polymerization of hemozoin. To address this hypothesis, *in vitro* effects of ganaplacide on physiology and morphology of *P. falciparum* gametocytes were studied using *in vitro* sensitivity tests and nanoparticles tracking analysis of extracted hemozoin, a real-time technique for visualizing and analyzing any nanoparticle in liquid suspension.¹⁴ Gametocytes and hemozoin were then observed with transmission (TEM) and scanning (SEM) electronic microscopy.

Material and Methods

Reagents

Ganaplacide (KAF156 hydrochloride, Cat. No: HY-108024A) was purchased from MedchemExpress (MCE®) through CliniSciences (Nanterre, France) and artesunate (chemical Abstract Service CAS number: 88495-63-0; IPCA #19003AS6RII) was purchased from IPCA Laboratories Limited (Mumbai, India) through Hepartex (Saint-Cloud, France). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich Merck and ThermoFisher Scientific. Ganaplacide stock solution (5 mM) was prepared by dissolving drug powder in pure DMSO and stored at -80°C. Artesunate stock solution (1.28 mM) was prepared by dissolving drug powder into pure ethanol and stored at -20°C. Ganaplacide and artesunate stock solutions were serially diluted in complete culture medium to final concentrations ranging from 0.125 nM to 128 nM for asexual stages phenotyping.

P. falciparum in vitro culture

P. falciparum clone NF54 obtained from the Malaria Research and Reference Resource Center (MR4) was routinely maintained in continuous culture in complete media containing Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 with phenol red, 25 mM of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 2 mM of L-glutamine, 2.1 g/L of sodium bicarbonate, 0.025 g/L of hypoxanthine, 20 µg/mL of gentamicin, 0.5 % of Albumax II and 5% O⁺ erythrocytes. The culture was incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The medium was renewed daily and parasitemia was monitored every two days.

Gametocytes were cultured using the *P. falciparum* strain NF54 known for its ability to produce gametocytes.^{15,16} The culture medium used for gametocytes was prepared with the same reagents as mentioned earlier, with the exception of Albumax II that was replaced by 10% inactivated pool of human AB⁺ serum sourced from five to nine donors. Gametocytes cultures were started with freshly thawed *P. falciparum* clone NF54 maintained in 5% O⁺ erythrocytes collected less than 14 days ago.

The culture medium was changed daily and parasitemia was monitored daily. To trigger gametocytogenesis, the culture volume was doubled with medium when parasitemia reached approximately 5%, resulting in halved hematocrit. At this point, the medium was changed twice daily until parasitemia reached $\geq 10\%$. *N*-acetyl-D-glucosamine (NAG) was then added to the culture at a final concentration of 50 mM for four consecutive days to eliminate asexual parasites. Asexual parasites were not removed by purification to limit the impact on gametocytes morphology and physiology caused by stressful conditions. Sexual stages II and III of gametocytes were observed starting from day 7 or 8, while mature stages IV and V of gametocytes appeared from day 12. Exflagellation of male gametocytes was visualized by light microscopy after incubation with xanthurenic acid for 15 minutes at 25°C.¹⁵

In vitro drug sensitivity

The SYBR Green I assay¹⁷ was used to evaluate the asexual drug sensitivity test. The culture was synchronized with 5% sorbitol¹⁸ and diluted to obtain 1.5% hematocrit and 0.5% parasitemia. In a 96-well plate, 175 μ L of culture was distributed in triplicates and mixed with 25 μ L of the appropriate drug dilution. The plates were then incubated for 72 hours at 37°C and 5% CO₂. Plates were subsequently frozen at – 20°C for 24 hours followed by thawing at room temperature prior to the SYBR Green I assay. For the assay, 100 μ L of lysed erythrocytes were mixed with 100 μ L of 1X SYBR Green solution in a lysis buffer and incubated for 15 minutes in the dark. The plates were then read at a wavelength of 485 nm for excitation and 535 nm for emission. Drug effects on gametocytes were assessed by incubating 90 μ L of mature gametocytes with 10 μ L of the corresponding drug dilution during 24 hours. Gametocytes survival was measured by microscopic examination of a Giemsa stained thin blood films, and the length (L) to width (W) ratio was assessed as a marker of maturation.

Hemozoin extraction

Hemozoin was extracted from asexual parasites (90% trophozoites) and gametocytes. Parasitized red blood cells were collected and washed twice with Phosphate-buffered saline (PBS). Cells were lysed by incubation with 100 μ L of 10% saponine solution in PBS for 15 min at 37°C and then the medium was washed three times in cold PBS. Hemozoin was then extracted by incubation for 1 hour at 55°C using a lysing buffer (50 mM 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol chlorohydrate (trisHCL), 10 mM 2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyl)dinitrilo) tetracetic acid (EDTA), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 10 mg/mL proteinase K).¹⁹ After centrifugation, the preparation was washed two times in PBS-EDTA and finally with distilled water.

Nano-tracking analysis

In order to measure the size and amount of hemozoin particles produced during parasite maturation, a NTA machine (NanoSight NS300, Malvern, UK) was used. This method is combining light scattering and Brownian motion to measure the nanoparticle size distribution in suspension. Brownian motion of laser-illuminated particles is observed through a microscope and tracked by a highly sensitive CMOS camera.¹⁴ The NTA software tracks particles individually and, using the Stokes Einstein equation, calculates their hydrodynamic diameter, leading to data on particle concentration, particle size, and aggregation in a range of 10 to 2000 nm. The software was calibrated to provide a regular flow of 500 μ L/minute, after a loading dose of 70 μ L/minute. Hemozoin samples were diluted to 1/5 in distilled water before tests. Tests were conducted for 60 seconds. Triplicates were performed automatically for each experiment. The low-volume flow cell (LVFC) was flushed with pure water between each sample to ensure adequate cleaning and to avoid any particles carry-

over. Data were analyzed to generate the histogram of particle size distribution and concentration of the heterogeneous mix of nanoparticles.

Electron Microscopy

Mature gametocytes were incubated with or without 2.5 μ M ganaplacide (IC90) for 18 hours. Samples were fixed in a solution of 2% glutaraldehyde in 0.1 M Cacodylate buffer pH 7.4. They were then rinsed before being fixed with 1% osmium in 0.1 M Cacodylate buffer. After several rinses in water, they were contrasted in a 1% uranyl acetate solution for one hour and then dehydrated in graded alcohol baths. They were progressively impregnated in EPON resin before being embedded in 100% EPON resin two days later. Ultrafine 70 nm sections were cutted with a LEICA UC7 ultramicrotome and mounted on 200 mesh copper grids with Formvar before being contrasted with lead citrate. Observation was carried out on a TEM JEOL 1400 Flash at a voltage of 120 Kv.

The same samples of hemozoin extract from gametocytes and trophozoites used for NTA analysis were fixed in a solution of 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. They were then filtered through a 0.2 μ m polycarbonate filter before being fixing with 1% osmium in 0.1 M cacodylate buffer. After several rinses in water, they were dehydrated in a 20 % and then 100% acetone bath for one hour before passing through a critical point dryer. They were observed using the FEG FEI Quanta 250 SEM with the ETD detector at a voltage of 10KV.

Results

In vitro efficacy of ganaplacide

Asexual parasites were exposed to serial dilutions of ganaplacide and artesunate as a control for 72 hours. The sensitivity profiles of asexual parasites to ganaplacide and artesunate are shown in

Figure 1a and 1b. IC₅₀ of ganaplacide was 11.03 ± 1.98 nM and IC₅₀ of artesunate 7.71 ± 0.69 nM. Gametocytes obtained from the same clone were exposed during 24 hours to ganaplacide and artesunate (Figure 1c). In these conditions, the IC₅₀ of ganaplacide and artesunate against sexual stages were 34.27 ± 14.57 nM and 30.20 ± 12.83 nM, respectively (Figure 1d and 1e). Mature gametocytes exposed to ganaplacide were more elongated with a pointed tips and lost width (Figure 1f). The length to width ratio is estimated to be 6:1 after exposure to ganaplacide compared to 4:1 and 3:1 for normal stage IV and V gametocytes respectively.

Nano-tracking analysis

Hemozoin was extracted from the same culture samples (NF54) at asexual (8400 parasites/ μ L with 89% trophozoites) and sexual (2790 gametocytes/ μ L) stages, as well as from samples at sexual stages treated with ganaplacide IC₉₀. The size and the concentration of these purified hemozoin samples were measured using NTA and the results were expressed with scattergrams and full counts of the particles according to their sizes (Figure 2 a,b,c and d). There was approximately a six fold increase in the total count of hemozoin particles between trophozoites collected at day 0 and gametocytes collected at day 16. The particles size was also significantly increased from 62.9 ± 6.9 nm to 114.5 ± 19.7 nm (Figure 2e). Interestingly, gametocytes exposed to ganaplacide produced a similar amount of hemozoin than untreated gametocytes, but with a significant increase in global size of the hemozoin particles from 105.5 ± 25.7 to 174.0 ± 32.0 nm (Figure 2e).

Electron Microscopy

Hemozoin particles were submitted to SEM. Large hemozoin blots were observed on treated and untreated gametocytes samples (Figure 3). While it was not possible to statistically compare the size of particles from all the images obtained, the global tendency was to observe more frequently larger

hemozoin particles in gametocytes treated with ganaplacide compared to untreated gametocytes (Figure 3). Based on these data, the treated and untreated gametocytes were examined by TEM to detect the potential impact of ganaplacide on the morphology of gametocytes. The gametocytes samples were a mix of stages III to V. Depending on the orientation of the parasites in the inclusion before SEM, the morphologies were longitudinal or transverse. Figure 4a and 4b shows the ultrastructure of normal gametocytes on TEM. As previously described,²⁰⁻²² the gametocytes can be distinguished by their shapes and the three membrane layers inside the erythrocyte, including the parasitophorous vacuole membrane (PVM), the parasite cytoplasmic membrane (PPM) and the inner membrane complex (IMC) under which the microtubules (MT) are arranged. The cytoplasm reveals numerous double-membrane organelles as well as dense and crystalline hemozoin particles within the vacuoles. The gametocyte nucleus (N), is large, occupying about 1/3 of the parasite. Some organelles were difficult to identify such as the endoplasmic reticulum (ER) and ribosomes confirming the observations from other researchers.^{20,23} Indeed, RNA synthesis is significantly reduced in mature gametocytes resulting in few ER and ribosomes within the cytoplasm.²⁰ Osmiophilic bodies (OB) in the form of small dense vesicles are also present. An enlarged mitochondrion (M) with numerous cristae was observed, sometimes rounded depending on the orientation of the section (longitudinal or transverse). The main difference between treated and untreated gametocytes was again related to the increasing amount and size of hemozoin particles, which appeared more polymerized after ganaplacide exposure.

Discussion

The aim of this study was to explore the mechanism of action of ganaplacide on *P. falciparum* sexual stages *in vitro*. The hypothesis was that the suspected role of ganaplacide on ER and lipids could be associated with an impact on hemozoin formation during the gametocyte maturation.

The first step was to evaluate *in vitro* drug susceptibility of NF54 clones including sexual and asexual stages. We reported a ganaplacide IC₅₀ of 11.03 ± 1.98 nM against asexual stages (in agreement with previous data against *P. falciparum* NF54 clone (7.7 ± 0.3 nM)⁹ or 3D7 and W2 clones (10 ± 3 nM and 6 ± 1 nM, respectively).²⁴ and during an *ex vivo* schizont maturation assay (12.6 nM; range: 3.5 to 27.1 nM) for clinical isolates collected on the Thai-Myanmar border.³ The killing effect of 24 hours exposure on gametocytes, ganaplacide had an IC₅₀ of 34.27 ± 14.57 nM. This was in the same range as data obtained for ganaplacide on male and female gametocytes (6.9 ± 3.8 nM and 47.5 ± 54.7 nM, respectively).⁹ Taken together, these data confirmed the very high efficacy of ganaplacide against asexual and sexual *P. falciparum* parasites.

The mechanism of action of ganaplacide against sexual stages is not yet fully known. The cyclic amine PfCARL protein expressed during asexual and sexual stages was suspected to be the target of ganaplacide.³ Two other transmembrane transporters localized in the ER apparatus (Acetyl-CoA transporter *pfact* and the UDP-galactose transporter *pfugt*) were also described as potential targets of imidazolopiperazines.¹² Recently, ganaplacide was shown to colocalize with ER tracker red, suggesting that its target is within this compartment or related to ER autophagy.²⁵ It is of interest to note that ganaplacide was demonstrated to produce an increase in ER volume and to affect ER homeostasis by inhibiting ER autophagy.²⁵ While several targets were suspected, such as protein glycosylation, inhibition of kinase, or ATP/GTP binding proteins, no definitive evidence about the mechanism of action of ganaplacide was confirmed. ER is involved in lipids biosynthesis required for parasite growth and there is large evidence that lipids accumulating in the food vacuole play a major role in heme detoxification through hemozoin,^{26–28} a natural bypass product of *Plasmodium* metabolism.

The intra-erythrocyte parasite degrades and digests the main part of hemoglobin for nutrients and to gain space into the red blood cell, releasing toxic ferric heme.²⁹ Since the parasite lacks heme oxygenase³⁰, it dimerizes heme by coordinating the porphyrin group to propionate carboxylate group of two heme molecules.³¹ These coordination steps may require either proteins such as heme detoxification protein (HDP) or a lipocalin-like protein (PV5) and membrane-bound or droplet of bioactive lipids. Hemozoin is a bioinert crystalline product of these complex mechanisms. Further polymerization produces the non-toxic hemozoin. Hemozoin formation is a well-known target for many drugs while the mechanisms underlying its biomineralization process are highly debated.^{32–34} Aminoquinolines, mainly chloroquine, were the most effective drugs acting on hemozoin crystallization.^{35,36} Resistance has dramatically impaired the role of these drugs during the last decades, but their initial high efficacy related to hemozoin inhibition suggest that this mechanism of detoxification should remain a major target for future drugs. Any change in the pathways of heme biomineralization may have an impact on parasite survival. Thus, innovative approach for studying native hemozoin morphology is needed to address this challenge.

The second step was to use NTA which is a very efficient method to measure the concentration and the size distribution of pure particles in suspension based on their light scattering properties. NTA is of particular interest for highly refractive particles such as hemozoin. Through the detection of hemozoin, we provided the first evidence of its ability to evaluate the effect of antimalarial drugs against heme detoxification. It was not surprising to accurately measure a major increase in hemozoin concentration per parasite between trophozoites and gametocytes stages, but here is the first demonstration that the mean size of hemozoin particles has doubled from asexual to sexual stages, from 62.9 ± 6.9 nm to 114.5 ± 19.7 nm. Moreover, the global size of these particles increased by 1.6 when gametocytes were submitted to ganaplacide during a short period of time. This information was

confirmed by electron microscopy of hemozoin particles extracted from the same parasites as the global tendency was to observe more frequently larger hemozoin particles in gametocytes treated with ganaplacide compared to untreated gametocytes. Taken together, these observations indicate that ganaplacide has an effect on hemozoin crystallization process inside the parasite's digestive vacuole.

The abnormalities in hemozoin crystals morphology was previously observed with parasite depleted in PfPV5, showing largest crystals which were 180% of wild-type size, multidirectional branching and frequent enormous aggregates inside the digestive vacuole.³² Similar enormous aggregates were observed after ganaplacide incubation, but this observation should be considered with caution since the hemozoin extraction and preparation for electronic microscopy may increase the risk of aggregates formation.

Our results based on NTA and electron microscopy provide the first evidence that ganaplacide inhibitory effect on *P. falciparum* gametocytes can be explained in part by a modification of hemozoin biomineralization. The relevance of this observation in the future treatment of malaria with ganaplacide is yet unclear, but the rate and size of hemozoin formation under drug pressure using NTA should be considered as a potential marker of drug efficacy.

Acknowledgements

This article was produced by WANECAM 2 which is part of the EDCTP2 programme supported by the European Union grant number RIA2017T-2018 WANECAM-2. The views and opinions of authors expressed herein do not necessarily state or reflect those of EDCTP. The authors thank the Centre Technologique des Microstructures, University Lyon. This work is dedicated to the memory of A-R. Omorou.

Funding

RO was supported by a grant from EDCTP (grant number RIA2017T-2018 WANECAM-2).

Transparency declarations

SP designed the study. RO, BD, AL, GB, CFB, LG, and SP collected and extracted the data. SP, BD, ALB, and RO wrote the manuscript and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. Novartis had no impact on the design of this study or on the results obtained and on the writing of this paper.

References

- 1 Anon. World malaria report 2022. Available at: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>. Accessed January 31, 2023.
- 2 Galatas B, Bassat Q, Mayor A. Malaria Parasites in the Asymptomatic: Looking for the Hay in the Haystack. *Trends Parasitol* 2016; **32**: 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.015>
- 3 Kuhen KL, Chatterjee AK, Rottmann M, *et al.* KAF156 is an antimalarial clinical candidate with potential for use in prophylaxis, treatment, and prevention of disease transmission. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 5060–7. <https://doi.org/10.1128/aac.02727-13>
- 4 Leong FJ, Zhao R, Zeng S, Magnusson B, Diagana TT, Pertel P. A first-in-human randomized, double-blind, placebo-controlled, single- and multiple-ascending oral dose study of novel Imidazolopiperazine KAF156 to assess its safety, tolerability, and pharmacokinetics in healthy adult volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 6437–43. <https://doi.org/10.1128/aac.03478-14>
- 5 Diagana TT. Supporting malaria elimination with 21st century antimalarial agent drug discovery. *Drug Discov Today* 2015; **20**: 1265–70. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.06.009>
- 6 Wu T, Nagle A, Kuhen K, *et al.* Imidazolopiperazines: hit to lead optimization of new antimalarial agents. *J Med Chem* 2011; **54**: 5116–30. <https://doi.org/10.1021/jm2003359>
- 7 Meister S, Plouffe DM, Kuhen KL, *et al.* Imaging of *Plasmodium* liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science* 2011; **334**: 1372–7. <https://doi.org/10.1126/science.1211936>
- 8 Nagle A, Wu T, Kuhen K, *et al.* Imidazolopiperazines: lead optimization of the second-generation antimalarial agents. *J Med Chem* 2012; **55**: 4244–73. <https://doi.org/10.1021/jm300041e>
- 9 Yipsirimetee A, Chiewpoo P, Tripura R, *et al.* Assessment *In vitro* of the Antimalarial and Transmission-Blocking Activities of Cipargamin and Ganaplacide in Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2022; **66**: e0148121. <https://doi.org/10.1128/aac.01481-21>
- 10 Anon. WANECAM 2 | West African Network for Clinical Trials of Antimalarial drugs. Available at: <https://www.wanecam.org/fr/accueil>. Accessed June 4, 2023.
- 11 Magistrado PA, Corey VC, Lukens AK, *et al.* *Plasmodium falciparum* Cyclic Amine Resistance Locus (PfCARL), a Resistance Mechanism for Two Distinct Compound Classes. *ACS Infect Dis* 2016; **2**: 816–26. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00025>
- 12 Lim MY-X, LaMonte G, Lee MCS, *et al.* UDP-galactose and acetyl-CoA transporters as *Plasmodium* multidrug resistance genes. *Nat Microbiol* 2016; **1**: 16166. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.166>

- 13** Ma W, Balta VA, West R, *et al.* A second mechanism employed by artemisinins to suppress *Plasmodium falciparum* hinges on inhibition of hemozoin crystallization. *J Biol Chem* 2021; **296**: 100123. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra120.016115>
- 14** Longjohn MN, Christian SL. Characterizing Extracellular Vesicles Using Nanoparticle-Tracking Analysis. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2022; **2508**: 353–73. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_23
- 15** Delves MJ, Straschil U, Ruecker A, *et al.* Routine *in vitro* culture of *P. falciparum* gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions. *Nat Protoc* 2016; **11**: 1668–80. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.096>
- 16** Roncalés M, Vidal-Mas J, Leroy D, Herreros E. Comparison and Optimization of Different Methods for the *In vitro* Production of *Plasmodium falciparum* Gametocytes. *J Parasitol Res* 2012; **2012**: 927148. <https://doi.org/10.1155/2012/927148>
- 17** Bacon DJ, Latour C, Lucas C, Colina O, Ringwald P, Picot S. Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for *in vitro* antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1172–8. <https://doi.org/10.1128/aac.01313-06>
- 18** Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979; **65**: 418–20.
- 19** Basilico N, Tognazioli C, Picot S, Ravagnani F, Taramelli D. Synergistic and antagonistic interactions between haemozoin and bacterial endotoxin on human and mouse macrophages. *Parassitologia* 2003; **45**: 135–40.
- 20** Sinden RE. Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* *in vitro*: an electron microscopic study. *Parasitology* 1982; **84**: 1–11. <https://doi.org/10.1017/s003118200005160x>
- 21** Kass L, Willerson D, Rieckmann KH, Carson PE, Becker RP. *Plasmodium falciparum* gametocytes. Electron microscopic observations on material obtained by a new method. *Am J Trop Med Hyg* 1971; **20**: 187–94.
- 22** Aikawa M. *Plasmodium*: The fine structure of malarial parasites. *Exp Parasitol* 1971; **30**: 284–320. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(71\)90094-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(71)90094-4)
- 23** Seed TM. *Plasmodium simium*: ultrastructure of erythrocytic phase. *Exp Parasitol* 1976; **39**: 262–76.
- 24** Nagle A, Wu T, Kuhlen K, *et al.* Imidazolopiperazines: Lead Optimization of the Second-Generation Antimalarial Agents. *J Med Chem* 2012; **55**: 4244–73. <https://doi.org/10.1021/jm300041e>
- 25** LaMonte GM, Rocamora F, Marapana DS, *et al.* Pan-active imidazolopiperazine antimalarials target the *Plasmodium falciparum* intracellular secretory pathway. *Nat Commun* 2020; **11**: 1780. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15440-4>

- 26** Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJP, Adisa A, Dogovski C, Tilley L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2004; **54**: 109–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04284.x>
- 27** Hoang AN, Sandlin RD, Omar A, Egan TJ, Wright DW. The neutral lipid composition present in the digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* concentrates heme and mediates β -hematin formation with an unusually low activation energy. *Biochemistry* 2010; **49**: 10107–16. <https://doi.org/10.1021/bi101397u>
- 28** Asad M, Yamaryo-Botté Y, Hossain ME, *et al.* An essential vesicular-trafficking phospholipase mediates neutral lipid synthesis and contributes to hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. *BMC Biol* 2021; **19**: 159. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01042-z>
- 29** Kapishnikov S, Hempelmann E, Elbaum M, Als-Nielsen J, Leiserowitz L. Malaria Pigment Crystals: The Achilles' Heel of the Malaria Parasite. *ChemMedChem* 2021; **16**: 1515–32. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000895>
- 30** Eckman JR, Modler S, Eaton JW, Berger E, Engel RR. Host heme catabolism in drug-sensitive and drug-resistant malaria. *J Lab Clin Med* 1977; **90**: 767–70.
- 31** Dalapati T, Moore JM. Hemozoin: a Complex Molecule with Complex Activities. *Curr Clin Microbiol Rep* 2021; **8**: 87–102. <https://doi.org/10.1007/s40588-021-00166-8>
- 32** Matz JM, Drepper B, Blum TB, *et al.* A lipocalin mediates unidirectional heme biomineralization in malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; **117**: 16546–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001153117>
- 33** Quadros HC, Silva MCB, Moreira DRM. The Role of the Iron Protoporphyrins Heme and Hematin in the Antimalarial Activity of Endoperoxide Drugs. *Pharm Basel Switz* 2022; **15**: 60. <https://doi.org/10.3390/ph15010060>
- 34** Ziegler J, Linck R, Wright DW. Heme Aggregation inhibitors: antimalarial drugs targeting an essential biomineralization process. *Curr Med Chem* 2001; **8**: 171–89.
- 35** Sullivan DJ. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol* 2002; **32**: 1645–53. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00193-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00193-5)
- 36** de Villiers KA, Egan TJ. Heme Detoxification in the Malaria Parasite: A Target for Antimalarial Drug Development. *Acc Chem Res* 2021; **54**: 2649–59. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00154>
- 37** Carter R, Miller LH. Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Bull World Health Organ* 1979; **57 Suppl 1**: 37–52.

Figure captions

Figure 1. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* NFR4 strain to ganaplacide and artesunate. (a) and (b) Susceptibility of asexual parasite to ganaplacide and artesunate respectively after 72 hours incubation using the parasite proliferation inhibition assay (SYBR Green). IC₅₀ of ganaplacide was 11.03 ± 1.98 nM and IC₅₀ of artesunate 7.71 ± 0.69 nM. The results are expressed as mean +/- sd (n = 3). (c) Morphological aspect of gametocyte maturation stages on GIEMSA-stained thin smears based on Carter and Miller.³⁷ The smears were examined under a light microscope at 100x magnification. Stage II gametocytes stretched on one side and began to take on an oval shape. This stretching extended at stage III to a ratio of length (L) to width (W) of 2:1. Gametocytes elongated more in stage IV with L/W ratio of 4:1. When stained with GIEMSA, male gametocytes exhibit a pink cytoplasm compared to purple-blue cytoplasm of female gametocytes. At stage V, gametocytes lost their rigidity and adopted a banana shape with an L:W ratio of 3:1. (d) and (e) Susceptibility of mature stage gametocytes to ganaplacide and artesunate respectively after 24 hours of exposure. Microscopy count of normal gametocytes. the IC₅₀ of ganaplacide and artesunate were 34.27 ± 14.57 nM and 30.20 ± 12.83 nM, respectively. The results are expressed as mean +/- sd (n = 3). Graphs were generated with ICEstimator. (f) Morphological aspect of gametocytes control, gametocytes exposed to ganaplacide and artesunate for 24 hours. GIEMSA-stained thin smears were examined under a light microscope. Both drugs induced an increase in L/W ratio.

Figure 2. Nanoparticles tracking analysis. Hemozoin particles were detected by their Brownian motion in solution, counted (particles/ml) and classified by size (nm). Scattergrams are presented according to parasite stages and treatment by ganaplacide. (a) trophozoites ; (b) gametocytes at day 16 ; (c) gametocytes control ; (d) gametocytes exposed to ganaplacide IC₉₀ (2.5µM) for 18

hours. (e) Mean size of the particles (nm), concentration (particles/ml) and size of 90% of the particles were plotted according to parasite stages.

Figure 3. Scanning electronic microscopy images of hemozoin extracted from *Plasmodium falciparum* gametocytes. (a) Untreated control gametocytes; (b) and (c) gametocytes exposed to ganaplacide during 18 hours. Magnitude: 40.000x ; voltage 15.00 kV.

Figure 4. Transmission electron microscopy. (a) and (b) Electron micrographs of a normal gametocyte showing the erythrocyte membrane (EM), the parasitophorous vacuole membrane (PVM), the parasite cytoplasmic membrane (PPM), the inner membrane complex (IMC), microtubules (MT), mitochondrion (M), nucleus (N), cytostome (C), osmiophilic bodies (OB). (c) and (d) Untreated gametocytes with HZ hemozoin pigments. (e) and (f) gametocytes exposed to 2.5 μ M of ganaplacide for 18 hours exhibited a greater number of large HZ particles than control gametocytes. (g) and (h) Magnified micrographs showing the ultra-microscopic detail of HZ from untreated gametocytes. (i) and (j) Magnified micrographs showing the ultra-microscopic detail of HZ from gametocytes exposed to ganaplacide. The size and polymerization of the HZ appeared to be greater than in control.

Figure 1.

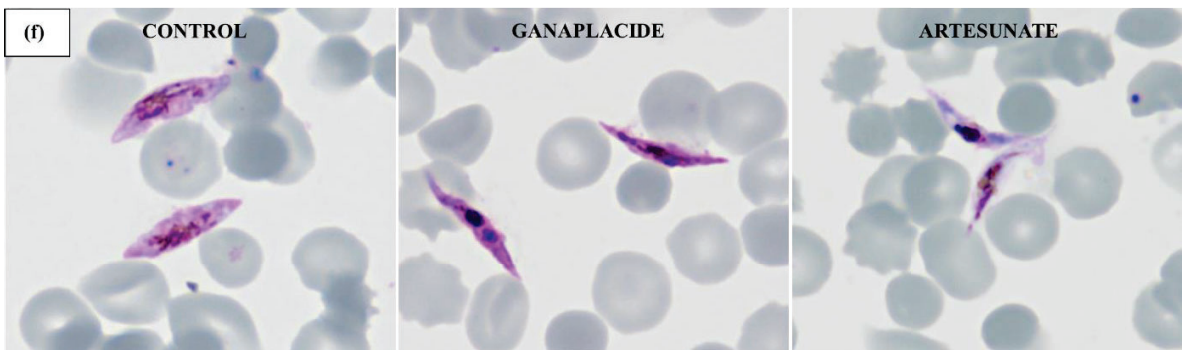
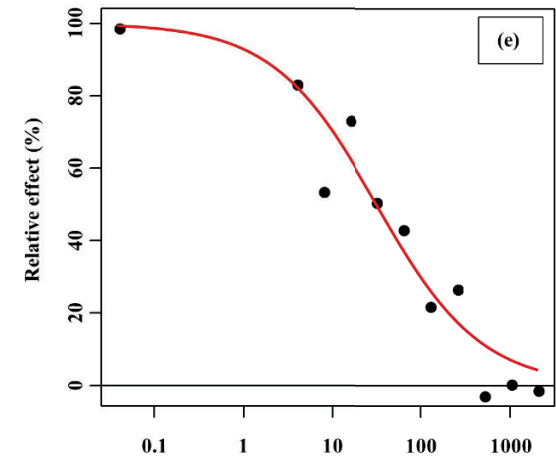
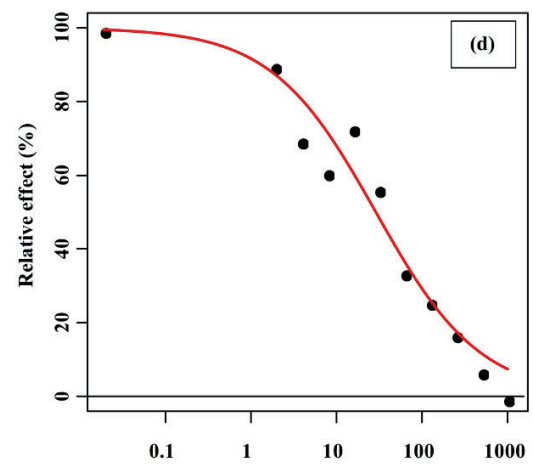
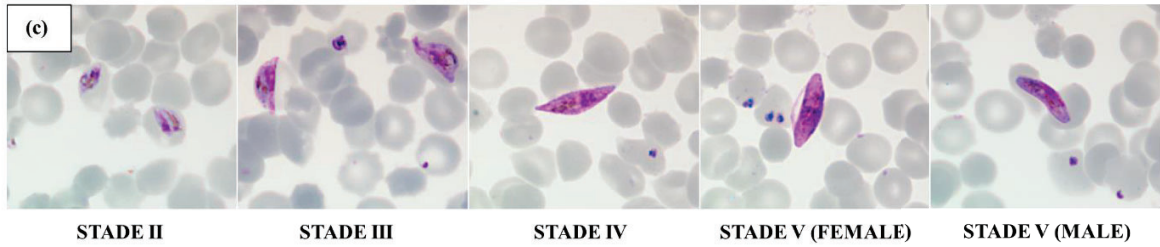
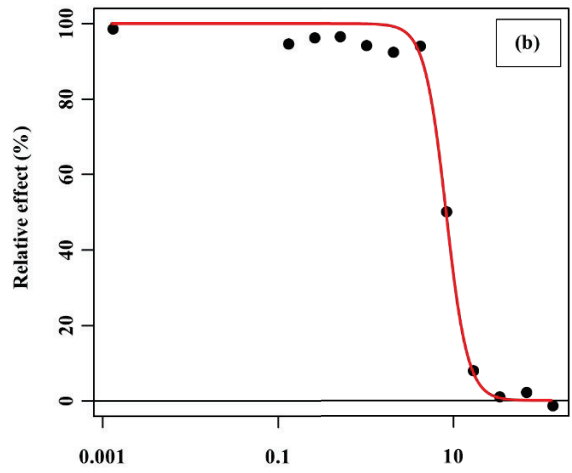
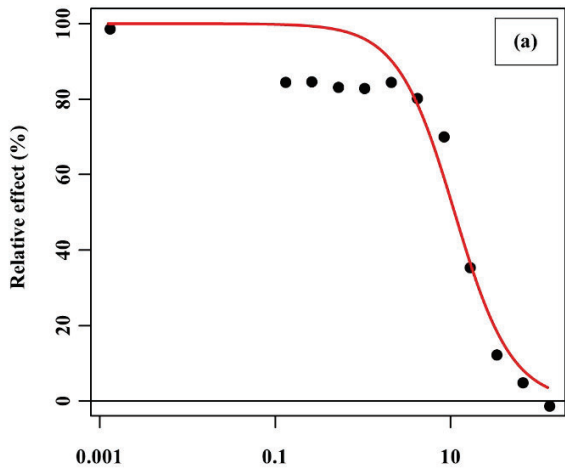
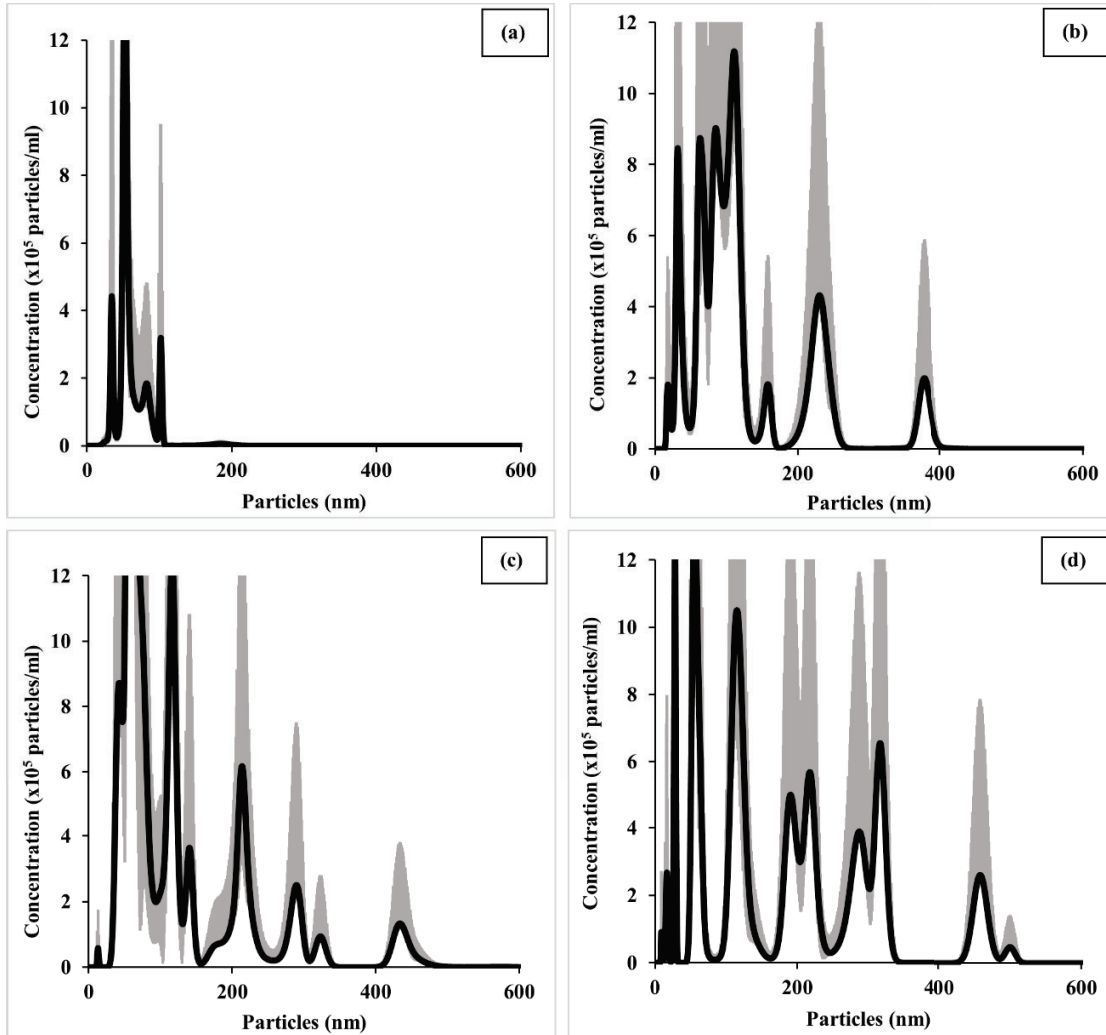
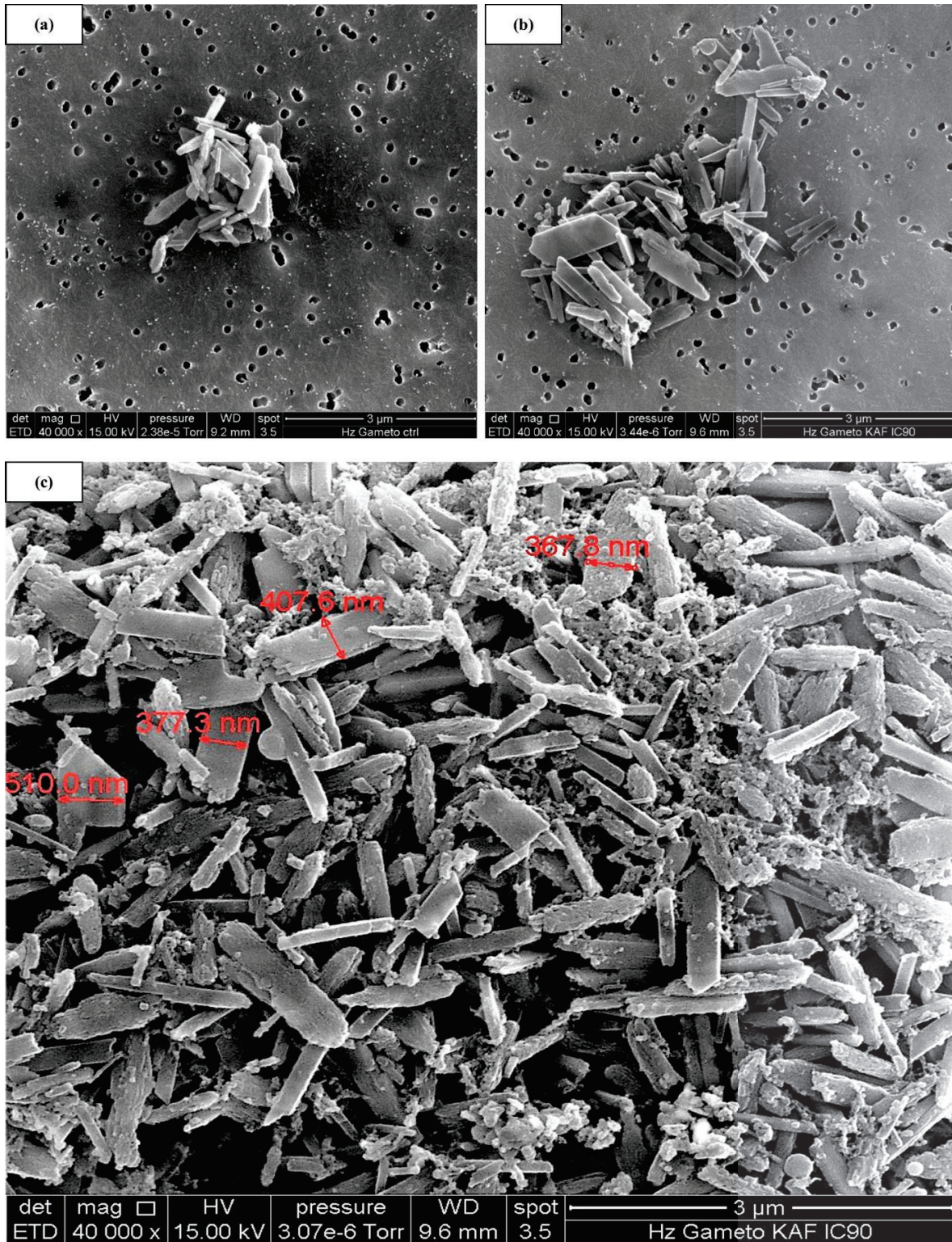


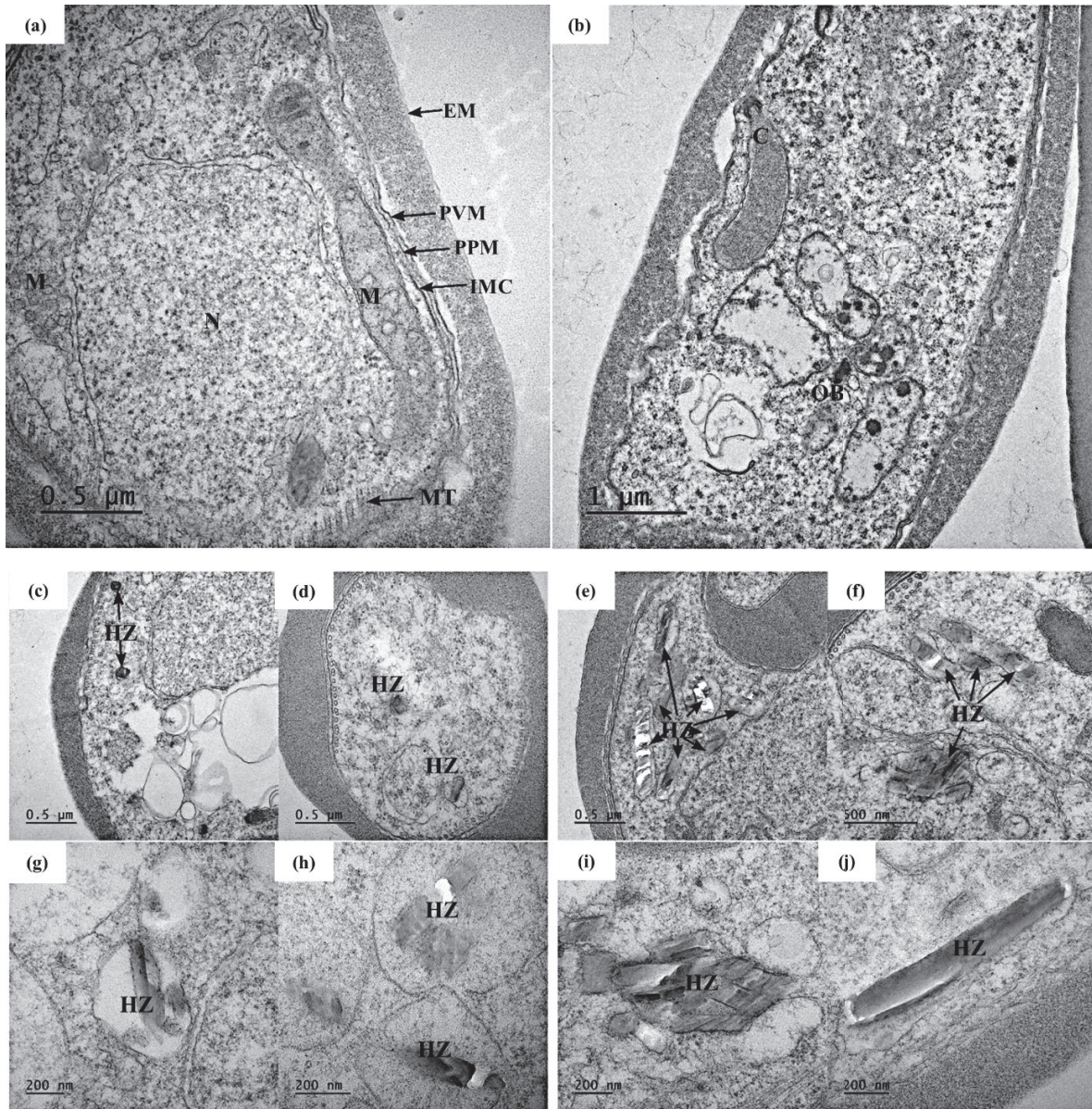
Figure 2.



	NF54	Mean size (nm)	Concentration (particles/ml)	D90 (nm)
	<i>Trophozoites</i>	62.9 ± 6.9	1.96 x 10 ⁷	88.6
	<i>Gametocytes T0</i>	114.5 ± 19.7	1.23 x 10 ⁸	231.1
	<i>Gametocytes T24</i>	105.5 ± 25.7	8.17 x 10 ⁷	236.6
	<i>Gametocytes T24 + KAF156</i>	174.0 ± 32.0	9.9 x 10 ⁷	322.0

Figure 3





Prise en compte des critiques des relecteurs de cet article :

Les relecteurs ont émis des critiques sur :

- L'impact direct de la ganaplacide sur la production ou la morphologie de l'Hz.

R : nous convenons que les modifications de l'Hz observées pourraient être un effet secondaire de l'action de la ganaplacide sur les gamétocytes et non une action directe sur l'Hz elle-même.

- Le lien direct entre l'effet gamétocytocide de la ganaplacide et les modifications de l'Hz observées.

R : actuellement, nous ne savons pas si l'augmentation de la taille de l'Hz est directement liée à la mort des gamétocytes. La mort des gamétocytes peut être multifactorielle. Les modifications de l'Hz pourraient être un marqueur biophysique de l'impact de la ganaplacide sur diverses fonctions vitales du gamétocyte. Mais ces observations ouvrent des pistes pour des recherches supplémentaires pour comprendre quelles sont les voies impactées et quelles sont les conséquences au niveau physiologique.

Critiques ayant donné lieu à une réécriture simple :

- Fournir une explication plus détaillée du protocole de l'essai sur les gamétocytes, notamment en précisant le stade des gamétocytes testés et les critères de comptage et de détermination de la viabilité des gamétocytes.
- Clarifier le fait que l'Hz extraite des gamétocytes n'était pas contaminée par l'Hz des trophozoïtes.
- Rectifier les libellés des figures en y ajoutant les traitements auxquels elles correspondent.

Critiques ayant donné lieu à de nouvelles expériences :

- Utilisation de la microscopie optique pour évaluer la sensibilité des gamétocytes à la ganaplacide : Nous évaluons la sensibilité par cytométrie en flux avec le XN31 de Sysmex en plus de la microscopie.
- L'absence d'étude comparative avec les molécules actives sur les gamétocytes et ciblant l'Hz pour élucider le mécanisme d'action de la ganaplacide : nous réalisons des expériences en incluant la primaquine (PQ), la chloroquine (CQ) et le bleu de méthylène (BM).

- L'absence de test d'exflagellation des gamétocytes mâles pour vérifier l'effet gamétocytocide de la ganaplacide : nous effectuons des tests d'exflagellation avec les gamétocytes mis en contact avec la ganaplacide, la PQ, BM et CQ
- Évaluation de l'impact directe de la ganaplacide sur l'Hz : nous réalisons des tests *in vitro* d'inhibition d'hématine avec la ganaplacide afin d'évaluer son impact sur la formation de l'Hz.

Critiques considérées comme non recevables

Les relecteurs contestent le fait que l'hémozoïne est encore synthétisée au stade gamétocytes.

R : l'Hz est synthétisée encore au stade I, II et III de formation des gamétocytes (Canning & Sinden, 1975; Hanssen et al., 2012; Hayward et al., 2000; Sinden et al., 1978).

Au moment de la rédaction de ce manuscrit et de sa présentation aux rapporteurs, la version finale de l'article après les modifications n'est pas encore totalement disponible. Cependant, la nouvelle version de l'article sera envoyée aux rapporteurs et intégrée dans la version finale du document, et présentée au jury, lors de la soutenance, en cas d'acceptation.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Avec la progression constante de la résistance, le paludisme continue de poser un défi de santé mondiale qui exige des interventions innovantes pour contrôler sa transmission. Cette thèse vise à étudier *in vitro* et *ex vivo* les gamétocytes de *Plasmodium falciparum*, la possibilité de leur cryopréservation à partir d'échantillons cliniques provenant d'Afrique de l'Ouest, leur sensibilité à la ganaplacide, et l'impact de la ganaplacide sur leur morphologie et leur production d'hémozoïne.

Cryopréservation des parasites

L'essai de cryopréservation mené dans le cadre de cette thèse visait à établir une méthode fiable et pratique adaptée aux contraintes techniques de l'Afrique subsaharienne et compatible aux expériences ultérieures *ex vivo* pour la production et l'évaluation des gamétocytes. En variant les paramètres tels que le type de cryoprotecteur et la concentration, l'étude visait à identifier les conditions qui garantiraient une conservation optimale des échantillons.

La congélation des cellules est un mécanisme physique qui entraîne une différence de pression entre le milieu intracellulaire et extracellulaire où l'équilibre de la pression est crucial pour éviter la formation de glace à l'intérieur des cellules. La réussite de cet équilibre dépend en partie de la vitesse de congélation (McColm & Latter, 1986; Pegg, 2002). La formation de glace à l'intérieur des cellules peut entraîner une augmentation de la pression osmotique endommageant les structures internes et les membranes cellulaires. Les cryoprotecteurs comme le glycérol et le dimeethyl-sulfoxide (DMSO) ont la capacité de réduire cette pression en pénétrant dans les cellules (Bhattacharya, 2018; Mutetwa & James, 1985). Ils se concentrent à l'intérieur des cellules augmentant la viscosité intracellulaire, ce qui d'une part diminue la perméabilité membranaire aux molécules d'eau et d'autre part, en raison de la polarité inhérente à ces molécules, des liaisons hydrogène peuvent être formées avec les molécules d'eau, empêchant ainsi la formation de cristaux de glace (Pegg, 2002). De manière concomitante, ceci entraîne une diminution de la vitesse de surfusion de l'eau (Pegg, 2002; Sutton, 1991). Par ailleurs, le processus de refroidissement lent comme à -20°C atténue le choc thermique subi par les cellules lors de la transition entre les températures ambiantes et cryogéniques. Ce refroidissement lent prévient la

vitrification intracellulaire importante pour la cryopréservation des parasites intracellulaires comme c'est le cas dans notre étude (Mazur, 1968; Sutton, 1991).

Notre expérience a révélé que la solution de glycérol 28% était la plus adaptée pour cryopréserver les parasites *PfNF54* aux stades asexués asynchrones à -20°C. Le glycérol est le cryoprotecteur couramment utilisé pour la cryopréservation des parasites en raison de sa faible toxicité et de sa pénétration lente dans le parasite comparé au DMSO (Bhattacharya, 2018; Miyake et al., 2004). La cryopréservation avec le DMSO à 2% a révélé une perte significative des parasites, 98% contre 83% avec le cryoprotecteur à 28% de glycérol. De plus, le test de viabilité suggère une perte de viabilité des parasites cryopréservés avec le DMSO 2%. Cependant, une étude a rapporté une conservation efficace des parasites à -185°C et -70°C en utilisant 10% de DMSO (Christofinis & Miller, 1983). Il est intéressant de noter que cette étude a également révélé une efficacité comparable entre DMSO 10% et glycérol 10% à ces mêmes températures. Ces résultats suggèrent que le DMSO pourrait n'être pas adapté à la cryopréservation à -20°C. Par ailleurs, au-delà du faible pourcentage de parasites recouverts avec la solution à 57% de glycérol (2,8 fois moins de parasites comparés à la solution à 28% de glycérol), la viabilité des parasites semble altérée (Figure 18). La concentration théorique finale de glycérol obtenu avec le cryoprotecteur à 28% et 57 % de glycérol est de 14% et 28,5% respectivement. Il se pourrait que cette dernière concentration de 28,5% soit toxique et/ou inadaptée à la cryopréservation à -20°C. L'étude de Christofinis et Miller a montré une cryopréservation optimale avec le glycérol à 10% à des températures de -185°C et -70°C (Christofinis & Miller, 1983).

Le résultat obtenu avec le glycérol renforce son efficacité et sa biocompatibilité établies dans la préservation des parasites (Keister & Kaslow, 1994; Mutetwa & James, 1985; Shaw-Saliba et al., 2016). Cependant, le glycérol est souvent utilisé à des températures plus cryogéniques que le -20°C, telles que -70°C et -196°C (azote liquide) (Christofinis & Miller, 1983; Keister & Kaslow, 1994; McColm & Latter, 1986; Shaw-Saliba et al., 2016). La température de cryopréservation affecte de manière significative la viabilité des parasites. Plus la température est basse, plus la viabilité de la cellule est préservée grâce au maintien de l'intégrité cellulaire et des fonctions moléculaires (Bhattacharya, 2018; Mazur, 1968, 1984; Pegg, 2002). Les températures autour de -80°C sont souvent utilisées pour de moyennes durées de conservation environ 80 jours et plus (Mutetwa & James, 1985). Elles favorisent la réduction des réactions métaboliques, la

réduction de la dénaturation des protéines tout en préservant le matériel génétique pendant un certain temps tandis que la formation réduite de glace à des températures inférieures à -100°C peut arrêter la dénaturation des protéines (Bhattacharya, 2018; Mutetwa & James, 1985). L'activité métabolique, le matériel génétique ainsi que les structures cellulaires peuvent rester intacts durant de longues durées de conservation à des températures en dessous de -100°C (Mazur, 1968, 1984). Tous ces éléments vitaux du parasite sont moins conservés à -20°C (Mazur, 1968, 1984), ce qui peut justifier les taux de recouvrement bas observés dans notre étude, bien que les parasites recouverts aient présenté une viabilité efficace (Figure 18). Ces caractéristiques du -20°C font qu'elle est plus appropriée pour une conservation à court terme. Dans notre étude, les parasites ont pu être conservés pendant un mois à -20°C avec la solution à 28% de glycérol et les gamétocytes ont pu être produits avec ces parasites (Figure 20). Cependant, au labo MRU, cette même concentration de glycérol permet une conservation prolongée durant plusieurs années dans l'azote liquide.

Cette expérience répond non seulement au besoin immédiat de conservation des échantillons dans un environnement aux ressources limitées, mais offre aussi une base pour les recherches dans les régions endémiques. Dans la suite logique, cette expérience devrait être étendue aux échantillons cliniques.

Production des gamétocytes

La capacité à produire des gamétocytes viables et matures *in vitro* est indispensable pour étudier les interventions visant à bloquer la transmission du paludisme. Cependant, le processus est semé d'embûches en raison de la complexité de la gamétocytogenèse, du faible pourcentage de parasites qui se différencient en gamétocytes et aussi de leur durée de maturation variable.

Dans cette thèse une exploration rigoureuse de la myriade de facteurs régissant la production des gamétocytes *in vitro* a été entreprise sur la base d'un examen des protocoles existants et d'une analyse intégrative des méthodologies utilisées entre 2000 et 2022. Dans le panorama des méthodes de production des gamétocytes, diverses approches ont mis l'accent sur la gestion de facteurs distincts afin d'améliorer le rendement de production des gamétocytes. Par exemple, la modification de la composition du milieu de culture avec l'ajout de l'acide lactique (West & Sullivan, 2020), la déplétion en glucose (Reader et al., 2015) ou en

lisophosphatidylcholine (Brancucci et al., 2017) ont été explorées pour améliorer la productivité. De même, les approches impliquant des variations du taux d'hématocrite pour simuler l'anémie et une parasitémie élevée imitant les conditions de stress *in vivo* ont été explorées pour influencer le taux de production des gamétocytes. Ces approches ont été corroborées par un nombre croissant de publications (Omorou et al., 2022). Quelques études ont mis l'accent sur l'utilisation de parasites transgéniques inductibles tirant parti des connaissances croissantes sur les facteurs moléculaires sous-jacents à la gamétocytogenèse. Cette dernière approche permet une manipulation plus ciblée des réponses physiologiques du parasite qui se traduit par des rendements plus élevés en gamétocytes (Boltryk et al., 2021; Llorà-Batlle et al., 2020). Cependant, les facteurs moléculaires peuvent être spécifiques à une espèce et le risque de variation physiologique et biologique peut être associé aux parasites transgéniques. Quelques-uns des facteurs critiques dans la production des gamétocytes sont la durée, les manipulations et les ressources requises pour obtenir les gamétocytes matures. Alors que certains protocoles permettent d'obtenir des gamétocytes en deux semaines, d'autres peuvent nécessiter une durée plus longue. Ce qui peut entraîner des conséquences sur des plannings expérimentaux et l'allocation de ressources humaines et techniques.

La synthèse de ces différents facteurs telle que réalisée dans notre revue peut favoriser une rationalisation des approches de production de gamétocytes. Une approche intégrative maximisant le rendement en gamétocytes sans surcharger le protocole avec des exigences complexes peut être dérivée de cette synthèse des divers facteurs de production des gamétocytes. Le résultat de ce travail a abouti à la mise au point d'un [protocole optimisé](#). Notre protocole établi trouve un équilibre entre faisabilité pratique et rendement.

Par ailleurs, en effectuant une analyse systématique des approches utilisées dans la production des gamétocytes au fil des ans, cette étude vient mettre en évidence les stratégies efficaces pour améliorer le rendement et la reproductibilité des gamétocytes. Ces résultats peuvent s'inscrire dans un cadre de recherche plus large sur les effets des conditions de culture sur la biologie du parasite et potentiellement mettre en lumière des pistes pour affiner davantage la production des gamétocytes *in vitro* avec comme finalité une normalisation possible de la production des gamétocytes.

Ganaplacide et impact sur les gamétocytes

L'émergence des souches parasitaires résistantes en particulier aux médicaments de premières lignes comme les combinaisons à base d'artémisinine menace de compromettre les progrès réalisés dans la réduction de la mortalité et de la morbidité liées au paludisme. La capacité d'adaptation évolutive des parasites représente un défi constant pour l'efficacité des traitements antipaludiques. Il est donc impératif d'explorer de nouvelles molécules dotées de propriétés physico-chimiques et de mécanismes d'action uniques en particulier celles qui bloquent la transmission du paludisme. La structure chimique unique de la ganaplacide et son efficacité démontrée contre les stades asexués et les gamétocytes en font un candidat prometteur pour le contrôle de la transmission du paludisme. Bien que son efficacité contre les gamétocytes soit encourageante, il est essentiel de comprendre comment elle exerce son effet sur les gamétocytes pour optimiser son potentiel thérapeutique et fournir des informations essentielles pouvant être utilisées pour développer des interventions visant à bloquer la transmission du paludisme. Cette thèse s'est concentrée sur l'étude de l'impact de la ganaplacide sur les gamétocytes par une approche méthodologique systématique afin de contribuer aux connaissances sur son mode d'action.

Des études antérieures ont mis en évidence la capacité de la ganaplacide à inhiber 50% des gamétocytes matures à des concentrations inférieures à 50 nM (Kuhlen et al., 2014; Yipsirimetee et al., 2022). En particulier, une étude récente publiée en 2022 a révélé une CI_{50} de 5,1 nM sur les gamétocytes mâles de stade V de *PfNF54* en utilisant le « *Pf* dual gamète assay » comme méthode d'évaluation (Yipsirimetee et al., 2022). Toutefois nos résultats diffèrent légèrement puisque notre étude expose les gamétocytes de *PfNF54* de stades III à IV à différentes concentrations de ganaplacide, révélant une CI_{50} de $34,27 \pm 14,57$ nM. La réponse des gamétocytes diffère selon leur stade de maturation et leur sexe. De plus, la méthode d'évaluation utilisée peut influencer les résultats de la CI_{50} , en particulier en ce qui concerne la viabilité des gamétocytes. La microscopie, bien qu'efficace, présente des limites qui ont été soulignées dans la sous-partie A du [chapitre III](#), notamment l'incapacité à évaluer la viabilité biologique ou fonctionnelle des gamétocytes. Les gamétocytes traités peuvent garder une morphologie normale bien qu'ils ne soient plus fonctionnellement viables (Yipsirimetee et al., 2022). Par conséquent, cette limitation pourrait

conduire à des valeurs de CI_{50} élevées lorsqu'on se base uniquement sur la morphologie comme indicateur de viabilité.

Nous avons trouvé que la CI_{50} de l'artésunate (30.20 ± 12.83 nM), une référence pertinente s'est avérée similaire à celle de la ganaplacide. Cette similitude peut s'expliquer par la présence de gamétocytes de stade III dans notre échantillon, car l'artésunate semble agir efficacement sur les différents stades de gamétocytes à l'exception des stades matures (Adjalley et al., 2011; S. Duffy & Avery, 2013; Lelièvre et al., 2012; Peatey et al., 2009).

Par ailleurs, notre étude a cherché à évaluer les altérations moléculaires et structurelles potentielles en se penchant particulièrement sur l'impact de la ganaplacide sur l'Hz avec utilisation de méthodes de microscopie électroniques d'une part et le NTA pour évaluer la taille et la concentration de l'Hz d'autre part. Cette approche multidimensionnelle a permis d'obtenir une compréhension plus fine des effets de la ganaplacide sur les gamétocytes et sur l'Hz.

L'Hz est présente en quantité variable suivant les stades intraérythrocytaires avec les gamétocytes contenant plus d'Hz que les stades asexués (Jamjoom, 2017). L'Hz est produite à partir d'hème provenant de la digestion de l'hémoglobine, mais aussi de l'hème synthétisée *de novo* par les parasites (Nagaraj et al., 2013). Ainsi, bien que la production de protéines et la digestion de l'hémoglobine semblent cesser dans les gamétocytes matures à partir du sixième jour de développement (Canning & Sinden, 1975; Hanssen et al., 2012; Sinden et al., 1978), il est plausible que la production de l'Hz se poursuive à partir de l'hème issue de la digestion de l'hémoglobine dans les stades antérieurs et potentiellement à partir de l'hème nouvellement synthétisé. Cela pourrait justifier la quantité d'Hz dans les gamétocytes matures par rapport aux gamétocytes jeunes. Cependant, s'il s'avère que l'Hz continue d'être produit dans les stades matures, une question se pose : pourquoi les antipaludiques qui interfèrent avec la production de l'Hz ne sont-ils pas efficaces contre les gamétocytes matures ? Se pourrait-il que le processus de production d'Hz diffère entre les gamétocytes matures et les stades asexués et les gamétocytes jeunes ? Est-il possible que les mécanismes antioxydants des gamétocytes détoxifient de manière efficace les ERO potentiellement générées par ces molécules d'hème libre résiduelles en les maintenant en dessous d'un certain seuil ? Les connaissances concernant la production d'Hz dans les gamétocytes

matures sont très limitées. Ce sujet mérite d'être exploré, car ces mécanismes pourraient être ciblés pour de nouvelles interventions thérapeutiques.

Dans notre étude, l'analyse NTA des particules d'Hz après exposition à la ganaplacide a révélé une augmentation inattendue de leur taille, de 105.5 ± 25.7 pour le contrôle à 174.0 ± 32.0 nm sous l'action de la ganaplacide. La microscopie électronique à transmission et à balayage corrobore ces résultats en montrant une augmentation de la taille de l'Hz ainsi qu'une réduction des structures membranaires identifiables. Il convient de souligner que nous avons mesuré un mécanisme biophysique qui est régulé par diverses fonctions métaboliques dans le parasite. Selon les connaissances actuelles, le potentiel site d'action de la KAF156 pourrait être le RE, notamment les transporteurs transmembranaires localisés dans le RE tels que Pfcarl, Pfugt et le Pfact qui sont potentiellement impliqués dans le processus de maturation des protéines (Kuhlen et al., 2014; LaMonte et al., 2020; Lim et al., 2016; Magistrado et al., 2016). Étant donné que les protéines et lipides sont nécessaires pour la biocristallisation de l'Hz, il est probable que les modifications observées dans l'Hz soient un épiphénomène de l'activité de la KAF156 sur le dysfonctionnement d'un ou de diverses fonctions métaboliques.

Par ailleurs, il convient de déterminer si ces modifications des caractéristiques de l'Hz sont responsables de la mort des gamétocytes. Comparativement, l'artésunate exerce son action létale sur les gamétocytes jeunes en inhibant la formation de l'Hz et en générant des radicaux oxygénés entre autres (Bridgford et al., 2018; Oujii et al., 2018; Suresh & Haldar, 2018) tandis que la primaquine induit la mort des gamétocytes jeunes et matures via la génération des ERO (Chotsiri et al., 2022; Kiszewski, 2010; Vale et al., 2009). Bien que son mode d'action précis reste à élucider, le bleu de méthylène est également actif sur les gamétocytes jeunes et matures via une probable inhibition de l'antioxydant glutathion réductase (Buchholz et al., 2008). Il est connu que l'inhibition de la production de l'Hz a une action délétère sur les parasites (Bridgford et al., 2018; Herraiz et al., 2019). Toutefois, il n'est pas établi qu'une augmentation de la quantité et de la taille des Hz influe sur la viabilité des parasites. Par conséquent, il serait intéressant d'explorer un lien de causalité entre nos observations et la mort des gamétocytes. Parallèlement, il peut être intéressant d'étudier la présence d'activité redox en réponse au traitement par la KAF156 en mesurant la quantité des ERO. Ces potentiels effets redox de la KAF156 peuvent être comparés avec ceux de la primaquine et du bleu de méthylène afin d'analyser une possible différence.

Cependant, même si nous nous réjouissons de ces résultats prometteurs, nos études présentent certaines limites qui méritent d'être discutées. L'une d'entre elles concerne l'utilisation unique de la microscopie optique pour évaluer la viabilité des gamétocytes indépendamment de notre volonté comme expliquée dans l'introduction du [chapitre III](#) de la partie II. Une méthode d'évaluation directe de la viabilité des gamétocytes devrait être mise en place pour des résultats plus précis de la sensibilité des gamétocytes. La crédibilité de l'étude pourrait être renforcée en faisant des analyses statistiques. Ces dernières sont contraignantes avec les observations de la microscopie électronique qui sont d'ordre qualitatif. De plus, l'utilisation de gamétocytes à différents stades de maturation pourrait introduire une variabilité dans les résultats, ce qui justifierait des expériences avec des populations synchrones de gamétocytes. Enfin, la purification de gamétocytes en gradient de percol pourrait être envisagée avant l'extraction de l'Hz afin d'améliorer la précision de nos observations.

Notre étude, bien que préliminaire, fait progresser nos connaissances sur le mode d'action de la ganaplacide en suggérant pour la première fois une possible interaction directe ou indirecte avec la formation de l'Hz. Cependant, elle laisse des questions en suspens concernant les cibles moléculaires précises. Pour la suite, plusieurs pistes peuvent renforcer notre compréhension des observations de cette étude. L'élucidation des voies moléculaires précises par lesquelles la ganaplacide influence le processus de formation de l'Hz reste un défi pouvant être abordé par des analyses protéomiques et métabolomiques qui peuvent révéler des interactions protéiques cruciales ou des voies affectées par la ganaplacide. Les efforts de collaboration dans divers domaines y compris la parasitologie, la biologie structurale, la biochimie la pharmacologie peuvent contribuer collectivement à une compréhension globale du mode d'action de la ganaplacide.

En conclusion, cette thèse représente une contribution dans le domaine des stratégies de blocage de la transmission du paludisme y compris la production des gamétocytes.

BIBLIOGRAPHIE

- Abay, S. M. (2013). Blocking malaria transmission to Anopheles mosquitoes using artemisinin derivatives and primaquine : A systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 6(1), 278. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-278>
- Abd-Rahman, A. N., Zaloumis, S., McCarthy, J. S., Simpson, J. A., & Commons, R. J. (2021). Scoping Review of Antimalarial Drug Candidates in Phase I and II Drug Development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(2), e01659-21. <https://doi.org/10.1128/aac.01659-21>
- Abdul-Ghani, R., Basco, L. K., Beier, J. C., & Mahdy, M. A. K. (2015). Inclusion of gametocyte parameters in anti-malarial drug efficacy studies : Filling a neglected gap needed for malaria elimination. *Malaria Journal*, 14, 413. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0936-4>
- Abdul-Ghani, R., Farag, H. F., Allam, A. F., & Azazy, A. A. (2014). Measuring resistant-genotype transmission of malaria parasites : Challenges and prospects. *Parasitology Research*, 113(4), 1481-1487. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3789-9>
- Abou Karam, P., Rosenhek-Goldian, I., Ziv, T., Ben Ami Pilo, H., Azuri, I., Rivkin, A., Kiper, E., Rotkopf, R., Cohen, S. R., Torrecilhas, A. C., Avinoam, O., Rojas, A., Morandi, M. I., & Regev-Rudzki, N. (2022). Malaria parasites release vesicle subpopulations with signatures of different destinations. *EMBO Reports*, 23(7), e54755. <https://doi.org/10.15252/embr.202254755>
- Abraham, M., Gagaring, K., Martino, M. L., Vanaerschot, M., Plouffe, D. M., Calla, J., Godinez-Macias, K. P., Du, A. Y., Wree, M., Antonova-Koch, Y., Eribez, K., Luth, M. R., Otilie, S., Fidock, D. A., McNamara, C. W., & Winzeler, E. A. (2020). Probing the Open Global Health Chemical Diversity Library for Multistage-Active Starting Points for Next-Generation Antimalarials. *ACS Infectious Diseases*, 6(4), 613-628. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00482>
- ACCESS-SMC Partnership. (2020). Effectiveness of seasonal malaria chemoprevention at scale in west and central Africa : An observational study. *Lancet (London, England)*, 396(10265), 1829-1840. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32227-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32227-3)
- Adjalley, S. H., Johnston, G. L., Li, T., Eastman, R. T., Ekland, E. H., Eappen, A. G., Richman, A., Sim, B. K. L., Lee, M. C. S., Hoffman, S. L., & Fidock, D. A. (2011). Quantitative assessment of Plasmodium falciparum sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(47), E1214-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112037108>
- Ahluwalia, J., Brooks, S. K., Weinman, J., & Rubin, G. J. (2020). A systematic review of factors affecting adherence to malaria chemoprophylaxis amongst travellers from non-endemic countries. *Malaria Journal*, 19(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-3104-4>
- Aitken, E. H., & Rogerson, S. J. (2022). Tackling variants with antibodies. *eLife*, 11, e77751. <https://doi.org/10.7554/eLife.77751>
- Alemayehu, A. (2023). Biology and epidemiology of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocyte carriage : Implication for malaria control and elimination. *Parasite Epidemiology and Control*, 21, e00295. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2023.e00295>
- Amat-Roze, J.-M. (2002). Aspect de la géographie du paludisme. *L'Information Géographique*, 66(3), 236-243. <https://doi.org/10.3406/ingeo.2002.2814>
- Aminake, M. N., & Pradel, G. (2013). *Antimalarial drugs resistance in Plasmodium falciparum and the current strategies to overcome them* (p. 269-282).

- Aminake, M. N., Schoof, S., Sologub, L., Leubner, M., Kirschner, M., Arndt, H.-D., & Pradel, G. (2011). Thiostrepton and derivatives exhibit antimalarial and gametocytocidal activity by dually targeting parasite proteasome and apicoplast. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(4), 1338-1348. <https://doi.org/10.1128/AAC.01096-10>
- Anamika, K., Verma, S., Jere, A., Desai, A., Anamika, K., Verma, S., Jere, A., & Desai, A. (2016). Transcriptomic Profiling Using Next Generation Sequencing—Advances, Advantages, and Challenges. In *Next Generation Sequencing—Advances, Applications and Challenges*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61789>
- Andolina, C., Ramjith, J., Rek, J., Lanke, K., Okoth, J., Grignard, L., Arinaitwe, E., Briggs, J., Bailey, J., Aydemir, O., Kanya, M. R., Greenhouse, B., Dorsey, G., Staedke, S. G., Drakeley, C., Jonker, M., & Bousema, T. (2023). Plasmodium falciparum gametocyte carriage in longitudinally monitored incident infections is associated with duration of infection and human host factors. *Scientific Reports*, *13*(1), 7072. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33657-3>
- Anstey, N. M., Grigg, M. J., Rajahram, G. S., Cooper, D. J., William, T., Kho, S., & Barber, B. E. (2021). Knowlesi malaria : Human risk factors, clinical spectrum, and pathophysiology. *Advances in parasitology*, *113*, 1-43. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2021.08.001>
- Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L., & Corbellino, M. (2012). Biology of Human Malaria Plasmodia Including Plasmodium Knowlesi. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, *4*(1), e2012013. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.013>
- Antwi-Baffour, S., Malibha-Pinchbeck, M., Stratton, D., Jorfi, S., Lange, S., & Inal, J. (s. d.). Plasma mEV levels in Ghanain malaria patients with low parasitaemia are higher than those of healthy controls, raising the potential for parasite markers in mEVs as diagnostic targets. *Journal of Extracellular Vesicles*, *9*(1), 1697124. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1697124>
- Aponte, J. J., Schellenberg, D., Egan, A., Breckenridge, A., Carneiro, I., Critchley, J., Danquah, I., Doodoo, A., Kobbe, R., Lell, B., May, J., Premji, Z., Sanz, S., Sevene, E., Soulaymani-Becheikh, R., Winstanley, P., Adjei, S., Anemana, S., Chandramohan, D., ... Menendez, C. (2009). Efficacy and safety of intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in African infants : A pooled analysis of six randomised, placebo-controlled trials. *Lancet (London, England)*, *374*(9700), 1533-1542. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61258-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61258-7)
- Armistead, J. S., Moraes Barros, R. R., Gibson, T. J., Kite, W. A., Patrick Mershon, J., Lambert, L., Orr-Gonzalez, S., Sá, J. M., Adams, J. H., & Wellems, T. E. (2018). Infection of mosquitoes from in vitro cultivated Plasmodium knowlesi H strain. *International journal for parasitology*, *48*(8), 601-610. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.02.004>
- Awandare, G. A., Kempaiah, P., Ochiel, D. O., Piazza, P., Keller, C. C., & Perkins, D. J. (2011). Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. *American journal of hematology*, *86*(2), 155-162. <https://doi.org/10.1002/ajh.21933>
- Azmi, W. A., Rizki, A. F. M., Djuardi, Y., Artika, I. M., & Siregar, J. E. (2023). Molecular insights into artemisinin resistance in Plasmodium falciparum: An updated review. *Infection, Genetics and Evolution*, *112*, 105460. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105460>
- Bachmann, A., Bruske, E., Krumkamp, R., Turner, L., Wichers, J. S., Petter, M., Held, J., Duffy, M. F., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., Kremsner, P. G., Lell, B., Lavstsen, T., Frank, M., Mordmüller, B., & Tannich, E. (2019). Controlled human malaria infection with Plasmodium falciparum

- demonstrates impact of naturally acquired immunity on virulence gene expression. *PLoS Pathogens*, 15(7), e1007906. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007906>
- Bahamontes-Rosa, N., Gomez-Lorenzo, M. G., Lelièvre, J., Rodriguez Alejandre, A., Almela, M. J., Lozano, S., Herreros, E., & Gamo, F.-J. (2016). A novel validated assay to support the discovery of new anti-malarial gametocytocidal agents. *Malaria Journal*, 15(1), 385. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1429-9>
- Baker, D. A. (2010). Malaria gametocytogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 172(2), 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019>
- Balaji, S. N., Deshmukh, R., & Trivedi, V. (2020a). Severe malaria : Biology, clinical manifestation, pathogenesis and consequences. *Journal of Vector Borne Diseases*, 57(1), 1-13. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.308793>
- Balaji, S. N., Deshmukh, R., & Trivedi, V. (2020b). Severe malaria : Biology, clinical manifestation, pathogenesis and consequences. *Journal of Vector Borne Diseases*, 57(1), 1-13. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.308793>
- Bancells, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., Kafsack, B. F. C., & Cortés, A. (2019). Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature Microbiology*, 4(1), 144-154. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0291-7>
- Bancone, G., & Chu, C. S. (2021a). G6PD Variants and Haemolytic Sensitivity to Primaquine and Other Drugs. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 638885. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.638885>
- Bancone, G., & Chu, C. S. (2021b). G6PD Variants and Haemolytic Sensitivity to Primaquine and Other Drugs. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.638885>
- Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M., & Goldberg, D. E. (2002). Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 990-995. <https://doi.org/10.1073/pnas.022630099>
- Barnadas, C., Ratsimbaoa, A., Tichit, M., Bouchier, C., Jahevitra, M., Picot, S., & Ménard, D. (2008). *Plasmodium vivax* Resistance to Chloroquine in Madagascar : Clinical Efficacy and Polymorphisms in *pvm-dr1* and *pvcr-t-o* Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(12), 4233-4240. <https://doi.org/10.1128/AAC.00578-08>
- Barnadas, C., Tichit, M., Bouchier, C., Ratsimbaoa, A., Randrianasolo, L., Raherinjafy, R., Jahevitra, M., Picot, S., & Ménard, D. (2008). *Plasmodium vivax* dhfr and dhps mutations in isolates from Madagascar and therapeutic response to sulphadoxine-pyrimethamine. *Malaria Journal*, 7, 35. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-35>
- Bates, M. D., Meshnick, S. R., Sigler, C. I., Leland, P., & Hollingdale, M. R. (1990). In vitro effects of primaquine and primaquine metabolites on exoerythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42(6), 532-537. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.532>
- Baton, L. A., & Ranford-Cartwright, L. C. (2005). Do malaria ookinete surface proteins P25 and P28 mediate parasite entry into mosquito midgut epithelial cells? *Malaria Journal*, 4, 15. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-4-15>
- Berman, J. D. (2019). Approval of Tafenoquine for Malaria Chemoprophylaxis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(6), 1301-1304. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0001>

- Berry, A., Deymier, C., Sertorio, M., Witkowski, B., & Benoit-Vical, F. (2009). Pfs 16 pivotal role in *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis : A potential antiplasmodial drug target. *Experimental Parasitology*, *121*(2), 189-192. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.10.010>
- Bhattacharya, S. (2018). Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process. In *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80477>
- Birkholtz, L.-M., Alano, P., & Leroy, D. (2022). Transmission-blocking drugs for malaria elimination. *Trends in Parasitology*, *38*(5), 390-403. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.01.011>
- Björkman, A., Benn, C. S., Aaby, P., & Schapira, A. (2023). RTS,S/AS01 malaria vaccine—Proven safe and effective? *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00126-3)
- Bobade, D., Khandare, A. V., Deval, M., Shastry, P., & Deshpande, P. (2019). Hemozoin-induced activation of human monocytes toward M2-like phenotype is partially reversed by antimalarial drugs-chloroquine and artemisinin. *MicrobiologyOpen*, *8*(3), e00651. <https://doi.org/10.1002/mbo3.651>
- Boltryk, S. D., Passecker, A., Alder, A., Carrington, E., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G.-J., van der Starre, A., Beck, H.-P., Sauerwein, R. W., Kooij, T. W. A., Brancucci, N. M. B., Proellocks, N., Gilberger, T.-W., & Voss, T. S. (2021). CRISPR/Cas9-engineered inducible gametocyte producer lines as a valuable tool for *Plasmodium falciparum* malaria transmission research. *Nature Communications*, *12*(1), 4806. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24954-4>
- Boschi, D., Pippione, A. C., Sainas, S., & Lolli, M. L. (2019). Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors in anti-infective drug research. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *183*, 111681. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111681>
- Bourée, P. (2006). Aspects actuels du paludisme. *Revue Francophone des Laboratoires*, *2006*(385), 25-38. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(06\)80535-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(06)80535-6)
- Bousema, T., & Drakeley, C. (2011). Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(2), 377-410. <https://doi.org/10.1128/CMR.00051-10>
- Bousema, T., Okell, L., Shekalaghe, S., Griffin, J. T., Omar, S., Sawa, P., Sutherland, C., Sauerwein, R., Ghani, A. C., & Drakeley, C. (2010). Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes : Molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs. *Malaria Journal*, *9*, 136. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-136>
- Bouwman, S. A., Zoleko-Manego, R., Renner, K. C., Schmitt, E. K., Mombo-Ngoma, G., & Grobusch, M. P. (2020). The early preclinical and clinical development of cipargamin (KAE609), a novel antimalarial compound. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *36*, 101765. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101765>
- Bradley, J., Stone, W., Da, D. F., Morlais, I., Dicko, A., Cohuet, A., Guelbeogo, W. M., Mahamar, A., Nsango, S., Soumaré, H. M., Diawara, H., Lanke, K., Graumans, W., Siebelink-Stoter, R., van de Vegte-Bolmer, M., Chen, I., Tiono, A., Gonçalves, B. P., Gosling, R., ... Bousema, T. (s. d.). Predicting the likelihood and intensity of mosquito infection from sex specific *Plasmodium falciparum* gametocyte density. *eLife*, *7*, e34463. <https://doi.org/10.7554/eLife.34463>
- Brancucci, N. M. B., Bertschi, N. L., Zhu, L., Niederwieser, I., Chin, W. H., Wampfler, R., Freymond, C., Rottmann, M., Felger, I., Bozdech, Z., & Voss, T. S. (2014). Heterochromatin protein 1 secures

- survival and transmission of malaria parasites. *Cell Host & Microbe*, 16(2), 165-176.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.004>
- Brancucci, N. M. B., Gerdt, J. P., Wang, C., De Niz, M., Philip, N., Adapa, S. R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S. D., Laffitte, M.-C., Clark, M. A., Grüning, C., Ravel, D., Blancke Soares, A., Demas, A., Bopp, S., Rubio-Ruiz, B., Conejo-Garcia, A., ... Marti, M. (2017). Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*, 171(7), 1532-1544.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.020>
- Brancucci, N. M. B., Goldowitz, I., Buchholz, K., Werling, K., & Marti, M. (2015). An assay to probe *Plasmodium falciparum* growth, transmission stage formation and early gametocyte development. *Nature protocols*, 10(8), 1131-1142. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.072>
- Brega, S., Meslin, B., de Monbrison, F., Severini, C., Gradoni, L., Udomsangpetch, R., Sutanto, I., Peyron, F., & Picot, S. (2005). Identification of the *Plasmodium vivax* mdr-like gene (pvm-dr1) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(2), 272-277. <https://doi.org/10.1086/426830>
- Bridgford, J. L., Xie, S. C., Cobbold, S. A., Pasaje, C. F. A., Herrmann, S., Yang, T., Gillett, D. L., Dick, L. R., Ralph, S. A., Dogovski, C., Spillman, N. J., & Tilley, L. (2018). Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nature Communications*, 9(1), 3801. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06221-1>
- Brod, F., Miura, K., Taylor, I., Li, Y., Marini, A., Salman, A. M., Spencer, A. J., Long, C. A., & Biswas, S. (2018). Combination of RTS,S and Pfs25-IMX313 Induces a Functional Antibody Response Against Malaria Infection and Transmission in Mice. *Frontiers in Immunology*, 9, 2780. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02780>
- Bruce, M. C., Alano, P., Duthie, S., & Carter, R. (1990). Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology*, 100 Pt 2, 191-200. <https://doi.org/10.1017/s0031182000061199>
- Buchholz, K., Burke, T. A., Williamson, K. C., Wiegand, R. C., Wirth, D. F., & Marti, M. (2011). A high-throughput screen targeting malaria transmission stages opens new avenues for drug development. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(10), 1445-1453. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir037>
- Buchholz, K., Schirmer, R. H., Eubel, J. K., Akoachere, M. B., Dandekar, T., Becker, K., & Grömer, S. (2008). Interactions of Methylene Blue with Human Disulfide Reductases and Their Orthologues from *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1), 183-191. <https://doi.org/10.1128/AAC.00773-07>
- Cabrera, A. C. (2019). Collaborative drug discovery and the Tres Cantos Antimalarial Set (TCAMS). *Drug Discovery Today*, 24(6), 1304-1310. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.04.005>
- Camarda, G., Jirawatcharadech, P., Priestley, R. S., Saif, A., March, S., Wong, M. H. L., Leung, S., Miller, A. B., Baker, D. A., Alano, P., Paine, M. J. I., Bhatia, S. N., O'Neill, P. M., Ward, S. A., & Biagini, G. A. (2019). Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11239-0>
- Canning, E. U., & Sinden, R. E. (1975). Nuclear organisation in gametocytes of *Plasmodium* and *Hepatocystis*: A cytochemical study. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 46(4), 297-299. <https://doi.org/10.1007/BF00418523>
- Carter, R. (2003). Speculations on the origins of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends in Parasitology*, 19(5), 214-219. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(03\)00070-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(03)00070-9)

- Carter, R., & Miller, L. H. (1979). Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Bulletin of the World Health Organization*, 57 Suppl 1(Suppl), 37-52.
- Casamassimi, A., Federico, A., Rienzo, M., Esposito, S., & Ciccodicola, A. (2017). Transcriptome Profiling in Human Diseases : New Advances and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1652. <https://doi.org/10.3390/ijms18081652>
- Cassera, M. B., Zhang, Y., Hazleton, K. Z., & Schramm, V. L. (2011). Purine and Pyrimidine Pathways as Targets in *Plasmodium falciparum*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(16), 2103-2115.
- Cenedella, R. J., Jarrell, J. J., & Saxe, L. H. (1969). Lipid synthesis in vivo from 1-14C-oleic acid and 6-3H-glucose by intraerythrocytic *Plasmodium berghei*. *Military Medicine*, 134(10), 1045-1055.
- Chaurasiya, A., Kumari, G., Garg, S., Shoaib, R., Anam, Z., Joshi, N., Kumari, J., Singhal, J., Singh, N., Kaushik, S., Kahlon, A. K., Dubey, N., Maurya, M. K., Srivastava, P., Marothia, M., Joshi, P., Gupta, K., Saini, S., Das, G., ... Ranganathan, A. (2022). Targeting Artemisinin-Resistant Malaria by Repurposing the Anti-Hepatitis C Virus Drug Alisporivir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(12), e0039222. <https://doi.org/10.1128/aac.00392-22>
- Chen, I., & Ishengoma, D. S. (2023). Ganaplacide plus lumefantrine solid dispersion formulation : Considerations for development and rollout. *The Lancet Infectious Diseases*, 23(9), 990-992. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00231-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00231-1)
- Chima, R. I., Goodman, C. A., & Mills, A. (2003). The economic impact of malaria in Africa : A critical review of the evidence. *Health Policy (Amsterdam, Netherlands)*, 63(1), 17-36. [https://doi.org/10.1016/s0168-8510\(02\)00036-2](https://doi.org/10.1016/s0168-8510(02)00036-2)
- Chotsiri, P., Mahamar, A., Hoglund, R. M., Koita, F., Sanogo, K., Diawara, H., Dicko, A., Simpson, J. A., Bousema, T., White, N. J., Brown, J. M., Gosling, R., Chen, I., & Tarning, J. (2022). Mechanistic Modeling of Primaquine Pharmacokinetics, Gametocytocidal Activity, and Mosquito Infectivity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 111(3), 676-685. <https://doi.org/10.1002/cpt.2512>
- Chou, E. S., Abidi, S. Z., Teye, M., Leliwa-Sytek, A., Rask, T. S., Cobbold, S. A., Tonkin-Hill, G. Q., Subramaniam, K. S., Sexton, A. E., Creek, D. J., Daily, J. P., Duffy, M. F., & Day, K. P. (2018). A high parasite density environment induces transcriptional changes and cell death in *Plasmodium falciparum* blood stages. *The FEBS Journal*, 285(5), 848-870. <https://doi.org/10.1111/febs.14370>
- Christofinis, G. J., & Miller, H. (1983). A simplified method for cryopreservation of *Plasmodium falciparum* from continuous in vitro cultures. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 77(2), 123-126.
- Chu, C. S., Bancone, G., Nosten, F., White, N. J., & Luzzatto, L. (2018). Primaquine-induced haemolysis in females heterozygous for G6PD deficiency. *Malaria Journal*, 17(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2248-y>
- Churcher, T. S., Bousema, T., Walker, M., Drakeley, C., Schneider, P., Ouédraogo, A. L., & Basáñez, M.-G. (2013). Predicting mosquito infection from *Plasmodium falciparum* gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *eLife*, 2, e00626. <https://doi.org/10.7554/eLife.00626>
- Clements, R. L., Morano, A. A., Navarro, F. M., McGee, J. P., Du, E. W., Strega, V. A., Lindner, S. E., & Dvorin, J. D. (2022). Identification of basal complex protein that is essential for maturation of transmission-stage malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(34), e2204167119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2204167119>

- Coalson, J. E., Cohee, L. M., Buchwald, A. G., Nyambalo, A., Kubale, J., Seydel, K. B., Mathanga, D., Taylor, T. E., Laufer, M. K., & Wilson, M. L. (2018). Simulation models predict that school-age children are responsible for most human-to-mosquito *Plasmodium falciparum* transmission in southern Malawi. *Malaria Journal*, *17*(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2295-4>
- Coalson, J. E., Walldorf, J. A., Cohee, L. M., Ismail, M. D., Mathanga, D., Cordy, R. J., Marti, M., Taylor, T. E., Seydel, K. B., Laufer, M. K., & Wilson, M. L. (2016). High prevalence of *Plasmodium falciparum* gametocyte infections in school-age children using molecular detection : Patterns and predictors of risk from a cross-sectional study in southern Malawi. *Malaria Journal*, *15*(1), 527. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1587-9>
- Cohee, L. M., Opondo, C., Clarke, S. E., Halliday, K. E., Cano, J., Shipper, A. G., Barger-Kamate, B., Djimde, A., Diarra, S., Dokras, A., Kanya, M. R., Lutumba, P., Ly, A. B., Nankabirwa, J. I., Njagi, J. K., Maiga, H., Maiteki-Sebuguzi, C., Matangila, J., Okello, G., ... Chico, R. M. (2020). Preventive malaria treatment among school-aged children in sub-Saharan Africa : A systematic review and meta-analyses. *The Lancet. Global health*, *8*(12), e1499-e1511. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30325-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30325-9)
- Cohee, L. M., Valim, C., Coalson, J. E., Nyambalo, A., Chilombe, M., Ngwira, A., Bauleni, A., Seydel, K. B., Wilson, M. L., Taylor, T. E., Mathanga, D. P., & Laufer, M. K. (2021). School-based screening and treatment may reduce *P. falciparum* transmission. *Scientific Reports*, *11*(1), 6905. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86450-5>
- Cohen, J. M., Okumu, F., & Moonen, B. (2022). The fight against malaria : Diminishing gains and growing challenges. *Science Translational Medicine*, *14*(651), eabn3256. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abn3256>
- Cohen, J. M., Smith, D. L., Cotter, C., Ward, A., Yamey, G., Sabot, O. J., & Moonen, B. (2012). Malaria resurgence : A systematic review and assessment of its causes. *Malaria Journal*, *11*, 122. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-122>
- Coleman, B. I., Skillman, K. M., Jiang, R. H. Y., Childs, L. M., Altenhofen, L. M., Ganter, M., Leung, Y., Goldowitz, I., Kafsack, B. F. C., Marti, M., Llinás, M., Buckee, C. O., & Duraisingh, M. T. (2014). A *Plasmodium falciparum* histone deacetylase regulates antigenic variation and gametocyte conversion. *Cell Host & Microbe*, *16*(2), 177-186. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.014>
- Collins, K. A., Wang, C. Y., Adams, M., Mitchell, H., Rampton, M., Elliott, S., Reuling, I. J., Bousema, T., Sauerwein, R., Chalon, S., Möhrle, J. J., & McCarthy, J. S. (2018). A controlled human malaria infection model enabling evaluation of transmission-blocking interventions. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(4), 1551-1562. <https://doi.org/10.1172/JCI98012>
- Colmenarejo, G., Lozano, S., González-Cortés, C., Calvo, D., Sanchez-Garcia, J., Matilla, J.-L. P., Leroy, D., & Rodrigues, J. (2018). Predicting transmission blocking potential of anti-malarial compounds in the Mosquito Feeding Assay using *Plasmodium falciparum* Male Gamete Inhibition Assay. *Scientific Reports*, *8*(1), 7764. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26125-w>
- Commons, R. J., Simpson, J. A., Watson, J., White, N. J., & Price, R. N. (2020). Estimating the Proportion of *Plasmodium vivax* Recurrences Caused by Relapse : A Systematic Review and Meta-Analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *103*(3), 1094-1099. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0186>

- Counihan, N. A., Modak, J. K., & de Koning-Ward, T. F. (2021). How Malaria Parasites Acquire Nutrients From Their Host. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 649184. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.649184>
- Cowell, A. N., & Winzeler, E. A. (2019). The genomic architecture of antimalarial drug resistance. *Briefings in Functional Genomics*, 18(5), 314-328. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elz008>
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria : Biology and Disease. *Cell*, 167(3), 610-624. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
- Dalapati, T., & Moore, J. M. (2021). Hemozoin : A Complex Molecule with Complex Activities. *Current Clinical Microbiology Reports*, 8(2), 87-102. <https://doi.org/10.1007/s40588-021-00166-8>
- D'Alessandro, S., Silvestrini, F., Dechering, K., Corbett, Y., Parapini, S., Timmerman, M., Galastri, L., Basílico, N., Sauerwein, R., Alano, P., & Taramelli, D. (2013). A Plasmodium falciparum screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(9), 2048-2058. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt165>
- Dash, M., Sachdeva, S., Bansal, A., & Sinha, A. (2022). Gametogenesis in Plasmodium : Delving Deeper to Connect the Dots. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 877907. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.877907>
- Day, K. P., Hayward, R. E., & Dyer, M. (1998). The biology of Plasmodium falciparum transmission stages. *Parasitology*, 116 Suppl, S95-109. <https://doi.org/10.1017/s0031182000084985>
- De Niz, M., Burda, P.-C., Kaiser, G., Del Portillo, H. A., Spielmann, T., Frischknecht, F., & Heussler, V. T. (2017). Progress in imaging methods : Insights gained into Plasmodium biology. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(1), 37-54. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.158>
- de Almeida, M. E. M., de Vasconcelos, M. G. S., Tarragô, A. M., & Mariúba, L. A. M. (2021). Circumsporozoite Surface Protein-based malaria vaccines : A review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 63, e11. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202163011>
- Dearnley, M. K., Yeoman, J. A., Hanssen, E., Kenny, S., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Tilley, L., & Dixon, M. W. A. (2012). Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of Plasmodium falciparum gametocytes. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 8), 2053-2063. <https://doi.org/10.1242/jcs.099002>
- de Carvalho, L. P., Kreidenweiss, A., & Held, J. (2021). The preclinical discovery and development of rectal artesunate for the treatment of malaria in young children : A review of the evidence. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 16(1), 13-22. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1804357>
- Delves, M. J., Miguel-Blanco, C., Matthews, H., Molina, I., Ruecker, A., Yahiya, S., Straschil, U., Abraham, M., León, M. L., Fischer, O. J., Rueda-Zubiaurre, A., Brandt, J. R., Cortés, Á., Barnard, A., Fuchter, M. J., Calderón, F., Winzeler, E. A., Sinden, R. E., Herreros, E., ... Baum, J. (2018). A high throughput screen for next-generation leads targeting malaria parasite transmission. *Nature Communications*, 9, 3805. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05777-2>
- Delves, M. J., Ruecker, A., Straschil, U., Lelièvre, J., Marques, S., López-Barragán, M. J., Herreros, E., & Sinden, R. E. (2013). Male and female Plasmodium falciparum mature gametocytes show different responses to antimalarial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3268-3274. <https://doi.org/10.1128/AAC.00325-13>
- Delves, M. J., Straschil, U., Ruecker, A., Miguel-Blanco, C., Marques, S., Dufour, A. C., Baum, J., & Sinden, R. E. (2016). Routine in vitro culture of P. falciparum gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions. *Nature Protocols*, 11(9), 1668-1680. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.096>

- Demanga, C. G., Eng, J. W. L., Gardiner, D. L., Roth, A., Butterworth, A., Adams, J. H., Trenholme, K. R., & Dalton, J. P. (2017). The development of sexual stage malaria gametocytes in a Wave Bioreactor. *Parasites & Vectors*, *10*, 216. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2155-z>
- de Santi, V. P., Khaireh, B. A., Chiniard, T., Pradines, B., Taudon, N., Larréché, S., Mohamed, A. B., de Laval, F., Berger, F., Gala, F., Mokrane, M., Benoit, N., Malan, L., Abdi, A. A., & Briolant, S. (2021). Role of Anopheles stephensi Mosquitoes in Malaria Outbreak, Djibouti, 2019. *Emerging Infectious Diseases*, *27*(6), 1697-1700. <https://doi.org/10.3201/eid2706.204557>
- DeVos, E., & Dunn, N. (2023). Malaria Prophylaxis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551639/>
- Dhorda, M., Amaratunga, C., & Dondorp, A. M. (2021). Artemisinin and multidrug-resistant Plasmodium falciparum—A threat for malaria control and elimination. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *34*(5), 432-439. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000766>
- Dilanian, R. A., Streltsov, V., Coughlan, H. D., Quiney, H. M., Martin, A. V., Klonis, N., Dogovski, C., Boutet, S., Messerschmidt, M., Williams, G. J., Williams, S., Phillips, N. W., Nugent, K. A., Tilley, L., & Abbey, B. (2017). Nanocrystallography measurements of early stage synthetic malaria pigment. *Journal of Applied Crystallography*, *50*(Pt 5), 1533-1540. <https://doi.org/10.1107/S1600576717012663>
- Dinglasan, R. R., & Jacobs-Lorena, M. (2008). Flipping the paradigm on malaria transmission-blocking vaccines. *Trends in Parasitology*, *24*(8), 364-370. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.002>
- Dinko, B., Awuah, D., Boamong, K., Larbi, J. A., Bousema, T., & Sutherland, C. J. (2023). Prevalence of Plasmodium falciparum gametocytaemia in asymptomatic school children before and after treatment with dihydroartemisinin-piperaquine (DP). *Parasite Epidemiology and Control*, *21*, e00292. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2023.e00292>
- Dixon, M. W. A., Dearnley, M. K., Hanssen, E., Gilberger, T., & Tilley, L. (2012). Shape-shifting gametocytes : How and why does P. falciparum go banana-shaped? *Trends in Parasitology*, *28*(11), 471-478. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.007>
- Dixon, M. W. A., & Tilley, L. (2021). Plasmodium falciparum goes bananas for sex. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *244*, 111385. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2021.111385>
- DNDi – Best science for the most neglected*. (2019, octobre 15). <https://dndi.org/>
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S. S., Yeung, S., Singhasivanon, P., ... White, N. J. (2009). Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. *The New England journal of medicine*, *361*(5), 455-467. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808859>
- Doolan, D. L., Dobaño, C., & Baird, J. K. (2009). Acquired Immunity to Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(1), 13-36. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08>
- Douglas, N. M., Piera, K. A., Rumaseb, A., Ley, B., Anstey, N. M., & Price, R. N. (2023). Primaquine-induced Severe Hemolysis in the Absence of Concomitant Malaria : Effects on G6PD Activity and Renal Function. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *108*(1), 76-80. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0834>
- Douglas, N. M., Pontororing, G. J., Lampah, D. A., Yeo, T. W., Kenangalem, E., Poespoprodjo, J. R., Ralph, A. P., Bangs, M. J., Sugiarto, P., Anstey, N. M., & Price, R. N. (2014). Mortality attributable to Plasmodium vivax malaria : A clinical audit from Papua, Indonesia. *BMC Medicine*, *12*, 217. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0217-z>

- Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., Carr, B., Redman, C. W. G., Harris, A. L., Dobson, P. J., Harrison, P., & Sargent, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine*, 7(6), 780-788. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>
- Duffy, M. F., Selvarajah, S. A., Josling, G. A., & Petter, M. (2012). The role of chromatin in Plasmodium gene expression. *Cellular Microbiology*, 14(6), 819-828. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01777.x>
- Duffy, P. E. (2022). The Virtues and Vices of Pfs230 : From Vaccine Concept to Vaccine Candidate. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, tpm211337. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-1337>
- Duffy, P. E., & Patrick Gorres, J. (2020). Malaria vaccines since 2000 : Progress, priorities, products. *NPJ Vaccines*, 5, 48. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0196-3>
- Duffy, S., & Avery, V. M. (2013). Identification of inhibitors of Plasmodium falciparum gametocyte development. *Malaria Journal*, 12, 408. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-408>
- Duffy, S., Sykes, M. L., Jones, A. J., Shelper, T. B., Simpson, M., Lang, R., Poulsen, S.-A., Sleebs, B. E., & Avery, V. M. (2017). Screening the Medicines for Malaria Venture Pathogen Box across Multiple Pathogens Reclassifies Starting Points for Open-Source Drug Discovery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(9), e00379-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00379-17>
- Dundas, K., Shears, M. J., Sinnis, P., & Wright, G. J. (2019). Important Extracellular Interactions between Plasmodium Sporozoites and Host Cells Required for Infection. *Trends in parasitology*, 35(2), 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.008>
- Dyer, M., & Day, K. P. (2000). Commitment to gametocytogenesis in Plasmodium falciparum. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 16(3), 102-107. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(99\)01608-7](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01608-7)
- Egan, T. J. (2002). Physico-chemical aspects of hemozoin (malaria pigment) structure and formation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(1), 19-26. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(02\)00372-0](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00372-0)
- Egan, T. J. (2008). Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(5-6), 1288-1299. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.12.004>
- Egwu, C. O., Pério, P., Augereau, J.-M., Tsamesidis, I., Benoit-Vical, F., & Reybier, K. (2022). Resistance to artemisinin in falciparum malaria parasites : A redox-mediated phenomenon. *Free Radical Biology & Medicine*, 179, 317-327. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.016>
- Egwu, C. O., Tsamesidis, I., Pério, P., Augereau, J.-M., Benoit-Vical, F., & Reybier, K. (2021). Superoxide : A major role in the mechanism of action of essential antimalarial drugs. *Free Radical Biology & Medicine*, 167, 271-275. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.001>
- El-Moamly, A. A., & El-Sweify, M. A. (2023). Malaria vaccines : The 60-year journey of hope and final success—lessons learned and future prospects. *Tropical Medicine and Health*, 51, 29. <https://doi.org/10.1186/s41182-023-00516-w>
- Enayati, A., Hanafi-Bojd, A. A., Sedaghat, M. M., Zaim, M., & Hemingway, J. (2020). Evolution of insecticide resistance and its mechanisms in Anopheles stephensi in the WHO Eastern Mediterranean Region. *Malaria Journal*, 19(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03335-0>
- Esslinger, C. W., Picot, S., & Ambroise-Thomas, P. (1994). Intra-erythrocytic Plasmodium falciparum induces up-regulation of inter-cellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells in vitro.

- Scandinavian Journal of Immunology*, 39(3), 229-232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1994.tb03365.x>
- Eugenin, E. A., Martiney, J. A., & Berman, J. W. (2019). The malaria toxin hemozoin induces apoptosis in human neurons and astrocytes : Potential role in the pathogenesis of cerebral malaria. *Brain Research*, 1720, 146317. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146317>
- Evers, F., Cabrera-Orefice, A., Elurbe, D. M., Kea-te Lindert, M., Boltryk, S. D., Voss, T. S., Huynen, M. A., Brandt, U., & Kooij, T. W. A. (2021). Composition and stage dynamics of mitochondrial complexes in *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications*, 12, 3820. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23919-x>
- Ezzet, F., van Vugt, M., Nosten, F., Looareesuwan, S., & White, N. J. (2000). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lumefantrine (Benflumetol) in Acute *Falciparum* Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 697-704.
- Fan, Y., Qin, L., Huang, Z., Liang, S., Huang, X., Zeng, S., Liu, Y., & Wang, H. (2022). Preliminary Assessment of Intramuscular Depot of Lipid-Based Decoquinatone Formulation for Long-Term Chemoprophylaxis of Malaria. *Pharmaceutics*, 14(12), 2813. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122813>
- Filarsky, M., Fraschka, S. A., Niederwieser, I., Brancucci, N. M. B., Carrington, E., Carrió, E., Moes, S., Jenoe, P., Bártfai, R., & Voss, T. S. (2018). GDV1 induces sexual commitment of malaria parasites by antagonizing HP1-dependent gene silencing. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6381), 1259-1263. <https://doi.org/10.1126/science.aan6042>
- Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W. (2010). Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27(5), 796-810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>
- Foguim, F. T., Robert, M. G., Gueye, M. W., Gendrot, M., Diawara, S., Mosnier, J., Amalvict, R., Benoit, N., Bercion, R., Fall, B., Madamet, M., & Pradines, B. (2019). Low polymorphisms in *pfact*, *pfugt* and *pfearl* genes in African *Plasmodium falciparum* isolates and absence of association with susceptibility to common anti-malarial drugs. *Malaria Journal*, 18, 293. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2919-3>
- Fontinha, D., Moules, I., & Prudêncio, M. (2020). Repurposing Drugs to Fight Hepatic Malaria Parasites. *Molecules*, 25(15), 3409. <https://doi.org/10.3390/molecules25153409>
- Forkuo, A. D., Ansah, C., Mensah, K. B., Annan, K., Gyan, B., Theron, A., Mancama, D., & Wright, C. W. (2017). In vitro anti-malarial interaction and gametocytocidal activity of cryptolepine. *Malaria Journal*, 16(1), 496. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2142-z>
- Francis, S. E., Sullivan, D. J., & Goldberg, D. E. (1997). Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology*, 51, 97-123. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.97>
- Frevert, U., Sinnis, P., Cerami, C., Shreffler, W., Takacs, B., & Nussenzweig, V. (1993). Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(5), 1287-1298. <https://doi.org/10.1084/jem.177.5.1287>
- Frita, R., Carapau, D., Mota, M. M., & Hänscheid, T. (2012). In Vivo Hemozoin Kinetics after Clearance of *Plasmodium berghei* Infection in Mice. *Malaria Research and Treatment*, 2012, 373086. <https://doi.org/10.1155/2012/373086>

- Fuehrer, H.-P., Campino, S., & Sutherland, C. J. (2022). The primate malaria parasites *Plasmodium malariae*, *Plasmodium brasilianum* and *Plasmodium ovale* spp. : Genomic insights into distribution, dispersal and host transitions. *Malaria Journal*, 21, 138. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04151-4>
- Galatas, B., Bassat, Q., & Mayor, A. (2016). Malaria Parasites in the Asymptomatic : Looking for the Hay in the Haystack. *Trends in Parasitology*, 32(4), 296-308. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.015>
- Gallup, J. L., & Sachs, J. D. (2001). The economic burden of malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64(1-2 Suppl), 85-96. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.64.85>
- Gardiner, D. L., & Trenholme, K. R. (2015). *Plasmodium falciparum* gametocytes : Playing hide and seek. *Annals of Translational Medicine*, 3(4), 45. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.01.23>
- Gardner, A., Reece, S. E., & West, S. A. (2003). Even more extreme fertility insurance and the sex ratios of protozoan blood parasites. *Journal of Theoretical Biology*, 223(4), 515-521. [https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(03)00142-5)
- Gardner, M. J., Shallom, S. J., Carlton, J. M., Salzberg, S. L., Nene, V., Shoaibi, A., Ciecko, A., Lynn, J., Rizzo, M., Weaver, B., Jarrahi, B., Brenner, M., Parvizi, B., Tallon, L., Moazzez, A., Granger, D., Fujii, C., Hansen, C., Pederson, J., ... Fraser, C. M. (2002). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature*, 419(6906), 531-534. <https://doi.org/10.1038/nature01094>
- Gautret, P., & Motard, A. (1999). Periodic infectivity of *Plasmodium* gametocytes to the vector. A review. *Parasite (Paris, France)*, 6(2), 103-111. <https://doi.org/10.1051/parasite/1999062103>
- Gbotosho, G. O., Sowunmi, A., Happi, C. T., & Okuboyejo, T. M. (2011). *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage, sex ratios and asexual parasite rates in Nigerian children before and after a treatment protocol policy change instituting the use of artemisinin-based combination therapies. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 685-690. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000600007>
- Gething, P. W., Casey, D. C., Weiss, D. J., Bisanzio, D., Bhatt, S., Cameron, E., Battle, K. E., Dalrymple, U., Rozier, J., Rao, P. C., Kutz, M. J., Barber, R. M., Huynh, C., Shackelford, K. A., Coates, M. M., Nguyen, G., Fraser, M. S., Kulikoff, R., Wang, H., ... Lim, S. S. (2016). Mapping *Plasmodium falciparum* Mortality in Africa between 1990 and 2015. *The New England journal of medicine*, 375(25), 2435-2445. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606701>
- Ginsburg, H. (2010). Metabolism : Malaria parasite stands out. *Nature*, 466(7307), 702-703. <https://doi.org/10.1038/466702a>
- Goldberg, D. E. (2005). Hemoglobin degradation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 295, 275-291. https://doi.org/10.1007/3-540-29088-5_11
- Gonçalves, B. P., Kapulu, M. C., Sawa, P., Guelbéogo, W. M., Tiono, A. B., Grignard, L., Stone, W., Hellewell, J., Lanke, K., Bastiaens, G. J. H., Bradley, J., Nébié, I., Ngoi, J. M., Oriango, R., Mkabili, D., Nyaurah, M., Midega, J., Wirth, D. F., Marsh, K., ... Bousema, T. (2017). Examining the human infectious reservoir for *Plasmodium falciparum* malaria in areas of differing transmission intensity. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01270-4>
- Gonçalves, D., & Hunziker, P. (2016). Transmission-blocking strategies : The roadmap from laboratory bench to the community. *Malaria Journal*, 15, 95. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1163-3>

- Goulielmaki, E., Kaforou, S., Venugopal, K., Loukeris, T. G., Siden-Kiamos, I., & Koussis, K. (2018). Distinct effects of HIV protease inhibitors and ERAD inhibitors on zygote to ookinete transition of the malaria parasite. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *220*, 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.12.003>
- Graves, P. M., Choi, L., Gelband, H., & Garner, P. (2018). Primaquine or other 8-aminoquinolines for reducing *Plasmodium falciparum* transmission. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2*(2), CD008152. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008152.pub5>
- Gruell, H., Hamacher, L., Jennissen, V., Tuchscherer, A., Ostendorf, N., Löffler, T., Hallek, M., Kochanek, M., Tannich, E., Böll, B., & Fätkenheuer, G. (2017). On Taking a Different Route : An Unlikely Case of Malaria by Nosocomial Transmission. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *65*(8), 1404-1406. <https://doi.org/10.1093/cid/cix520>
- Guggisberg, A. M., Amthor, R. E., & Odom, A. R. (2014). Isoprenoid biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*, *13*(11), 1348-1359. <https://doi.org/10.1128/EC.00160-14>
- Guillaume Zango, W.-W., Faucher, J.-F., & Desmoulière, A. (2023). Mesures préventives et nouveaux outils de lutte contre le paludisme. *Actualités Pharmaceutiques*, *62*(623), 39-43. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2023.01.011>
- Guimarães, L. O., Fernandes, F., Monteiro, E. F., Curado, I., Holcman, M. M., Wunderlich, G., Santos, S. E., Soler, J. M., & Kirchgatter, K. (2018). Influence of polymorphisms in toll-like receptors (TLRs) on malaria susceptibility in low-endemic area of the Atlantic Forest, São Paulo, Brazil. *Acta Tropica*, *182*, 309-316. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.03.011>
- Gulati, S., Ekland, E. H., Ruggles, K. V., Chan, R. B., Jayabalasingham, B., Zhou, B., Mantel, P.-Y., Lee, M. C. S., Spottiswoode, N., Coburn-Flynn, O., Hjelmqvist, D., Worgall, T. S., Marti, M., Di Paolo, G., & Fidock, D. A. (2015). Profiling the Essential Nature of Lipid Metabolism in Asexual Blood and Gametocyte Stages of *Plasmodium falciparum*. *Cell Host & Microbe*, *18*(3), 371-381. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.08.003>
- Gupta, P., Pandey, R., Thakur, V., Parveen, S., Kaur, I., Panda, A., Bishi, R., Mehrotra, S., Akhtar, A., Gupta, D., Mohammed, A., & Malhotra, P. (2022). Heme Detoxification Protein (PfHDP) is essential for the hemoglobin uptake and metabolism in *Plasmodium falciparum*. *FASEB bioAdvances*, *4*(10), 662-674. <https://doi.org/10.1096/fba.2022-00021>
- Guy, R., Liu, P., Pennefather, P., & Crandall, I. (2007). The use of fluorescence enhancement to improve the microscopic diagnosis of *falciparum* malaria. *Malaria Journal*, *6*, 89. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-89>
- Hamilton, W. D. (1967). Extraordinary sex ratios. A sex-ratio theory for sex linkage and inbreeding has new implications in cytogenetics and entomology. *Science (New York, N.Y.)*, *156*(3774), 477-488. <https://doi.org/10.1126/science.156.3774.477>
- Hanssen, E., Knoechel, C., Dearnley, M., Dixon, M. W. A., Le Gros, M., Larabell, C., & Tilley, L. (2012). Soft X-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Structural Biology*, *177*(2), 224-232. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.09.003>
- Hawadak, J., Dongang Nana, R. R., & Singh, V. (2021). Global trend of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* spp. malaria infections in the last two decades (2000–2020) : A systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, *14*, 297. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04797-0>

- Hayward, R. E., Sullivan, D. J., & Day, K. P. (2000). Plasmodium falciparum : Histidine-rich protein II is expressed during gametocyte development. *Experimental Parasitology*, *96*(3), 139-146. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4557>
- Healy, S. A., Anderson, C., Swihart, B. J., Mwakingwe, A., Gabriel, E. E., Decederfelt, H., Hobbs, C. V., Rausch, K. M., Zhu, D., Muratova, O., Herrera, R., Scaria, P. V., MacDonald, N. J., Lambert, L. E., Zaidi, I., Coelho, C. H., Renn, J. P., Wu, Y., Narum, D. L., & Duffy, P. E. (2021). Pfs230 yields higher malaria transmission-blocking vaccine activity than Pfs25 in humans but not mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(7), e146221, 146221. <https://doi.org/10.1172/JCI146221>
- Hemingway, J., Shretta, R., Wells, T. N. C., Bell, D., Djimdé, A. A., Achee, N., & Qi, G. (2016). Tools and Strategies for Malaria Control and Elimination : What Do We Need to Achieve a Grand Convergence in Malaria? *PLoS Biology*, *14*(3), e1002380. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002380>
- Hempelmann, E. (2007). Hemozoin biocrystallization in Plasmodium falciparum and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. *Parasitology Research*, *100*(4), 671-676. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0313-x>
- Herraiz, T., Guillén, H., González-Peña, D., & Arán, V. J. (2019). Antimalarial Quinoline Drugs Inhibit β -Hematin and Increase Free Hemin Catalyzing Peroxidative Reactions and Inhibition of Cysteine Proteases. *Scientific Reports*, *9*, 15398. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51604-z>
- Hoang, A. N., Ncokazi, K. K., de Villiers, K. A., Wright, D. W., & Egan, T. J. (2010). Crystallization of synthetic haemozoin (beta-haematin) nucleated at the surface of lipid particles. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, *39*(5), 1235-1244. <https://doi.org/10.1039/b914359a>
- Hoang, A. N., Sandlin, R. D., Omar, A., Egan, T. J., & Wright, D. W. (2010). The Neutral Lipid Composition Present in the Digestive Vacuole of Plasmodium falciparum Concentrates Heme and Mediates β -Hematin Formation with an Unusually Low Activation Energy. *Biochemistry*, *49*(47), 10107-10116. <https://doi.org/10.1021/bi101397u>
- Hong, Y. L., Yang, Y. Z., & Meshnick, S. R. (1994). The interaction of artemisinin with malarial hemozoin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *63*(1), 121-128. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90014-0)
- Huber, J. H., Koepfli, C., España, G., Nekkab, N., White, M. T., & Alex Perkins, T. (2021). How radical is radical cure? Site-specific biases in clinical trials underestimate the effect of radical cure on Plasmodium vivax hypnozoites. *Malaria Journal*, *20*(1), 479. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-04017-1>
- Ippolito, M. M., Johnson, J., Mullin, C., Mallow, C., Morgan, N., Wallender, E., Li, T., & Rosenthal, P. J. (2017). The Relative Effects of Artemether-lumefantrine and Non-artemisinin Antimalarials on Gametocyte Carriage and Transmission of Plasmodium falciparum : A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *65*(3), 486-494. <https://doi.org/10.1093/cid/cix336>
- Ippolito, M. M., Moser, K. A., Kabuya, J.-B. B., Cunningham, C., & Juliano, J. J. (2021). Antimalarial Drug Resistance and Implications for the WHO Global Technical Strategy. *Current Epidemiology Reports*, *8*(2), 46-62. <https://doi.org/10.1007/s40471-021-00266-5>
- Ivanescu, B., Miron, A., & Corciova, A. (2015). Sesquiterpene Lactones from Artemisia Genus : Biological Activities and Methods of Analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, *2015*, 247685. <https://doi.org/10.1155/2015/247685>

- Iwuafor, A., Ogban, G., Emanghe, U., Erengwa, P., Offiong, A., Nsor, G., & Owai, P. (2023). Artemisinin drug resistance and monitoring : A narrative review. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 24, 112-119. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v24i2.1>
- Izak, D., Klim, J., & Kaczanowski, S. (2018). Host-parasite interactions and ecology of the malaria parasite—a bioinformatics approach. *Briefings in Functional Genomics*, 17(6), 451-457. <https://doi.org/10.1093/bfgp/ely013>
- Jamjoom, G. A. (2017). Evidence for a role of hemozoin in metabolism and gametocytogenesis. *MalariaWorld Journal*, 8, 10.
- Jani, D., Nagarkatti, R., Beatty, W., Angel, R., Slebodnick, C., Andersen, J., Kumar, S., & Rathore, D. (2008). HDP—A Novel Heme Detoxification Protein from the Malaria Parasite. *PLoS Pathogens*, 4(4), e1000053. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000053>
- Jepson, W. F., Moutia, A., & Courtois, C. (1947). The malaria problem in Mauritius; the bionomics of Mauritian anophelines. *Bulletin of Entomological Research*, 38(1), 177-208. <https://doi.org/10.1017/s0007485300030273>
- Jiang, X. (2022). An overview of the Plasmodium falciparum hexose transporter and its therapeutic interventions. *Proteins*, 90(10), 1766-1778. <https://doi.org/10.1002/prot.26351>
- Josling, G. A., Williamson, K. C., & Llinás, M. (2018). Regulation of Sexual Commitment and Gametocytogenesis in Malaria Parasites. *Annual Review of Microbiology*, 72, 501-519. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062712>
- Kafsack, B. F. C., Rovira-Graells, N., Clark, T. G., Bancells, C., Crowley, V. M., Campino, S. G., Williams, A. E., Drought, L. G., Kwiatkowski, D. P., Baker, D. A., Cortés, A., & Llinás, M. (2014). A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in human malaria parasites. *Nature*, 507(7491), 248-252. <https://doi.org/10.1038/nature12920>
- Kapishnikov, S., Grolimund, D., Schneider, G., Pereiro, E., McNally, J. G., Als-Nielsen, J., & Leiserowitz, L. (2017). Unraveling heme detoxification in the malaria parasite by in situ correlative X-ray fluorescence microscopy and soft X-ray tomography. *Scientific Reports*, 7, 7610. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06650-w>
- Kapishnikov, S., Hempelmann, E., Elbaum, M., Als-Nielsen, J., & Leiserowitz, L. (2021). Malaria Pigment Crystals : The Achilles' Heel of the Malaria Parasite. *Chemmedchem*, 16(10), 1515-1532. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000895>
- Kapishnikov, S., Staalø, T., Yang, Y., Lee, J., Pérez-Berná, A. J., Pereiro, E., Yang, Y., Werner, S., Guttmann, P., Leiserowitz, L., & Als-Nielsen, J. (2019). Mode of action of quinoline antimalarial drugs in red blood cells infected by Plasmodium falciparum revealed in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(46), 22946-22952. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910123116>
- Kapishnikov, S., Weiner, A., Shimoni, E., Guttmann, P., Schneider, G., Dahan-Pasternak, N., Dzikowski, R., Leiserowitz, L., & Elbaum, M. (2012). Oriented nucleation of hemozoin at the digestive vacuole membrane in Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(28), 11188-11193. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118120109>
- Kapoor, N., Vanjak, I., Rozzelle, J., Berges, A., Chan, W., Yin, G., Tran, C., Sato, A. K., Steiner, A. R., Pham, T. P., Birkett, A. J., Long, C. A., Fairman, J., & Miura, K. (2018). Malaria Derived Glycosylphosphatidylinositol Anchor Enhances Anti-Pfs25 Functional Antibodies That Block Malaria Transmission. *Biochemistry*, 57(5), 516-519. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01099>

- Kato, N., Comer, E., Sakata-Kato, T., Sharma, A., Sharma, M., Maetani, M., Bastien, J., Brancucci, N. M., Bittker, J. A., Corey, V., Clarke, D., Derbyshire, E. R., Dornan, G. L., Duffy, S., Eckley, S., Itoe, M. A., Koolen, K. M. J., Lewis, T. A., Lui, P. S., ... Schreiber, S. L. (2016). Diversity-oriented synthesis yields novel multistage antimalarial inhibitors. *Nature*, *538*(7625), 344-349. <https://doi.org/10.1038/nature19804>
- Keister, D. B., & Kaslow, D. C. (1994). Cryopreservation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Experimental Parasitology*, *78*(1), 118-119. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1012>
- Keleta, Y., Ramelow, J., Cui, L., & Li, J. (2021). Molecular interactions between parasite and mosquito during midgut invasion as targets to block malaria transmission. *NPJ Vaccines*, *6*, 140. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00401-9>
- Khim, N., Andrianaranjaka, V., Popovici, J., Kim, S., Ratsimbao, A., Benedet, C., Barnadas, C., Durand, R., Thellier, M., Legrand, E., Musset, L., Menegon, M., Severini, C., Nour, B. Y. M., Tichit, M., Bouchier, C., Mercereau-Puijalon, O., & Ménard, D. (2014). Effects of Mefloquine Use on *Plasmodium vivax* Multidrug Resistance. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(10), 1637-1644. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140411>
- Kiriiri, G. K., Njogu, P. M., & Mwangi, A. N. (2020). Exploring different approaches to improve the success of drug discovery and development projects : A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *6*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00047-9>
- Kiszewski, A. E. (2010). Blocking *Plasmodium falciparum* Malaria Transmission with Drugs : The Gametocytocidal and Sporontocidal Properties of Current and Prospective Antimalarials. *Pharmaceuticals*, *4*(1), 44-68. <https://doi.org/10.3390/ph4010044>
- Klein, E. Y. (2013). Antimalarial drug resistance : A review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *41*(4), 311-317. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.12.007>
- Koepfli, C., Nguitragool, W., de Almeida, A. C. G., Kuehn, A., Waltmann, A., Kattenberg, E., Ome-Kaius, M., Rarau, P., Obadia, T., Kazura, J., Monteiro, W., Darcy, A. W., Wini, L., Bassat, Q., Felger, I., Sattabongkot, J., Robinson, L. J., Lacerda, M., & Mueller, I. (2021). Identification of the asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocyte reservoir under different transmission intensities. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(8), e0009672. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009672>
- Koepfli, C., & Yan, G. (2018). *Plasmodium* Gametocytes in Field Studies : Do we Measure Commitment to Transmission or Detectability? *Trends in parasitology*, *34*(5), 378-387. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.009>
- Koller, R., Mombo-Ngoma, G., & Grobusch, M. P. (2018). The early preclinical and clinical development of ganaplacide (KAF156), a novel antimalarial compound. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *27*(10), 803-810. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1524871>
- Kongkasuriyachai, D., Fujioka, H., & Kumar, N. (2004). Functional analysis of *Plasmodium falciparum* parasitophorous vacuole membrane protein (Pfs16) during gametocytogenesis and gametogenesis by targeted gene disruption. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *133*(2), 275-285. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.10.014>
- Kouakou, Y. I., Millet, A., Fromentin, E., Hauchard, N., Farias, G., Fieux, M., Coudert, A., Omorou, R., Bin Sa'id, I., Lavoignat, A., Bonnot, G., Bienvenu, A.-L., & Picot, S. (2022). Pre-referral intranasal artesunate powder for cerebral malaria : A proof-of-concept study. *Malaria Journal*, *21*(1), 291. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04309-0>

- Krungkrai, S. R., & Krungkrai, J. (2016). Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(6), 525-534. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.04.012>
- Kublin, J. G., Murphy, S. C., Maenza, J., Seilie, A. M., Jain, J. P., Berger, D., Spera, D., Zhao, R., Soon, R. L., Czartoski, J. L., Potochnic, M. A., Duke, E., Chang, M., Vaughan, A., Kappe, S. H. I., Leong, F. J., Pertel, P., & Prince, W. T. (2020). Safety, Pharmacokinetics, and Causal Prophylactic Efficacy of KAF156 in a *Plasmodium falciparum* Human Infection Study. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(7), e2407-e2414. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa952>
- Kuhen, K. L., Chatterjee, A. K., Rottmann, M., Gagaring, K., Borboa, R., Buenviaje, J., Chen, Z., Francek, C., Wu, T., Nagle, A., Barnes, S. W., Plouffe, D., Lee, M. C. S., Fidock, D. A., Graumans, W., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G. J., Wirjanata, G., Sebayang, B., ... Diagana, T. T. (2014). KAF156 Is an Antimalarial Clinical Candidate with Potential for Use in Prophylaxis, Treatment, and Prevention of Disease Transmission. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 5060-5067. <https://doi.org/10.1128/AAC.02727-13>
- Kumar, V., Behl, A., Kapoor, P., Nayak, B., Singh, G., Singh, A. P., Mishra, S., Kang, T. S., Mishra, P. C., & Hora, R. (2019). Inner membrane complex II protein of *Plasmodium falciparum* links membrane lipids with cytoskeletal element « actin » and its associated motor « myosin ». *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 673-684. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.239>
- LaMonte, G. M., Rocamora, F., Marapana, D. S., Gnädig, N. F., Otilie, S., Luth, M. R., Worgall, T. S., Goldgof, G. M., Mohunlal, R., Santha Kumar, T. R., Thompson, J. K., Vigil, E., Yang, J., Hutson, D., Johnson, T., Huang, J., Williams, R. M., Zou, B. Y., Cheung, A. L., ... Winzeler, E. A. (2020). Pan-active imidazolopiperazine antimalarials target the *Plasmodium falciparum* intracellular secretory pathway. *Nature Communications*, 11(1), 1780. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15440-4>
- Lamour, S. D., Straschil, U., Saric, J., & Delves, M. J. (2014). Changes in metabolic phenotypes of *Plasmodium falciparum* in vitro cultures during gametocyte development. *Malaria Journal*, 13, 468. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-468>
- Lamprey, H., Ofori, M. F., Kusi, K. A., Adu, B., Owusu-Yeboah, E., Kyei-Baafour, E., Arku, A. T., Bosomprah, S., Alifrangis, M., & Quakyi, I. A. (2018). The prevalence of submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage and multiplicity of infection in children, pregnant women and adults in a low malaria transmission area in Southern Ghana. *Malaria Journal*, 17(1), 331. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2479-y>
- Langford, S., Douglas, N. M., Lampah, D. A., Simpson, J. A., Kenangalem, E., Sugiarto, P., Anstey, N. M., Poespoprodjo, J. R., & Price, R. N. (2015). *Plasmodium malariae* Infection Associated with a High Burden of Anemia : A Hospital-Based Surveillance Study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(12), e0004195. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004195>
- Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J. S., Vermunt, A. M. W., Pain, A., Sauerwein, R. W., Eling, W. M. C., Hall, N., Waters, A. P., Stunnenberg, H. G., & Mann, M. (2002). Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*, 419(6906), 537-542. <https://doi.org/10.1038/nature01111>
- Lasonder, E., Rijpma, S. R., van Schaijk, B. C. L., Hoeijmakers, W. A. M., Kensche, P. R., Gresnigt, M. S., Italiaander, A., Vos, M. W., Woestenenk, R., Bousema, T., Mair, G. R., Khan, S. M., Janse, C.

- J., Bártfai, R., & Sauerwein, R. W. (2016). Integrated transcriptomic and proteomic analyses of *P. falciparum* gametocytes : Molecular insight into sex-specific processes and translational repression. *Nucleic Acids Research*, *44*(13), 6087-6101. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw536>
- Lazarus, M. D., Schneider, T. G., & Taraschi, T. F. (2008). A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of cell science*, *121*(11), 1937-1949. <https://doi.org/10.1242/jcs.023150>
- Lee, J. H., Kim, H. R., Lee, J. H., Lee, S. K., Chun, Y., Han, S. O., Yoo, H. Y., Park, C., & Kim, S. W. (2019). Enhanced In-Vitro Hemozoin Polymerization by Optimized Process using Histidine-Rich Protein II (HRPII). *Polymers*, *11*(7), 1162. <https://doi.org/10.3390/polym11071162>
- Lee, M. C., & Fidock, D. A. (2014). CRISPR-mediated genome editing of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Genome Medicine*, *6*(8), 63. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0063-9>
- Lelièvre, J., Almela, M. J., Lozano, S., Miguel, C., Franco, V., Leroy, D., & Herreros, E. (2012). Activity of clinically relevant antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* mature gametocytes in an ATP bioluminescence transmission blocking assay. *PLoS ONE*, *7*(4), e35019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035019>
- Leong, F. J., Jain, J. P., Feng, Y., Goswami, B., & Stein, D. S. (2018). A phase 1 evaluation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic interaction of the anti-malarial agents KAF156 and piperazine. *Malaria Journal*, *17*, 7. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2162-8>
- Leong, F. J., Zhao, R., Zeng, S., Magnusson, B., Diagana, T. T., & Pertel, P. (2014). A first-in-human randomized, double-blind, placebo-controlled, single- and multiple-ascending oral dose study of novel Imidazolopiperazine KAF156 to assess its safety, tolerability, and pharmacokinetics in healthy adult volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(11), 6437-6443. <https://doi.org/10.1128/AAC.03478-14>
- L'Episcopia, M., Perrotti, E., Severini, F., Picot, S., & Severini, C. (2020). An insight on drug resistance in *Plasmodium vivax*, a still neglected human malaria parasite. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, *56*(4), 409-418. https://doi.org/10.4415/ANN_20_04_02
- Lim, M. Y.-X., LaMonte, G., Lee, M. C. S., Reimer, C., Tan, B. H., Corey, V., Tjahjadi, B. F., Chua, A., Nachon, M., Wintjens, R., Gedeck, P., Malleret, B., Renia, L., Bonamy, G. M. C., Ho, P. C.-L., Yeung, B. K. S., Chow, E. D., Lim, L., Fidock, D. A., ... Bifani, P. (2016). UDP-galactose and Acetyl-CoA transporters as *Plasmodium* multidrug resistance genes. *Nature microbiology*, *1*, 16166. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.166>
- Lindner, S. E., Swearingen, K. E., Shears, M. J., Walker, M. P., Vrana, E. N., Hart, K. J., Minns, A. M., Sinnis, P., Moritz, R. L., & Kappe, S. H. I. (2019). Transcriptomics and proteomics reveal two waves of translational repression during the maturation of malaria parasite sporozoites. *Nature Communications*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12936-6>
- Llorà-Batlle, O., Michel-Todó, L., Witmer, K., Toda, H., Fernández-Becerra, C., Baum, J., & Cortés, A. (2020). Conditional expression of PfAP2-G for controlled massive sexual conversion in *Plasmodium falciparum*. *Science Advances*, *6*(24), eaaz5057. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz5057>
- Lucantoni, L., Duffy, S., Adjalley, S. H., Fidock, D. A., & Avery, V. M. (2013). Identification of MMV malaria box inhibitors of *Plasmodium falciparum* early-stage gametocytes using a luciferase-based high-throughput assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(12), 6050-6062. <https://doi.org/10.1128/AAC.00870-13>

- Lucantoni, L., Fidock, D. A., & Avery, V. M. (2016). Luciferase-Based, High-Throughput Assay for Screening and Profiling Transmission-Blocking Compounds against *Plasmodium falciparum* Gametocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(4), 2097-2107. <https://doi.org/10.1128/AAC.01949-15>
- Mace, K. E., Lucchi, N. W., & Tan, K. R. (2022). Malaria Surveillance—United States, 2018. *MMWR Surveillance Summaries*, *71*(8), 1-35. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7108a1>
- MacRae, J. I., Dixon, M. W., Dearnley, M. K., Chua, H. H., Chambers, J. M., Kenny, S., Bottova, I., Tilley, L., & McConville, M. J. (2013). Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Biology*, *11*, 67. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-67>
- Madrid, L., Casellas, A., Sacoor, C., Quintó, L., Sítio, A., Varo, R., Acácio, S., Nhampossa, T., Massora, S., Sigaúque, B., Mandomando, I., Cousens, S., Menéndez, C., Alonso, P., Macete, E., & Bassat, Q. (2019). Postdischarge Mortality Prediction in Sub-Saharan Africa. *Pediatrics*, *143*(1), e20180606. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-0606>
- Magistrado, P. A., Corey, V. C., Lukens, A. K., LaMonte, G., Sasaki, E., Meister, S., Wree, M., Winzeler, E., & Wirth, D. F. (2016). *Plasmodium falciparum* Cyclic Amine Resistance Locus (PfCARL), a Resistance Mechanism for Two Distinct Compound Classes. *ACS Infectious Diseases*, *2*(11), 816-826. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00025>
- Maier, A. G., & van Ooij, C. (2022). The role of cholesterol in invasion and growth of malaria parasites. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 984049. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.984049>
- Maiga, H., Barger, B., Sagara, I., Guindo, A., Traore, O. B., Tekete, M., Dara, A., Traore, Z. I., Diarra, M., Coumare, S., Kodio, A., Toure, O. B., Doumbo, O. K., & Djimde, A. A. (2020). Impact of Three-Year Intermittent Preventive Treatment Using Artemisinin-Based Combination Therapies on Malaria Morbidity in Malian Schoolchildren. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *5*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5030148>
- malERA Refresh Consultative Panel on Characterising the Reservoir and Measuring Transmission. (2017). malERA : An updated research agenda for characterising the reservoir and measuring transmission in malaria elimination and eradication. *PLoS Medicine*, *14*(11), e1002452. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002452>
- Malmquist, N. A., Moss, T. A., Mecheri, S., Scherf, A., & Fuchter, M. J. (2012). Small-molecule histone methyltransferase inhibitors display rapid antimalarial activity against all blood stage forms in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(41), 16708-16713. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205414109>
- Malmquist, N. A., Sundriyal, S., Caron, J., Chen, P., Witkowski, B., Menard, D., Suwanarusk, R., Renia, L., Nosten, F., Jiménez-Díaz, M. B., Angulo-Barturen, I., Santos Martínez, M., Ferrer, S., Sanz, L. M., Gamo, F.-J., Wittlin, S., Duffy, S., Avery, V. M., Ruecker, A., ... Scherf, A. (2015). Histone methyltransferase inhibitors are orally bioavailable, fast-acting molecules with activity against different species causing malaria in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(2), 950-959. <https://doi.org/10.1128/AAC.04419-14>
- Marfurt, J., de Monbrison, F., Brega, S., Barbollat, L., Müller, I., Sie, A., Goroti, M., Reeder, J. C., Beck, H.-P., Picot, S., & Genton, B. (2008). Molecular markers of in vivo *Plasmodium vivax* resistance to amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine : Mutations in *pvdhfr* and *pvm-dr1*. *The Journal of Infectious Diseases*, *198*(3), 409-417. <https://doi.org/10.1086/589882>

- Marwa, K., Kapesa, A., Baraka, V., Konje, E., Kidenya, B., Mukonzo, J., Kamugisha, E., & Swedberg, G. (2022). Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine and dihydroartemisinin-piperaquine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Sub-Saharan Africa : A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, *17*(3), e0264339. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264339>
- Mass drug administration for falciparum malaria : A practical field manual*. (2017, septembre 20). <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241513104>
- Mathieu, L. C., Cox, H., Early, A. M., Mok, S., Lazrek, Y., Paquet, J.-C., Ade, M.-P., Lucchi, N. W., Grant, Q., Udhayakumar, V., Alexandre, J. S., Demar, M., Ringwald, P., Neafsey, D. E., Fidock, D. A., & Musset, L. (2020). Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance. *eLife*, *9*, e51015. <https://doi.org/10.7554/eLife.51015>
- Mazur, P. (1968). Physical and Chemical Changes During Freezing and Thawing of Cells, with Special Reference to Blood Cells *. In L. P. Hollander & International Society of Blood Transfusion (Éds.), *International Society of Blood Transfusion* (Vol. 29, p. 764-777). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000384705>
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells : Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *247*(3), C125-C142. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- McCarthy, J. S., Abd-Rahman, A. N., Collins, K. A., Marquart, L., Griffin, P., Kümmel, A., Fuchs, A., Winnips, C., Mishra, V., Csermak-Renner, K., Jain, J. P., & Gandhi, P. (2021). Defining the Antimalarial Activity of Cipargamin in Healthy Volunteers Experimentally Infected with Blood-Stage *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01423-20>
- McColm, A. A., & Latter, V. S. (1986). Comparison of fast (one-step) and interrupted slow cooling methods using a range of intracellular and extracellular cryoprotectants for the freeze-preservation of *Plasmodium yoelii*-infected mouse erythrocytes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *80*(1), 29-33. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90188-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90188-4)
- Meerstein-Kessel, L., Andolina, C., Carrio, E., Mahamar, A., Sawa, P., Diawara, H., van de Vegte-Bolmer, M., Stone, W., Collins, K. A., Schneider, P., Dicko, A., Drakeley, C., Felger, I., Voss, T., Lanke, K., & Bousema, T. (2018). A multiplex assay for the sensitive detection and quantification of male and female *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Malaria Journal*, *17*, 441. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2584-y>
- Melssen, M. M., Fisher, C. T., Slingluff, C. L., & Melief, C. J. M. (2022). Peptide emulsions in incomplete Freund's adjuvant create effective nurseries promoting egress of systemic CD4+ and CD8+ T cells for immunotherapy of cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *10*(9), e004709. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-004709>
- Menard, D., & Dondorp, A. (2017). Antimalarial Drug Resistance : A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(7), a025619. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025619>
- Meshnick, S. R., Thomas, A., Ranz, A., Xu, C. M., & Pan, H. Z. (1991). Artemisinin (qinghaosu) : The role of intracellular hemin in its mechanism of antimalarial action. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *49*(2), 181-189. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90062-b](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90062-b)

- Miao, J., Li, J., Fan, Q., Li, X., Li, X., & Cui, L. (2010). The Puf-family RNA-binding protein PfPuf2 regulates sexual development and sex differentiation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 7), 1039-1049. <https://doi.org/10.1242/jcs.059824>
- Miguel-Blanco, C., Molina, I., Bardera, A. I., Díaz, B., de Las Heras, L., Lozano, S., González, C., Rodrigues, J., Delves, M. J., Ruecker, A., Colmenarejo, G., Viera, S., Martínez-Martínez, M. S., Fernández, E., Baum, J., Sinden, R. E., & Herreros, E. (2017). Hundreds of dual-stage antimalarial molecules discovered by a functional gametocyte screen. *Nature Communications*, 8, 15160. <https://doi.org/10.1038/ncomms15160>
- Milner, D. A. (2018). Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1), a025569. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>
- Mita, T., Tanabe, K., & Kita, K. (2009). Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitology International*, 58(3), 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.04.004>
- Mitri, C., Thiery, I., Bourgoignie, C., & Paul, R. E. L. (2009). Density-dependent impact of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* gametocyte sex ratio on mosquito infection rates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1673), 3721-3726. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0962>
- Miura, K., Stone, W. J. R., Koolen, K. M., Deng, B., Zhou, L., van Gemert, G.-J., Locke, E., Morin, M., Bousema, T., Sauerwein, R. W., Long, C. A., & Dechering, K. J. (2016). An inter-laboratory comparison of standard membrane-feeding assays for evaluation of malaria transmission-blocking vaccines. *Malaria Journal*, 15(1), 463. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1515-z>
- Miura, K., Swihart, B. J., Deng, B., Zhou, L., Pham, T. P., Diouf, A., Fay, M. P., & Long, C. A. (2019). Strong concordance between percent inhibition in oocyst and sporozoite intensities in a *Plasmodium falciparum* standard membrane-feeding assay. *Parasites & Vectors*, 12(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3470-3>
- Miyake, Y., Karanis, P., & Uga, S. (2004). Cryopreservation of protozoan parasites. *Cryobiology*, 48(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.004>
- Mmv.org/about-us*. (2023). Medicines for Malaria Venture. <https://www.mmv.org/about-us>
- Mmv.org/our-work/research-and-development*. (2023). Medicines for Malaria Venture. <https://www.mmv.org/our-work/research-and-development>
- Mnzava, A., Monroe, A. C., & Okumu, F. (2022). Anopheles stephensi in Africa requires a more integrated response. *Malaria Journal*, 21(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04197-4>
- Mohammad, A. H., Naserrudin, N. A., Syed Abdul Rahim, S. S., Jelip, J., Atil, A., Sazali, M. F., Muyou, A. J., Kunasagan, P. D., Ahmad Kamarudin, N., Azhar, Z. I., Dapari, R., Jeffree, M. S., & Hassan, M. R. (2022). Narrative Review of the Control and Prevention of Knowlesi Malaria. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(8), 178. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7080178>
- Mohammed, R., Asres, M. S., Gudina, E. K., Adissu, W., Johnstone, H., Marrast, A. C., Donini, C., Duparc, S., & Yilma, D. (2023). Efficacy, Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of MMV390048 in Acute Uncomplicated Malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 108(1), 81-84. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.22-0567>
- Monroe, A., Williams, N. A., Ogoma, S., Karema, C., & Okumu, F. (2022). Reflections on the 2021 World Malaria Report and the future of malaria control. *Malaria Journal*, 21(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04178-7>
- Mouchet, J. (Éd.). (2004). *Biodiversité du paludisme dans le monde*. Libbey [u.a.].

- Movellan, J., Urbán, P., Moles, E., de la Fuente, J. M., Sierra, T., Serrano, J. L., & Fernández-Busquets, X. (2014). Amphiphilic dendritic derivatives as nanocarriers for the targeted delivery of antimalarial drugs. *Biomaterials*, *35*(27), 7940-7950. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.061>
- Moxon, C. A., Gibbins, M. P., McGuinness, D., Milner, D. A., & Marti, M. (2020). New Insights into Malaria Pathogenesis. *Annual Review of Pathology*, *15*, 315-343. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032640>
- Mueller, I., Zimmerman, P. A., & Reeder, J. C. (2007). Plasmodium malariae and Plasmodium ovale – the ‘bashful’ malaria parasites. *Trends in parasitology*, *23*(6), 278-283. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.04.009>
- Munro, B. A., & McMorran, B. J. (2022). Antimalarial Drug Strategies to Target Plasmodium Gametocytes. *Parasitologia*, *2*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/parasitologia2020011>
- Murata, C. E., & Goldberg, D. E. (2003). Plasmodium falciparum falcilysin : An unprocessed food vacuole enzyme. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *129*(1), 123-126. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00098-7](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00098-7)
- Mutetwa, S. M., & James, E. R. (1985). Low temperature preservation of Plasmodium spp. *Parasitology*, *90* (Pt 3), 589-603. <https://doi.org/10.1017/s003118200005558x>
- Mutz, K.-O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J.-G., & Stahl, F. (2013). Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*(1), 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.004>
- Nacher, M., Singhasivanon, P., Silachamroon, U., Treeprasertsuk, S., Tosukhowong, T., Vannaphan, S., Gay, F., Mazier, D., & Looareesuwan, S. (2002). Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, and severe malaria are associated with increased Plasmodium falciparum gametocyte carriage. *The Journal of Parasitology*, *88*(1), 97-101. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0097:DHCHAS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0097:DHCHAS]2.0.CO;2)
- Nadeem, A. Y., Shehzad, A., Islam, S. U., Al-Suhaimi, E. A., & Lee, Y. S. (2022). Mosquirix™ RTS, S/AS01 Vaccine Development, Immunogenicity, and Efficacy. *Vaccines*, *10*(5), 713. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050713>
- Nagaraj, V. A., Sundaram, B., Varadarajan, N. M., Subramani, P. A., Kalappa, D. M., Ghosh, S. K., & Padmanaban, G. (2013). Malaria parasite-synthesized heme is essential in the mosquito and liver stages and complements host heme in the blood stages of infection. *PLoS Pathogens*, *9*(8), e1003522. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003522>
- Nagle, A., Wu, T., Kuhen, K., Gagaring, K., Borboa, R., Francek, C., Chen, Z., Plouffe, D., Lin, X., Caldwell, C., Ek, J., Skolnik, S., Liu, F., Wang, J., Chang, J., Li, C., Liu, B., Hollenbeck, T., Tuntland, T., ... Chatterjee, A. K. (2012). Imidazolopiperazines : Lead optimization of the second-generation antimalarial agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, *55*(9), 4244-4273. <https://doi.org/10.1021/jm300041e>
- Naik, R. S., Branch, O. H., Woods, A. S., Vijaykumar, M., Perkins, D. J., Nahlen, B. L., Lal, A. A., Cotter, R. J., Costello, C. E., Ockenhouse, C. F., Davidson, E. A., & Gowda, D. C. (2000). Glycosylphosphatidylinositol Anchors of Plasmodium falciparum. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(11), 1563-1576.
- Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) | Malvern Panalytical.* (s. d.). Consulté 21 juillet 2023, à l'adresse <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/nanoparticle-tracking-analysis>

- Naserrudin, N. A., Monroe, A., Culleton, R., Hod, R., Jeffree, M. S., Ahmed, K., & Hassan, M. R. (2022). Reimagining zoonotic malaria control in communities exposed to *Plasmodium knowlesi* infection. *Journal of Physiological Anthropology*, *41*, 14. <https://doi.org/10.1186/s40101-022-00288-y>
- Ndayisaba, G., Yeka, A., Asante, K. P., Grobusch, M. P., Karita, E., Mugerwa, H., Asiimwe, S., Oduro, A., Fofana, B., Doumbia, S., Jain, J. P., Barsainya, S., Kullak-Ublick, G. A., Su, G., Schmitt, E. K., Csermak, K., Gandhi, P., & Hughes, D. (2021). Hepatic safety and tolerability of cipargamin (KAE609), in adult patients with *Plasmodium falciparum* malaria : A randomized, phase II, controlled, dose-escalation trial in sub-Saharan Africa. *Malaria Journal*, *20*(1), 478. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-04009-1>
- Neal, A. T. (2011). Male gametocyte fecundity and sex ratio of a malaria parasite, *Plasmodium mexicanum*. *Parasitology*, *138*(10), 1203-1210. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000941>
- Nguitragool, W., Mueller, I., Kumpitak, C., Saeseu, T., Bantuchai, S., Yorsaeng, R., Yimsamran, S., Maneeboonyang, W., Sa-angchai, P., Chaimungkun, W., Rukmanee, P., Puangsa-art, S., Thanyavanich, N., Koepfli, C., Felger, I., Sattabongkot, J., & Singhasivanon, P. (2017). Very high carriage of gametocytes in asymptomatic low-density *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections in western Thailand. *Parasites & Vectors*, *10*, 512. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2407-y>
- Ngwa, C. J., Scheuermayer, M., Mair, G. R., Kern, S., Brühl, T., Wirth, C. C., Aminake, M. N., Wiesner, J., Fischer, R., Vilcinskis, A., & Pradel, G. (2013). Changes in the transcriptome of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* during the initial phase of transmission from the human to the mosquito. *BMC Genomics*, *14*, 256. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-256>
- Nilsson, S. K., Childs, L. M., Buckee, C., & Marti, M. (2015). Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. *PLoS Pathogens*, *11*(6), e1004871. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004871>
- Nkhoma, E. T., Poole, C., Vannappagari, V., Hall, S. A., & Beutler, E. (2009). The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : A systematic review and meta-analysis. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, *42*(3), 267-278. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2008.12.005>
- Noland, G. S., Briones, N., & Sullivan, D. J. (2003). The shape and size of hemozoin crystals distinguishes diverse *Plasmodium* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *130*(2), 91-99. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00163-4](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00163-4)
- Novartis and Medicines for Malaria Venture announce decision to move to Phase 3 study for novel ganaplacide/lumefantrine-SDF combination in adults and children with malaria. (2022, novembre 23). Medicines for Malaria Venture. <https://www.mmv.org/news/novartis-and-medicines-malaria-venture-announce-decision-move-phase-3-study-novel>
- Ogutu, B., Yeka, A., Kusemererwa, S., Thompson, R., Tinto, H., Toure, A. O., Uthaisin, C., Verma, A., Kibuuka, A., Lingani, M., Lourenço, C., Mombo-Ngoma, G., Nduba, V., N'Guessan, T. L., Nassa, G. J. W., Nyantaro, M., Tina, L. O., Singh, P. K., El Gaaloul, M., ... Grobusch, M. P. (2023). Ganaplacide (KAF156) plus lumefantrine solid dispersion formulation combination for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria : An open-label, multicentre, parallel-group, randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet. Infectious Diseases*, S1473-3099(23)00209-8. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00209-8)

- Ohm, J. R., Baldini, F., Barreaux, P., Lefevre, T., Lynch, P. A., Suh, E., Whitehead, S. A., & Thomas, M. B. (2018). Rethinking the extrinsic incubation period of malaria parasites. *Parasites & Vectors*, *11*, 178. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2761-4>
- Okamoto, N., Spurck, T. P., Goodman, C. D., & McFadden, G. I. (2009). Apicoplast and Mitochondrion in Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*, *8*(1), 128-132. <https://doi.org/10.1128/EC.00267-08>
- Olivier, M., Van Den Ham, K., Shio, M. T., Kassa, F. A., & Fougeray, S. (2014). Malarial Pigment Hemozoin and the Innate Inflammatory Response. *Frontiers in Immunology*, *5*, 25. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00025>
- Olszewski, K. L., & Llinás, M. (2011). Central carbon metabolism of *Plasmodium* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *175*(2), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.09.001>
- Omorou, R., Bin Sa'id, I., Delves, M., Severini, C., Kouakou, Y. I., Bienvenu, A.-L., & Picot, S. (2022). Protocols for *Plasmodium* gametocyte production in vitro : An integrative review and analysis. *Parasites & Vectors*, *15*(1), 451. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05566-3>
- OMS. (2021). *Global technical strategy for malaria 2016–2030, 2021 update*.
- Opadokun, T., Agyapong, J., & Rohrbach, P. (2022). Protein Profiling of Malaria-Derived Extracellular Vesicles Reveals Distinct Subtypes. *Membranes*, *12*(4), 397. <https://doi.org/10.3390/membranes12040397>
- Orjih, A. U. (2012). Hemozoin accumulation in Garnham bodies of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Parasitology Research*, *111*(6), 2353-2359. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3090-8>
- Orondo, P. W., Nyanjom, S. G., Atieli, H., Githure, J., Ondeto, B. M., Ochwedo, K. O., Omondi, C. J., Kazura, J. W., Lee, M.-C., Zhou, G., Zhong, D., Githeko, A. K., & Yan, G. (2021). Insecticide resistance status of *Anopheles arabiensis* in irrigated and non-irrigated areas in western Kenya. *Parasites & Vectors*, *14*(1), 335. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04833-z>
- Ouji, M., Augereau, J.-M., Paloque, L., & Benoit-Vical, F. (2018). *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies : A sword of Damocles in the path toward malaria elimination. *Parasite (Paris, France)*, *25*, 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018021>
- Ouologuem, D. T., Kone, C. O., Fofana, B., Sidibe, B., Togo, A. H., Dembele, D., Toure, S., Koumare, S., Toure, O., Sagara, I., Toure, A., Dao, A., Doumbo, O. K., & Djimde, A. A. (2018). Differential infectivity of gametocytes after artemisinin-based combination therapy of uncomplicated *falciparum* malaria. *African Journal of Laboratory Medicine*, *7*(2), 784. <https://doi.org/10.4102/ajlm.v7i2.784>
- Owoloye, A., Olufemi, M., Idowu, E. T., & Oyebola, K. M. (2021). Prevalence of potential mediators of artemisinin resistance in African isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, *20*, 451. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03987-6>
- Owusu-Ofori, A. K., Betson, M., Parry, C. M., Stothard, J. R., & Bates, I. (2013). Transfusion-transmitted malaria in Ghana. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *56*(12), 1735-1741. <https://doi.org/10.1093/cid/cit130>
- Oyegoke, O. O., Maharaj, L., Akoniyan, O. P., Kwoji, I., Roux, A. T., Adewumi, T. S., Maharaj, R., Oyebola, B. T., Adeleke, M. A., & Okpeku, M. (2022). Malaria diagnostic methods with the elimination goal in view. *Parasitology Research*, *121*(7), 1867-1885. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07512-9>
- Pádua, T. A., & Souza, M. C. (2020). Heme on Pulmonary Malaria : Friend or Foe? *Frontiers in Immunology*, *11*, 1835. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01835>

- Pagola, S., Stephens, P. W., Bohle, D. S., Kosar, A. D., & Madsen, S. K. (2000). The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*, *404*(6775), 307-310. <https://doi.org/10.1038/35005132>
- Paljetak, H. C., Tomaskovic, L., Matijasic, M., Bukvic, M., Fajdetic, A., Verbanac, D., & Peric, M. (2017). Macrolide Hybrid Compounds : Drug Discovery Opportunities in Anti- Infective and Anti-inflammatory Area. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *17*(8), 919-940. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160927160036>
- Pandey, A. V., Tekwani, B. L., Singh, R. L., & Chauhan, V. S. (1999). Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(27), 19383-19388. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.19383>
- Paquet, T., Le Manach, C., Cabrera, D. G., Younis, Y., Henrich, P. P., Abraham, T. S., Lee, M. C. S., Basak, R., Ghidelli-Disse, S., Lafuente-Monasterio, M. J., Bantscheff, M., Ruecker, A., Blagborough, A. M., Zakutansky, S. E., Zeeman, A.-M., White, K. L., Shackelford, D. M., Mannila, J., Morizzi, J., ... Chibale, K. (2017). Antimalarial efficacy of MMV390048, an inhibitor of Plasmodium phosphatidylinositol 4-kinase. *Science Translational Medicine*, *9*(387), eaad9735. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad9735>
- Parkyn Schneider, M., Liu, B., Glock, P., Suttie, A., McHugh, E., Andrew, D., Batinovic, S., Williamson, N., Hanssen, E., McMillan, P., Hliscs, M., Tilley, L., & Dixon, M. W. A. (2017). Disrupting assembly of the inner membrane complex blocks Plasmodium falciparum sexual stage development. *PLoS Pathogens*, *13*(10), e1006659. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006659>
- Peatey, C. L., Skinner-Adams, T. S., Dixon, M. W. A., McCarthy, J. S., Gardiner, D. L., & Trenholme, K. R. (2009). Effect of antimalarial drugs on Plasmodium falciparum gametocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, *200*(10), 1518-1521. <https://doi.org/10.1086/644645>
- Peatey, C. L., Spicer, T. P., Hodder, P. S., Trenholme, K. R., & Gardiner, D. L. (2011a). A high-throughput assay for the identification of drugs against late-stage Plasmodium falciparum gametocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *180*(2), 127-131. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.09.002>
- Peatey, C. L., Spicer, T. P., Hodder, P. S., Trenholme, K. R., & Gardiner, D. L. (2011b). A high-throughput assay for the identification of drugs against late-stage Plasmodium falciparum gametocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *180*(2), 127-131. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.09.002>
- Pegg, D. E. (2002). The History and Principles of Cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine*, *20*(1), 005-014. <https://doi.org/10.1055/s-2002-23515>
- Pegoraro, M., & Weedall, G. D. (2021). Malaria in the ‘Omics Era’. *Genes*, *12*(6), 843. <https://doi.org/10.3390/genes12060843>
- Pérez-del Palacio, J., Díaz, C., Vergara, N., Algieri, F., Rodríguez-Nogales, A., de Pedro, N., Rodríguez-Cabezas, M. E., Genilloud, O., Gálvez, J., & Vicente, F. (2017). Exploring the Role of CYP3A4 Mediated Drug Metabolism in the Pharmacological Modulation of Nitric Oxide Production. *Frontiers in Pharmacology*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00202>
- Pervaiz, T., Lotfi, A., Salman Haider, M., Haifang, J., & Fang, J. (2017). High Throughput Sequencing Advances and Future Challenges. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, *05*(02). <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000188>

- Pessanha de Carvalho, L., Kreidenweiss, A., & Held, J. (2021). Drug Repurposing : A Review of Old and New Antibiotics for the Treatment of Malaria: Identifying Antibiotics with a Fast Onset of Antiplasmodial Action. *Molecules*, 26(8), 2304. <https://doi.org/10.3390/molecules26082304>
- Pham, T.-T., Lamb, T. J., Deroost, K., Opdenakker, G., & Van den Steen, P. E. (2021). Hemozoin in Malarial Complications : More Questions Than Answers. *Trends in Parasitology*, 37(3), 226-239. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.016>
- Phyo, A. P., Dahal, P., Mayxay, M., & Ashley, E. A. (2022). Clinical impact of vivax malaria : A collection review. *PLoS Medicine*, 19(1), e1003890. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003890>
- Phyo, A. P., Jittamala, P., Nosten, F. H., Pukrittayakamee, S., Imwong, M., White, N. J., Duparc, S., Macintyre, F., Baker, M., & Möhrle, J. J. (2016). Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria : An open-label phase 2 trial. *The Lancet. Infectious Diseases*, 16(1), 61-69. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00320-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00320-5)
- Picot, S. (2006). [Is Plasmodium vivax still a paradigm for uncomplicated malaria?]. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 36(8), 406-413. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2006.06.001>
- Picot, S., & Bienvenu, A.-L. (2009). [Plasmodium vivax infection : Not so benign]. *Medecine Sciences: M/S*, 25(6-7), 622-626. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009256-7622>
- Picot, S., & Bienvenu, A.-L. (2022). Plasmodium. In N. Rezaei (Éd.), *Encyclopedia of Infection and Immunity* (p. 655-665). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00041-0>
- Picot, S., Cucherat, M., & Bienvenu, A.-L. (2020). Systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) methods compared with microscopy, polymerase chain reaction and rapid diagnostic tests for malaria diagnosis. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 98, 408-419. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.009>
- Picot, S., Olliaro, P., de Monbrison, F., Bienvenu, A.-L., Price, R. N., & Ringwald, P. (2009). A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. *Malaria Journal*, 8, 89. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-89>
- Picot, S., Perpoint, T., Chidiac, C., Sigal, A., Javouhey, E., Gillet, Y., Jacquin, L., Douplat, M., Tazarourte, K., Argaud, L., Wallon, M., Miossec, C., Bonnot, G., & Bienvenu, A.-L. (2022). Diagnostic accuracy of fluorescence flow-cytometry technology using Sysmex XN-31 for imported malaria in a non-endemic setting. *Parasite (Paris, France)*, 29, 31. <https://doi.org/10.1051/parasite/2022031>
- Picot, S., Peyron, F., Deloron, P., Boudin, C., Chumpitazi, B., Barbe, G., Vuillez, J. P., Donadille, A., & Ambroise-Thomas, P. (1993). Ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf/155RESA) induces tumour necrosis factor-alpha production. *Clinical and Experimental Immunology*, 93(2), 184-188.
- Plouffe, D., Brinker, A., McNamara, C., Henson, K., Kato, N., Kuhen, K., Nagle, A., Adrián, F., Matzen, J. T., Anderson, P., Nam, T., Gray, N. S., Chatterjee, A., Janes, J., Yan, S. F., Trager, R., Caldwell, J. S., Schultz, P. G., Zhou, Y., & Winzeler, E. A. (2008). In silico activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26), 9059-9064. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802982105>

- Plouffe, D. M., Wree, M., Du, A. Y., Meister, S., Li, F., Patra, K., Lubar, A., Okitsu, S. L., Flannery, E. L., Kato, N., Tanaseichuk, O., Comer, E., Zhou, B., Kuhen, K., Zhou, Y., Leroy, D., Schreiber, S. L., Scherer, C. A., Vinetz, J., & Winzeler, E. A. (2016). High-Throughput Assay and Discovery of Small Molecules that Interrupt Malaria Transmission. *Cell Host & Microbe*, *19*(1), 114-126. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.001>
- Ponce, C., Kaczorowski, F., Perpoint, T., Mialhes, P., Sigal, A., Javouhey, E., Gillet, Y., Jacquin, L., Douplat, M., Tazarourte, K., Potinet, V., Simon, B., Lavoignat, A., Bonnot, G., Sow, F., Bienvenu, A.-L., & Picot, S. (2017). Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting. *Parasite (Paris, France)*, *24*, 53. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017054>
- Portugaliza, H. P., Miyazaki, S., Geurten, F. J., Pell, C., Rosanas-Urgell, A., Janse, C. J., & Cortés, A. (2020). Artemisinin exposure at the ring or trophozoite stage impacts Plasmodium falciparum sexual conversion differently. *eLife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.60058>
- Price, R. N., Nosten, F., Luxemburger, C., ter Kuile, F. O., Paiphun, L., Chongsuphajaisiddhi, T., & White, N. J. (1996). Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet (London, England)*, *347*(9016), 1654-1658. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)91488-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)91488-9)
- Priyadarshini, S. (2018). Artemisinin-resistant malaria surfaces in India. *Nature India*. <https://doi.org/10.1038/nindia.2018.151>
- Raabe, A. C., Billker, O., Vial, H. J., & Wengelnik, K. (2009). Quantitative assessment of DNA replication to monitor microgametogenesis in Plasmodium berghei. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *168*(2), 172-176. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.08.004>
- Rajapandi, T. (2019). Upregulation of gametocytogenesis in anti-malarial drug-resistant Plasmodium falciparum. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, *43*(3), 458-463. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01110-w>
- Ramaprasad, A., Burda, P.-C., Calvani, E., Sait, A. J., Palma-Duran, S. A., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Macrae, J., Collinson, L., Gilberger, T. W., & Blackman, M. J. (2022). A choline-releasing glycerophosphodiesterase essential for phosphatidylcholine biosynthesis and blood stage development in the malaria parasite. *eLife*, *11*, e82207. <https://doi.org/10.7554/eLife.82207>
- Ramiro, R. S., Alpedrinha, J., Carter, L., Gardner, A., & Reece, S. E. (2011). Sex and Death : The Effects of Innate Immune Factors on the Sexual Reproduction of Malaria Parasites. *PLoS Pathogens*, *7*(3), e1001309. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001309>
- Rashpa, R., & Brochet, M. (2022). Expansion microscopy of Plasmodium gametocytes reveals the molecular architecture of a bipartite microtubule organisation centre coordinating mitosis with axoneme assembly. *PLoS Pathogens*, *18*(1), e1010223. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010223>
- Rasmussen, C., Alonso, P., & Ringwald, P. (2022). Current and emerging strategies to combat antimalarial resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *20*(3), 353-372. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1962291>
- Reader, J., Botha, M., Theron, A., Lauterbach, S. B., Rossouw, C., Engelbrecht, D., Wepener, M., Smit, A., Leroy, D., Mancama, D., Coetzer, T. L., & Birkholtz, L.-M. (2015). Nowhere to hide : Interrogating different metabolic parameters of Plasmodium falciparum gametocytes in a transmission blocking drug discovery pipeline towards malaria elimination. *Malaria journal*, *14*(1), 213. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0718-z>

- Reader, J., van der Watt, M. E., Taylor, D., Le Manach, C., Mittal, N., Otilie, S., Theron, A., Moyo, P., Erlank, E., Nardini, L., Venter, N., Lauterbach, S., Bezuidenhout, B., Horatscheck, A., van Heerden, A., Spillman, N. J., Cowell, A. N., Connacher, J., Opperman, D., ... Birkholtz, L.-M. (2021). Multistage and transmission-blocking targeted antimalarials discovered from the open-source MMV Pandemic Response Box. *Nature Communications*, *12*, 269. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20629-8>
- Reece, S. E., Drew, D. R., & Gardner, A. (2008). Sex ratio adjustment and kin discrimination in malaria parasites. *Nature*, *453*(7195), 10.1038/nature06954. <https://doi.org/10.1038/nature06954>
- Rek, J., Blanken, S. L., Okoth, J., Ayo, D., Onyige, I., Musasizi, E., Ramjith, J., Andolina, C., Lanke, K., Arinaitwe, E., Olwoch, P., Collins, K. A., Kamya, M. R., Dorsey, G., Drakeley, C., Staedke, S. G., Bousema, T., & Conrad, M. D. (2022). Asymptomatic School-Aged Children Are Important Drivers of Malaria Transmission in a High Endemicity Setting in Uganda. *The Journal of Infectious Diseases*, *226*(4), 708-713. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac169>
- Reuling, I. J., van de Schans, L. A., Coffeng, L. E., Lanke, K., Meerstein-Kessel, L., Graumans, W., van Gemert, G.-J., Teelen, K., Siebelink-Stoter, R., van de Vegte-Bolmer, M., de Mast, Q., van der Ven, A. J., Ivinson, K., Hermsen, C. C., de Vlas, S., Bradley, J., Collins, K. A., Ockenhouse, C. F., McCarthy, J., ... Bousema, T. (2018). A randomized feasibility trial comparing four antimalarial drug regimens to induce Plasmodium falciparum gametocytemia in the controlled human malaria infection model. *eLife*, *7*, e31549. <https://doi.org/10.7554/eLife.31549>
- Reyes, P., Rathod, P. K., Sanchez, D. J., Mrema, J. E., Rieckmann, K. H., & Heidrich, H. G. (1982). Enzymes of purine and pyrimidine metabolism from the human malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *5*(5), 275-290. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(82\)90035-4](https://doi.org/10.1016/0166-6851(82)90035-4)
- Rodrigo, C., Rajapakse, S., & Fernando, S. D. (2020). Compliance with Primary Malaria Chemoprophylaxis : Is Weekly Prophylaxis Better Than Daily Prophylaxis? *Patient preference and adherence*, *14*, 2215-2223. <https://doi.org/10.2147/PPA.S255561>
- Romoli, O., & Gendrin, M. (2018). The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and Plasmodium. *Parasites & Vectors*, *11*, 200. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2784-x>
- Roncalés, M., Vidal-Mas, J., Leroy, D., & Herreros, E. (2012). Comparison and Optimization of Different Methods for the In Vitro Production of Plasmodium falciparum Gametocytes. *Journal of Parasitology Research*, *2012*, 927148. <https://doi.org/10.1155/2012/927148>
- Rosenthal, P. J. (2011). Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *712*, 30-48. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8414-2_3
- Ross, L. S., & Fidock, D. A. (2019). Elucidating Mechanisms of Drug-Resistant Plasmodium falciparum. *Cell host & microbe*, *26*(1), 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.001>
- Rossati, A., Bargiacchi, O., Kroumova, V., Zaramella, M., Caputo, A., & Garavelli, P. L. (2016). Climate, environment and transmission of malaria. *Le Infezioni in Medicina*, *24*(2), 93-104.
- Ruecker, A., Mathias, D. K., Straschil, U., Churcher, T. S., Dinglasan, R. R., Leroy, D., Sinden, R. E., & Delves, M. J. (2014). A Male and Female Gametocyte Functional Viability Assay To Identify Biologically Relevant Malaria Transmission-Blocking Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(12), 7292-7302. <https://doi.org/10.1128/AAC.03666-14>
- Salanti, A., Dahlbäck, M., Turner, L., Nielsen, M. A., Barfod, L., Magistrado, P., Jensen, A. T. R., Lavstsen, T., Ofori, M. F., Marsh, K., Hviid, L., & Theander, T. G. (2004). Evidence for the

- Involvement of VAR2CSA in Pregnancy-associated Malaria. *Journal of Experimental Medicine*, 200(9), 1197-1203. <https://doi.org/10.1084/jem.20041579>
- Sanchez, C. P., Stein, W. D., & Lanzer, M. (2008). Dissecting the components of quinine accumulation in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 67(5), 1081-1093. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06108.x>
- Sanders, N. G., Sullivan, D. J., Mlambo, G., Dimopoulos, G., & Tripathi, A. K. (2014). Gametocytocidal screen identifies novel chemical classes with *Plasmodium falciparum* transmission blocking activity. *PLoS One*, 9(8), e105817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105817>
- Sarma, N., Patouillard, E., Cibulskis, R. E., & Arcand, J.-L. (2019). The Economic Burden of Malaria : Revisiting the Evidence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(6), 1405-1415. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0386>
- Sato, S. (2021). Plasmodium—A brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *Journal of Physiological Anthropology*, 40, 1. <https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9>
- Sawa, P., Shekalaghe, S. A., Drakeley, C. J., Sutherland, C. J., Mweresa, C. K., Baidjoe, A. Y., Manjurano, A., Kavishe, R. A., Beshir, K. B., Yussuf, R. U., Omar, S. A., Hermsen, C. C., Okell, L., Schallig, H. D. F. H., Sauerwein, R. W., Hallett, R. L., & Bousema, T. (2013). Malaria transmission after artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperazine : A randomized trial. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(11), 1637-1645. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit077>
- Schalkwijk, J., Allman, E. L., Jansen, P. A. M., de Vries, L. E., Verhoef, J. M. J., Jackowski, S., Botman, P. N. M., Beuckens-Schortinghuis, C. A., Koolen, K. M. J., Bolscher, J. M., Vos, M. W., Miller, K., Reeves, S. A., Pett, H., Trevitt, G., Wittlin, S., Scheurer, C., Sax, S., Fischli, C., ... Dechering, K. J. (2019). Antimalarial pantothenamide metabolites target acetyl-coenzyme A biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Science Translational Medicine*, 11(510), eaas9917. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aas9917>
- Schneider, P., Bousema, T., Omar, S., Gouagna, L., Sawa, P., Schallig, H., & Sauerwein, R. (2006). (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *International Journal for Parasitology*, 36(4), 403-408. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.01.002>
- Schneider, P., & Reece, S. E. (2021). The private life of malaria parasites : Strategies for sexual reproduction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 244, 111375. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2021.111375>
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum : Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 79-94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Shakibaei, M., & Frevert, U. (1996). Dual interaction of the malaria circumsporozoite protein with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(5), 1699-1711. <https://doi.org/10.1084/jem.184.5.1699>
- Shaw-Saliba, K., Clarke, D., Santos, J. M., Menezes, M. J., Lim, C., Mascarenhas, A., Chery, L., Gomes, E., March, S., Bhatia, S. N., Rathod, P. K., Ferreira, M. U., Catteruccia, F., & Duraisingh, M. T. (2016). Infection of laboratory colonies of *Anopheles* mosquitoes with *Plasmodium vivax* from cryopreserved clinical isolates. *International Journal for Parasitology*, 46(11), 679-683. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.06.003>

- Sherman, I. W. (1977). Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bulletin of the World Health Organization*, 55(2-3), 265-276.
- Silvestrini, F., Alano, P., & Williams, J. L. (2000). Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 121 Pt 5, 465-471. <https://doi.org/10.1017/s0031182099006691>
- Sinden, R. E. (1982). Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro : An electron microscopic study. *Parasitology*, 84(1), 1-11. <https://doi.org/10.1017/s003118200005160x>
- Sinden, R. E. (1983). Sexual development of malarial parasites. *Advances in Parasitology*, 22, 153-216. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60462-5](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60462-5)
- Sinden, R. E. (2017). Developing transmission-blocking strategies for malaria control. *PLoS Pathogens*, 13(7), e1006336. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006336>
- Sinden, R. E., Canning, E. U., Bray, R. S., & Smalley, M. E. (1978). Gametocyte and gamete development in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 201(1145), 375-399. <https://doi.org/10.1098/rspb.1978.0051>
- Singh, R., Singh, R., Srihari, V., & Makde, R. D. (2023). In Vitro Investigation Unveiling New Insights into the Antimalarial Mechanism of Chloroquine : Role in Perturbing Nucleation Events during Heme to β -Hematin Transformation. *ACS Infectious Diseases*, 9(8), 1647-1657. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00278>
- Singh, S. K., Plieskatt, J., Chourasia, B. K., Singh, V., Bengtsson, K. L., Reimer, J. M., van Daalen, R. C., Teelen, K., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G.-J., Jore, M. M., & Theisen, M. (2021). Preclinical development of a Pfs230-Pfs48/45 chimeric malaria transmission-blocking vaccine. *NPJ Vaccines*, 6, 120. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00383-8>
- Singh, S. K., Roeffen, W., Mistarz, U. H., Chourasia, B. K., Yang, F., Rand, K. D., Sauerwein, R. W., & Theisen, M. (2017). Construct design, production, and characterization of *Plasmodium falciparum* 48/45 R0.6C subunit protein produced in *Lactococcus lactis* as candidate vaccine. *Microbial Cell Factories*, 16, 97. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0710-0>
- Sinha, A., Hughes, K. R., Modrzynska, K. K., Otto, T. D., Pfander, C., Dickens, N. J., Religa, A. A., Bushell, E., Graham, A. L., Cameron, R., Kafsack, B. F. C., Williams, A. E., Llinas, M., Berriman, M., Billker, O., & Waters, A. P. (2014). A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature*, 507(7491), 253-257. <https://doi.org/10.1038/nature12970>
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Burkot, T. R., Harbach, R. E., & Hay, S. I. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5, 69. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-69>
- Skorokhod, O. A., Caione, L., Marrocco, T., Migliardi, G., Barrera, V., Arese, P., Piacibello, W., & Schwarzer, E. (2010). Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia : Role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal. *Blood*, 116(20), 4328-4337. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-272781>
- Slater, A. F., Swiggard, W. J., Orton, B. R., Flitter, W. D., Goldberg, D. E., Cerami, A., & Henderson, G. B. (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(2), 325-329.
- Slater, L., Ashraf, S., Zahid, O., Ali, Q., Oneeb, M., Akbar, M. H., Riaz, M. I., Afshan, K., Sargison, N., & Chaudhry, U. (2022). Current methods for the detection of *Plasmodium* parasite species

- infecting humans. *Current Research in Parasitology & Vector-borne Diseases*, 2, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2022.100086>
- Snow, R. W., Sartorius, B., Kyalo, D., Maina, J., Amratia, P., Mundia, C. W., Bejon, P., & Noor, A. M. (2017). The prevalence of *Plasmodium falciparum* in sub Saharan Africa since 1900. *Nature*, 550(7677), 515-518. <https://doi.org/10.1038/nature24059>
- Spicer, T. P., Gardiner, D. L., Schoenen, F. J., Roy, S., Griffin, P. R., Chase, P., Scampavia, L., Hodder, P., & Trenholme, K. R. (2019). Identification of Antimalarial Inhibitors Using Late-Stage Gametocytes in a Phenotypic Live/Dead Assay. *SLAS Discovery : Advancing Life Sciences R & D*, 24(1), 38-46. <https://doi.org/10.1177/2472555218796410>
- Stiebler, R., Soares, J. B. R. C., Timm, B. L., Silva, J. R., Mury, F. B., Dansa-Petretski, M., & Oliveira, M. F. (2011). On the mechanisms involved in biological heme crystallization. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43(1), 93-99. <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9335-x>
- Sudsumrit, S., Chamchoy, K., Songdej, D., Adisakwattana, P., Krudsood, S., Adams, E. R., Imwong, M., Leartsakulpanich, U., & Boonyuen, U. (2022). Genotype-phenotype association and biochemical analyses of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants : Implications for the hemolytic risk of using 8-aminoquinolines for radical cure. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1032938. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1032938>
- Sullivan, D. J. (2017). Quinolines block every step of malaria heme crystal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(29), 7483-7485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708153114>
- Sun, W., Tanaka, T. Q., Magle, C. T., Huang, W., Southall, N., Huang, R., Dehdashti, S. J., McKew, J. C., Williamson, K. C., & Zheng, W. (2014). Chemical signatures and new drug targets for gametocytocidal drug development. *Scientific Reports*, 4, 3743. <https://doi.org/10.1038/srep03743>
- Suresh, N., & Haldar, K. (2018). Mechanisms of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Current opinion in pharmacology*, 42, 46-54.
- Surur, A. S., Huluka, S. A., Mitku, M. L., & Asres, K. (2020). Indole : The After Next Scaffold of Antiplasmodial Agents? *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 4855-4867. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S278588>
- Susanna, D., & Pratiwi, D. (2021). Current status of insecticide resistance in malaria vectors in the Asian countries : A systematic review. *F1000Research*, 10, 200. <https://doi.org/10.12688/f1000research.46883.2>
- Sutherland, C. J. (2016). Persistent Parasitism : The Adaptive Biology of Malariae and Ovale Malaria. *Trends in Parasitology*, 32(10), 808-819. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.07.001>
- Sutton, R. L. (1991). Critical cooling rates to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 87(1), 101. <https://doi.org/10.1039/ft9918700101>
- Syed, Y. Y. (2022). RTS,S/AS01 malaria vaccine (Mosquirix®) : A profile of its use. *Drugs & Therapy Perspectives*, 38(9), 373-381. <https://doi.org/10.1007/s40267-022-00937-3>
- Tadesse, F. G., Meerstein-Kessel, L., Gonçalves, B. P., Drakeley, C., Ranford-Cartwright, L., & Bousema, T. (2019). Gametocyte Sex Ratio : The Key to Understanding *Plasmodium falciparum* Transmission? *Trends in Parasitology*, 35(3), 226-238. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.12.001>
- Tadesse, F. G., Slater, H. C., Chali, W., Teelen, K., Lanke, K., Belachew, M., Menberu, T., Shumie, G., Shitaye, G., Okell, L. C., Graumans, W., van Gemert, G.-J., Kedir, S., Tesfaye, A., Belachew, F., Abebe, W., Mamo, H., Sauerwein, R., Balcha, T., ... Bousema, T. (2018). The Relative

- Contribution of Symptomatic and Asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Infections to the Infectious Reservoir in a Low-Endemic Setting in Ethiopia. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 66(12), 1883-1891. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1123>
- Tadesse, F. G., van den Hoogen, L., Lanke, K., Schildkraut, J., Tetteh, K., Aseffa, A., Mamo, H., Sauerwein, R., Felger, I., Drakeley, C., Gadissa, E., & Bousema, T. (2017). The shape of the iceberg : Quantification of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia and gametocytaemia in five low endemic settings in Ethiopia. *Malaria Journal*, 16, 99. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1749-4>
- Takale, N. R., Aji, A., Jane, K., Deshmukh, P. R., Pendharkar, V. V., Khade, R. R., Ghule, B. V., Inamdar, N. N., & Kotagale, N. R. (2022). Lumefantrine solid dispersions with piperine for the enhancement of solubility, bioavailability and anti-parasite activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 628, 122354. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122354>
- Talman, A. M., Domarle, O., McKenzie, F. E., Ariey, F., & Robert, V. (2004). Gametocytogenesis : The puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 3, 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-3-24>
- Tambo, M., Mwinga, M., & Mumbengegwi, D. R. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and Polymerase Chain Reaction (PCR) as quality assurance tools for Rapid Diagnostic Test (RDT) malaria diagnosis in Northern Namibia. *PLoS ONE*, 13(12), e0206848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206848>
- Tanaka, T. Q., Dehdashti, S. J., Nguyen, D.-T., McKew, J. C., Zheng, W., & Williamson, K. C. (2013). A quantitative high throughput assay for identifying gametocytocidal compounds. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 188(1), 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.02.005>
- Tanaka, T. Q., & Williamson, K. C. (2011). A malaria gametocytocidal assay using oxidoreduction indicator, alamarBlue. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 177(2), 160-163. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.02.005>
- Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., & Krudsood, S. (2009). Malaria Diagnosis : A Brief Review. *The Korean Journal of Parasitology*, 47(2), 93-102. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.2.93>
- Toda, H., Diaz-Varela, M., Segui-Barber, J., Roobsoong, W., Baro, B., Garcia-Silva, S., Galiano, A., Gualdrón-López, M., Almeida, A. C. G., Brito, M. A. M., de Melo, G. C., Aparici-Herraiz, I., Castro-Cavada, C., Monteiro, W. M., Borràs, E., Sabidó, E., Almeida, I. C., Chojnacki, J., Martínez-Picado, J., ... Del Portillo, H. A. (2020). Plasma-derived extracellular vesicles from *Plasmodium vivax* patients signal spleen fibroblasts via NF-κB facilitating parasite cytoadherence. *Nature Communications*, 11(1), 2761. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16337-y>
- Tokumasu, F., Hayakawa, E. H., Fukumoto, J., Tokuoka, S. M., & Miyazaki, S. (2021). Creative interior design by *Plasmodium falciparum* : Lipid metabolism and the parasite's secret chamber. *Parasitology International*, 83, 102369. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102369>
- Tomas, A. M., Margos, G., Dimopoulos, G., van Lin, L. H. M., de Koning-Ward, T. F., Sinha, R., Lupetti, P., Beetsma, A. L., Rodriguez, M. C., Karras, M., Hager, A., Mendoza, J., Butcher, G. A., Kafatos, F., Janse, C. J., Waters, A. P., & Sinden, R. E. (2001). P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *The EMBO Journal*, 20(15), 3975-3983. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.3975>

- Touray, A. O., Mobegi, V. A., Wamunyokoli, F., Butungi, H., & Herren, J. K. (2021). Prevalence of asymptomatic *P. falciparum* gametocyte carriage among school children in Mbita, Western Kenya and assessment of the association between gametocyte density, multiplicity of infection and mosquito infection prevalence. *Wellcome Open Research*, *5*, 259. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16299.2>
- Trager, W., Gill, G. S., Lawrence, C., & Nagel, R. L. (1999). Plasmodium falciparum : Enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. *Experimental Parasitology*, *91*(2), 115-118. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4347>
- Tran, P. N., Brown, S. H. J., Rug, M., Ridgway, M. C., Mitchell, T. W., & Maier, A. G. (2016). Changes in lipid composition during sexual development of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Malaria Journal*, *15*, 73. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1130-z>
- Tripathy, S., & Roy, S. (2015). Redox sensing and signaling by malaria parasite in vertebrate host. *Journal of Basic Microbiology*, *55*(9), 1053-1063. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500031>
- Tripet, F., Aboagye-Antwi, F., & Hurd, H. (2008). Ecological immunology of mosquito-malaria interactions. *Trends in Parasitology*, *24*(5), 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.02.008>
- Tumwebaze, P. K., Conrad, M. D., Okitwi, M., Orena, S., Byaruhanga, O., Katairo, T., Legac, J., Garg, S., Giesbrecht, D., Smith, S. R., Ceja, F. G., Nsohya, S. L., Bailey, J. A., Cooper, R. A., & Rosenthal, P. J. (2022). Decreased susceptibility of Plasmodium falciparum to both dihydroartemisinin and lumefantrine in northern Uganda. *Nature Communications*, *13*, 6353. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33873-x>
- Updated WHO recommendations for malaria chemoprevention and elimination.* (2022, juin 3). <https://www.who.int/news/item/03-06-2022-updated-who-recommendations-for-malaria-chemoprevention-and-elimination>
- Usui, M., & Williamson, K. C. (2021). Stressed Out About Plasmodium falciparum Gametocytogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 790067. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.790067>
- Uwimana, A., Legrand, E., Stokes, B. H., Ndikumana, J.-L. M., Warsame, M., Umulisa, N., Ngamije, D., Munyaneza, T., Mazarati, J.-B., Munguti, K., Campagne, P., Criscuolo, A., Ariey, F., Murindahabi, M., Ringwald, P., Fidock, D. A., Mbituyumuremyi, A., & Menard, D. (2020). Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant Plasmodium falciparum kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nature Medicine*, *26*(10), 1602-1608. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1005-2>
- Vale, N., Moreira, R., & Gomes, P. (2009). Primaquine revisited six decades after its discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(3), 937-953. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.08.011>
- Vallejo, A. F., García, J., Amado-Garavito, A. B., Arévalo-Herrera, M., & Herrera, S. (2016a). Plasmodium vivax gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malaria Journal*, *15*, 48. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1104-1>
- Vallejo, A. F., García, J., Amado-Garavito, A. B., Arévalo-Herrera, M., & Herrera, S. (2016b). Plasmodium vivax gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malaria Journal*, *15*, 48. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1104-1>
- van der Watt, M. E., Reader, J., & Birkholtz, L.-M. (2022). Adapt or Die : Targeting Unique Transmission-Stage Biology for Malaria Elimination. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 901971. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.901971>

- Van Voorhis, W. C., Adams, J. H., Adelfio, R., Ah Yong, V., Akabas, M. H., Alano, P., Alday, A., Alemán Resto, Y., Alsibae, A., Alzualde, A., Andrews, K. T., Avery, S. V., Avery, V. M., Ayong, L., Baker, M., Baker, S., Ben Mamoun, C., Bhatia, S., Bickle, Q., ... Willis, P. A. (2016). Open Source Drug Discovery with the Malaria Box Compound Collection for Neglected Diseases and Beyond. *PLoS Pathogens*, *12*(7), e1005763. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005763>
- van Doorn, E., Liu, H., Huckriede, A., & Hak, E. (2015). Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA™51 as vaccine adjuvant : A systematic review. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *12*(1), 159-169. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1071455>
- Vasquez, M., Zuniga, M., & Rodriguez, A. (2021). Oxidative Stress and Pathogenesis in Malaria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 768182. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.768182>
- Vaughan, A. M., & Kappe, S. H. I. (2017). Malaria Parasite Liver Infection and Exoerythrocytic Biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(6), a025486. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025486>
- Vial, H. J., Ancelin, M. L., Philippot, J. R., & Thuet, M. J. (1990). Biosynthesis and dynamics of lipids in Plasmodium-infected mature mammalian erythrocytes. *Blood Cells*, *16*(2-3), 531-555; discussion 556-561.
- Villena, O. C., Ryan, S. J., Murdock, C. C., & Johnson, L. R. (2022). Temperature impacts the environmental suitability for malaria transmission by *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Ecology*, *103*(8), e3685. <https://doi.org/10.1002/ecy.3685>
- Volkman, S. K., Neafsey, D. E., Schaffner, S. F., Park, D. J., & Wirth, D. F. (2012). Harnessing genomics and genome biology to understand malaria biology. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(5), 315-328. <https://doi.org/10.1038/nrg3187>
- Vos, M. W., Stone, W. J. R., Koolen, K. M., van Gemert, G.-J., van Schaijk, B., Leroy, D., Sauerwein, R. W., Bousema, T., & Dechering, K. J. (2015). A semi-automated luminescence based standard membrane feeding assay identifies novel small molecules that inhibit transmission of malaria parasites by mosquitoes. *Scientific Reports*, *5*, 18704. <https://doi.org/10.1038/srep18704>
- Wadi, I., Deora, N., Nath, M., & Sinha, A. (2021). Investigation of factors affecting the production of *P. falciparum* gametocytes in an Indian isolate. *3 Biotech*, *11*(2), 55. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02586-7>
- Wadi, I., Pillai, C. R., Anvikar, A. R., Sinha, A., Nath, M., & Valecha, N. (2018). Methylene blue induced morphological deformations in *Plasmodium falciparum* gametocytes : Implications for transmission-blocking. *Malaria journal*, *17*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2153-9>
- Wahlgren, M., Goel, S., & Akhouri, R. R. (2017). Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria. *Nature Reviews. Microbiology*, *15*(8), 479-491. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.47>
- Walz, E. J., Volkman, H. R., Adedimeji, A. A., Abella, J., Scott, L. A., Angelo, K. M., Gaines, J., Coyle, C. M., Dunlop, S. J., Wilson, D., Biah, A. P., Wanduragala, D., & Stauffer, W. M. (2019). Barriers to malaria prevention in US-based travellers visiting friends and relatives abroad : A qualitative study of West African immigrant travellers. *Journal of travel medicine*, *26*(2), tay163. <https://doi.org/10.1093/jtm/tay163>
- West, R., & Sullivan, D. J. (2020). Lactic Acid Supplementation Increases Quantity and Quality of Gametocytes in *Plasmodium falciparum* Culture. *Infection and Immunity*, *89*(1), e00635-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00635-20>

- White, N. J. (2017). Malaria parasite clearance. *Malaria Journal*, 16, 88. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1731-1>
- White, N. J., Duong, T. T., Uthaisin, C., Nosten, F., Phyo, A. P., Hanboonkunupakarn, B., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chuthasmit, K., Cheung, M. S., Feng, Y., Li, R., Magnusson, B., Sultan, M., Wieser, D., Xun, X., Zhao, R., Diagana, T. T., Pertel, P., & Leong, F. J. (2016). Antimalarial Activity of KAF156 in Falciparum and Vivax Malaria. *The New England Journal of Medicine*, 375(12), 1152-1160. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602250>
- WHO Guidelines for malaria. (2022, novembre 25). <https://www.who.int/publications-detail-redirect/guidelines-for-malaria>
- Witkowski, B., Lelièvre, J., Nicolau-Travers, M.-L., Iriart, X., Njomnang Soh, P., Bousejra-ElGarah, F., Meunier, B., Berry, A., & Benoit-Vical, F. (2012). Evidence for the Contribution of the Hemozoin Synthesis Pathway of the Murine Plasmodium yoelii to the Resistance to Artemisinin-Related Drugs. *PLoS ONE*, 7(3), e32620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032620>
- Woodrow, C. J., Burchmore, R. J., & Krishna, S. (2000). Hexose permeation pathways in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 9931-9936.
- World Health Organization. (2012a). *Test, treat, track : Scaling up diagnostic testing, treatment and surveillance for malaria* (WHO/HTM/GMP/2012.03). World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337979>
- World Health Organization. (2012b). *WHO policy recommendation : Seasonal malaria chemoprevention (SMC) for plasmodium falciparum malaria control in highly seasonal transmission areas of the Sahel sub-region in Africa* (WHO/HTM/GMP/2012.02). World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337978>
- World Health Organization. (2021, octobre 6). *WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk*. <https://www.who.int/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk>
- World Health Organization. (2022). *World malaria report 2022*. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>
- World Health Organization. (2023a). *Malaria Threat Map*. <https://apps.who.int/malaria/maps/threats/>
- World Health Organization. (2023b, août 15). *WHO initiative to stop the spread of Anopheles stephensi in Africa, 2023 update*. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-UCN-GMP-2022.06>
- World-malaria-report-2022. (s. d.). Consulté 22 février 2023, à l'adresse https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2022.pdf?sfvrsn=40bfc53a_4
- Wu, T., Nagle, A., Kuhen, K., Gagaring, K., Borboa, R., Francek, C., Chen, Z., Plouffe, D., Goh, A., Lakshminarayana, S. B., Wu, J., Ang, H. Q., Zeng, P., Kang, M. L., Tan, W., Tan, M., Ye, N., Lin, X., Caldwell, C., ... Chatterjee, A. K. (2011). Imidazolopiperazines : Hit to Lead Optimization of New Antimalarial Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(14), 5116-5130. <https://doi.org/10.1021/jm2003359>
- Wu, Y., Ellis, R. D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E. M., Mahanty, S., Fay, M. P., Narum, D., Rausch, K., Miles, A. P., Aebig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., ... Durbin, A. P. (2008). Phase 1 Trial of Malaria Transmission Blocking Vaccine Candidates Pfs25 and Pvs25 Formulated with Montanide ISA 51. *PLoS ONE*, 3(7), e2636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002636>

- WWARN Gametocyte Study Group. (2016). Gametocyte carriage in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria following treatment with artemisinin combination therapy : A systematic review and meta-analysis of individual patient data. *BMC Medicine*, *14*, 79. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0621-7>
- Xu, M., Hu, Y.-X., Lu, S.-N., Idris, M. A., Zhou, S.-D., Yang, J., Feng, X.-N., Huang, Y.-M., Xu, X., Chen, Y., & Wang, D.-Q. (2023). Seasonal malaria chemoprevention in Africa and China's upgraded role as a contributor : A scoping review. *Infectious Diseases of Poverty*, *12*(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01115-x>
- Xu, Y., Qiao, D., Wen, Y., Bi, Y., Chen, Y., Huang, Z., Cui, L., Guo, J., & Cao, Y. (2020). PfAP2-G2 Is Associated to Production and Maturation of Gametocytes in *Plasmodium falciparum* via Regulating the Expression of PfMDV-1. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 631444. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.631444>
- Yahiya, S., Saunders, C. N., Straschil, U., Fischer, O. J., Rueda-Zubiaurre, A., Haase, S., Vizcay-Barrena, G., Jordan, S., Hassan, S., Delves, M. J., Tate, E. W., Barnard, A., Fuchter, M. J., & Baum, J. (2021). *Plasmodium falciparum* protein Pfs16 is a target for transmission-blocking antimalarial drug development (p. 2021.06.14.448287). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.06.14.448287>
- Yared, S., Gebressielasie, A., Damodaran, L., Bonnell, V., Lopez, K., Janies, D., & Carter, T. E. (2020). Insecticide resistance in *Anopheles stephensi* in Somali Region, eastern Ethiopia. *Malaria Journal*, *19*, 180. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03252-2>
- Yipsirimetee, A., Chiewpoo, P., Tripura, R., Lek, D., Day, N. P. J., Dondorp, A. M., Pukrittayakamee, S., White, N. J., & Chotivanich, K. (2022). Assessment In Vitro of the Antimalarial and Transmission-Blocking Activities of Cipargamin and Ganaplacide in Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *66*(3), e01481-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.01481-21>
- Yombi, J. C., & Olinga, U. N. (2015). *LA MALARIA : ASPECT CLINIQUE ET THÉRAPEUTIQUE*. *134*(9), 499-509.
- Yu, S., Wang, J., Luo, X., Zheng, H., Wang, L., Yang, X., & Wang, Y. (2022). Transmission-Blocking Strategies Against Malaria Parasites During Their Mosquito Stages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 820650. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.820650>
- Zeng, S., Wang, H., Tao, L., Ning, X., Fan, Y., Zhao, S., Qin, L., & Chen, X. (2022). Decoquinate liposomes : Highly effective clearance of *Plasmodium* parasites causing severe malaria. *Malaria Journal*, *21*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04042-8>