

Thèse de doctorat
de l'Université Sorbonne Paris Cité
Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale 561 HOB (hématologie, oncogénèse, biothérapies)

Institut National de la Transfusion Sanguine-UMR_S1134, département de recherches
biologiques sur le globule rouge

**Splénomégalie, déformabilité des globules rouges circulants
et héritabilité de la diversité phénotypique
chez des sujets exposés à *Plasmodium falciparum***

Par Benoît Henry

Thèse de doctorat d'hématologie

Dirigée par le Pr Pierre Buffet

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 1^{er} juillet 2019

Devant un jury composé de :

Pr Pierre-Marie Girard, Université Pierre et Marie Curie, président du jury

Pr Loïc Garçon, Université de Picardie Jules Verne, Rapporteur

Pr Antoine Berry, Université Paul Sabatier Toulouse III, Rapporteur

Pr Sandrine Houzé, Université Paris Descartes, Examinatrice

Pr Olivier Bouchaud, Université Paris 13, Examineur

Pr Pierre Buffet, Université Paris Descartes, directeur de thèse



Titre : Splénomégalie, déformabilité des globules rouges circulants et héritabilité de la diversité phénotypique chez des sujets exposés à *Plasmodium falciparum*

Resumé : En Afrique sub saharienne, les membres du groupe ethnique Peulh ont une réponse phénotypique singulière à l'infection par *Plasmodium falciparum*, comportant une prévalence plus élevée de la splénomégalie et de l'anémie, ainsi qu'une charge parasitaire circulante plus basse et qu'une réponse immune humorale anti parasitaire plus intense. Ce phénotype considéré comme « protecteur » est proche d'une forme rare et chronique d'infection palustre, la splénomégalie palustre hyper-réactive. Les déterminants de cette présentation phénotypique particulière sont mal connus. Une origine génétique est suspectée. Nous avons émis l'hypothèse que des spécificités des hématies (parasitées ou non) jouaient un rôle dans la genèse de ce phénotype.

Nous avons étudié la réponse phénotypique à l'infection palustre au sein d'une population multi-ethnique (Bariba, Gando, Otamari, Peulh) de près de 800 individus (193 familles) vivant dans le nord-ouest du Bénin, en zone d'hyper endémie palustre. Huit passages transversaux entre juin 2015 et décembre 2017 ont été réalisés. Nous avons confirmé, dans le groupe Peulh, une sur-prévalence de la splénomégalie. Les IgM plasmatiques totales, mesurées à 2 reprises, étaient aussi plus élevées chez les Peulhs. L'évolution temporelle de la prévalence de l'infection palustre, de la fièvre et de l'anémie différait selon les ethnies de façon inconstante.

Nous avons ensuite analysé le phénotype érythrocytaire au sein de cette même population lors d'un passage transversal fin 2017. A cette date, la splénomégalie était significativement plus prévalente chez les Peulhs, mais la tendance à l'anémie et à une moindre charge parasitaire, bien que présente, n'était pas significative. Il existait une sur-prévalence non significative d'infection palustre dans le groupe Peulh. Les hématies circulantes, étudiées par microsphiltration et ektacytométrie, étaient plus déformables dans le groupe Peulh. L'analyse uni puis multivariée des facteurs associés aux valeurs de déformabilité a montré que les déterminants en étaient l'ethnie et la présence de marqueurs d'infection palustre (test diagnostique rapide ou PCR) ; la déformabilité élevée des hématies n'étant observée que chez les sujets Peulhs infectés. Au sein d'un sous-groupe de 120 sujets, l'infection des hématies *in vitro* par *P. falciparum* n'a pas montré de différence inter ethnique en termes de déformabilité des hématies infectées ou de croissance parasitaire. En revanche, il existait une corrélation positive, plus marquée chez les Peulhs, entre déformabilité des hématies circulantes et croissance plasmodiale *in vitro*. L'héritabilité de la déformabilité érythrocytaire (valeurs de microsphiltration) était très importante chez les Peulhs et les sujets infectés. Le groupe Peulh possédait également une plus grande proportion de cellules B mémoires IgM positives en circulation.

Ces données confirment l'existence d'une réponse phénotypique particulière de l'ethnie Peulh à l'infection palustre, sujette à de fortes variations temporelles. La déformabilité élevée des hématies circulantes chez les Peulhs, trait hautement héritable associé à une corrélation entre déformabilité des hématies circulantes et croissance *in vitro* du parasite, pourrait être expliquée, dans ce groupe, soit par une réponse hématopoïétique exacerbée à l'infection, soit par une déformabilité basale plus importante dans un sous-groupe de sujets Peulhs, favorisant l'infection, soit enfin par une filtration splénique des hématies exacerbée par l'infection palustre. Ces éléments suggèrent que chez les sujets exposés au paludisme, des spécificités érythrocytaires ou spléniques pourraient intervenir en amont

de la réaction immunitaire adaptative, et ouvrent la voie à l'identification des déterminants génétiques de ce nouveau trait.

Mots clefs : Paludisme ; *Plasmodium falciparum* ; rate ; ethnicité ; érythrocyte ; héritabilité.

Title : Splenomegaly, deformability of circulating erythrocytes and heritability of phenotypic diversity in *Plasmodium falciparum*-exposed subjects.

Abstract : In sub-Saharan Africa, the Fulani people display a specific phenotypic response to the infection with *Plasmodium falciparum*, defined by the over-prevalence of splenomegaly and anemia, less frequent or lower parasitemia, and a stronger anti-plasmodial immune response. This "protective" phenotype is reminiscent of hyper-reactive malarial splenomegaly, a rare and chronic form of malarial infection. Determinants of this specific phenotype remain elusive, but a genetic basis is suspected. We hypothesized that specificities of erythrocytes (parasitized or not) would play a role in the emergence of this phenotype.

We have studied the phenotypic response to malarial infection in a 800 subjects (193 families) multi-ethnic cohort (Bariba, Gando, Otamari, Fulani) living in sympatry in Northern Benin, a malarial hyperendemic region. Eight cross-sectional studies were performed between June, 2015 and December, 2017. We confirmed, among Fulani, a greater prevalence of splenomegaly. Total plasma IgM were also higher among Fulani at 2 time points. Analysis of temporal trends of *Plasmodium* infection markers, fever and anemia showed inconstant inter-ethnic differences.

We then evaluated erythrocyte phenotype in the same cohort, during a cross-sectional study in December, 2017. At this time, prevalence of splenomegaly was significantly higher among Fulani, but the trend towards anemia and lower parasitic load, although present, was insignificant. We found a higher, non-significant, prevalence of malarial infection among Fulani. Deformability of circulating erythrocytes, measured through ektacytometry and microspiltration, was higher among Fulani. Uni-then multivariate analysis of factors associated with erythrocyte deformability showed that the major determinants of this trait were ethnicity and markers of plasmodial infection (rapid diagnostic test or PCR); increase in deformability being almost exclusively observed among infected Fulani subjects. In a subgroup of 120 subjects, *in vitro* infection of erythrocytes with *P. falciparum* did not show inter-ethnic differences regarding erythrocyte deformability or parasite growth. However, a positive correlation was observed between circulating erythrocytes deformability and parasite growth. This was more pronounced in Fulani. Heritability of erythrocyte deformability (through microspiltration) was very high in Fulani and in infected subjects. Fulani also displayed a higher proportion of circulating IgM-positive memory B cells.

These data confirm the reality of a peculiar phenotypic response to malarial infection among Fulani; this phenotype is nevertheless subject to marked temporal variations. The enhanced deformability of circulating erythrocytes in Fulani, its strong heritability, and the correlation between circulating erythrocytes deformability and parasite growth after *in vitro* infection could be explained by three non-

mutually exclusive hypotheses: and enhanced erythropoietic response to malarial infection in Fulani; an increased circulating erythrocytes deformability in a subgroup of Fulani, which would favor infection; or by an enhanced splenic filtration of erythrocytes by the spleen in reaction to infection in Fulani. These elements suggest that in malaria-exposed subjects, erythrocytes or spleen-related specificities could act upstream of antimalarial immune response. This also paves the way to the identification of genes involved in this novel trait.

Keywords: Malaria ; *Plasmodium falciparum* ; spleen ; ethnicity ; erythrocyte ; heritability.

Sommaire

Liste des abréviations	5
Liste des Figures	8
Liste des tableaux	11
Introduction	12
I. Le paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i> : notions générales	12
A. Malgré une régression globale récente, la mortalité et la morbidité du paludisme pèsent encore sur les populations des zones endémiques.....	12
B. L'interaction entre le parasite et ses deux hôtes, le moustique et l'être humain	13
C. La présentation clinique du paludisme est polymorphe et dépend de facteurs humains, parasitaires et environnementaux	22
D. Le diagnostic de l'infection palustre chez l'être humain repose sur la détection de formes circulantes asexuées.....	26
E. Les dérivés de l'artémisinine ont amélioré la prise en charge médicamenteuse du paludisme, mais ce bénéfice est menacé.	29
F. Les mesures préventives ont joué un rôle décisif dans le recul du nombre de cas, mais leur efficacité est elle aussi menacée.	32
II. Interactions hôte-parasite : les éléments génétiques protecteurs vis-à-vis du paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i>	35
A. Aspects historiques et généraux	35
B. Démarche globale	36
C. Polymorphismes érythrocytaires et paludisme à <i>P. falciparum</i> (figure 11 ; tableau 2).....	39
C. Polymorphismes génétiques non érythrocytaires et paludisme à <i>P. falciparum</i>	50
C. En résumé.....	52
III. Ethnicité et paludisme	53
A. La définition d'un groupe ethnique.....	53
B. Ethnicité au Bénin ; le cas particulier des Peulhs	53
C. Relations entre ethnie Peulh et paludisme en Afrique subsaharienne.....	55
D. Polymorphismes génétiques, ethnie Peulh et paludisme.	59
IV. Physiologie splénique et paludisme à <i>P. falciparum</i>	65
A. Structure anatomique et histologique de la rate	65
B. Physiologie de la circulation sanguine intra splénique	75
C. Rôles physiologiques & pathologiques de la rate	76
D. Paludisme chez les sujets hypo ou aspléniques.....	79

E. Prévalence de la splénomégalie et intensité de la transmission du paludisme	82
F. La rate dans l'accès aigu	84
G. La rate et le patient traité	92
H. Rôle dans la transmission de la maladie	96
I. Rate et portage chronique de parasites	98
J. En résumé.....	99
K. La splénomégalie palustre hyper réactive et ses complications	100
V. Problématique du travail de thèse	109
A. Retrouve-t-on au Bénin les mêmes différences inter-ethniques au plan du phénotype palustre qu'au cours des études déjà publiées ?	109
B. Pouvons-nous aller plus loin dans l'exploration d'éventuelles variations inter-ethniques de la réponse immunitaire B ?	110
C. Quelle est la faisabilité technique et logistique d'une exploration de terrain d'un phénotypage érythrocytaire inter ethnique étendu ?	110
D. Quel est la place des interactions rate-hématie (infectée ou non) dans la physiopathologie du phénotype Peulh-SPH ?	110
E. Quelle est la fonction splénique des Peulhs ?	110
F. Quel est le substratum génétique du phénotype palustre Peulh ?.....	110
Résultats.....	111
Première partie : caractérisation phénotypique de l'infection palustre chez les membres d'une cohorte multi-ethnique au Bénin	112
I. Etude principale et explorations cliniques, biologiques et échographiques complémentaires	112
II. Résultats	119
Seconde partie: la variabilité de la déformabilité érythrocytaire en lien avec l'infection à <i>Plasmodium falciparum</i> chez des sujets africains est un trait héritable.....	129
Discussion.....	179
I. Préambule	179
II. Synthèse sur les données phénotypiques	179
A. Evolution de la problématique de la thèse : de l'objectif initial d'étude de la splénomégalie palustre hyper réactive et du lymphome splénique tropical à l'analyse des variations phénotypiques dans une cohorte multi-ethnique en zone hyperendémique.	179
B. Les données recueillies par l'étude BAOBAB sont-elles cohérentes avec l'antériorité ?.....	181
III. Interprétation des données : vers un nouveau modèle physiopathologique de la variabilité inter-ethnique d'adaptation phénotypique à l'exposition à <i>P. falciparum</i> ?.....	186
A. Résumé des principaux résultats	186

B. Eléments de validité technique	187
C. Temporalité de l'infection et filtrabilité des GR	189
D. Pouvons-nous proposer un modèle cohérent liant l'ensemble des données obtenues ?	191
E. Quels mécanismes cellulaires peuvent être potentiellement impliqués?	198
1. Quels pourraient être les mécanismes cellulaires d'une hyper réactivité splénique à l'infection palustre chez les Peulhs ?.....	198
2. Dans l'hypothèse qu'une population de GR plus déformables et plus infectables existe chez certains Peulhs, quels mécanismes peuvent être envisagés pour leur genèse ?	200
3. Que pourrait sous-tendre une réponse érythropoïétique plus intense dans le groupe Peulh ?	200
F. Comment nos données d'évaluation de la réponse immune B s'intègrent-elles dans cette analyse ?	201
IV. Vers l'identification de nouveaux variants du génome liés à la réponse phénotypique à l'infection palustre.....	203
A. Données d'héritabilité.....	203
B. Le cas particulier du groupe Gando	204
C. Quelles mutations génétiques pourraient être en jeu ?	204
D. Concordance génotype/ethnie déclarative.	206
V. Limites de ce travail.....	206
A. Données phénotypiques	206
B. Données de déformabilité.....	207
C. Difficultés logistiques.	208
VI. Réflexion sur la poursuite des explorations	209
A. Préciser le phénotype clinico-biologique.....	209
B. Etoffer l'analyse phénotypique érythrocytaire.....	210
C. Tester l'hypothèse d'une hyperfiltration splénique en réponse à l'infection.....	210
D. Tester l'hypothèse d'une réponse érythropoïétique intense chez les sujets Peulhs infectés.....	212
E. Confrontations aux données génotypiques.	212
VII. Que nous a appris cette approche dans le contexte général du paludisme ?	213
VIII. Au-delà du paludisme, que peut nous apprendre ce travail de thèse?	213
IX. Conclusion générale.	214
Annexes.....	215
I. Communications scientifiques en rapport avec le travail de thèse	215
II. Publication en rapport avec une partie du travail de thèse :.....	219

Références bibliographiques.....235

Liste des abréviations

AD : Autosomique Dominant

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ACT : "Artemisinin Combination Therapies" ou thérapeutiques anti paludiques à base de dérivés de l'artémisinine

AID : Activation-induced Cytidine Deaminase

AMA1 : Apical Membrane Antigen 1

AMPc : Adénosine Mono Phosphate cyclique

AR : Autosomique Récessif

ARN : Acide Ribonucléique

BCR : B Cell Receptor

CD : Cluster de Différentiation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CR1 : Récepteur du Complément 1

CSP : Circumsporozoite Protein

DMT1 : Divalent Metal Transporter 1

EBV : Virus d'Epstein-Barr

FBH : Fièvre Bilieuse Hémoglobinurique

G6PD : Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase

GOF : Gain Of Function ou mutation gain de fonction

GR : Globules Rouges

GWAS : Genome-Wide Association Study

HRP2 : Histidin-Rich Protein 2

HLA : Human Leukocyte Antigen

IgG : Immunoglobulines G

IgM : Immunoglobulines M

ICAM 1 : Inter Cellular Adhesion Molecule 1

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IRF1 : Interferon Regulatory Factor-1

LAMP : Loop-mediated isothermal AMPlification assay

LDH : Lactico DésHydrogénase

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue

MARCO : Macrophage Receptor with Collagenous Structure

MBC : Memory B Cells

M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor

MSP : Merozoite Surface Protein

NRAMP1 : Natural Resistance Associated Macrophage Protein-1

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PADH : Post Artesunate Delayed Hemolysis

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PALS : PeriArterial Lymphoid Sheath ou manchon lymphoïde péri artériel

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFEMP 1 : *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1

PFZ : Peri Follicular Zone

PI : Phosphatidyl Inositol

PI3K : Phosphatidyl Inositol tri phosphate

PK : Pyruvate Kinase

PRR : Pattern Recognition Receptor

RESA : Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen

RIFIN : Repetitive Interspersed Families of polypeptides

RPM : Red Pulp Macrophage

RR : Risque Relatif

SAO : Southeast Asian Ovalocytosis

SLVL: Splenic Lymphoma with Villous Lymphocytes

S/P : Sulfadoxine-Pyriméthamine

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SPH : Splénomégalie Palustre Hyper-Réactive

STEVOR : Sub Telomeric Open Reading Frame

TDM : Tomodensitométrie

TDR : Test Diagnostique Rapide

Tfh : cellules T Follicular Helper

TGF β : Transforming Growth Factor β

TLR : Toll-Like Receptor

TPI : Traitement Préventif Intermittent

VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VHC : Virus de l'Hépatite C

VM : Ventilation Mécanique

VNI : Ventilation Non Invasive

ZM : Zone Marginale

Liste des Figures

Figure 1 : Répartition mondiale des pays endémiques et non endémiques pour <i>Plasmodium</i>	13
Figure 2 : Cycle de réplication sexué (chez l'anophèle) et asexué (chez l'être humain) de <i>P. falciparum</i> . D'après (Crompton et al., 2014)..	15
Figure 3 : Principales voies de signalisation mises en jeu dans la réponse immune innée dirigée contre les stades érythrocytaires de <i>P. falciparum</i>	18
Figure 4 : Mécanismes d'action potentiels des anticorps dirigés contre les stades asexués de <i>P. falciparum</i>	20
Figure 5 : Ségrégation des différentes formes clinico-biologiques de paludisme sévère dans une cohorte de 1822 enfants pris en charge au Kenya.....	24
Figure 6 : A, exemple de goutte épaisse mettant en évidence des trophozoïtes de <i>P. falciparum</i> après coloration au May-Grünwald-Giemsa et lecture au microscope optique B: résultat de frottis sanguin mince positif à <i>P. falciparum</i> (stade anneaux ou « rings ») après coloration au May-Grünwald-Giemsa et lecture au microscope optique. C: principe des tests de diagnostic rapide immunochromatographiques utilisant les protéines parasitaires HRP2, LDH ou aldolase.....	28
Figure 7 : Représentation graphique du mécanisme moléculaire supposé des mutations de <i>PfKelch 13</i> dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine	31
Figure 8 : Répartition géographique mondiale de la résistance de <i>P. falciparum</i> aux dérivés de l'artémisinine début 2018.....	32
Figure 9 : Proposition théorique de modélisation de la composante génétique de la susceptibilité aux infections selon l'âge.....	36
Figure 10 : Démarche générale d'étude de l'association entre variants génétiques et phénotype pathologique..	38
Figure 11 : Représentation générale des composants érythrocytaires dont des variants génétiques ont été associés à une protection vis-à-vis du paludisme.....	40
Figure 12 : Représentation des mécanismes physiopathologiques supposés sous-tendant la protection anti palustre conférée par le trait drépanocytaire.....	41
Figure 13 : Répartition géographique des principaux groupes ethniques au Bénin	54
Figure 14 : Répartition géographique de l'ethnie Peulh, estimée via celle des locuteurs de la langue Fulfulde.....	55
Figure 15 : Macro anatomie de la rate humaine et rapports anatomiques.....	66
Figure 16 : Histologie de la rate humaine après coloration argentique de Gordon-Sweet qui souligne les fibres de réticuline.....	67
Figure 17 : Aspect histologique de la pulpe rouge de la rate humaine après coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS) qui souligne les fibres discontinues autour de la paroi sinusale	68
Figure 18 : Représentation, chez la souris, du sinus marginal et de la zone marginale (partie supérieure) entourant la pulpe blanche splénique (partie inférieure)	70
Figure 19 : Représentation tri dimensionnelle de la structure d'un sinus veineux de la pulpe rouge splénique en coupe à la fois longitudinale et transversale, vu de l'extérieur.....	71
Figure 20 : Représentation de la double circulation sanguine intra splénique.....	76
Figure 21 : Surincidence précoce des accès palustres (a), toutes espèces confondues (b) dus à <i>P. falciparum</i> , ou (c) à <i>P. vivax</i> dans une cohorte de 67 sujets splénectomisés (courbe rouge) en	

<i>comparaison aux sujets contrôles (courbe bleue), vivant en Papouasie et suivis un an après splénectomie.</i>	81
Figure 22 : Densité parasitaire et taille moyenne de la rate selon la classification de Hackett en fonction de l'âge dans un collectif d'enfants vivant en zone holoendémique , mettant en évidence un parallélisme marqué entre les deux paramètres.....	84
Figure 23 : Rétention des hématies infectées dans la rate humaine.	86
Figure 24 : Activation de la fonction d'épuration de la rate humaine au cours de l'accès palustre.	87
Figure 25 : Illustration de l'association statistique entre splénomégalie et anémie sévère, association absente en cas de neuropaludisme.	89
Figure 26 : Mise en évidence expérimentale du processus de pitting intrasplénique.	94
Figure 27 : Cinétique temporelle, chez un patient traité par artésunate, des taux l'hémoglobine, des réticulocytes, des LDH, des hématies infectées et pitées	95
Figure 28 : Modélisation en fonction du temps de la charge parasitaire globale (et de la parasitémie) selon l'importance de la filtration splénique des hématies infectées et non infectées.	98
Figure 29 : Evolution temporelle des dénominations nosologiques et des principales découvertes physiopathologiques de la SPH.....	101
Figure 30 : Aspect en microscopie à fluorescence d'anticorps anti nucléaires associés à la SPH.	104
Figure 31 : Modèle physiopathologique du lymphome de Burkitt dans sa forme endémique illustrant les liens avec le virus EBV et <i>P. falciparum</i>	106
Figure 32 : Frottis sanguins mettant en évidence des lymphocytes villeux après coloration de Wright ou May-Grunwald-Giemsa chez des patients atteints de SLVL.	107
Figure 33 : Situation géographique de l'étude BAOBAB..	115
Figure 34 : Photographies prises lors des missions transversales de 2016.	116
Figure 35 : Répartition ethnique de la population globale de l'étude et dans chacun des 4 villages participant	120
Figure 36 : Fréquence relative des âges des sujets participants.	120
Figure 37 : Fluctuations temporelles de la prévalence de la splénomégalie, de la fièvre, de la positivité du test diagnostique rapide palustre et de l'anémie en fonction du groupe ethnique.	124
Figure 38 : Représentation au cours du temps du taux d'hémoglobine selon la catégorie d'âge et l'ethnie.....	124
Figure 39 : Concentration plasmatique des IgM totales chez les sujets Peulh et non-Peulhs, en 2016 et 2017.....	125
Figure 40 : Fluctuations temporelles entre 2016 et 2017 de la concentration plasmatique d'IgM totales dans un groupe de 147 enfants et 141 adultes	126
Figure 41 : Evaluation de la concordance inter-observateurs de la palpation splénique sur un groupe de 62 sujets Peulh	126
Figure 42 : Concordance entre examen clinique et échographie splénique chez 37 adultes.	127
Figure 43 : A, valeurs individuelles de ferritinémie chez 419 sujets évalués en décembre 2017. B, proportion de sujets atteints de carence martiale dans les groupes Peulh et non Peulh.	128
Figure 44 : Représentation graphique du degré de concordance, en décembre 2017, entre les 3 tests diagnostiques de l'infection palustre à notre disposition (PCR en temps réel, goutte épaisse, test diagnostique rapide) sur 388 sujets.	182

Figure 45 : Mise en perspective des valeurs de l'index d'élongation à 30 pascals du sang total évalué par ektacytométrie sur des sujets atteints de paludisme, et des volontaires sains (Dondorp et al., 1997), avec les valeurs mesurées au sein de la cohorte BAOBAB. 188

Figure 46 : Oscillations de parasitémie illustrant la possibilité, après la clairance d'une parasitémie patente, de la persistance en circulation d'antigènes palustres et donc d'une positivité du TDR.. 190

Figure 47 : Représentation graphique des populations érythrocytaires circulantes et non circulantes putatives chez un sujet Peulh, selon les 3 hypothèses interprétatives proposées..... 197

Figure 48 : A, histogramme de fréquence des différentes populations circulantes et non circulantes de GR chez un être humain infecté par *P. falciparum*. B1, représentation des valeurs de filtrabilité des GR en décembre 2017 chez les sujets de l'étude BAOBAB. B2, représentation des mêmes valeurs en séparant les sujets TDR négatifs et positifs. 197

Figure 49 : Hiérarchie des différentes composantes de l'héritabilité 203

Liste des tableaux

Tableau 1 : critères cliniques (panel supérieur) et paracliniques (panel inférieur) de gravité du paludisme d'importation..	23
Tableau 2 : résumé des caractéristiques des polymorphismes génétiques érythrocytaires associés à la protection anti paludique..	49
Tableau 3 : Liste des gènes intervenant dans le système immunitaire dont les variations ont été explorées en association avec l'infection palustre.	52
Tableau 4 : résumé des principales caractéristiques des études décrivant le phénotype clinico-biologique des sujets Peulh exposés à <i>P. falciparum</i>	63
Tableau 5 : Récapitulatif des principales caractéristiques des différentes populations de macrophages spléniques..	73
Tableau 6 : Critères OMS de classification des zones d'endémicité palustre selon l'intensité de transmission, via l'indice splénique.	83
Tableau 7 : Seuils retenus par l'OMS pour la définition de l'anémie. Les valeurs d'hémoglobine sont ici données en grammes par litre.....	115

Introduction

I. Le paludisme à *Plasmodium falciparum* : notions générales

A. Malgré une régression globale récente, la mortalité et la morbidité du paludisme pèsent encore sur les populations des zones endémiques.

Le paludisme est la première maladie parasitaire humaine au monde, en termes de mortalité induite. Cette infection est due à un protozoaire appartenant au phylum des *Apicomplexa*, du Genre *Plasmodium*. Plus de 150 espèces de *Plasmodium* ont été décrites, mais 6 seulement sont capables d'infecter l'être humain : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. ovale* qui comporte 2 sous-espèces : *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*, et *P. simium*. Ce travail est focalisé sur *P. falciparum*, espèce responsable de la très grande majorité des formes graves et des décès. Certains développements concerneront cependant *P. vivax*, seconde espèce en termes de prévalence et de morbidité.

Le paludisme est une pathologie dont la distribution géographique actuelle est essentiellement intertropicale (figure 1), suivant l'aire de répartition dense du moustique vecteur, qui appartient au genre *Anopheles*. Il existe des disparités géographiques quant à la répartition des espèces d'*Anopheles* et des espèces plasmodiales (<https://map.ox.ac.uk/explorer/#/>). *Plasmodium falciparum* est majoritaire en Afrique, alors qu'une proportion importante des cas est due à *P. vivax* en Asie et en Amérique du Sud. On estime qu'environ la moitié de la population mondiale (3.2 milliards de personnes dans 91 pays) vit en zone à risque de paludisme. Environ 216 millions d'accès aigus surviennent annuellement, et 445 000 décès par an sont attribuables au paludisme à l'échelle mondiale ¹. La très grande majorité de ces formes fatales concerne des enfants de moins de 5 ans vivant en Afrique subsaharienne. Le continent africain supporte 90% du poids de la morbidité et des décès par paludisme. L'estimation du nombre de cas et de décès liés au paludisme est méthodologiquement très complexe et fragile, notamment en raison du manque de moyens sanitaires et logistiques des pays les plus concernés par l'endémie. Ceci a conduit certains auteurs à reconsidérer les chiffres les plus communément admis, qui pourraient sous-évaluer le poids réel de la maladie ².

L'intensité de la transmission varie au cours de l'année dans la plupart des zones endémiques : la saison des pluies est beaucoup plus propice à la prolifération des moustiques que la saison sèche. La grande majorité des accès cliniques a donc lieu à ce moment. A l'inverse, l'intensité de transmission baisse drastiquement en saison sèche.

La décennie 2008-2018 a vu le poids du paludisme diminuer nettement à l'échelle mondiale. Entre 2000 et 2015, le nombre de cas annuels estimés a été réduit de 37% et le nombre de décès de 60%. Certains pays ont réussi à atteindre une quasi élimination de la circulation du parasite, d'autres ont effectué d'important progrès dans ce sens, si bien que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) affiche des objectifs d'élimination de la maladie au cours des prochaines décennies. Les facteurs déterminants de ce déclin comprennent un meilleur accès aux techniques diagnostiques de l'infection

(notamment les tests diagnostiques rapides) et une plus grande simplicité d'utilisation de ces techniques, un meilleur accès aux traitements anti paludiques également, l'essor des multi-thérapies antiparasitaires comprenant des dérivés de l'artémisinine (« artemisinin-based combination therapies : ACT »), l'augmentation de l'usage des moustiquaires imprégnées d'insecticides. La mise à disposition de fonds dédiés à des interventions de santé publique et à des actions de recherche fondamentale, translationnelle et clinique (fonds mondial de l'Organisation des Nations Unies, mécénat comme celui de la fondation Bill & Melinda Gates ou du Wellcome Trust...) a sans doute contribué à ce succès. Ces éléments encourageants doivent cependant être interprétés avec prudence au vu des dernières données épidémiologiques à l'échelle mondiale, faisant état d'une confirmation de la diminution de la mortalité globale du paludisme, mais d'une stabilisation du nombre de cas en 2017 (219 millions versus 217 millions l'année précédente). Parmi les pays rapportant une hausse des cas figuraient les 10 pays d'Afrique subsaharienne les plus touchés, notamment le Nigeria, Madagascar et la République Démocratique du Congo ³.

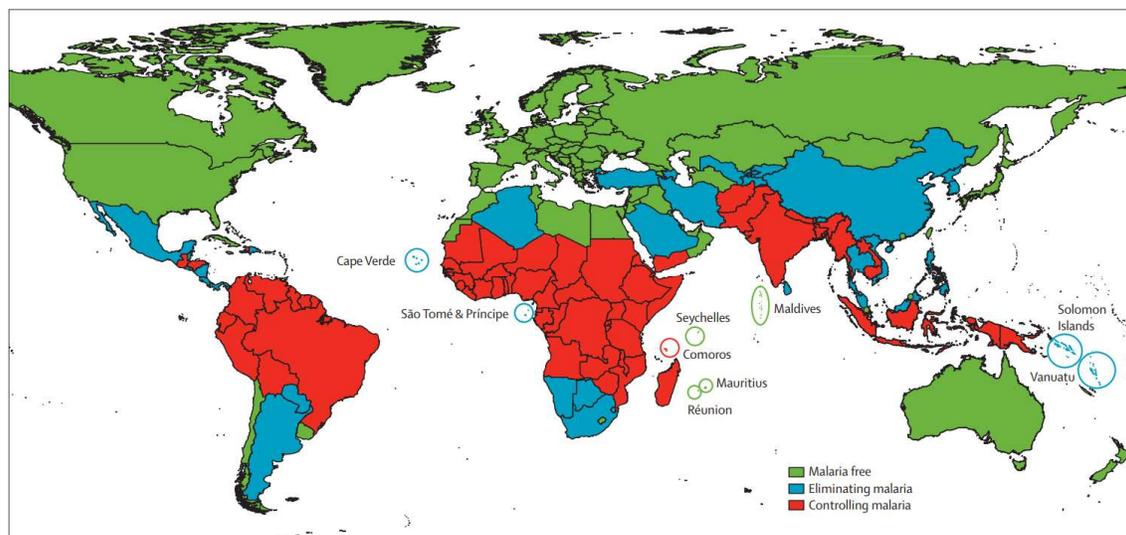


Figure 1 : répartition mondiale des pays endémiques (en rouge et bleu) et non endémiques (en vert) pour *Plasmodium*. D'après ⁴.

B. L'interaction entre le parasite et ses deux hôtes, le moustique et l'être humain

Le cycle parasitaire peut être dichotomisé en cycle sexué chez le moustique (qui constitue donc l'hôte définitif, au sens parasitologique du terme), et en cycle asexué chez l'être humain (qui correspond à un hôte intermédiaire).

1. Cycle chez l'humain (Figure 2)

L'être humain devient infecté lorsque piqué par un anophèle femelle. Le moustique injecte au moment de la piqûre une quantité en général modeste (50 ou moins) de sporozoïtes de *Plasmodium*, qui se

trouvent dans sa salive. Ces sporozoïtes sont mobiles, et peuvent gagner les vaisseaux sanguins dermiques puis le foie. A ce niveau, une première multiplication parasitaire a lieu à l'intérieur des hépatocytes et va donner lieu à la formation de schizontes intra-hépatiques. Cette étape est nommée schizogonie exo-érythrocytaire. Ces schizontes se rompent et libèrent alors dans la circulation sanguine des mérozoïtes, qui sont eux capables d'envahir les hématies humaines. A l'intérieur de celles-ci, le développement parasitaire se poursuit, passant successivement par les stades d'anneaux (« rings »), de trophozoïtes puis de schizontes. Ces derniers se rompent 48 heures après l'entrée des mérozoïtes, libérant de nouveaux mérozoïtes qui pourront réamorcer une schizogonie endo-érythrocytaire. La schizogonie exo-érythrocytaire est asymptomatique, le développement intra-érythrocytaire du parasite est seul responsable des symptômes et signes de la maladie.

Les espèces plasmodiales diffèrent quant à la durée de la schizogonie endo-érythrocytaire (48 heures pour *P. falciparum* et *P. vivax*, 72 heures pour *P. malariae* par exemple) et par la possibilité de formation d'hypnozoïtes hépatiques. Ces formes du parasite sont inactives au sein des hépatocytes pendant une durée variable, mais peuvent ultérieurement se réactiver et donner lieu à un nouveau cycle intra-érythrocytaire, responsable au plan clinique d'un accès de reviviscence. *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae* ne produisent pas d'hypnozoïtes hépatiques, contrairement à *P. vivax* et *P. ovale*.

2. Cycle chez le moustique

Lors de la multiplication érythrocytaire, certains parasites peuvent se différencier en formes sexuées, appelées gamétocytes mâles ou femelles. Ces gamétocytes mûrissent essentiellement dans les espaces avasculaires de la moelle osseuse⁵⁻⁷ ; (Sinton *et al.* 1923, Pietro Alano, communication personnelle) et dans la rate, où ils sont initialement retenus (stades I à IV). Le stade ultime de différenciation du gamétocyte (stade V) est capable de circuler dans le sang périphérique. Si un anophèle pique le sujet infecté à ce moment, ces gamétocytes pourront être absorbés et poursuivre leur développement : transformation en gamètes matures, fusion pour formation d'un zygote puis d'un ookinète. Ce dernier peut migrer dans le tube digestif, devenir un oocyste, puis se diviser et se différencier en sporozoïte qui est capable d'atteindre les glandes salivaires du moustique et représente donc la forme infectante pour l'être humain.

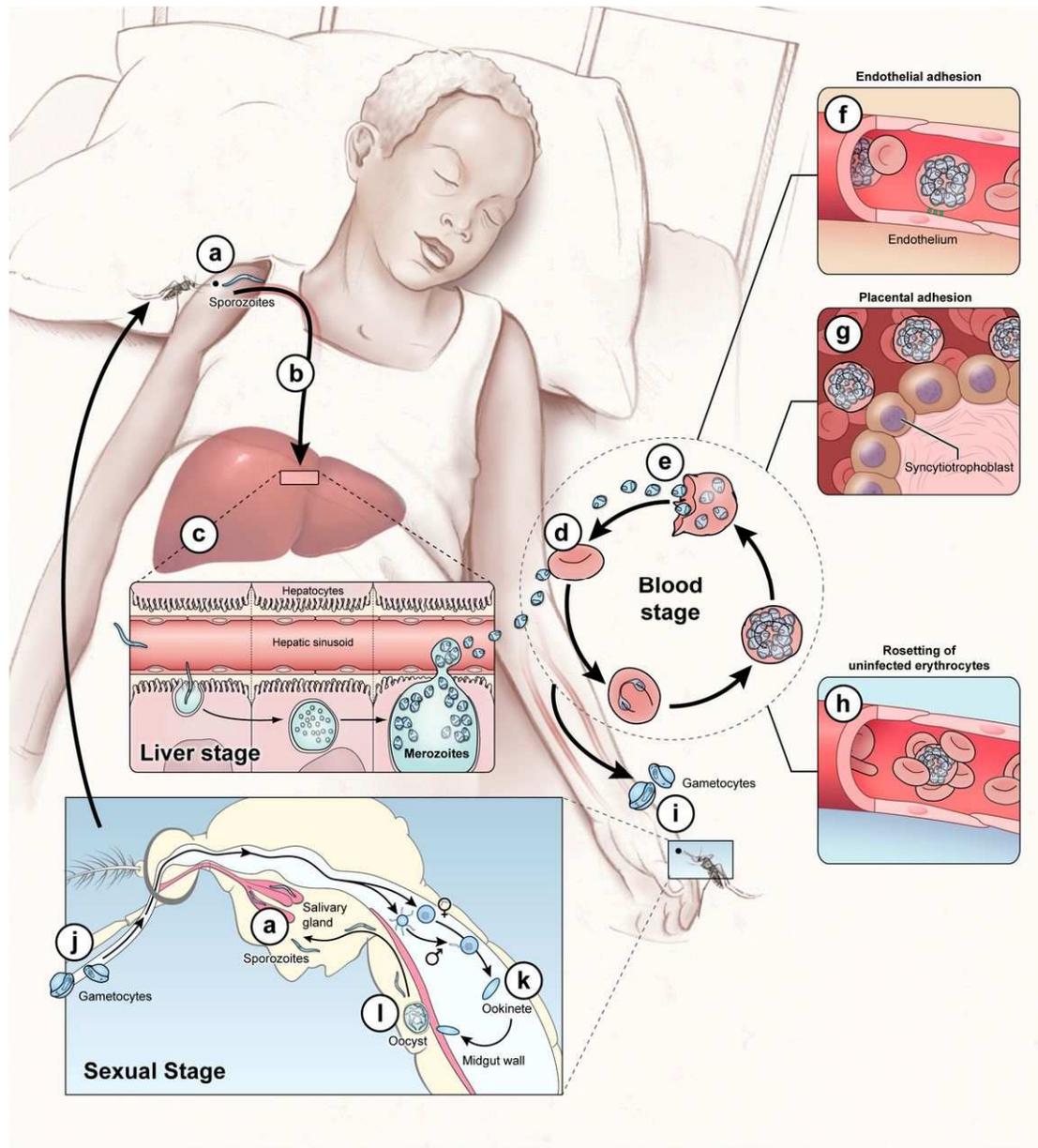


Figure 2 : cycle de réplication sexué (chez l'anophèle) et asexué (chez l'être humain) de *P. falciparum*. D'après ⁸. Les étapes pré érythrocytaires humaines correspondent aux images a, b et c ; le cycle érythrocytaire humain aux images d et e ; les conséquences pathologiques humaines de ce cycle aux images f, g et h ; la capture des gamétocytes par le moustique à l'image i ; et le cycle sexué chez l'anophèle aux images j, k, l et a.

3. Immunité anti-plasmodiale dirigée contre les stades asexués

a. Immunité contre les stades pré érythrocytaires

Vision générale : Le stade pré érythrocytaire est silencieux cliniquement, et ne produit pas de réaction inflammatoire locale ou générale chez l'humain. Pour cette raison et du fait de la difficulté d'accès à

des échantillons de peau et de foie humains, la très grande majorité des connaissances sur l'immunité anti parasitaire à ce stade provient de modèles animaux, principalement murins, infectés par *P. yoeli* ou *P. berghei*, espèces incapables d'infecter l'être humain⁹. D'autres modèles animaux, simiens cette fois, ont permis la mise en évidence des hypnozoïtes hépatiques dans un modèle d'infection à *P. cynomolgi* puis à *P. vivax*¹⁰, l'étude de leur biologie et de la réaction de l'hôte à leur présence.

L'immunité à ce stade est manifestement non stérilisante puisqu'elle n'empêche pas, en conditions naturelles, le passage d'au moins quelques parasites au stade ultérieur, intra-érythrocytaire. Elle pourrait cependant réduire la proportion de parasites franchissant cette étape hépatique. Les raisons invoquées pour expliquer ce caractère peu efficace de la protection « anti-stade hépatique » tiennent au nombre assez faible de sporozoïtes injectés par l'anophèle, l'environnement « tolérogène » de la peau (riche notamment en cellules T régulatrices) et du foie, qui ne facilitent pas l'établissement d'une réponse immune intense. Cependant, la possibilité d'interrompre le cycle avant la survenue de la réplication intra-érythrocytaire et le fait que la biomasse parasitaire soit à ce stade moindre que lors du stade érythrocytaire font de cette partie du développement de *Plasmodium* une cible privilégiée des approches vaccinales. Les vaccins les plus avancés en termes de développement clinique sont dirigés contre des antigènes de la phase pré érythrocytaire: le RTS,S/AS01, qui est composé d'un antigène du sporozoïte, la CircumSporozoite Protein¹¹, et le vaccin PfSPZ qui est composé de sporozoïtes atténués par une irradiation^{12,13}.

L'immunité humorale joue un rôle mineur à ce stade mais les anticorps anti circumsporozoïte protein (CSP, protéine majeure de la surface du sporozoïte) sont produits à ce stade, et sont de bons marqueurs du niveau d'exposition du sujet au parasite (mais pas du niveau d'infection érythrocytaire)¹⁴.

Immunité anti-sporozoïtes : le devenir des sporozoïtes de *Plasmodium*, après leur injection par le moustique dans le derme, semble pouvoir prendre 3 voies, tout au moins dans les infections animales expérimentales : certains restent bloqués au niveau cutané, d'autres empruntent la voie des vaisseaux lymphatiques cutanés et sont in fine pris en charge par les cellules dendritiques du ganglion lymphatique drainant le territoire concerné ; d'autres enfin vont réussir à gagner la circulation générale via les vaisseaux dermiques et ainsi envahir les hépatocytes après un passage à travers les macrophages résidents du foie (cellules de Kupffer). Les facteurs humains et/ou parasitaires influençant l'engagement du parasite dans l'une ou l'autre de ces 3 voies sont encore incomplètement compris.

Une partie de la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre les sporozoïtes semble avoir lieu dans la peau, via les cellules dendritiques cutanées, et surtout dans le ganglion lymphatique satellite. Une capture du sporozoïte est réalisée par les cellules dendritiques, suivie d'une présentation, en association aux molécules du CMH de classe I, à des lymphocytes T CD8 spécifiques du parasite.

Immunité contre les stades hépatiques : la réponse immune hépatique fait intervenir, dans les modèles expérimentaux, les cellules de Kupffer qui peuvent capturer les sporozoïtes et présenter leurs antigènes aux lymphocytes T CD8. Le rôle de ces dernières cellules est majeur dans la destruction des hépatocytes infectés ou l'inhibition de la croissance intra-hépatique. Ce processus est médié par les effecteurs cytotoxiques classiques des cellules T CD8 (perforine, granzyme...) ou par la production de médiateurs (interféron, Tumor Necrosis Factor...) ¹⁵. Lors des tentatives d'exploration de ces

phénomènes chez l'homme, des cellules T CD4 et CD8 spécifiques des antigènes pré-érythrocytaires ont été retrouvées (inconstamment) en circulation ¹⁶.

Approches vaccinales et stades pré-érythrocytaires : Le niveau d'immunité atteint suite à l'inoculation à des volontaires de sporozoïtes modifiés (irradiés, atténués génétiquement, ou administrés en association à des antipaludiques) semble très supérieur à ce que l'on peut observer après exposition naturelle aux parasites. Même si le mécanisme sous-tendant cette différence reste incomplètement élucidé, les raisons évoquées sont les fonds génétiques (et notamment immunogénétiques) différents, la plupart des volontaires sains ayant participé aux expériences d'inoculation étant des sujets nord-américains ou européens ; la présence de coinfections bactériennes et parasitaires chez les sujets exposés naturellement, qui peuvent moduler la réponse immune, voire le statut carenciel et la composition du microbiote ⁸. Une action immunorégulatrice émanant des parasites vivants peut aussi être envisagée.

b. Immunité dirigée contre les stades érythrocytaires asexués

Réponse innée : La réponse à ce stade comporte une part de réaction inflammatoire systémique, dans laquelle la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires joue un rôle important. Comme dans toute rencontre entre le système immunitaire humain et un micro-organisme pathogène, les premières étapes de la réaction immune mettent en jeu des interactions entre des motifs microbiens reconnus comme signaux de danger (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) et des récepteurs de ces signaux situés sur les cellules immunes, à leur surface ou dans leur cytoplasme (pattern recognition receptors, PRR). Les PAMP plasmodiaux sont nombreux, mais les principaux sont les ancres glycoposphatidylinositol (GPI), l'hémozoïne (qui est un produit de dégradation de l'hème après digestion de l'hémoglobine par le parasite), certains motifs de l'ADN parasitaire comme les motifs CpG (cytosine, guanine séparées par phosphate). Les récepteurs de type PRR qui reconnaissent ces motifs ont été progressivement caractérisés, mais pas toujours chez l'humain : à titre d'exemple, on peut citer les Toll-Like Receptors (TLR) 1/2/4/6, (l'hémozoïne est reconnue par TLR-9) et les NOD-Like Receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3). Ces PRR activent, en aval, plusieurs cascades protéiques qui résultent en la transcription de médiateurs de l'immunité innée et de la réaction inflammatoire (figure 3). Dans le cas du paludisme, parmi les plus importants figurent les interférons de type I ¹⁷.

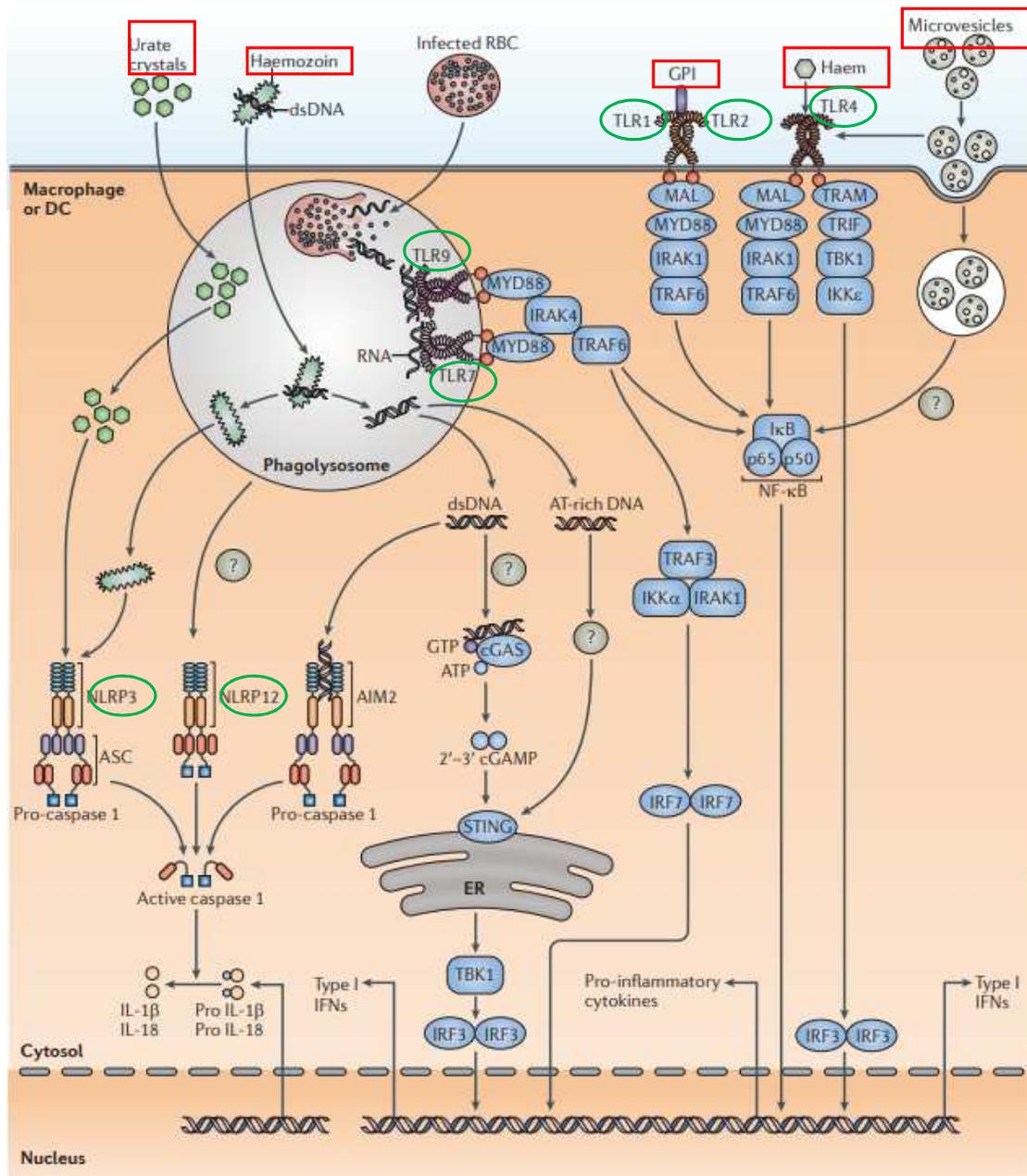


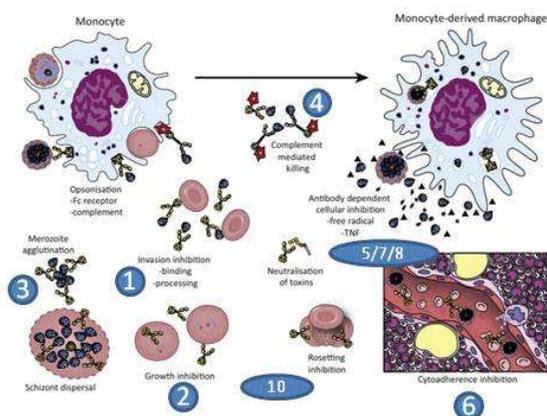
Figure 3 : Principales voies de signalisation mises en jeu dans la réponse immunitaire dirigée contre les stades érythrocytaires de *P. falciparum*. En vert sont entourés les Pattern Recognition Receptors (PRR). En rouge sont encadrés leurs ligands, les Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP); D'après¹⁷.

Réponse cellulaire : Le rôle de la réponse cellulaire dirigée contre les stades asexués est d'importance moindre, notamment en raison de l'impossibilité pour les hématies, qui ne possèdent pas de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), de présenter des antigènes palustres aux cellules T. De nombreux travaux se sont intéressés à la co-infection *Plasmodium*/virus de l'immunodéficience

humaine (VIH), ce dernier étant particulièrement prévalent dans la zone intertropicale et constituant un modèle d'immunodépression cellulaire acquise: plusieurs travaux anciens ont montré une majoration du risque d'accès palustres, graves et non graves, chez les sujets infectés par le VIH, et ce de manière inversement proportionnelle au taux de CD4. L'immunodépression cellulaire semble donc avoir un impact sur la morbidité palustre, même si de nombreux facteurs de confusion (état nutritionnel, infections opportunistes concomitantes...) existent ¹⁸. Cependant, de manière plus récente, l'amélioration de la prise en charge du VIH, l'accès des patients VIH aux mesures préventives antipaludiques telles que les moustiquaires imprégnées, l'essor des traitements antipaludiques combinés comprenant des dérivés de l'artémisinine, rendent très probable une diminution de l'impact de l'infection à VIH sur l'incidence et la gravité du paludisme.

Réponse humorale :

Vision générale : Le rôle de la réponse humorale est majeur au stade érythrocytaire, comme attesté par les expériences fondatrices de Cohen *et al.* qui ont montré l'effet inhibiteur sur la parasitémie du transfert passif d'anticorps en provenance de sujets immuns ¹⁹. Ces travaux ont été répétés en Thaïlande par l'équipe de P. Druilhe, où les immunoglobulines G purifiées en provenance de sujets immuns Ivoiriens exerçaient un effet anti parasitaire majeur lorsqu'administrées à des sujets thaïlandais parasitémiques à *P. falciparum* ²⁰. Tous les anticorps anti *P. falciparum* ne sont pas associés à la protection, et de plus leur mécanisme d'action est très imparfaitement élucidé. Ces anticorps peuvent contribuer à la défense de l'hôte de nombreuses manières, résumées dans la figure 4.



Anti mérozoïtes	
1	Inhibition de l'invasion
2	Inhibition de la croissance
3	Opsonisation des mérozoïtes
4	Interactions avec le complément
5	Déclenchement du burst oxydatif des PNN
Anti hématies infectées	
6	Blocage de l'interaction avec les cellules humaines
7	Opsonisation des GR
8	Fixation du complément
9	Inhibition de la rupture des schizontes
10	Inhibition du rosetting

Figure 4 : Mécanismes d'action potentiels des anticorps dirigés contre les stades asexués de *P. falciparum*. Les chiffres entourés renvoient à la colonne de gauche du tableau récapitulatif. D'après ²¹.

Cibles de la réponse humorale effectrice : *P. falciparum* exprime à la surface de l'hématie infectée plusieurs protéines qui sont autant de cibles antigéniques. De nombreux anticorps anti-*P. falciparum* sont ainsi détectés dans le plasma des sujets immuns, même si nombre d'entre eux sont en réalité dirigés contre des antigènes internes du parasite intra érythrocytaire. Certains de ces antigènes sont de plus soumis à la variation antigénique qui correspond, comme chez *Trypanosoma*, à un mécanisme majeur d'échappement à la réponse effectrice de l'hôte. L'antigène principal exposé par *Plasmodium falciparum* à la surface de son GR hôte est Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) ²², protéine de grande taille (4 à 10 kDa) codée par les gènes *var*, et qui possède de nombreux domaines de liaison à des récepteurs présents sur des cellules humaines tels qu'Inter Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) ou CD36. Il s'agit donc d'un opérateur moléculaire majeur de l'adhérence des globules rouges parasités aux cellules endothéliales (cytoadhérence). Via un mécanisme de régulation épigénétique, chaque souche parasitaire n'exprime qu'un seul membre de la famille multigénique *var* à la fois, parmi la soixantaine disponible ²³. La commutation d'expression concerne environ 2% de la progénie à chaque cycle de multiplication asexuée. Les anticorps anti-PfEMP1 sont donc probablement un acteur très important de la protection contre les formes graves de paludisme (renvoyant à la notion d'immunité anti-maladie, appelée parfois prémunition) ²⁴. Leur rôle dans la protection contre le paludisme gestationnel est particulièrement bien établi. D'autres familles protéiques plasmodiales font l'objet d'une variation antigénique et peuvent contribuer à des interactions intercellulaires, notamment les Repetitive Interspersed Families of polypeptides (RIFIN) et les Sub Telomeric Open Reading Frame (STEVOR) qui jouent un rôle dans la formation des rosettes, c'est-à-dire l'agrégation d'hématies non infectées autour d'une hématie infectée ²⁵. Enfin, des protéines de surface du mérozoïte, telles que les Merozoite Surface Protein-1 et 3 (MSP-1 et MSP-3), qui jouent un rôle lors de l'invasion de l'hématie, sont aussi des cibles privilégiées de la réponse anticorps.

Lenteur et instabilité de la réponse humorale antipaludique - Sous-types lymphocytaires: des travaux menés en zone endémique ²⁶ et non endémique ²⁷ ont montré que cette réponse anticorps est de courte durée, certains anticorps anti-*P. falciparum* n'étant plus retrouvés lors de la saison sèche qui suit la saison de transmission où ils ont été mis en évidence. Toutefois les cellules B mémoires spécifiques de ces mêmes antigènes persistent plus longtemps que les anticorps, relativisant ainsi cette notion de perte de la réponse humorale ^{28,29}. Une autre caractéristique de l'immunité humorale anti *P. falciparum* est son acquisition très lente, la diversité et le taux des anticorps n'augmentant que graduellement au cours de l'enfance et de l'adolescence, et le pool de cellules B mémoires anti *P. falciparum* connaissant aussi une expansion lentement progressive. Ce phénomène semble spécifique de *Plasmodium*, les cellules B dirigées contre la toxine de *Clostridium tetani* ne semblant pas connaître le même sort ³⁰. En revanche, lors des premiers mois de la vie, comme pour d'autres antigènes, les nouveau-nés bénéficient du répertoire large des anticorps anti-paludiques maternels acquis par transfert passif transplacentaire.

Lymphocytes B mémoire atypiques : L'équipe de Susan Pierce au National Institute of Health a montré que chez les sujets exposés au parasite survient une expansion notable de cellules B mémoires (memory B cells, MBC) de phénotype particulier (CD10-CD21-CD27-, contrairement aux cellules B

mémoires conventionnelles qui sont CD21^{high}IgD^{low}/IgM^{high}, nommées atypical memory B cells³¹, ou en français cellules B mémoire atypiques. Leur expansion est corrélée positivement à l'intensité de la transmission parasitaire^{32,33}. L'étude fonctionnelle de ces cellules a mis en évidence plusieurs altérations, notamment une diminution du signal du récepteur B (B Cell Receptor, BCR), des capacités réduites de prolifération, de production cytokinique et de production d'anticorps³⁴. Ces cellules expriment abondamment le facteur de transcription t-bet et la molécule CD11c. Le rôle de ces cellules dans l'acquisition lente et partielle d'une immunité humorale efficace anti-*P. falciparum* est assez probable. Ces cellules B mémoires atypiques ont été auparavant décrites dans d'autres situations d'infections chroniques contre lesquelles la mise en place d'une réponse anticorps efficace est lente et partielle, notamment l'infection à VIH, où elles avaient aussi été nommées « exhausted MBC », ou « tissular MBC »³⁵.

Cellules B transitionnelles et plasmablastes : de manière attendue, l'accès palustre aigu est responsable d'une expansion transitoire de certaines cellules B, comme observé chez des sujets péruviens exposés à *P. falciparum*, où a été notée une expansion transitoire des plasmablastes, plus marquée chez les enfants³⁶. Chez des enfants Ougandais, une expansion très brève des plasmablastes a été observée après l'accès clinique. Dans cette même étude, la concentration circulante des cellules B mémoire atypiques, et des cellules B transitionnelles (population de cellules B en transit entre la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires) augmentaient, en proportion du nombre total de cellules B, au décours de l'accès aigu. Ceci peut faire évoquer une activation B polyclonale suivant l'accès aigu, qui nécessiterait une production de nouvelles cellules B pour maintenir l'homéostasie³⁷. Cette expansion de cellules B transitionnelles avait été également mise en évidence lors d'une étude similaire chez des enfants kenyans³⁸. Par ailleurs, cette expansion B semble particulièrement importante dans les cas d'anémie palustre grave³⁹.

Lymphocytes T folliculaires auxiliaires : Au cours du processus de production d'anticorps, se produit dans les organes lymphoïdes secondaires la réaction du centre germinatif, qui permet la sélection de cellules B possédant un BCR très affiné pour l'antigène. Cette réaction repose sur une coopération entre trois acteurs cellulaires : la cellule B spécifique de l'antigène parasitaire, la cellule dendritique folliculaire (cellule de l'immunité innée, présentatrice professionnelle de l'antigène) et une sous population de cellules T CD4 résidant dans les follicules B, appelées T follicular helper (Tfh). Des données issues de modèles murins initialement, mais suivies d'études chez des enfants vivant au Mali, ont montré que l'environnement cytokinique Th1 induit par les accès palustres aigus était responsable d'une orientation des cellules Tfh vers un phénotype hypoactif, coopérant moins efficacement avec les cellules B, et jouant donc très probablement un rôle dans la genèse de cette réponse humorale suboptimale⁴⁰.

Rôle des IgM : Le rôle spécifique des IgM dans le paludisme humain est encore actuellement mal connu et peu étudié⁴¹. Les IgM jouent-elles un rôle particulier dans l'opsonisation des hématies infectées ou des mérozoïtes? Des travaux anciens ont pointé le fait que les IgM peuvent participer à la clairance des hématies non infectées, notamment via l'activation du complément⁴².

C. La présentation clinique du paludisme est polymorphe et dépend de facteurs humains, parasitaires et environnementaux

Le paludisme n'est pas une entité clinique homogène. La présentation de l'infection dépend de nombreux facteurs liés au parasite, à l'hôte, aux conditions de leurs rencontres et à la durée de leurs interactions. On peut séparer les accès aigus, pouvant être graves ou non, et le portage chronique de parasites, pouvant être ou non symptomatique.

1. Accès aigu

L'accès aigu typique fait le plus souvent suite à une primo invasion chez un sujet non immun (voyageur en provenance d'une zone non endémique ou jeune enfant vivant en zone endémique). Il s'agit d'une maladie aiguë fébrile, dont les signes fonctionnels et cliniques sont communs à de nombreuses maladies responsables de fièvre aigue.

a. Accès aigu simple

Dans l'accès aigu non compliqué, on peut retrouver, outre la fièvre, qui est quasi constante, des céphalées, des algies diffuses, des signes digestifs (nausées, vomissements, diarrhée non invasive). L'examen clinique, en règle pauvre, peut objectiver (peu fréquemment) une splénomégalie. Il doit être soigneux pour ne pas méconnaître une forme grave. Le bilan biologique trouve très fréquemment une thrombopénie modérée et contribue aussi à la recherche des signes de gravité (cf infra).

b. Accès aigu grave

Les formes graves de paludisme sont caractérisées par la survenue de défaillances d'organe au cours de l'accès. Ces défaillances peuvent être (i) neurologique (neuropaludisme) avec troubles de conscience d'intensité variable allant jusqu'au coma, plus rarement signes focaux ou convulsions ; (ii) respiratoire avec polypnée parfois consécutive à une anémie profonde et/ou une acidose métabolique, plus rarement (iii) œdème pulmonaire lésionnel responsable du syndrome de détresse respiratoire aiguë ; (iv) rénale avec insuffisance rénale aiguë multifactorielle ou acidose métabolique ; (v) digestive avec cytolysse et/ou hyperbilirubinémie grave, ictère ; (vi) hématologique avec anémie et/ou thrombopénie profondes, et enfin (vii) défaillance circulatoire avec état de choc. Cette dernière complication, peu fréquente, est très rarement liée au paludisme seul et doit faire chercher une co_infection bactérienne ou une rupture splénique. Les critères de gravité édités par l'OMS sont rappelés dans le tableau 1⁴³. Ces formes graves sont très majoritairement dues à *P. falciparum*, mais des accès graves dus à *P. vivax* et *P. knowlesi* ont également été décrits^{44,45}.

En zone de forte transmission, les formes graves sont très majoritairement rencontrées chez de jeunes enfants (moins de 5 ans), qui ne bénéficient pas encore de la prémunition qu'acquière les sujets plus âgés. Leur présentation clinique n'est pas distribuée au hasard et trois formes cliniques ont été individualisées dans un travail prospectif portant sur plus de 1800 enfants Kenyans : l'atteinte neurologique, l'anémie grave, et la détresse respiratoire⁴⁶ (figure 5). Cette ségrégation entre neuropaludisme et anémie grave a été confirmée ultérieurement au cours d'études portant sur plus de 6600 enfants en Tanzanie⁴⁷ et sur plus de 1900 enfants vivant en Ouganda⁴⁸. Les mécanismes qui sous-

tendent l'évolution vers l'une ou l'autre de ces formes cliniques restent imparfaitement compris mais l'âge de l'enfant est un paramètre majeur. Quel que soit le niveau de transmission, le risque de souffrir d'une anémie grave (définie par un taux d'hémoglobine inférieur à 5 g/dL) est plus élevé chez les nourrissons alors que le risque de souffrir d'un neuropaludisme est plus élevé chez les enfants plus âgés⁴⁹.

Pronostic	Critères cliniques et/ou biologiques	Fréquence
+++	Défaillance neurologique incluant : <ul style="list-style-type: none"> - obnubilation, confusion, somnolence, prostration - coma avec score de Glasgow < 11 - convulsion(s) 	+++
+++	Défaillance respiratoire incluant : <ul style="list-style-type: none"> - si VM ou VNI : PaO₂/FiO₂ < 300 mmHg - si non ventilé PaO₂ < 60 mmHg et/ou SpO₂ < 92% en air ambiant et/ou FR > 30/min - signes radiologiques : images interstitielles et/ou alvéolaires 	+
+++	Défaillance cardio-circulatoire incluant : <ul style="list-style-type: none"> - PAS < 80 mmHg et/ou présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire - nécessité de drogues vasopressives* et lactate > 2 mmol/l 	++
++	Hémorragie : définition clinique	+
+	Ictère : clinique ou bilirubine totale > 50 µmol/l	+++
+	Anémie profonde : hémoglobine < 7 g/dl, hématocrite < 20%	+
+	Hypoglycémie : glycémie < 2,2 mmol/l	+
+++	Acidose : bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/l, ou acidémie avec pH < 7,35 (surveillance rapprochée dès que bicarbonates < 18 mmol/l)	++
+++	Hyperlactatémie : > 2 mmol/l (<i>a fortiori</i> si > 5 mmol/l)	++
++	Hyperparasitémie : > 4% (voir texte long)	+++
++	Insuffisance rénale : créatininémie > 265 µmol/l ou urée > 20 mmol/l	+++

Tableau 1: Critères cliniques (panel supérieur) et paracliniques (panel inférieur) de gravité du paludisme d'importation. D'après la révision 2017 des recommandations pour la pratique clinique de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. VM : ventilation mécanique ; VNI : ventilation non invasive.

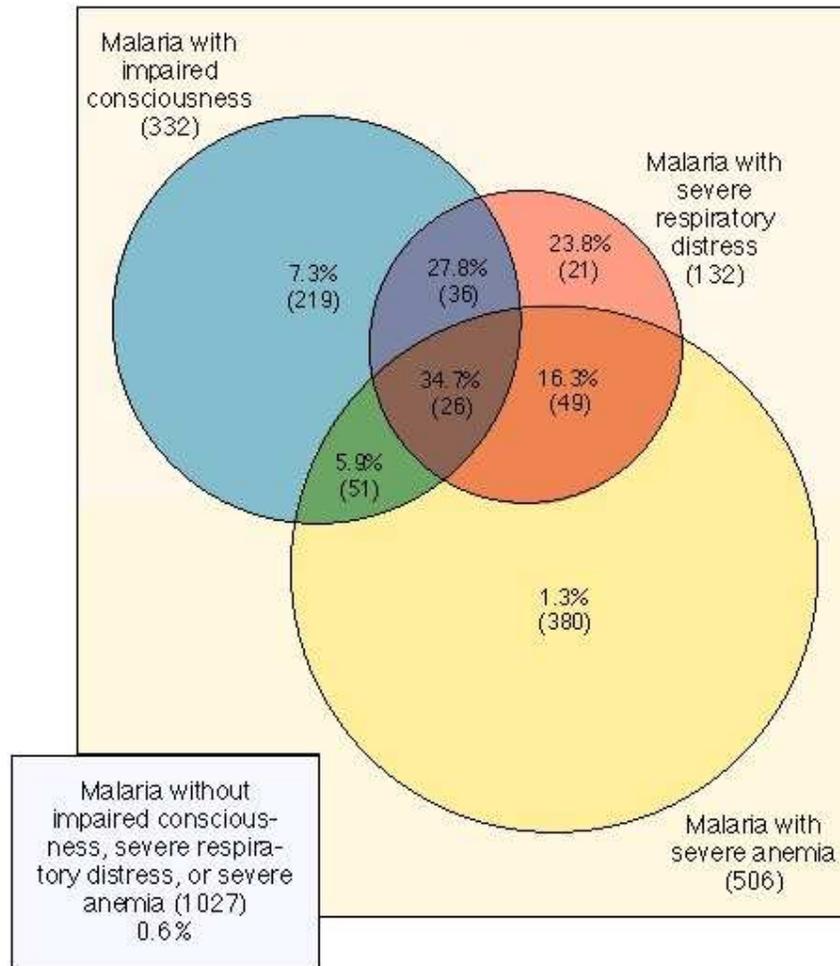


Figure 5 : Ségrégation des différentes formes clinico-biologiques de paludisme sévère dans une cohorte de 1822 enfants pris en charge au Kenya, illustrant l'hétérogénéité phénotypique du paludisme grave de l'enfant vivant en zone endémique. D'après ⁴⁶.

c. Le cas particulier des accès de reviviscence

Les accès de reviviscence sont liés à la réactivation d'hypnozoïtes hépatiques de *P. vivax* ou *P. ovale*, parfois plusieurs années après le séjour en zone endémique, et prennent cliniquement la forme d'un accès aigu simple. Le poids sanitaire de ces accès de reviviscence, lorsqu'ils se répètent en zone endémique, est important : malnutrition, anémie chronique et accidents obstétricaux en sont les principales composantes ⁵⁰.

d. Formes aiguës rares et polémiques: fièvre bilieuse hémoglobinurique et néphrite quartane

La fièvre bilieuse hémoglobinurique (FBH), historiquement importante aux temps d'utilisation massive de la quinine, notamment en prophylaxie chez les soldats opérant en zone endémique ⁵¹, est devenue rarissime actuellement chez les voyageurs et expatriés. Elle est essentiellement rencontrée chez des sujets expatriés en zone endémique, chroniquement exposés au parasite, et irrégulièrement

consommateurs de quinine à titre prophylactique. En réalité, d'autres antipaludiques de la famille des amino alcools ont pu déclencher des épisodes de FBH. Cliniquement, le tableau est celui d'une hémolyse aiguë intravasculaire (LDH élevées, hémoglobine plasmatique libre élevée, hémoglobinurie), fébrile, pouvant se compliquer d'insuffisance rénale aiguë par nécrose tubulaire, voire de décès. Contrairement à l'hémolyse associée à l'accès palustre aigu, grave ou non, la parasitémie au cours de la FBH est généralement très faible. La physiopathologie de cette affection est mal comprise, et semble associer sensibilisation par les médicaments et déficit en glucose 6 phosphate deshydrogénase (G6PD).

La néphrite quartane est une néphropathie glomérulaire caractérisée par un syndrome néphrotique associé à l'infection à *P. malariae*, décrite au Nigeria initialement ⁵². Histologiquement il s'agit d'une glomérulonéphrite membranoproliférative avec dépôts de complexes immuns. La physiopathologie et même la réalité de cette association avec l'infection palustre sont discutées ⁵³. Cette forme est peu sensible aux antipaludiques et l'efficacité de la corticothérapie systémique est inconstante.

2. Portage chronique

a. Portage oligo ou asymptomatique

Le portage chronique, qui s'observe dès l'enfance, est de loin la situation la plus fréquente chez les adolescents et les adultes vivant en zone endémique. Il est sous-tendu par l'acquisition d'une immunité humorale permettant la prévention des accès graves, la clairance et/ou la neutralisation des composants parasitaires pyrogènes, ainsi qu'un contrôle partiel de la parasitémie (prémunition). Ces trois modalités de protection naturelle liées à l'immunité adaptative sont acquises séquentiellement à la suite d'infections répétées. Dans cette forme, le patient est asymptomatique, mais on peut mettre en évidence des formes asexuées de *Plasmodium* dans le sang périphérique. La parasitémie est en règle faible, voire très faible, parfois uniquement détectable par des méthodes très sensibles telles que la réaction de polymérisation en chaîne de fragments d'ADN parasite (PCR). Par rapport aux techniques conventionnelles (frottis, goutte épaisse, test de diagnostic rapide), le recours à la PCR augmente significativement la proportion de sujets identifiés comme parasitémiques en zone endémique.

La prévalence du portage asymptomatique dépend, entre autres, de l'intensité de la transmission, le portage asymptomatique étant plus fréquent en zone de forte transmission. Les raisons invoquées sont multiples : plus haut niveau d'immunité en zone de forte transmission, zones restreintes de forte transmission («hot spots») au sein d'une zone faiblement endémique ⁵⁴.

Il a été montré dans des situations d'infection naturelle ou d'inoculation à volontaires sains que la parasitémie périphérique peut fluctuer autour des valeurs seuils des méthodes optiques, et ce pour des durées prolongées.

Cette forme a un impact moindre en termes de morbidité, les patients étant par définition exempts de symptômes d'accès clinique. Cependant, ce portage chronique, via une hémolyse persistante à bas bruit et une inhibition de l'hématopoïèse, est souvent responsable d'une anémie chronique ; il existe également une association statistique entre portage chronique de parasites et certaines infections

bactériennes⁵⁵, notamment les *Salmonella* non typhi. Cet effet n'est pas totalement compris au plan physiopathologique, mais dans un modèle murin, les produits de dégradation de l'hème induits par la présence du parasite exercent un effet inhibiteur sur la fonction des neutrophiles⁵⁶. Plusieurs travaux épidémiologiques ont en outre montré une amélioration des performances scolaires d'enfants vivant en zone endémique en parallèle de l'amélioration de la prise en charge du paludisme dans ces zones⁵⁷. Enfin, en constituant un « réservoir » de parasites asexués susceptibles de se différencier en gamétocytes, ce portage chronique de parasites joue un rôle majeur dans la transmission au moustique et donc dans la pérennisation de l'endémie palustre.

b. Splénomégalie palustre hyper-réactive

Une seconde forme chronique plus rare est parfois rencontrée, appelée splénomégalie palustre hyper-réactive ou hyper-immune (très proche, voire confondue avec le paludisme viscéral évolutif, et historiquement nommée splénomégalie tropicale). Cette forme clinique a été reconnue initialement en Papouasie Nouvelle Guinée, et à Madagascar par Charmot sous le terme de splénomégalie avec macroglobulinémie. Par la suite, les critères diagnostiques en ont été affinés par Bryceson *et al.*⁵⁸ puis Bates & Bedu-Addo⁵⁹. Cette forme sera détaillée au chapitre IV, K de l'introduction.

D. Le diagnostic de l'infection palustre chez l'être humain repose sur la détection de formes circulantes asexuées.

Il n'existe pas de moyen de routine de faire le diagnostic de la phase hépatique asymptomatique.

Lors de la multiplication intra érythrocytaire du parasite, les formes asexuées de *Plasmodium* (ou leurs antigènes, ou encore leurs acides nucléiques) peuvent être observées ou détectées dans le sang périphérique veineux ou capillaire, permettant ainsi le diagnostic d'infection palustre.

1. Méthodes optiques (figure 6)

Le frottis sanguin et la goutte épaisse sont des méthodes microscopiques de référence, historiquement les seules disponibles pour le diagnostic. Le frottis mince est réalisé en procédant à l'étalement d'une goutte de sang sur une lame de verre, qui est immédiatement séchée, puis fixée (méthanol) et colorée au May-Grünwald-Giemsa, le colorant marquant les parasites. La visualisation de formes asexuées intra érythrocytaires en microscopie optique (grossissement x 100 en général) permet de faire le diagnostic positif, le diagnostic d'espèce, et la quantification du nombre d'hématies parasitées rapporté au nombre d'hématies totales (parasitémie). La goutte épaisse est obtenue en étalant une goutte de sang périphérique sur une lame de verre avant séchage, lyse contrôlée des globules rouges sans lyse parasitaire, puis coloration. Le dépôt d'une plus grande quantité de sang sur une petite surface permet d'augmenter la sensibilité de la technique par rapport à celle du frottis mince. Les hématies étant lysées, la mesure précise de la parasitémie est impossible, mais la densité parasitaire peut être approchée en rapportant le nombre de parasites visualisés au nombre de leucocytes

observés, puis en calculant la parasitémie par microlitre de sang total grâce à une estimation, ou la mesure directe, du nombre de leucocytes par microlitres. Le seuil de détection de ces méthodes dépend de l'expérience de l'opérateur, de la qualité du matériel utilisé et de la qualité de l'étalement, et avoisine 200 parasites/microlitre en moyenne (ce seuil peut être abaissé aux alentours de 50 en cas de conditions techniques optimisées et d'opérateur expérimenté).

2. Détection rapide d'antigènes (figure 6)

La complexité logistique et le niveau d'expertise technique des techniques optiques rendent leur sensibilité et leur spécificité sous-optimales dans certaines zones à ressources sanitaires limitées ou lorsque les lecteurs sont trop rarement sollicités pour effectuer ce diagnostic. Les techniques de détection antigénique reposant sur l'emploi de bandelettes immunochromatographiques ont connu un essor important au cours des dernières décennies. Les antigènes palustres détectés peuvent être communs aux 6 espèces pathogènes (lacticoeshydrogénase...) ou spécifiques de *P. falciparum* (Histidine Rich Protein 2 ; HRP2...). Ces tests diagnostiques rapides (TDR) ne nécessitent qu'une goutte de sang capillaire pour leur réalisation, et la lecture, comportant un témoin positif, en est généralement aisée. Leur seuil de détection se situe également aux alentours de 200 parasites/microlitre, et la réponse ne peut être quantitative. L'existence de souches de *P. falciparum* mutantes (délétion ou insertion/délétion) pour le gène d'HRP2 a récemment soulevé des inquiétudes quant à une baisse de la valeur prédictive négative de ces TDR. Les souches mutantes restent cependant fortement minoritaires (< 3%) au moins en Afrique. En outre, ces tests ne sont pas spécifiques en cas d'accès récent traité, car l'antigène peut rester en circulation jusqu'à 4 semaines après clairance parasitaire⁶⁰, particulièrement après traitement par dérivés de l'artémisinine⁶¹.

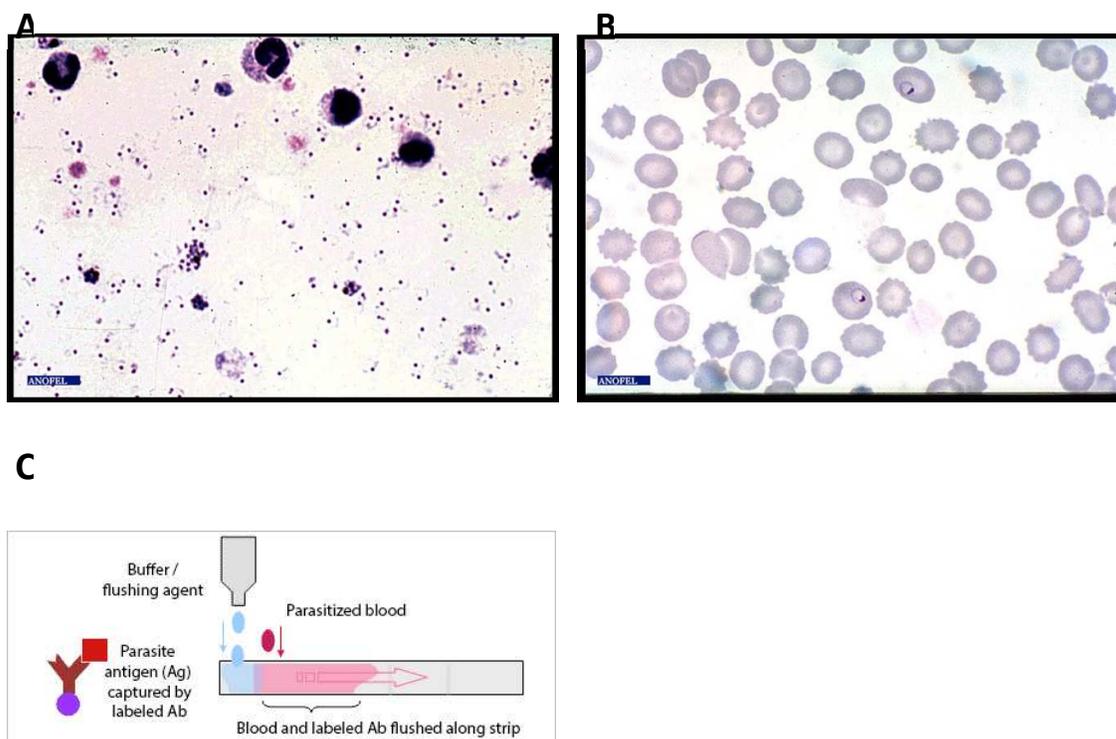


Figure 6 : A, exemple de goutte épaisse mettant en évidence des trophozoïtes de *P. falciparum* après coloration au May-Grünwald-Giemsa et lecture au microscope optique. Les hématies sont lysées et 5 leucocytes sont visibles. B: résultat de frottis sanguin mince positif à *P. falciparum* (stade anneaux ou « rings ») après coloration au May-Grünwald-Giemsa et lecture au microscope optique. Les hématies sont ici bien visibles car non lysées, permettant de calculer le pourcentage d'hématies parasitées (source : ANOFEL, Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicales). C: principe des tests de diagnostic rapide immunochromatographiques utilisant les protéines parasitaires HRP2, LDH ou aldolase. Une goutte de sang total capillaire est déposée sur une membrane de nitrocellulose, et l'antigène palustre, s'il est présent, se fixera à un anticorps marqué par l'or colloïdal. Sous l'effet d'un tampon de migration ajouté secondairement, les complexes antigène-anticorps migrent par capillarité sur la membrane, et seront arrêtés par un anticorps de capture qui fera alors apparaître une bande colorée sur la bandelette. Cette bande, associée à la positivité de la bande contrôle, signe la positivité du test.

3. Techniques de biologie moléculaire

Les techniques d'amplification de l'ADN parasite sur sang total ou plasma ont également été développées. Celles-ci permettent une augmentation importante de la sensibilité (seuil à moins de 10, voire moins de 5 parasites par microlitre de sang), et un diagnostic d'espèce grâce à des amorces spécifiques. Plusieurs types d'amplification sont disponibles : PCR standard, PCR en temps réel, Reverse-Transcriptase PCR qui permet d'amplifier des transcrits d'ARN parasite, ultrasensible PCR, loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP)... Leur usage a permis de redéfinir l'ampleur du phénomène de portage chronique submicroscopique de parasites, et de mieux comprendre la dynamique du portage et de la transmission des parasites dans de nombreuses régions du monde. Ces

techniques restent cependant peu adaptées actuellement à une utilisation de routine en pratique de terrain, en raison de leur lourdeur logistique, de leur coût et de la nécessité d'une expertise et d'une maintenance technique solides et pérennes.

4. Sérologies plasmodiales

Plusieurs techniques sont disponibles pour la mise en évidence d'anticorps anti *Plasmodium*. La plus utilisée est une immunofluorescence sur lame utilisant comme antigènes des produits de culture plasmodiale.

Leur intérêt en pratique clinique est très limité: elles ne permettent pas le diagnostic d'une parasitémie, mais la sérologie est intégrée aux critères diagnostiques de formes chroniques telles que la SPH (cf infra). La sérologie peut également être utile au criblage des donneurs de sang⁶². Ce sont alors des techniques ELISA, adaptées à des flux importants, qui sont généralement utilisées.

E. Les dérivés de l'artémisinine ont amélioré la prise en charge médicamenteuse du paludisme, mais ce bénéfice est menacé.

1. Médicaments disponibles

Le traitement médicamenteux du paludisme, historiquement basé sur la quinine, les sulfamides, les amino 4 quinoléines, a été révolutionné par la découverte des dérivés de l'artémisinine, composé extrait d'une plante et dont les vertus ont été découvertes par des médecins chinois. Le Pr Youyou Tu a reçu le prix Nobel de physiologie & médecine en 2015 pour leur découverte.

2. Prise en charge des accès graves

a. Traitement anti parasitaire

La prise en charge des accès graves repose sur l'artésunate intraveineux, qui a prouvé, dans 2 essais de phase 3 randomisés menés l'un en Asie, l'autre en Afrique, une supériorité en termes de mortalité, en comparaison à la quinine^{63,64}. La tolérance de l'artésunate est globalement bonne, mais des hémolyses retardées (post-artesunate delayed hemolysis) ont été décrites.

b. Traitement symptomatique

L'autre aspect essentiel de la prise en charge des formes graves est la suppléance des défaillances d'organe. La disponibilité des techniques de réanimation (ventilation mécanique, hémodialyse...) dans les pays du Nord explique que la mortalité du paludisme grave d'importation y soit faible (3 à 10% en

France) ⁶⁵ (rapport de synthèse sur l'utilisation de l'artésunate en France : https://www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/e862b94fe244e77cd90f9ccf1877b9b9.pdf).

Le traitement de support réanimatoire est moins opérant en zone endémique, où l'équipement sanitaire est très souvent insuffisant en termes de soins intensifs, faute de moyens.

Comme pour le choc septique bactérien, et malgré de nombreuses pistes issues de modèles animaux, aucun médicament adjuvant n'a jusqu'ici réellement démontré son intérêt pour améliorer le pronostic du paludisme grave chez l'être humain.

3. La prise en charge thérapeutique des accès simples est bien codifiée.

La prise en charge des accès simples a lieu en ambulatoire en l'absence de signe de gravité clinique ou biologique, de vomissements, d'antécédent augmentant le risque de complication, et si le patient peut être surveillé à domicile par son entourage. Elle repose essentiellement sur des traitements oraux combinés incluant des dérivés de l'artémisinine (ACT). Les ACT les plus utilisés en France sont l'artéméther-luméfantrine et la dihydroartémisinine-pipéraquline.

Une alternative ne contenant pas de dérivés de l'artémisinine est la combinaison atovaquone-proguanil, à des doses supérieures à celles utilisées en prophylaxie.

La quinine intraveineuse est d'indication marginale, réservée aux accès simples compliqués de vomissements empêchant l'administration orale.

La surveillance est clinique, biologique afin de s'assurer de la régression des anomalies initiales. La quininémie doit être mesurée en raison de l'index thérapeutique étroit de la molécule. Les examens parasitologiques doivent être répétés à J3, J7, J28 afin de prendre en charge précocement une rechute.

4. La résistance parasitaire aux dérivés de l'artémisinine complique la prise en charge médicamenteuse en Asie du Sud-Est.

a. Emergence en Asie du Sud-Est

Après plusieurs alertes sur l'existence d'une diminution de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine, un travail mené à la frontière Cambodge-Thaïlande a démontré un ralentissement significatif de la clairance parasitaire (mesurée par évaluation séquentielle de la parasitémie) sous dérivés de l'artémisinine dans cette région ⁶⁶. Il est à noter que l'Asie du Sud Est avait déjà, dans les années 1970, été le théâtre de l'émergence de la chloroquino résistance. Cette résistance s'est répandue en Asie du Sud-Est, notamment aux frontières entre Thaïlande et Cambodge d'une part, Myanmar d'autre part ⁶⁷.

b. Mécanisme moléculaire

L'une des propriétés essentielles des dérivés de l'artémisinine est leur activité dès le stade anneau (ring) du parasite ; le mécanisme de moindre sensibilité semble toucher ce même stade. Un test phénotypique de sensibilité des rings en culture *in vitro* a été mis au point par l'équipe de l'Institut Pasteur du Cambodge, et a permis de distinguer de manière fiable les isolats sensibles et résistants ⁶⁸.

Un marqueur moléculaire de cette résistance a été identifié au Cambodge ⁶⁹ via le séquençage du génome d'isolats rendus résistants *in vitro* comparés à des isolats sensibles, puis confirmé sur des souches parasitaires de terrain ; il s'agit du gène *Kelch13* dans son domaine dit « propulseur » (propeller). De nombreuses mutations ont été décrites dans cette région du gène, variablement associées à la résistance. Une mutation (C580Y) s'est progressivement fixée et est actuellement très majoritaire. La déconvolution du mécanisme moléculaire de la résistance est en cours : les mutations de *Pfkelch13* diminuent la liaison de la kinase PfPI3K à l'ubiquitine, diminuant ainsi sa dégradation ultérieure par le protéasome. La plus grande quantité d'enzyme PfPI3K disponible convertit donc plus de phosphatidyl inositol (PI) en phosphatidyl inositol tri phosphate (PI3K), ce qui promeut la survie du parasite malgré la présence du médicament ⁷⁰ (figure 7).

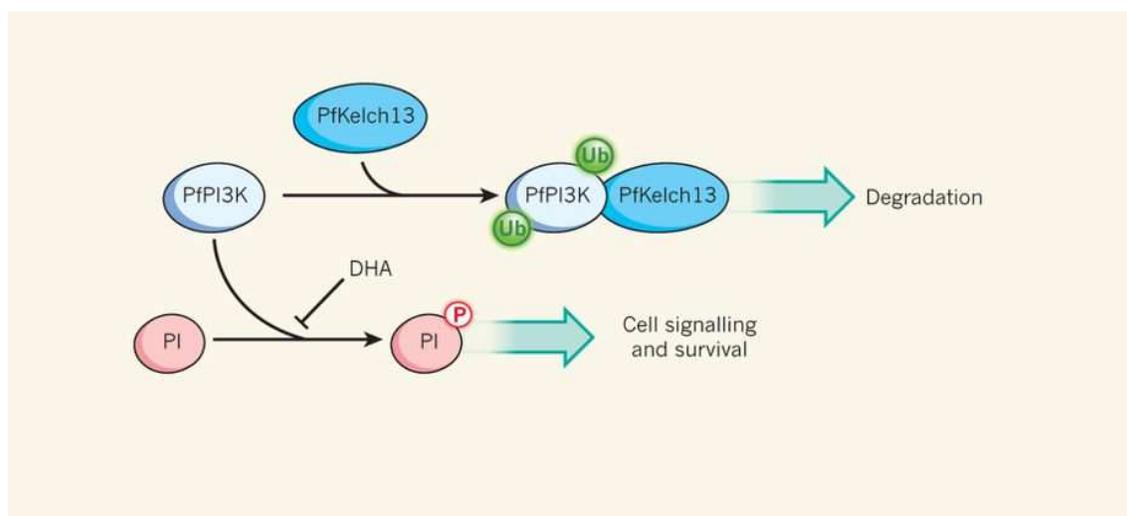


Figure 7 : représentation graphique du mécanisme moléculaire supposé des mutations de PfKelch 13 dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine. En situation normale, PfKelch 13 lie l'enzyme parasitaire PfPI3K et favorise sa dégradation. Les mutations de PfKelch 13 inhibent son interaction avec l'enzyme parasitaire PfPI3K, majorant ainsi la quantité d'enzyme PfPI3K, ce qui permet au parasite de poursuivre sa croissance malgré l'existence de dérivés de l'artémisinine (DHA). D'après ⁷¹.

c. Etat des lieux actuel

La résistance aux dérivés de l'artémisinine s'est répandue à l'ensemble de l'Asie du Sud-Est ; au Vietnam, au Cambodge, en Thaïlande, au Laos, se manifestant de façon prédominante par une augmentation du taux de rechute après traitement par ACT, les échecs cliniques initiaux restant rares. La clairance parasitaire sous ACT est diminuée au Myanmar, sans échec clinique rapporté ⁷².

A ce jour, les investigations menées en Afrique n'ont pas mis en évidence de dissémination des souches porteuses de la mutation kelch13⁷³. Un cas survenu en 2013 et publié en 2017 d'acquisition d'une souche africaine artémisinine résistante a été décrit après importation en Chine⁷⁴. Ce cas est pour l'instant isolé, et la mutation de kelch13 mise en évidence était différente de la mutation prévalente en Asie du Sud-Est (figure 8).

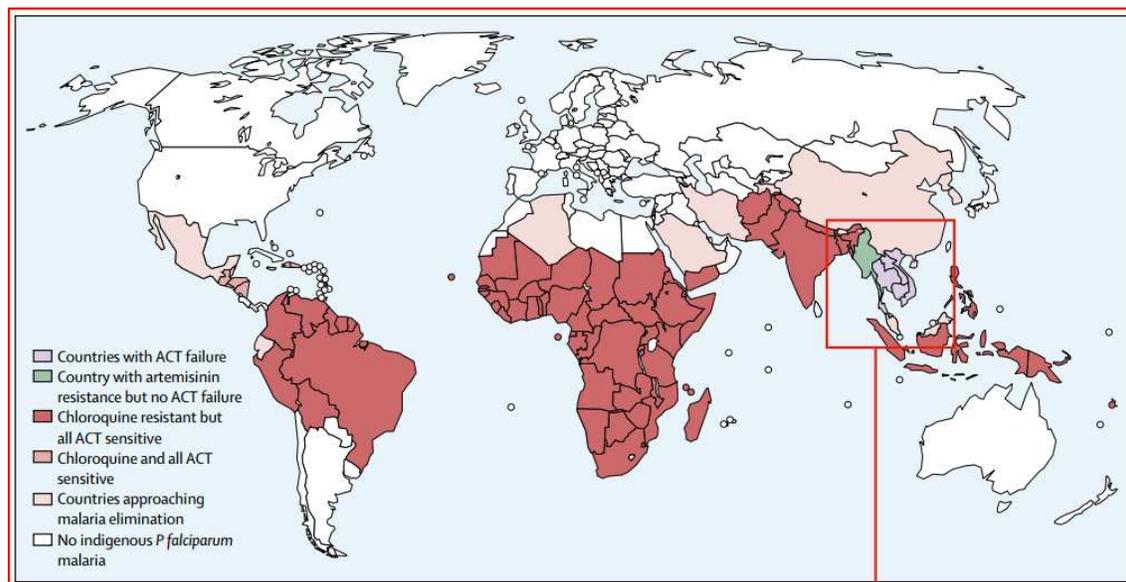


Figure 8 : répartition géographique mondiale de la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine début 2018. D'après⁷². Les pays sièges de résistance et d'échecs cliniques sont en violet foncé, le Myanmar est siège de résistance sans échec clinique.

F. Les mesures préventives ont joué un rôle décisif dans le recul du nombre de cas, mais leur efficacité est elle aussi menacée.

1. Mesures anti vectorielles

a. Moustiquaires

La prévention contre les piqûres d'anophèles en zone endémique repose surtout sur l'utilisation de moustiquaires entourant les lits, idéalement imprégnées de répulsifs à effet rémanent, de la classe des pyréthroïdes. Leur usage s'est généralisé dans bon nombre de zones endémiques ; il s'agit de la mesure préventive dont l'impact estimé est le plus fort en zone de transmission élevée⁷⁵.

b. La pulvérisation d'insecticides dans les domiciles

Il s'agit d'une mesure additive à celle des moustiquaires imprégnées.

2. Certains antipaludiques ont un intérêt pour bloquer la transmission, en administration de masse ou en prévention individuelle.

a. Primaquine

La primaquine n'a pas seulement un effet sur les hypnozoïtes de *P. vivax* et *P. ovale*, mais également contre les gamétocytes de *P. falciparum*. L'intérêt de cet effet gamétocytocide a progressivement émergé. Plusieurs essais randomisés ont évalué l'intérêt de l'administration de primaquine en dose unique en accompagnement du traitement d'accès palustres par ACT, et ont démontré une réduction du portage de gamétocytes. Dans un nombre moindre d'essais, un critère de jugement plus complexe mais plus rigoureux a été utilisé, l'infectivité vis-à-vis des anophèles ⁷⁶. Ceci a mené à une recommandation de l'OMS d'administrer 0.25 mg/kg de primaquine en dose unique (dose cumulée près de 50 fois plus faible que celle utilisée dans l'éradication des hypnozoïtes de *P. vivax*), en accompagnement de traitement d'un accès aigu, dans le but de réduire le portage de gamétocytes dans certaines zones, particulièrement les zones de faible transmission et à risque de résistance aux dérivés de l'artémisinine.

La primaquine peut être responsable d'accidents hémolytiques chez les sujets déficitaires en glucose 6 phosphate deshydrogénase (G6PD), mais aux faibles doses utilisées à visée gamétocytocide, ce risque apparaît très modeste ⁷⁷, y compris chez des sujets déficitaires en G6PD ⁷⁸.

b. Ivermectine

Plus récemment, l'intérêt potentiel de l'ivermectine, molécule anti parasitaire non active sur les protozoaires, dans la prévention du paludisme a été signalé : si un anophèle pique un sujet récemment traité (dans les 7 jours environ) par ivermectine, l'absorption d'ivermectine est létale pour le moustique. Cette particularité a permis d'élaborer des stratégies d'administration de masse d'ivermectine dans le cadre d'une lutte anti vectorielle. Aux doses classiques de 200 microg/kg, l'ivermectine augmente la mortalité des anophèles lors d'une étude menée au Burkina Faso chez des sujets porteurs asymptomatiques ⁷⁹. Des travaux récents menés au Kenya ont évalué l'intérêt de l'adjonction de fortes doses d'ivermectine (300 à 600 microg/kg) en association à des ACT : la mortalité des moustiques piquant les sujets exposés à l'ivermectine était significativement augmentée, et ce avec une rémanence d'au moins un mois ⁸⁰.

c. Bleu de méthylène

Le bleu de méthylène (chlorure de methylthionium) est une molécule dont l'effet antipaludique avait été noté dès le 19^{ème} siècle ⁸¹ puis qui a été évaluée par plusieurs essais randomisés dans les situations d'accès palustres simples. Son activité importante contre les gamétocytes de *P. falciparum* ⁸² a justifié des tentatives d'approche anti transmission, même si le mécanisme précis de son action est imparfaitement compris. Au Burkina Faso, le bleu de méthylène administré au décours d'un traitement d'accès palustre par artésunate-amiodaquine a permis une réduction de la prévalence du portage de

gamétocytes dans le groupe recevant ce traitement ⁸³. Un travail récent mené au Mali, évaluant à la fois l'intérêt du bleu de méthylène et de la primaquine à visée anti transmission, a donné des résultats prometteurs ⁸⁴. Le bleu de méthylène est globalement bien toléré ; une réduction transitoire et modeste du taux d'hémoglobine peut survenir au décours de son administration.

3. Le Traitement Préventif Intermittent (TPI) des femmes enceintes

Le paludisme au cours de la grossesse chez une femme non immune peut être responsable d'accouchement prématuré, de morts fœtales in utero, et d'accès maternels graves. En zone de forte transmission, chez les femmes préalablement prémunies le risque maternel est limité à une accentuation de l'anémie mais l'hypotrophie fœtale est significativement plus fréquente avec un risque de surmortalité infantile. L'OMS recommande donc de traiter de manière prophylactique les femmes enceintes par sulfadoxine-pyriméthamine (S/P), ou par cotrimoxazole en cas de co-infection par le VIH. Le TPI par S/P a démontré son intérêt en termes de morbidité maternelle et infantile à de nombreuses reprises. Initialement conseillé à chaque trimestre, il est désormais recommandé à chaque visite anténatale, à partir du second trimestre. L'expansion de la résistance parasitaire à la combinaison S/P a rendu nécessaire l'exploration de TPI alternatifs, dont bon nombre n'ont pas réussi à obtenir un rapport efficacité/tolérance favorable. La combinaison dihydroartémisinine/pipéraquline donne cependant des résultats prometteurs ⁸⁵.

4. Chez les voyageurs non immuns

La prévention du paludisme chez le voyageur repose sur des mesures anti-vectorielles globalement similaires à celles utilisées en zone endémique (moustiquaires imprégnées d'insecticides, répulsifs cutanés, vêtements couvrants le soir), ainsi que sur une chimioprophylaxie antipaludique, envisageable car de durée relativement brève. Celle-ci repose sur l'atovaquone-proguanil ou la doxycycline, très rarement sur la méfloquine, qui pose le problème d'effets indésirables neuropsychiques parfois graves. Cette prophylaxie n'évite pas la totalité des accès palustres d'importation, même lorsqu'elle est correctement prise, mais est particulièrement efficace pour la prévention des formes graves.

La situation peut être plus complexe en cas de séjours répétés et brefs en zone endémique (cas des personnels navigants du transport aérien par exemple), ou de l'expatriation. Dans ces cas, des prophylaxies de 6 mois, des périodes de prophylaxie couvrant les saisons de forte transmission, voire la mise à disposition d'un traitement antipaludique de réserve sous conditions strictes peuvent être discutés lors de consultations spécialisées en pathologie tropicale.

5. Résistance de l'anophèle aux insecticides et contremesures

Les anophèles ont développé une moindre sensibilité aux pyréthroïdes dans plusieurs pays endémiques tels que l'Ouganda⁸⁶, nécessitant donc une rapide adaptation des mesures préventives.

Le *piperonyl butoxide* est une molécule qui, lorsqu'associée aux pyréthroïdes, contrebalance les mécanismes de résistance de l'anophèle et restaure ainsi la sensibilité aux pyréthroïdes. Lors d'une étude menée en Tanzanie, l'utilisation de moustiquaires contenant les 2 composés permet une diminution des taux d'inoculation de manière plus efficace que grâce à des moustiquaires imprégnées de pyréthroïdes seuls⁸⁷.

Tout aussi récemment, l'utilisation au Burkina Faso de moustiquaires imprégnées non seulement de pyréthrines, mais aussi de *pyriproxifène*, molécule dont le mode d'action est différent, a montré des résultats prometteurs en termes de réduction du nombre de piqûres infectantes⁸⁸, qui étaient diminuées d'un facteur 2.

II. Interactions hôte-parasite : les éléments génétiques protecteurs vis-à-vis du paludisme à *Plasmodium falciparum*

A. Aspects historiques et généraux

L'étude de la susceptibilité génétique de l'être humain aux maladies infectieuses a bénéficié dans les années 1990-2000 des avancées techniques majeures obtenues en termes de séquençage de l'ADN.

Certains experts de la génétique des maladies infectieuses ont construit une théorie qui tente de rendre compte de la variabilité liée à l'âge de la présentation des infections, et tente également d'expliquer la grande variabilité inter-individuelle observée quant à la susceptibilité vis-à-vis de certaines infections: le premier contact avec nombre de microorganismes se produit au cours de la petite enfance; cependant, seule une minorité d'enfants développe des infections létales. Il est proposé qu'à ce stade, les décès soient le fait de maladies génétiques monogéniques graves, à pénétrance variable, typiquement des déficits immunitaires congénitaux comme le SCID (severe combined immune deficiency). *A contrario*, chez les sujets plus âgés, les infections graves, liées soit à la réactivation de microorganismes latents, soit à des primo-infections plus tardives, peuvent survenir, mais seraient alors liées à l'effet combiné de plusieurs gènes (maladies polygéniques)⁸⁹ (figure 9).

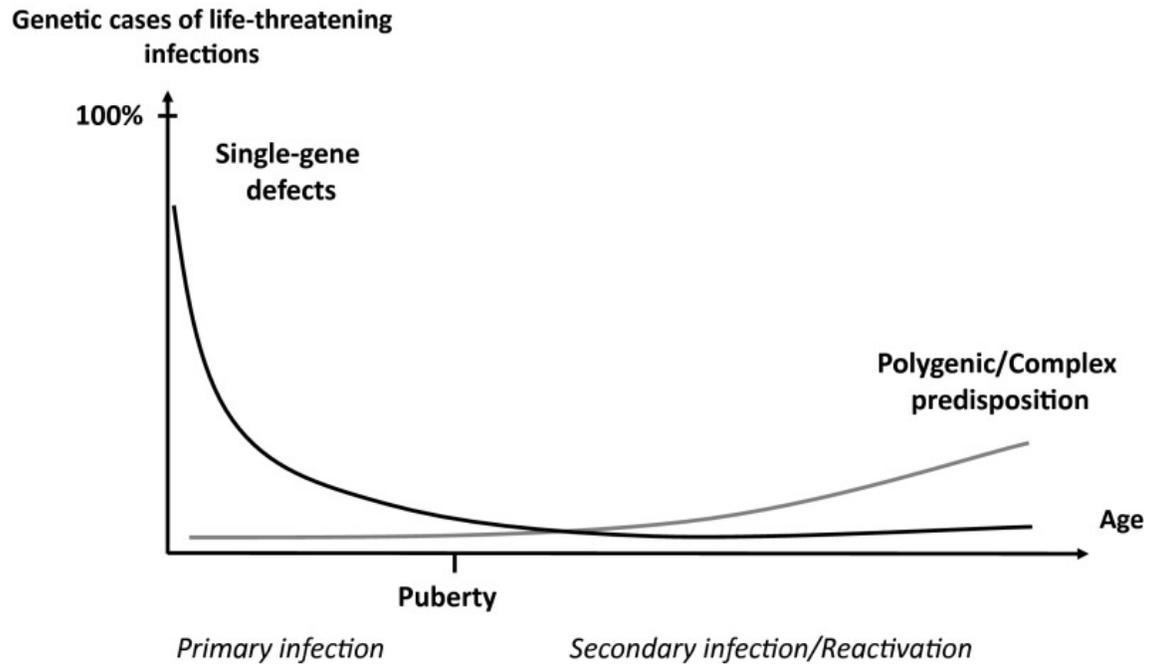


Figure 9 : Proposition théorique de modélisation de la composante génétique de la susceptibilité aux infections selon l'âge. D'après ⁸⁹.

Comment le paludisme se positionne-t-il sur ce schéma ? La mortalité globale de la maladie est en effet très majoritairement infantile, et un trait génétique semble conférer une importante protection vis-à-vis des formes létales : la drépanocytose à l'état hétérozygote, qui de manière intéressante n'est pas une pathologie du système immunitaire. Nous ne connaissons pas en revanche de maladies monogéniques graves prédisposant au paludisme grave. Les choses sont plus complexes chez l'adulte. Il est possible que, dans les populations continuellement exposées, le fait de souffrir ou non d'une morbidité palustre à l'âge adulte puisse être en partie le fait de variants génétiques. L'effet de l'âge sur la propension à souffrir d'un paludisme grave à l'occasion d'une primo-infection ajoute un élément complémentaire au schéma général de Casanova. Chez des sujets non immuns la primo-infection palustre est près de 10 fois plus souvent grave chez l'adulte que chez l'enfant faisant suspecter l'existence de mécanismes innés conférant aux nourrissons une protection partielle contre les formes graves ^{49,90}.

B. Démarche globale

1. Une composante génétique ?

Une étape importante dans l'étude des relations entre un hôte et un agent infectieux consiste à envisager l'influence potentielle de la génétique de l'hôte sur les manifestations de l'infection. Les

moyens d'y répondre reposent sur des observations épidémiologiques et des analyses de ségrégation, notamment les études de jumeaux mono ou dizygotes, ou les études familiales, qui permettent d'évaluer l'héritabilité. Cette notion d'héritabilité se définit par la proportion de la variation d'un phénotype (le fait d'être infecté ou non, la gravité de la présentation clinique) qui résulte de la variabilité du génome de l'individu, ceci en opposition à la variabilité résultant des conditions environnementales (exposition à un vecteur ou alimentation, par exemple). En effet, si l'on connaît d'une part la proportion du génome que plusieurs individus partagent, et leur phénotype d'autre part, on peut estimer cette proportion de variation phénotypique due à des variations génétiques. L'analyse de ségrégation permet par la suite de tenter d'estimer le mode de transmission qui correspond le mieux aux différences inter-phénotypiques observées (autosomique dominant, récessif...).

Plusieurs études familiales ont ainsi été menées en zone endémique, certaines s'attachant à l'héritabilité de la densité parasitaire au Cameroun ⁹¹ ou en Ouganda ⁹², des formes graves au Mali ⁹³, des formes non graves au Burkina Faso ⁹⁴, ou encore du taux d'IgG dirigées contre les stades érythrocytaires ⁹⁵ et même du portage de gamétocytes chez des sujets symptomatiques ou non ⁹⁶. Toutes ces études mettent donc en évidence de forts arguments pour une participation génétique au phénotype palustre. Le mode de transmission ne semblait pas mendélien ⁹⁷. Des études de jumeaux s'intéressant aux niveaux d'anticorps anti *P. falciparum* ^{98,99}, au caractère fébrile des accès aigus ¹⁰⁰, ont également montré l'existence d'un composant génétique fort. Enfin, une troisième approche intéressante consiste en l'observation de populations sympatriques exposées au même risque parasitaire. Les études de ce type sont présentées au chapitre « ethnicité et paludisme ».

Il a été estimé, lors d'une étude d'héritabilité menée sur deux cohortes d'enfants kenyans, que la composante génétique rendait globalement compte de 25% du risque d'accès palustre non grave ¹⁰¹, mais qu'une partie de cette héritabilité n'était pas expliquée par les variants déjà connus (trait drépanocytaire, α thalassémie). Il existe donc possiblement d'autres variants génétiques influençant l'histoire naturelle du paludisme, et non encore découverts. Comme exposé au premier chapitre de cette thèse, la complexité du cycle parasitaire chez l'être humain ainsi que la multiplicité des formes cliniques et des marqueurs d'infection ont généré une grande variété d'études dont les résultats ne sont pas toujours concordants. Le terme paludisme grave recouvre par exemple plusieurs formes cliniques nettement distinctes (anémie grave du nourrisson, neuropaludisme de l'enfant, défaillance multiviscérale de l'adulte) qui n'ont pas toujours été analysées séparément.

2. Quelle composante génétique ?

Une deuxième étape d'exploration, une fois que la contribution de la composante génétique a été quantifiée, est d'identifier plus précisément les facteurs génétiques protecteurs ou aggravants la maladie. Plusieurs scénarios sont alors possibles : soit les connaissances acquises par des modèles animaux pertinents (s'il en existe) ou des observations cliniques ont orienté vers un ou plusieurs gènes candidats, qui seront alors explorés dans le cadre d'études cas-témoins, soit on ne dispose pas de « suspect » a priori, et une approche génome entier est plus appropriée ^{102,103} (figure 10).

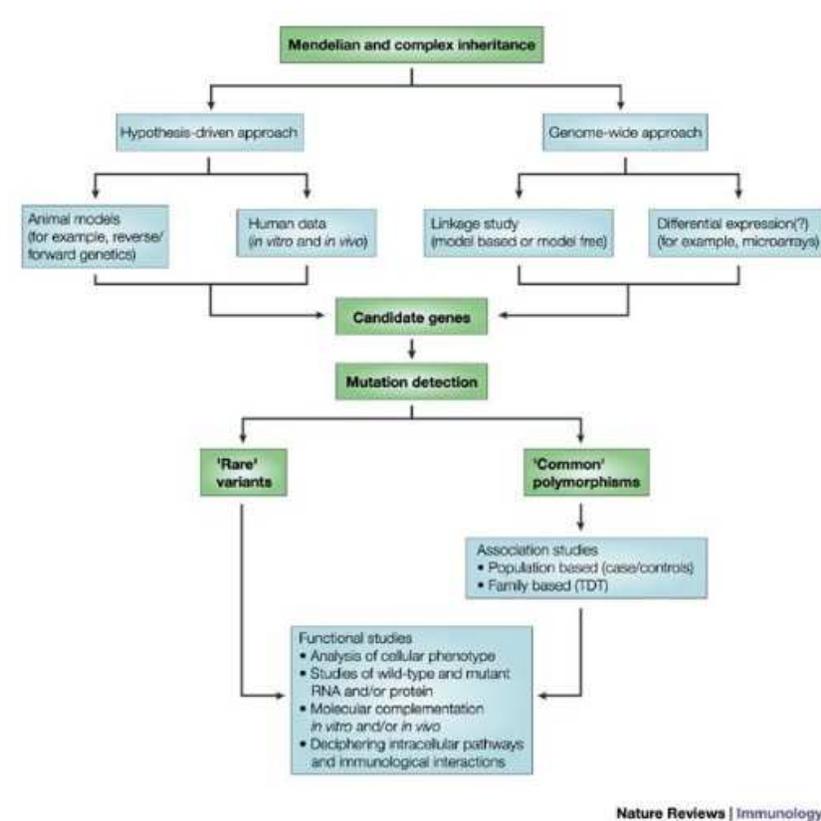


Figure 10 : Démarche générale d'étude de l'association entre variants génétiques et phénotype pathologique. D'après ¹⁰².

Les observations épidémiologiques dans le contexte du paludisme ont fourni un nombre important de gènes candidats : par exemple, le caractère superposable de la répartition géographique de l'endémie palustre et de certaines pathologies génétiques du globule rouge a fourni un argument fort pour évoquer une pression de sélection positive ^{104,105}. C'est ainsi que les liens entre hémoglobinopathies et paludisme ont été initialement identifiés.

Les approches génome entier (GWAS : genome-wide association studies) ont été rendues possibles par le développement des techniques de génotypage et d'analyse à haut débit et par la mise en place de consortiums internationaux tels que MalariaGEN (Malaria Genomic Epidemiology Network), qui a collecté de nombreuses données épidémiologiques, cliniques et génétiques dans différentes zones endémiques, pour tenter d'identifier ces marqueurs génétiques et de comprendre leurs mécanismes d'action ¹⁰⁶.

3. Éléments de complexité dans l'étude du paludisme.

Un élément crucial dans l'analyse des nombreuses données relatives à l'effet protecteur ou aggravant de polymorphismes génétiques humains sur l'infection palustre est le phénotype d'intérêt : le critère jugé peut être la propension à être infecté (positivité des tests diagnostiques), l'intensité du

parasitisme (mesure quantitative de la parasitémie), la survenue d'accès cliniques graves ou non, voire la réponse aux antipaludiques ou la réponse anticorps. La majorité des travaux publiés a évalué la protection vis-à-vis des accès graves. Il convient d'être très vigilant quant aux critères utilisés pour classer les phénotypes palustres sur ces grandes cohortes, puisqu'il s'agit d'un gage de qualité déterminant dans la fiabilité des résultats. A titre d'exemple, il est très probable que la plupart des cohortes « paludisme grave » chez l'enfant en zone endémique sont « contaminées » par des affections neurologiques incidentes sans lien réel avec le paludisme. La prévalence du portage du parasite est en effet si élevée (souvent > 50%) qu'un enfant souffrant d'une encéphalite virale a une chance sur deux d'être parasitémique et donc considéré comme atteint de neuropaludisme sur la foi de la définition de l'OMS associant troubles de conscience fébriles et présence de parasites dans le sang¹⁰⁷.

Un élément supplémentaire de complexité vient de la très importante diversité génétique des populations africaines^{108,109}, plus importante que sur les autres continents : si l'échantillon de sujets étudiés n'est pas assez représentatif de la diversité génétique en conditions réelles, les différences inter individuelles observées peuvent être uniquement le reflet de différence de fréquence de variants d'un groupe à l'autre. A l'inverse, le faible déséquilibre de liaison entre les différents marqueurs de génotypage peut parfois masquer l'identification de variants génétiques ayant pourtant un impact significatif.

La prise en compte des facteurs environnementaux est également cruciale pour ne pas biaiser les résultats : le « phénotype palustre » d'un sujet dépend de nombreux facteurs tels que l'exposition au vecteur, l'accès aux mesures anti vectorielles ou au système de soins, qu'il faut tenter de prendre en compte dans l'analyse du phénotype.

C. Polymorphismes érythrocytaires et paludisme à *P. falciparum* (figure 11 ; tableau 2)

La coexistence entre *Homo sapiens* et *Plasmodium* est un phénomène ancien, estimé à 200 000 ans. Le paludisme grave a donc eu le temps d'exercer une pression de sélection très importante sur le génome humain, peut-être même la plus importante de l'histoire « récente » de l'humanité, en raison de l'importante et de la précocité de la mortalité liée à la maladie. Le poids humain du paludisme semble avoir augmenté nettement il y a environ 10 000 ans, au moment de l'essor de l'agriculture, qui a vraisemblablement rendu plus étroits les contacts entre l'homme et l'anophèle. Ces éléments pourraient expliquer pourquoi les maladies génétiques les plus fréquentes en médecine humaine, à l'échelle mondiale, sont des maladies du globule rouge.

Néanmoins, certains aspects mécanistiques sont encore mal compris, et se heurtent à des difficultés techniques lors de l'exploration *ex vivo* de phénomènes complexes *in vivo*. Il est probable qu'une partie de l'hétérogénéité des résultats des travaux expérimentaux ayant exploré les liens entre variants génétiques érythrocytaires et infection à *P. falciparum* soit due à des éléments techniques (conditions de culture, choix des hématies contrôles qui seront plus ou moins permissives quant à l'infection, choix

de la souche parasitaire elle-même plus ou moins virulente...). Certains éléments saillants, cependant, seront soulignés ci-après.

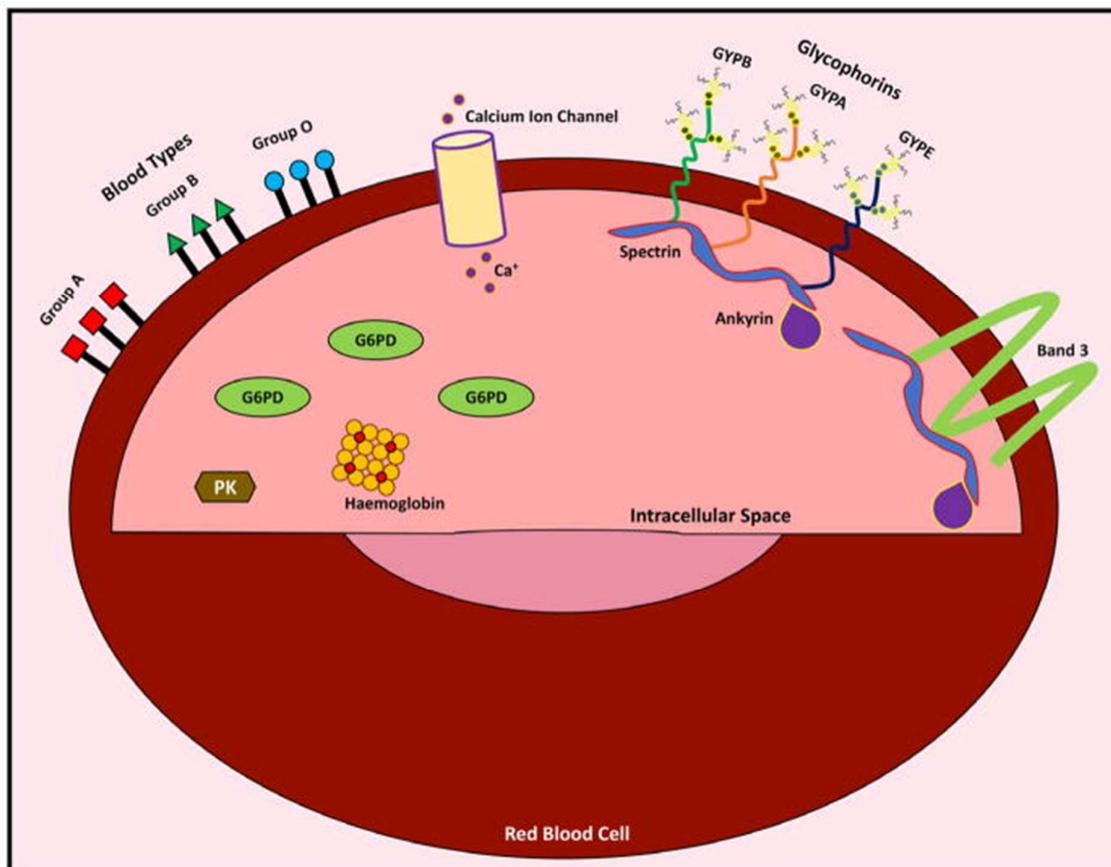


Figure 11: Représentation générale des composants érythrocytaires dont des variants génétiques ont été associés à une protection vis-à-vis du paludisme. D'après ¹¹⁰.

1. Hémoglobine S

L'exemple le plus classique et le plus anciennement démontré de protection conférée par un variant génétique de l'hématie est le trait drépanocytaire, correspondant au portage hétérozygote de l'hémoglobine S (le portage homozygote étant la forme la plus fréquente de syndrome drépanocytaire majeur). L'hémoglobine S résulte de la synthèse d'une chaîne de beta globine mutée, par mutation ponctuelle remplaçant un acide glutamique par une valine sur le 6^{ème} codon.

Il a été montré au cours des années 1950 que le portage hétérozygote de cet allèle était protecteur vis-à-vis du portage parasitaire et des formes graves de paludisme à *P. falciparum* ¹⁰⁴. L'effet est moindre vis-à-vis des formes simples. Depuis, un très grand nombre d'études épidémiologiques a

confirmé le rôle protecteur du génotype AS contre les épisodes de paludisme grave, qu'il s'agisse de neuro-paludisme ou d'anémie grave ^{110,111}. Les GWAS réalisées dans le domaine du paludisme grave ont constamment retrouvé un effet protecteur du trait drépanocytaire, et il s'agissait du polymorphisme ayant l'effet le plus fort. La pression de sélection semble encore active de nos jours ¹¹².

Le trait drépanocytaire constitue un exemple classique de polymorphisme équilibré : un allèle est délétère à l'état homozygote, mais son caractère avantageux à l'état hétérozygote lui permet de persister à fréquence intermédiaire au sein d'une population donnée.

Malgré une activité de recherche prolifique dans le domaine, les mécanismes précis déterminant la protection chez ces patients sont incomplètement élucidés et, bien que potentiellement nombreux, leurs impacts protecteurs restent fort mal hiérarchisés (figure 12). La réduction de la croissance parasitaire chez les hématies AS a été observée à plusieurs reprises, en faibles concentrations d'oxygène, tout comme une diminution de l'invasion parasitaire. La désorganisation du cytosquelette érythrocytaire et la polymérisation de l'hémoglobine rendent la cytoadhérence moins efficace ¹¹³. Les hématies AS infectées par *P. falciparum* sont plus volontiers phagocytées ¹¹⁴. La réponse immune anti *P. falciparum*, dans tous ses compartiments semble également plus intense chez les sujets AS ¹¹⁵.

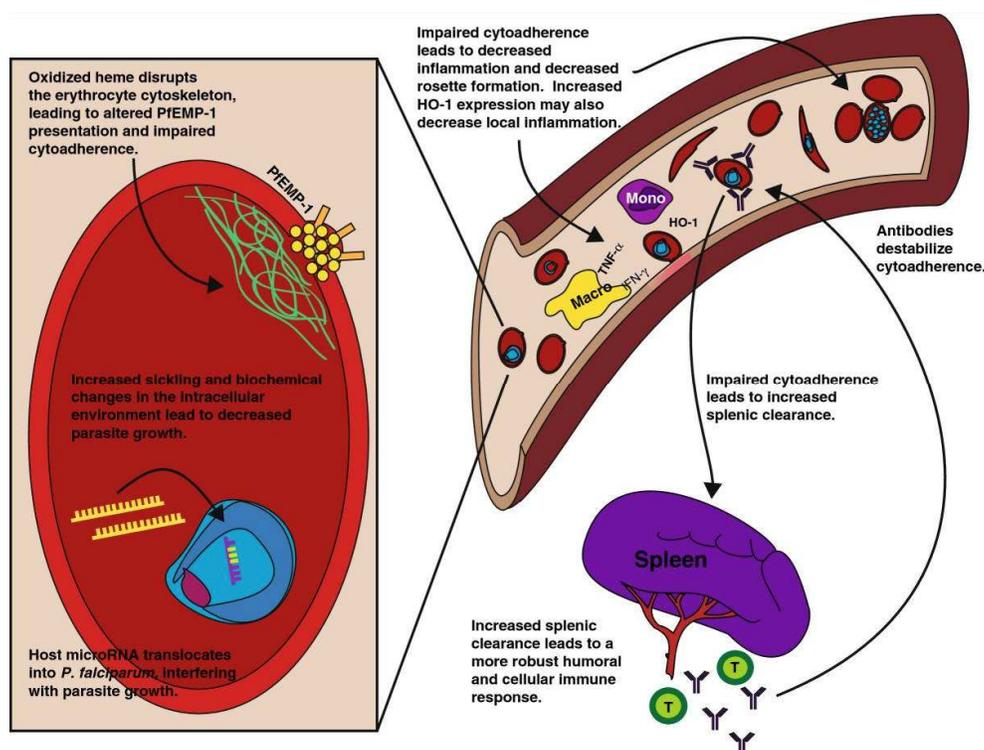


Figure 12 : Représentation des mécanismes physiopathologiques supposés sous-tendant la protection anti palustre conférée par le trait drépanocytaire. D'après ¹¹⁵.

2. L'hémoglobinoses C

Cette hémoglobinopathie autosomique récessive est également liée à une mutation ponctuelle de la beta-globine (glutamate > lysine en position 6). L'état hétérozygote est asymptomatique, l'état homozygote est responsable d'une anémie hémolytique modérée en général asymptomatique, avec splénomégalie. Cette pathologie est rencontrée en Afrique de manière quasi exclusive, surtout en Afrique de l'Ouest ¹¹⁶.

L'état hétérozygote (très faiblement) et homozygote de façon plus nette protège contre les formes graves de paludisme, mais de manière beaucoup moins marquée que la protection induite par le trait drépanocytaire. La protection contre les formes simples et la parasitémie n'est pas formellement prouvée, même si certains travaux récents vont en ce sens ¹¹⁷.

Les mécanismes invoqués et explorés sont proches de ceux à l'œuvre dans la drépanocytose : expression altérée de PfEMP1 ¹¹⁸, diminution du nombre de knobs (protrusions constatées à la surface des hématies infectées par des formes matures, sièges notamment de l'expression de PfEMP1 et donc importantes pour la cytoadhérence) ¹¹⁹, réduisant ainsi la séquestration dans les organes périphériques et accélérant donc la clairance parasitaire splénique. Une diminution de la croissance intra-érythrocytaire du parasite dans les cas d'homozygotie ¹²⁰ a également été retrouvée. Enfin, le cytosquelette érythrocytaire semble désorganisé en cas d'infection d'hématies AC ou CC par *P. falciparum* ¹²¹.

Il semble exister une majoration de la transmission de l'homme au moustique en cas d'hémoglobinoses C ou S ¹²². Ces résultats n'ont pas été reproduits et leur mécanisme n'est pas connu.

3. Hémoglobine E

Cette hémoglobinopathie très peu symptomatique (hémolyse et splénomégalie modérées à l'état homozygote) est là encore due à une mutation ponctuelle de la beta globine (glutamate > lysine en position 26). Sa prévalence en Asie du Sud-Est est élevée (30 à 45% en moyenne, jusqu'à 50% dans certaines zones). Un parallélisme entre la répartition géographique du paludisme et de l'hémoglobinoses E en Thaïlande a fait suspecter une pression de sélection due à *Plasmodium* ¹²³. Des analyses de déséquilibre de liaison réalisées ultérieurement en Thaïlande suggèrent une apparition de ce variant dans la population Thaïlandaise il y a environ 3000 ans, soit nettement plus récemment que le trait drépanocytaire ¹²⁴.

La réalité de la protection clinique est discutée: une étude rétrospective menée en Thaïlande semble indiquer une diminution du risque d'accès graves ¹²⁵ même si ceci n'a pu être confirmé dans une autre étude menée également en Thaïlande ¹²⁶. Une étude réalisée en Inde indique une moindre prévalence du portage de parasites chez les sujets EE et AE ¹²⁷.

Les mécanismes protecteurs sont discutés et moins intenses : une diminution de la croissance du parasite en culture *in vitro* avec des hématies EE a été mise en évidence dans certains travaux ^{128,129},

mais pas dans d'autres¹³⁰. L'invasion parasitaire d'hématies AE semble moins efficace¹³¹, même si ceci est également controversé¹³². Les hématies homozygotes et hétérozygotes EE infectées par *P. falciparum* semblent plus efficacement phagocytées par des monocytes humains¹³³, et la clairance parasitaire est plus rapide après artésunate chez les sujets de génotype EE¹³⁴.

4. Thalassémies

Il s'agit d'un groupe d'affections génétiques très fréquentes (1 à 5% de la population mondiale possède au moins l'une des mutations), diminuant à des degrés variables la synthèse soit de la chaîne α (2 gènes), soit de la chaîne β (1 gène) de la globine, définissant ainsi les α ou β thalassémies. Les α thalassémies peuvent être divisées en $\alpha+$ ou $\alpha0$ selon la persistance ou non de la synthèse de l'une des 2 chaînes (l' $\alpha0$ est létale à l'état homozygote). Les thalassémies β sont subdivisées en formes mineures, intermédiaires ou majeures selon le degré de déséquilibre entre chaînes α et β et l'intensité des manifestations cliniques et biologiques. La coexistence d'une β thalassémie et d'une hémoglobine C ou S est possible, et possède essentiellement les caractéristiques d'un syndrome drépanocytaire majeur¹³⁵.

La répartition géographique des thalassémies est elle aussi en partie superposable à celle de l'endémie palustre actuelle ou récente : Afrique subsaharienne, bassin méditerranéen, sous-continent Indien, Asie du Sud-Est. Les travaux princeps d'Haldane, qui ont mené à la découverte de la pression de sélection exercée par le paludisme sur les variants génétiques de l'hématie, concernaient initialement la thalassémie¹⁰⁵.

De nombreux travaux ont exploré les relations unissant paludisme et les différentes formes de thalassémie : il existe une protection nette contre les formes graves de paludisme (neuropaludisme et anémie grave) en cas d' α -thalassémie. Les données sont nettement moins nombreuses en cas de β thalassémie, et ne permettent pas de conclure formellement. La protection vis-à-vis des formes non graves et du portage de parasites n'est pas non plus établie¹¹¹. Par ailleurs, la coexistence α thalassémie-hémoglobine S semble gommer la protection liée au trait drépanocytaire¹³⁶. Ce phénomène d'interaction négative entre deux gènes situés à des loci différents est nommé épistasie négative.

Au plan mécanistique, les phénomènes à l'œuvre sont encore imparfaitement compris. Il semble exister une majoration de la liaison aux anticorps et donc de la clairance parasitaire. Une réduction du rosetting via une expression diminuée du récepteur du complément CR1 a également été évoquée, même si le mécanisme liant ces 2 éléments est actuellement inconnu¹¹⁰.

5. Le déficit en glucose 6 phosphate deshydrogénase (G6PD)

La G6PD est une enzyme intra-érythrocytaire qui catalyse une des premières étapes de la voie des pentoses phosphates, voie qui mène *in fine* à la production de NADPH, molécule clé dans la réduction de l'oxydation intra-érythrocytaire.

De très nombreuses mutations du gène G6PD (qui est porté par le chromosome X) ont été décrites, affectant variablement l'activité enzymatique. Certaines sont cependant nettement sur-représentées en Afrique. Le déficit se manifeste, selon le variant, par une hémolyse rarement permanente, plus souvent déclenchée par des épisodes infectieux, l'exposition à des médicaments ou des aliments oxydants (classique favisme).

Un certain degré de similitude de la répartition géographique du déficit en G6PD et du paludisme a, à l'instar d'autres polymorphismes, soulevé la question d'une pression de sélection exercée par le paludisme. De nombreuses études ont donc logiquement tenté d'évaluer cette association, mais ont révélé des résultats très contradictoires : la protection clinique était retrouvée chez les femmes hétérozygotes ¹³⁷, ou chez ces dernières et chez les hommes hémizyotes ^{138,139}, ou chez les hommes hémizyotes seulement ¹⁴⁰. Certaines études ne mettaient en évidence aucune protection ¹⁴¹. L'hétérogénéité des méthodes utilisées (définition des accès palustres, définition du déficit enzymatique, taille de l'échantillon...) rend en partie compte de ces discordances. Une GWAS de grande envergure a précisé le phénomène en retrouvant, chez les sujets déficitaires un effet mixte: protection contre le neuropaludisme, mais aggravation de l'anémie palustre grave ¹⁴². Dans une cohorte multinationale africaine, après estimation du niveau d'activité enzymatique, une tendance similaire a été retrouvée. Il pourrait s'agir d'un équilibre de sélection lié à l'excès de mortalité du neuropaludisme, en comparaison à l'anémie grave ¹⁴³. Cette notion a cependant récemment été remise en cause, arguant que la définition des formes graves utilisée dans ces études (neuropaludisme ou anémie grave, mais exclusion des patients présentant des caractéristiques des deux formes) introduisait un facteur de confusion en raison de l'association forte existant entre déficit en G6PD et anémie ¹⁴⁴.

6. Déficit en pyruvate kinase (PK)

Il s'agit d'une autre cause d'anémie hémolytique corpusculaire. Sa répartition géographique semble large. Sa prévalence est mal connue ; celle de la maladie est estimée, dans la population caucasienne, à 1 pour 20 000 ¹⁴⁵ ; celle des mutations pourrait être plus fréquente en Afrique subsaharienne ¹⁴⁶. Là aussi, de nombreuses mutations (environ 200) sur le gène de l'enzyme ont été décrites, et transmises sur un mode autosomique récessif. La PK est une enzyme clé de la glycolyse, particulièrement importante pour la production d'ATP dans l'hématie, qui ne possède pas de mitochondrie. Cliniquement, les sujets atteints présentent une anémie hémolytique chronique d'intensité variable selon la mutation.

In vitro, l'invasion des hématies par le parasite semble réduite et la clairance des hématies parasitées par les macrophages augmentée ^{147,148}. Chez la souris infectée par *P. chabaudi*, le déficit semble protéger de la symptomatologie ¹⁴⁹. En revanche les données cliniques sont très rares ; une étude

menée en Thaïlande semble retrouver un taux réduit d'infections à *P. falciparum* seulement ¹⁵⁰, sans que ces éléments aient pu être confirmés.

7. Maladies du cytosquelette érythrocytaire

L'*ovalocytose du Sud-Est asiatique (SAO)*, l'une des formes connues d'ovalocytose, est due à une délétion hétérozygote (la forme homozygote est létale dans la très grande majorité des cas, même si un enfant homozygote vivant a été décrit ¹⁵¹), de 27 paires de bases ¹⁵² dans le gène *SLC4A1*. Ce gène code pour la protéine Bande 3 (sur un domaine transmembranaire) qui détermine le groupe sanguin Diego. La Bande 3 est une des protéines majoritaires de la membrane érythrocytaire, et a une fonction structurelle importante, notamment via son interaction avec l'ankyrine, dans les interactions verticales entre cytosquelette et membrane érythrocytaire. Il s'agit aussi d'un canal anionique jouant un rôle important dans le transport du CO₂. Cette mutation est responsable d'un défaut d'ancrage de la bande 3 aux protéines du cytosquelette ¹⁵³, rendant l'hématie plus rigide. Cette pathologie est très prévalente en Asie du sud-est et dans certaines îles du Pacifique (1/20 à 1/4 dans certaines zones de Papouasie Nouvelle Guinée) et est transmise sur un mode autosomique dominant. La très grande majorité des sujets hétérozygotes est asymptomatique. Elle semble protéger vis-à-vis des formes graves de paludisme (neuropaludisme)¹⁵⁴, mais pas du portage de parasites ¹⁵⁵. Le mécanisme protecteur passerait par une diminution de l'invasion, les ovalocytes étant plus rigides ^{156,157}, mais ce mécanisme semble également dépendant de la souche parasitaire ¹⁵⁸. Les ovalocytes infectés semblent se lier de manière préférentielle à CD36; la protection pourrait ainsi s'expliquer par une déviation de la séquestration des hématies parasitées vers des organes riches en CD36, ce qui n'est pas le cas du cerveau ¹⁵⁹.

Les relations entre *sphérocytose héréditaire* et paludisme sont moins claires. Dans un modèle de souris sphérocytaire par mutation de l'ankyrine et infectée par *P. chabaudi*, les souris hétérozygotes présentaient une meilleure survie que le groupe contrôle et une parasitémie moindre; la survie intra-érythrocytaire de *Plasmodium* semblait affectée ¹⁶⁰. Il n'existe en revanche pas de données cliniques convaincantes quant à la protection éventuelle conférée par ce polymorphisme.

L'*elliptocytose héréditaire* est une pathologie autosomique dominante, hétérogène, due à des mutations du gène de l' α -spectrine (le plus souvent), de la β -spectrine ou de la protéine 4.1R. Ces mutations modifient les interactions latérales du cytosquelette érythrocytaire et le déstabilisent. Cette pathologie n'est pas rare en Afrique de l'ouest (prévalence estimée entre 1 et 2%). La très grande majorité des sujets atteints est asymptomatique. Les sujets homozygotes ou hétérozygotes composites présentent une anémie d'intensité variable ¹⁶¹. Des données *in vitro* suggèrent que la croissance intraérythrocytaire, voire l'invasion du parasite sont réduites au sein des hématies elliptocytaires ^{162,163}.

8. Groupes sanguins

Il existe une similitude entre les aires géographiques de forte prévalence du groupe O et celle du paludisme à *P. falciparum*. Le groupe O correspond à une évolution génétique des groupes A et B, et l'apparition de ce groupe date de 50 000 à 100 000 ans, avant que les premiers humains migrent hors de l'Afrique. *Plasmodium* coexistait déjà avec l'être humain à ce moment, ce qui constitue un argument supplémentaire pour son implication dans la pression de sélection ¹⁶⁴ ayant fait émerger ce groupe.

Il existe un abondant corpus d'études, de qualité variable, menées en Afrique et en Asie, attestant de l'effet protecteur du groupe O sur les formes graves, neuropaludisme ou anémie grave ^{48,165,166}. Le groupe O ne semble en revanche pas protéger contre les accès simples dans une grande étude au Mali ¹⁶⁷, ni contre le portage de parasites ¹⁶⁸. Les données dans le paludisme gestationnel chez les primipares ¹⁶⁹ sont variables (étude négative en Asie du Sud-Est) ¹⁷⁰.

Le mécanisme protecteur conféré par le groupe O semble être essentiellement une réduction du rosetting, mécanisme pathogène par lequel des hématies non infectées se lient à une hématie infectée. Un nombre important d'études *in vitro* confirment la réduction de la formation des rosettes au sein d'hématies du groupe O ¹⁷¹⁻¹⁷⁴, certains domaines de l'adhésine parasitaire PfEMP1 lient des antigènes présents sur les hématies A ou B pour la constitution du rosetting ¹⁷¹; de même, le rosetting lié aux adhésines RIFINs se fait préférentiellement avec des hématies A ¹⁷⁵. En outre, les hématies O, comparées aux A et B, semblent plus efficacement phagocytées par les cellules effectrices ¹⁷⁶.

Le groupe O est plus fréquemment retrouvé en Afrique subsaharienne mais pas de manière exclusive, probablement par sélection équilibrée (ce groupe semble majorer certaines infections bactériennes comme le choléra ¹⁷⁷).

9. Glycophorines A/B/C.

Les glycophorines sont des glycoprotéines sialylées de la surface érythrocytaire qui ont un rôle dans l'attachement du cytosquelette érythrocytaire à sa membrane, et déterminent des groupes sanguins mineurs (MNS pour A, B, E, et Gerbich pour C). Ce sont également des récepteurs majeurs de l'invasion du mérozoïte de *Plasmodium*. Les glycophorines A, B, C lient les protéines parasitaires EBA175, EBL1, EBA140, respectivement. Les glycophorines A et B lient EBA-175 & EBL1 via un domaine sialylé.

La délétion de l'exon 3 dans la glycophorine C (chromosome 2) est responsable d'une modification du groupe sanguin Gerbich (Ge) et détermine le phénotype Ge négatif. Dans ces conditions, EBA140 ne se lie pas à la glycophorine C ¹⁷⁸. Ces polymorphismes ont essentiellement été décrits en Mélanésie. Le phénotype Ge négatif ne protège pas contre le portage de parasites ¹⁷⁹, ni contre l'anémie palustre grave ¹⁸⁰.

L'une des GWAS réalisées par le Malaria Genomic Epidemiology Network a identifié comme protecteur un locus du chromosome 4, proche des glycophorines (Odds Ratio 0.67) vis-à-vis des formes graves, ¹⁸¹. L'approfondissement de l'étude de cette région du génome, en se focalisant sur des individus

africains, a mis en évidence une grande variation du nombre de copies des gènes des GYP A et B. Un variant structural appelé DUP4, formé d'un domaine extracellulaire GYP B, intracellulaire GYP A, est responsable du groupe sanguin nommé Dantu. Cet allèle semble protéger du paludisme grave, et est retrouvé à une plus grande fréquence en Afrique de l'Est, mais pas de l'Ouest¹⁸². Le mécanisme précis de la protection conférée, incomplètement élucidé, résulte probablement d'une altération des interactions Glycophorine/Bande 3.

10. ATP2B4

Ce gène (ATPase, Ca²⁺-transporting, plasma membrane, 4) code pour la molécule PMCA4, qui est une pompe à calcium (responsable d'un export de calcium) présente au sein de nombreux types cellulaires dont l'érythrocyte, dont elle est la principale pompe calcique. Une étude d'association génome entier menée au Ghana a mis en évidence¹⁸³ une association entre le locus d'ATP2B4 et le phénotype palustre grave. Ce même variant a confirmé son rôle protecteur, cette fois dans une cohorte de femmes enceintes ghanéennes¹⁸⁴, ainsi que dans la réplique d'une GWAS sur une cohorte multinationale¹⁴² et dans une étude cas-témoin portant sur 2244 enfants kenyans atteints de paludisme grave¹⁸⁵. Un effet de sélection positive relativement récente dans la population européenne a été mis en évidence pour un single nucleotide polymorphism (SNP) d'ATP2B4¹⁸⁶.

Au plan mécanistique, le variant génétique semble se trouver au sein d'une zone activatrice de la transcription d'ATP2B4 dans la lignée érythroïde. Sa délétion, responsable de bas niveaux d'expression de la protéine PMCA4, augmente nettement la quantité de calcium intra-érythrocytaire, activant ainsi le canal potassique Gardos, qui laisse fuir le potassium hors de la cellule. La déshydratation de l'hématie qui en résulte protègerait contre l'invasion parasitaire¹⁸⁷.

Il existe en outre une possible interaction épistatique entre ATP2B4 et HbC¹⁴².

11. Xérocitose héréditaire (ou stomatocytose deshydratée)

La xérocitose héréditaire est un groupe hétérogène d'affections du globule rouge. La principale anomalie moléculaire causale est la mutation gain de fonction du gène codant pour la protéine PIEZO1. La pathologie est transmise sur un mode autosomique dominant. Le phénotype associe, à des degrés variables hémolyse, évènements thrombotiques, hyper ferritinémie, pseudo hyperkaliémie.

PIEZO1 est un canal ionique préférentiellement perméable au calcium (entrée de calcium), sensible à la pression mécanique (mécano transduction) et capable d'activer à son tour le canal potassique Gardos. La mutation suractive le canal PIEZO1¹⁸⁸, qui active à son tour la protéine Gardos. L'efflux de potassium qui en découle déshydrate l'hématie¹⁸⁹.

D'autres cas de xérocytose héréditaire sont dus à des mutations du gène *KCNN4*, codant pour la protéine Gardos, qui là aussi, suractivent cette protéine ¹⁹⁰.

Un travail mené *in vitro* a montré que l'état d'hydratation des hématies était un facteur affectant l'invasion parasitaire de manière importante, celle-ci étant nettement réduite en cas de déshydratation de l'hématie. La xérocytose héréditaire, modèle de déshydratation de l'hématie, obéit à cette règle ¹⁹¹.

Une nouvelle mutation de *PIEZO1* (E756del) a récemment été décrite et semble être présente dans des proportions importantes (de l'ordre de 30%) dans la population africaine. Les hématies portant cette mutation sont moins sensibles, *in vitro*, à l'invasion par les mérozoïtes ¹⁹². Des travaux menés sur plusieurs cohortes de patients drépanocytaires ont confirmé une prévalence élevée de cette mutation (20% environ), mais les données relatives au phénotype érythrocytaire chez les porteurs étaient contradictoires ^{193,194}.

12. Associations de polymorphismes érythrocytaires

La coexistence d'une α -thalassémie et du trait drépanocytaire abroge la protection anti-palustre conférée par ces 2 variants pris isolément ¹³⁶. Le mécanisme semble être une réversion des altérations d'expression de PfEMP1, de diminution du rosetting et de cytoadhérence observées dans les hématies AS ¹⁹⁵.

Une interaction d'importance modeste entre hémoglobine C et le variant d'ATP2B4 a été mise en évidence par une des études génome entier réalisées : le variant minoritaire en Afrique semble contrebalancer l'effet protecteur de l'hémoglobine C ¹⁴².

Pathologie ou polymorphisme	Mécanismes protecteurs												
	Gène	Protéine	Mutation	Mode de transmission	Régions concernées	Conséquence pathologique	Portage de parasites	Accès simple	Accès grave	Résistance à l'invasion parasitaire	Inhibition de la cytoadhérence	Majoration de la phagocytose	Réduction du rosetting
Trait drépanocytaire	HBB	β globine	Glu>Val 6	AR	Afrique subsaharienne	HbSS Syndrome drépanocytaire majeur HbAS Aucune situation extrême	O/N	O	Anémie grave et neuropaludisme	O si [O2] basse	O	O	
Hémoglobinoses C	HBB	β globine	Glu>Lys 6	AR	Afrique	HbCC Anémie hémolytique modérée	?	N	HbCC : O* HbAC : N *	HbCC : O	HbCC : O		HbCC : O
Hémoglobinoses E	HBB	β globine	Glu>Lys 26	AR	Asie du Sud-Est	HbEE Anémie hémolytique & splénomégalie modérées	O	?	O	O (Hé)/N	?	N	O
α thalassémie	HBA1/2	α globine	Nombreuses	AR	Afrique subsaharienne, bassin méditerranéen, Asie du Sud et Afrique subsaharienne, bassin méditerranéen, Asie du Sud et de l'Est	Anémie d'intensité variable	N	N?	O	?	O?	Sans doute	?
β thalassémie	HBB	β globine	Nombreuses	AR	Afrique subsaharienne, bassin méditerranéen, Asie du Sud et de l'Est	Anémie modérée (Hé)/Anémie sévère (Ho)	?	?	?	?	N?	O	O
Déficit en G6PD	G6PD	Glucose 6 phosphate deshydrogénase	Nombreuses	lié à l'X	Afrique, Moyen Orient, Asie du Sud-Est	Anémie hémolytique d'importance variable	?	?	O (CM)/N (SMA)	?	O mais inconstant	N	O
Déficit en PK	PK-LR	Pyruvate Kinase	Nombreuses	AR		Anémie hémolytique modérée (Hé) ou sévère (Ho)			O	O			O
Ovalocytose du Sud-Est asiatique	SLCA41	Band3	del 27 pb	AD	Asie du SE/Pacifique	Anémie très sévère (Ho)	N	?	O	O	N	O (sur ICAM1)	?
Groupe sanguin O	ABO	Glycosyl transférase A/B/O	?	SO	Afrique de l'Est	Aucune	N	N	O	N	N	?	O
Glycophorines A/B	GYP A/B	Glycophorines A/B	Variation du nombre de copies	SO	Afrique de l'Est	Aucune	?	?	O	?	?	?	?
Glycophorine C	GYP C	Glycophorine C	Del exon 3	SO	Mélanésie	Aucune	N	?	?	O	?	?	?
ATP2B4	ATP2B4	PMCA4	Plusieurs polymorphismes décrits	AD/AR?	Afrique	Aucune sauf hyperchromie?	O femmes enceinte & densité	?	O	?	?	?	?
Xérocytose héréditaire	HEZO1/KCWN-1/GARDOS	Piero 1/GARDOS	Variables, missense ou GOF	AD	Europe/Afrique?	Anémie hémolytique modérée & hyperchromie Inconstamment: surcharge martiale, pseudohyperkaliémie	?	?	?	O	O	?	?
Absence de l'antigène Duffy	Fya/b	Antigène Duffy			Afrique de l'Ouest		?	?	O P. vivax unique	O	?	N	N

Tableau 2 : résumé des caractéristiques des polymorphismes génétiques érythrocytaires associés à la protection anti paludique. Ho : homozygote ; Hé : hétérozygote ; O : oui ; N : non ; GOF : gain of function=mutation gain de fonction ; AR : autosomique récessif ; AD : autosomique dominant ; SO : sans objet.

C. Polymorphismes génétiques non érythrocytaires et paludisme à *P. falciparum*.

Contrairement aux travaux menés sur les polymorphismes génétiques érythrocytaires, les études s'attachant à mettre en évidence le rôle de polymorphismes autres dans la susceptibilité vis-à-vis de *P. falciparum* n'ont été que rarement reproductibles.

Les variants érythrocytaires sont souvent responsables de pathologies cliniquement et/ou biologiquement apparentes, alors que les variants immunitaires, en raison de la redondance des mécanismes de la réponse immune, sont souvent moins parlants cliniquement.

1. Système HLA

La fonction essentielle du système Human Leukocyte Antigen (HLA) dans la présentation antigénique en fait un candidat majeur dans le domaine de la susceptibilité génétique aux maladies infectieuses, au sens large. Comme discuté plus haut, la particularité du paludisme, dans ce domaine, tient au fait que la phase du cycle qui est responsable des symptômes a lieu au sein de cellules n'exprimant pas de molécules HLA (les érythrocytes). L'association potentielle entre allèles HLA et paludisme devrait donc, instinctivement, avoir trait à la phase hépatique. Les données sur les liens HLA et paludisme sont de plus complexifiées par la variation antigénique de *Plasmodium* : certains haplotypes HLA peuvent être associés à des variants antigéniques de *Plasmodium*.

Les premiers travaux ont été menés en Sardaigne, et ont mis en évidence une sur représentation (d'un facteur 9.5) de l'allèle HLA B35 dans les populations vivant à basse altitude, et donc exposées au parasite ¹⁹⁶.

En dehors d'une association entre HLA-B53 et paludisme grave ¹⁹⁷, qui ne fut pas confirmée lors d'une tentative de réplique en Gambie ¹⁹⁸, et malgré les GWAS réalisées, il n'existe pas à ce jour de preuve que des allèles HLA sont robustement associés à une protection vis-à-vis d'une forme clinique de paludisme. Une étude menée au Mali sur des enfants de l'ethnie Dogon avait mis en évidence une association entre HLA A*30 :01 et A*33 :01 et neuropaludisme ¹⁹⁹.

Il existe également quelques données sur l'association entre certains haplotypes HLA-G et certains phénotypes palustres : 2 études familiales conduites au Sénégal ont mis en évidence des associations entre certains polymorphismes HLA-G et parasitémie pour une étude ²⁰⁰, et niveau d'anticorps anti *P. falciparum* pour la seconde ²⁰¹.

2. Cytokines

De nombreux polymorphismes siégeant sur des gènes de cytokines, ou de récepteurs aux cytokines (gène lui-même ou son promoteur) ont été évalués quant à leurs potentiels liens avec la protection contre le paludisme. Les molécules les plus étudiées sont le Tumor Necrosis Factor α , l'interféron γ , le CD40 ligand, et les interleukines 1 et 4. Dans des études cas-témoins, des polymorphismes de ces gènes ont été associés à un sur-risque ou à une protection contre le paludisme grave. Cependant, la réplification de ces résultats dans des populations différentes a échoué.

La liste des gènes étudiés est présentée tableau 3.²⁰²

3. Récepteurs de l'hôte humain auxquels adhèrent les globules rouges parasités

Les molécules humaines liant les ligands parasitaires présents à la surface des hématies infectées opèrent la cytoadhérence, et sont donc d'une grande importance dans la physiopathologie des formes graves. Ils ont été explorés dans le cadre d'approches focalisées (gène candidat).

a. *CD36* a fait l'objet d'études en Afrique et en Asie, sans qu'il ait pu être mis en évidence de lien fort entre polymorphisme de cette molécule et protection : des travaux préliminaires menés dans l'ethnie Yoruba au Nigeria avaient mis en évidence un haplotype porteur d'une mutation non-sens et sous la dépendance d'une pression de sélection récente. Lors d'un travail confirmatoire sur un plus grand échantillon (3420 sujets, 66 groupes), il est apparu que cet haplotype était restreint à la population Yoruba²⁰³, et qu'en analyse globale, il n'existait pas d'effet protecteur sur les formes graves de paludisme.

b. Des résultats identiques, peu concluants, ont été obtenus en explorant les polymorphismes d'*ICAM1* et *PECAM1*.

4. Récepteur au complément de type 1 (CR1 ou CD35)

Cette molécule, présente entre autres à la surface des hématies, régule leur propension à être phagocytées et joue également un rôle dans le rosetting, voire dans l'invasion par les mérozoïtes. Il existe des arguments épidémiologiques pour penser que le paludisme a exercé une pression de sélection sur le locus CR1 chez les Sardes²⁰⁴ à l'époque où cette île était impaludée.

Les données cliniques et *in vitro* sont contradictoires: une expression diminuée du CR1 sur les érythrocytes semble majorer le risque de paludisme grave, mais une expression augmentée majore le rosetting, qui favorise théoriquement le neuropaludisme. Epidémiologiquement, une protection contre le paludisme grave conférée par des variants de CR1 qui diminuent son expression a été mise en évidence en Papouasie Nouvelle Guinée²⁰⁵, mais pas en Gambie²⁰⁶.

Gene	Protein	Function	Reported Genetic Associations with Malaria
<i>FCGR2A</i>	CD32, low affinity receptor for Fc fragment of IgG	Clearance of antigen-antibody complexes	Association with severe malaria in the Gambia
<i>HLA-B</i>	HLA-B, a component of MHC class I	Antigen presentation that leads to cytotoxic T cells	HLA-B53 association with severe malaria in the Gambia
<i>HLA-DR</i>	HLA-DR, a component of MHC class II	Antigen presentation that leads to antibody production	HLA-DRB1 association with severe malaria in the Gambia
<i>IFNAR1</i>	Interferon α receptor component	Cytokine receptor	Association with severe malaria in the Gambia
<i>IFNG</i>	Interferon γ	Cytokine with antiparasitic and proinflammatory properties	Weak associations with severe malaria in the Gambia
<i>IFNGR1</i>	Interferon γ receptor component	Cytokine receptor	Association with severe malaria in Mandinka people of the Gambia
<i>IL1A/IL1B</i>	Interleukin-1 α and -1 β	Proinflammatory cytokines	Marginal associations with severe malaria in the Gambia
<i>IL10</i>	Interleukin-10	Anti-inflammatory cytokine	Haplotypic association with severe malaria in the Gambia
<i>IL12B</i>	Interleukin-12 β subunit	Promotes development of Th1 cells	Association with severe malaria in Tanzania
<i>IL4</i>	Interleukin-4	Promotes antibody-producing B cells	Association with antimalarial antibody levels in Fulani people of Burkina Faso
<i>MBL2</i>	Mannose-binding protein	Activates classic complement	Association with severe malaria in Gabon
<i>NOS2A</i>	Inducible NO synthase	Generates NO, a free radical	Various associations with severe malaria in Gabon, the Gambia, and Tanzania
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor	Cytokine with antiparasitic and proinflammatory properties	Various associations with severe malaria and reinfection risk in the Gambia, Kenya, Gabon, and Sri Lanka
<i>TNFSF5</i>	CD40 ligand	T cell-B cell interactions leading to immunoglobulin class switching	Association with severe malaria in the Gambia

Tableau 3 : Liste des gènes intervenant dans le système immunitaire dont les variations ont été explorées en association avec l'infection palustre. D'après ²⁰².

C. En résumé

La pression de sélection très ancienne et importante exercée par *Plasmodium* sur le génome humain a été d'une importance majeure, en faisant émerger des polymorphismes génétiques de l'hématie qui concernent une part importante de l'humanité, y compris des variants très pathogènes en cas d'homozygotie (hémoglobine S), ce qui illustre parfaitement la notion de polymorphisme équilibré (mutation délétère à l'état homozygote mais protectrice à l'état hétérozygote).

A contrario, les liens entre paludisme et variants génétiques non érythrocytaires sont d'interprétation beaucoup plus difficile: il n'existe en effet pas de résultats très probants et reproductibles dans ce domaine. Ceci est sans doute du en partie à la complexité de la réponse immune dirigée contre les stades sanguins de *Plasmodium* (cf supra), ainsi qu'à l'existence de possibles polymorphismes génétiques non encore découverts car d'effet faible lorsqu'étudiés individuellement. Les progrès rapides en termes de couverture du génome lors des séquençages, le gain logistique conféré par le séquençage de l'exome, génèreront sans doute prochainement une meilleure compréhension de ce domaine important et complexe de l'interface entre génétique humaine et maladies infectieuses.

L'influence de la génétique humaine sur les formes cliniques pauci-symptomatiques et/ou chroniques de paludisme reste encore peu explorée.

III. Ethnicité et paludisme

A. La définition d'un groupe ethnique

La notion d'ethnie (du grec ἔθνος, peuple) ne revêt pas une définition univoque dans la littérature des sciences humaines. Le dictionnaire Larousse définit l'ethnie comme "groupement humain qui possède une structure familiale, économique et sociale homogène, et dont l'unité repose sur une communauté de langue, de culture et de conscience de groupe"²⁰⁷. Les contours de cette notion, et leurs frontières avec celles de nation, de communauté, voire avec le concept désuet de race ont cependant fait l'objet de nombreux débats en sciences sociales, débats dont la complexité a été majorée par le phénomène de colonisation, tout particulièrement en Afrique. Certains auteurs vont même jusqu'à questionner la réalité de ce concept, le renvoyant plus à une notion abstraite issue de la colonisation qu'à une réalité sociologique, mais ce point de vue n'est en aucun cas consensuel²⁰⁸. L'héritage social et culturel commun est sans doute l'élément le plus communément admis. La confirmation génétique de l'existence d'un ancêtre commun n'est pas constante pour toutes les ethnies²⁰⁹.

Dans le cadre de ce travail, l'appartenance ethnique revêtira un intérêt tout particulier en raison de l'homogénéité génétique qu'elle peut révéler, elle-même consécutive à une stricte endogamie au Bénin. Cette appartenance ethnique sera également responsable de spécificités en termes d'habitus, telles que l'alimentation, l'habitat, l'exposition au vecteur, ces spécificités pouvant jouer un rôle important dans l'expression de l'infection palustre.

B. Ethnicité au Bénin ; le cas particulier des Peulhs

Le Bénin est le siège d'une mosaïque ethnique complexe ; les presque 11 millions d'habitants que compte le pays sont en effet divisés en près de 50 ethnies²¹⁰. Les principaux groupes sont, par ordre d'importance numérique décroissant : les Fon (38.4%), les Adja (15.1%), les Yoruba (12%), les Bariba (9.6%), les Peulh (8.6%), et les Otamari (6.1%). Cependant, il existe une grande hétérogénéité géographique de cette répartition : dans le département de l'Atacora, lieu où a été réalisé ce travail, les Otamari sont majoritaires (59.3%), suivis des Bariba (19%) et des Peulh (12.5%) (figure 13).

Les Peulh (appelés aussi Peuls, Foulbés, ou Fulani dans la littérature anglo saxonne) représentent un groupe ethnique important en Afrique de l'Ouest, comptant globalement 35 à 40 millions d'individus, si l'on se réfère au nombre de locuteurs Peulh (<http://www.axl.cefan.ulaval.ca/afrique/afracc.htm>). Leur répartition géographique va du Sud du Soudan jusqu'au Sénégal (cf figure 14). Leur origine est encore assez mystérieuse et fait l'objet de débats d'experts. Les Peulhs observent très majoritairement la religion musulmane. Une caractéristique importante est leur nomadisme, même si certains Peulhs se sont sédentarisés et urbanisés au cours des dernières décennies. Leur économie est essentiellement fondée sur le pastoralisme (élevage de vaches, de zébus principalement). En conséquence, la place des

produits laitiers dans leur alimentation est importante, et ses conséquences sur le microbiote commencent à être étudiées. La consommation de viande sous toutes ses formes est très modeste. Comme dans plusieurs groupes ethniques du Bénin, l'endogamie est très stricte chez les Peulhs.

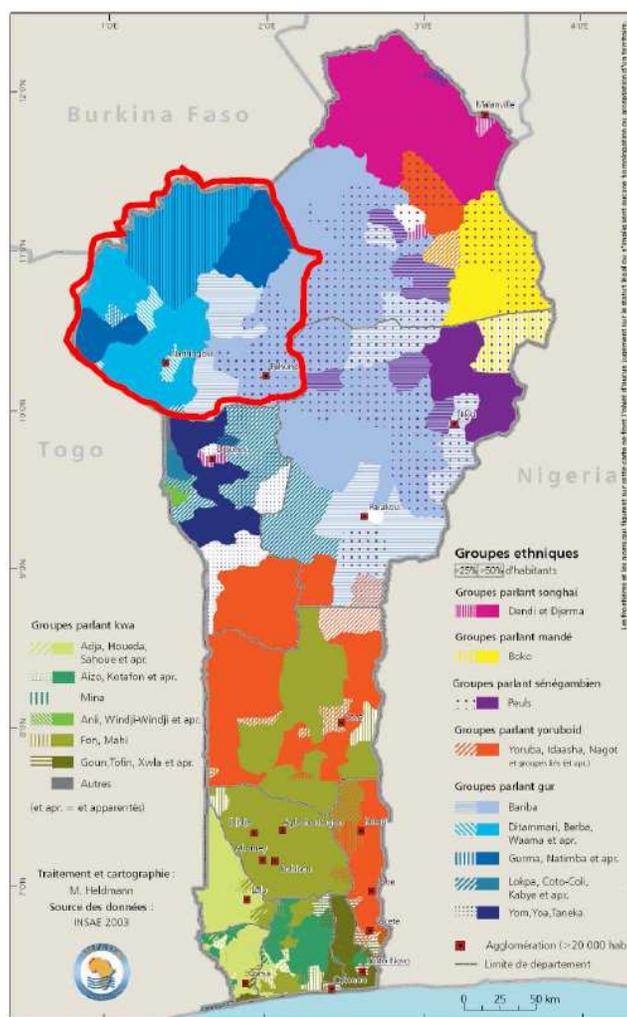


Figure 13 : Répartition géographique des principaux groupes ethniques au Bénin. Le département de l'Atacora est entouré en rouge. D'après l'Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique, république du Bénin.

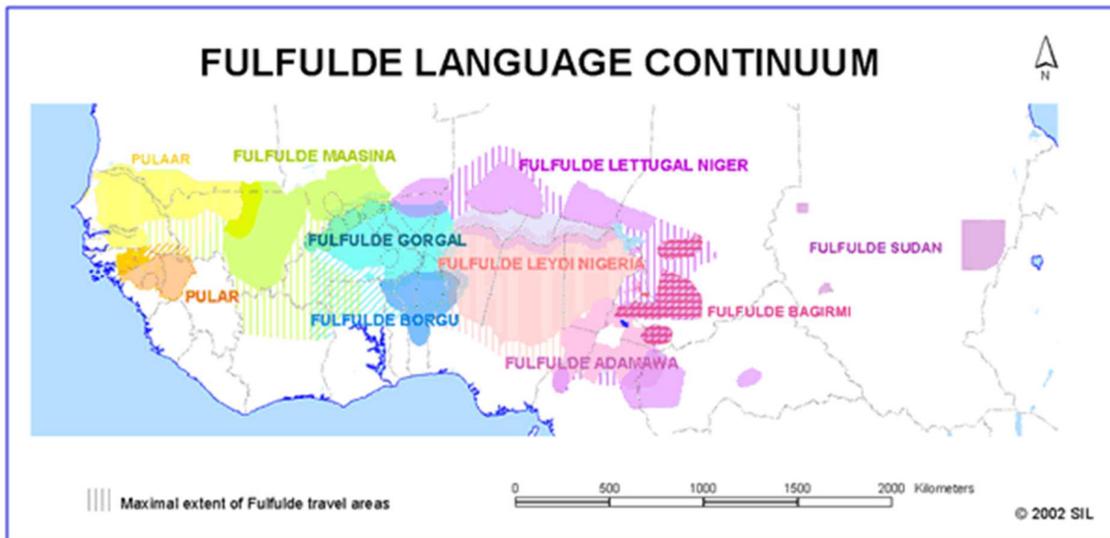


Figure 14 : Répartition géographique de l'ethnie Peulh, estimée via celle des locuteurs de la langue Fulfulde ; D'après Harrison A (<http://www-01.sil.org/silesr/2003/silesr2003-009.html>).

C. Relations entre ethnie Peulh et paludisme en Afrique subsaharienne

L'observation de différences phénotypiques en lien avec l'infection palustre a débuté au cours des décennies 1970 et 1980. Au Nigeria, Oomen *et al.* ont mis en évidence la sur-représentation de la splénomégalie tropicale (terme désormais remplacé par celui de splénomégalie palustre hyper réactive, SPH) chez les Peulhs ²¹¹. En 1987, Greenwood *et al.* ont mis en évidence, en Gambie, des différences inter-ethniques marquées entre les ethnies Peulh, Mandinka, et Wolof : les adultes Peulhs ont un risque plus élevé que les adultes d'autres ethnies de souffrir de SPH ²¹². Ces observations ont par la suite été approfondies par l'équipe de David Modiano au Burkina Faso, ainsi que par celle d'Ogobara Doumbo au Mali. Au total, une cinquantaine d'études se sont intéressées au phénomène de protection liée à l'ethnie vis à vis de *P. falciparum*. Ces études découlent, dans leur majorité, de l'observation de cohortes ayant débuté dans les années 1990, au nord-est de Ouagadougou, au Mali, au Soudan, et plus confidentiellement au Nigeria. En dehors de l'Afrique, l'ethnie népalaise Tharu, qui vit dans la région du Terai, endémique pour le paludisme, semble nettement moins touchée par le paludisme que les groupes sympatriques. Il est possible que cette protection soit conférée par une haute prévalence de l'alpha- thalassémie ²¹³.

1. Différences phénotypiques inter-ethniques en lien avec le paludisme (tableau 4)

La splénomégalie est le trait phénotypique le plus souvent retrouvé. En 1974 déjà, Michel pointe la surprévalence de splénomégalie chez les Peulhs au Sénégal ²¹⁴. Cette observation a été confirmée dans

de nombreuses études, quel que soit le groupe ethnique comparateur^{215–223,223–227}. L'indice splénique (soit la prévalence de la splénomégalie), considéré comme un marqueur du niveau d'endémicité palustre²²⁸, varie moins d'une saison de transmission à une saison sèche chez les Peulhs que chez les sujets d'autres ethnies. Même si la classification semi-quantitative de Hackett²²⁹ est très fréquemment utilisée dans ces études, très peu d'informations sont disponibles sur le détail du niveau de splénomégalie des Peulhs dans ces études. Il n'existe pas de données anatomopathologiques sur la structure histologique de la rate chez des sujets Peulhs ayant bénéficié d'une splénectomie.

La prévalence du portage de *P. falciparum* est généralement moindre chez les Peulhs, argument important pour parler de protection dans ce groupe. Selon les études réalisées, la présence de parasites circulants a été déterminée par microscopie optique (frottis sanguin mince ou goutte épaisse) ou par PCR mais jamais par test diagnostique rapide (TDR). Une courte majorité d'études retrouve une prévalence de parasitémie positive moindre chez les Peulhs en microscopie optique^{216,219,227,230–237} ou en PCR^{217,218,223,238,239}. Lorsque le niveau de parasitémie était quantifié, d'autres travaux trouvent un niveau d'infection moindre chez les Peulhs, mais sans mettre en évidence de différences significatives que ce soit en microscopie optique^{220–222,224,240–243} ou en PCR^{224,234}. Les rares études ayant utilisé simultanément les méthodes optiques et moléculaires ne retrouvent pas de résultats concordants.

La densité parasitaire quantifiée en goutte épaisse était significativement moindre chez les Peulhs que chez les comparateurs dans 8 études^{220–222,225–227,234,237}, moindre mais de façon non significative dans 6 études^{224,235,238,240,242,243}, et similaire dans les 2 groupes dans 5 études^{218,233,239,244,245}, voire supérieure (non significativement) chez les Peulhs^{223,246}. De manière paradoxale, une étude de cohorte au Mali évaluant le taux de clairance d'une parasitémie à *P. falciparum* chloroquino-résistante après un traitement par chloroquine (donc vraisemblablement médiée par l'immunité) retrouvait un taux de clairance significativement moindre chez les Peulhs. Le niveau de parasitémie n'était cependant pas précisé ; il reste possible que les Peulhs n'éliminent pas complètement les parasites et restent parasitémiques à des densités très faibles²⁴⁷.

Le taux d'hémoglobine est significativement moindre chez les Peulhs^{215,218,222,226,235} dans certaines études, mais la différence n'est pas significative dans d'autres études^{239,244,245}. Il s'agissait ici de niveau d'hémoglobine traité comme une variable continue plutôt que de prévalence de l'anémie. Au sein des études retrouvant un taux d'hémoglobine significativement plus bas chez les Peulhs, la différence est en moyenne de 1.25 g/dl d'hémoglobine. Si l'on considère les études ne retrouvant qu'une différence non significative, cette différence n'est que de 0.42 g/dl. Aucune étude ne mentionne cependant la recherche d'autres causes ou facteurs de risque d'anémie ; seuls Dolo *et al.* rapportent des données sur la prévalence de la microcytose, non significativement différente entre les 2 ethnies²⁴⁸, et ce sans complément de bilan martial.

La température axillaire (analysée comme une variable quantitative continue) était le plus souvent moindre chez les sujets Peulhs, de manière significative^{221,222,226,234,240,244,245}, avec dans ce cas une différence de température moyenne de 0.58°C, ou non significative^{222,246}. Rarement, le niveau de température était similaire dans les différents groupes ethniques²³⁹. La prévalence de sujets fébriles n'était en général pas indiquée dans ces études.

2. Immunité innée et ethnie

Certains compartiments de l'immunité innée ont été explorés chez les sujets Peulhs. Arama *et al.* ont mis en évidence un plus grand état d'activation des cellules dendritiques chez les sujets Peulhs, et, au cours de l'accès aigu, une réponse intense de ces cellules à une stimulation par des agonistes des TLR4, 7 et 9 conservée alors que celle-ci était nettement altérée chez les Dogon²⁴⁴. Quin *et al.* ont comparé le transcriptome de monocytes de Peulh et de Mossi au Burkina Faso, et mis en évidence un état d'activation monocytaire nettement supérieur chez les Peulhs, à la fois avant l'infection, et en réponse à l'infection palustre²³⁹. Dans ce travail, les domaines d'activité cellulaire mis en jeu semblent très variés, mais nombre d'entre eux concernent la réponse immunitaire innée.

3. Production de cytokines

A l'état basal, les Peulhs semblent être capables de produire plus de cytokines pro inflammatoires telles qu'IL1, IL6, Interferon (IFN) γ ^{245,249}. En réponse à l'infection par *P. falciparum*, les Peulhs produisent plus d'IFN γ et d'interleukine 4²¹⁷, et leur réponse IFN γ est très nettement plus ample que chez les comparateurs Dogon²²². Cette réponse IFN γ semblait spécifique de *P. falciparum*, et non retrouvée lors de la réponse à d'autres micro-organismes tels que *Staphylococcus aureus* ou *Candida*. Les chimiokines pro-inflammatoires CXCL10 et CCL22 étaient produites en plus grande quantité chez les Peulhs que chez les Mossi²⁵⁰.

4. Immunité adaptative cellulaire

Il s'agit d'un champ peu exploré à ce jour dans le domaine de la protection ethnique vis-à-vis du paludisme. L'équipe de Modiano a mis en évidence, sur des données transcriptomiques, un défaut d'activité des lymphocytes T régulateurs chez les Peulhs comparé aux Mossi²⁵⁰. De manière plus quantitative que qualitative, Sanou *et al.* ont mis en évidence une proportion de lymphocytes T $\gamma\delta$ plus importante chez les Peulhs, mais un nombre de lymphocytes T régulateurs plus important²³⁵. Des données récentes sur la fonction des cellules T folliculaires helpers dans l'infection palustre éclairent notre compréhension des difficultés qu'ont les sujets chroniquement exposés à mettre en place une réponse humorale efficace et durable contre *P. falciparum*⁴⁰; ces explorations mériteraient d'être étendues à l'étude de l'impact de l'ethnie sur la sensibilité ou la résistance à l'infection par *P. falciparum*.

5. Immunité adaptative humorale

L'importance des anticorps dans la protection vis-à-vis de *P. falciparum* étant bien établie ^{19,251}, de nombreux travaux se sont logiquement intéressés à l'étude comparative de la réponse anticorps des Peulhs et d'autres ethnies : lorsque la réponse est évaluée de manière globale contre un mélange d'antigènes plasmodiaux (en général un lysat de culture parasitaire), les taux d'anticorps circulants sont plus élevés chez les sujets Peulhs que chez les sujets contrôles ^{216,217,226,233,252}, y compris si l'on affine l'étude à celle des différentes sous classes d'IgG ²¹⁸ ou aux IgM ²⁵². Cette différence paraît, dans certaines études, circonscrite à la saison de transmission ²³⁷. Une autre évaluation de la réponse anticorps globale des Peulhs, menée grâce à des puces protéiques, a mis en évidence une réponse à la fois plus ample et plus diversifiée, en termes d'épitopes reconnus, chez les Peulhs. Ceci était plus marqué pour la réponse IgM ²⁴² qu'IgG.

La réponse anticorps des Peulhs a également fait l'objet d'études plus ciblées sur un ou plusieurs antigènes plasmodiaux : les Peulhs avaient plus d'anticorps anti-Circumsporozoite Protein (CSP), anti-RESA et anti-Pf332 que les Mossi ou les Rimaibe dans les travaux de Modiano *et al.* ^{236,253}. Cette réponse augmentée a également été observée par Dolo *et al.* au Mali vis-à-vis des antigènes Merozoite Surface Protein (MSP) et Apical Membrane Antigen 1 (AMA1). Les Peulhs produisent également plus d'anticorps dirigés contre les protéines de la salive de l'anophèle ^{254,255}.

Les IgM totales plasmatiques ont été mesurées dans certaines cohortes ethniques, notamment Peulhs, devant la constatation de la proximité phénotypique entre le « phénotype Peulhs » et la SPH : les taux d'IgM totales sériques semblent en effet plus élevés chez les Peulhs ^{211,212}. Les mécanismes de cette élévation sont mal compris.

6. En résumé

Les sujets Peulhs ont une surprévalence de splénomégalie clinique mais sont moins intensément ou moins fréquemment fébriles dans presque toutes les études (12/14 et 7 sur 8, respectivement). Leur taux d'hémoglobine est aussi plus bas (5 études sur 8), et leur niveau d'infection par *P. falciparum* moindre, de manière qualitative (prévalence du portage) ou quantitative (densité parasitaire). Ces traits phénotypiques sont trouvés fréquemment mais non constamment. Le fait que l'âge des sujets inclus soit variable, tout comme la période de l'année (saison de transmission ou saison sèche), et le lieu d'endémie palustre (zones hyper-endémiques comme le Burkina, méso-endémiques comme le Mali, ou instables comme le Soudan) explique peut-être en partie ces disparités. On ne peut pas formellement exclure une hétérogénéité au sein de l'ethnie Peulh.

Au plan immunologique, il existe chez les sujets Peulhs une activation plus importante de l'immunité innée, un environnement cytokinique pro inflammatoire, une réponse anticorps IgM et IgG à la fois plus ample et plus intense (taux sériques plus élevés).

Afin de tenter de mieux comprendre ces spécificités phénotypiques, les auteurs se sont logiquement penchés sur les caractéristiques qui semblaient distinguer les Peulhs des autres ethnies : un fond génétique potentiellement différent, dans un contexte d'endogamie très stricte, ou des éléments liés à l'environnement comme l'habitus (alimentation, attitudes de prévention vis-à-vis du paludisme, recours au système de soins...).

D. Polymorphismes génétiques, ethnie Peulh et paludisme.

La première étape a été l'exploration des variants génétiques associés à la protection contre l'infection palustre, tels que le trait drépanocytaire ¹⁰⁴, le déficit en glucose 6 phosphate déshydrogénase, le déficit en pyruvate kinase, d'autres anomalies de l'hémoglobine (hémoglobinoses C) ou groupes sanguins (groupe O).

La mutation de la G6PD ne semble pas plus fréquente chez les Peulhs que chez les Dogon au Mali ^{219,256} voire moins fréquente au Burkina Faso ²⁵⁷; le portage d'HbC est moins fréquent chez les Peulhs que chez les sujets contrôles au Mali ou au Burkina Faso ^{220,257} ou de fréquence égale au Soudan ²²⁵. Les Peulhs sont moins souvent porteurs du trait drépanocytaire ^{225,258} que les sujets d'autres ethnies. La thalassémie ne semble pas non plus sur-représentée ²⁵⁷.

Une étude exploratoire menée au Mali a permis de typer 166 Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) dans une population de Peulhs et de Dogons, et de corrélérer ces SNP à des indices malarométriques : 4 SNP étaient présents à des fréquences différentes selon les ethnies (CD36, IL4, RTN3, ADCY9) ; certains de ces 4 polymorphismes, mais aussi d'autres, étaient associés au portage de parasites, aux épisodes cliniques, au niveau d'anticorps anti *P. falciparum* ²²⁰.

D'autres travaux se sont intéressés à des polymorphismes de gènes de l'immunité chez les Peulhs:

Un polymorphisme sur le gène de l'IL4 (IL4-524T) est associé, chez les Peulhs seulement, à une plus grande production d'anticorps anti CSP et Pf332, mais pas anti RESA ²⁵⁹. Un second polymorphisme de l'IL4 (IL4-590 C/T) était associé à un moindre portage (en fréquence, mais pas en densité) de parasites chez les Peulhs ²²⁴. L'allèle T de ce même polymorphisme était associé à un taux plus élevé d'IgE totales, d'IgE et d'IgG4 anti *P. falciparum* chez les Peulhs ²³⁸.

Le polymorphisme FcγRIIa 131 R/H a été abondamment étudié: sa distribution ne semble pas significativement différente d'une ethnie à l'autre ^{218,237} sauf au Mali ²²¹ et au Soudan ²⁶⁰. Chez les Peulhs, l'allèle H est associé à un taux plus élevé d'IgG2 anti *P. falciparum*, alors que l'allèle R le serait au taux d'IgG3 ²¹⁸. Ce résultat a été confirmé dans un travail mené au Soudan chez les Peulhs ²⁶⁰, où les sujets de cette ethnie présentaient également des taux moindres d'IgG1 et IgG3 anti-*P. falciparum*. L'allèle R est associé, au Burkina Faso, à un taux plus élevé d'anticorps anti-*P. falciparum*, mais sans franche différence inter-ethnique; il n'était par ailleurs pas retrouvé d'influence de l'allèle 131 sur le portage de parasites ²³⁷. Au Mali, l'allèle H était associé, exclusivement chez les Peulhs, à un taux plus élevé d'IgE totales ²²¹.

Trois autres polymorphismes situés sur les récepteurs Fcγ ont été étudiés au Mali : FcγRIIB rs1050519, FcγRIIC rs3933769, et FcγRIIA rs36991. Les polymorphismes des FcγRIIA et C présentaient des fréquences alléliques statistiquement différentes entre ethnies. Cependant, dans la population Peulh, aucun d'entre eux ne présentait d'association significative avec les indices malarométriques cliniques ou immunologiques ²²⁶.

L'interferon regulatory factor-1 (IRF-1) est une protéine dont le polymorphisme a été associé au portage de *P. falciparum* ainsi qu'à la densité parasitaire en cas d'accès aigu, mais de manière identique d'une ethnie à l'autre (Peulh et Mossi) lors d'une étude conduite au Burkina Faso²³².

HENRY Benoît - Thèse de doctorat - 2019

Année	Pays d'étude	N	Age	Saison d'étude	Prévalence de GE positives		Densité parasitaire en GE		Proportion PCR <i>Plasmodium</i> positives		Taux d'hémoglobine		Prévalence splénomégalie		Température		Référence
					GE	p	Densité	p	PCR	p	Taux d'Hb	p	SMG	p	Temp	p	
1996	Burkina Faso	Environ 1900	E/A	les 2	F<R/M	<0,05	F=R=M	NS	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	Modiano PNAS
2004	Burkina Faso	117	E	P	F<M	<0,001	F<M	<0,001	F<M	NS	NF	NF	NF	NF	F<M	<0,01	Paganotti AJTMH
2005	Mali	5814	E/A	P	F<M	<0,001	ND	ND	NF	NF	NF	NF	F>D	0.001	NF	NF	Dolo AJTMH
2005	Mali	83	E/A	fin P	ND	ND	ND	ND	F<D	0.005	NF	NF	F>D	0.008	NF	NF	Farouk Microbes Infect
2006	Burkina Faso	150	E	fin P	F<M	NS	F<M	NS	F>M	NS	NF	NF	NF	NF	F<M	<0,001	Paganotti Parasitology
2007	Mali	426	E/A	P	F<D	NS	F<D	0.06	F<D	0.06	NF	NF	F>D	<0,0001	ND	ND	Vafa Microbes Infect
2008	Mali	328	E/A	P	NF	NF	F=D	NS	F<D	0.008	F<D	<0,0001	F>D	<0,0001	NF	NF	Israelsson Malar J
2008	Burkina Faso	780	E/A	P	F<M	<0,0001	ND	ND	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	Mangano Genes Immun
2009	Mali	185	E/A	P	ND	ND	F<D	NS	F<D	0.003	NF	NF	F>D	<0,0001	NF	NF	Vafa Microbes Infect

HENRY Benoît - Thèse de doctorat - 2019

Année	Pays d'étude	N	Age	Saison d'étude	Prévalence de GE positives		Densité parasitaire en GE		Proportion PCR <i>Plasmodium</i> positives		Taux d'hémoglobine		Prévalence splénomégalie		Température		Référence
					GE	p	Densité	p	PCR	p	Taux d'Hb	p	SMG	p	Temp	p	
2010	Mali	290	E/A	les 2	F<D	NS	F<D	<0,05	NF	NF	F<D	0,005 sympto; 0,17 asympo	F>D	<0,05	F<D	<0,05 (P); NS (S)	McCall J Infect Dis
2011	Mali	77	E	fin P	ND	ND	F=D	NS	NF	NF	D=F	NS	NF	NF	F<D infectés	<0,05	Arama PLoS One
2012	Mali	77	E	fin P	ND	ND	F=D	NS	NF	NF	D=F	NS	NF	NF	F<D infectés	<0,05	Bostrom Malar J
2012	Burkina Faso	217	A	les 2	F<M	0.002	F<M	0.01	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	Cherif Scand J Immunol
2012	Mali	843	E/A	les 2	F=D	NS	ND	ND	NF	NF	F<D (1 fois/2)	<0,05 (1 fois/2)	F>D (2 fois/3)	<0,05	ND	ND	Dolo Bull Soc Path Exo
2012	Mali	165	E/A	fin P	F<D	0.02	ND	ND	NF	NF	NF	NF	F=D	NS	NF	NF	Dolo Bull Soc Path Exo
2012	Burkina Faso	133	A	les 2	F<M	<0,05	F<M	NS	NF	NF	F<M	0,01 (P); NS (S)	NF	NF	ND	ND	Sanou BMC Res Notes
2012	Mali	50	A	P	F<D	0.196	F<D	0.766	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	Portugal Malar J

HENRY Benoît - Thèse de doctorat - 2019

Année	Pays d'étude	N	Age	Saison d'étude	Prévalence de GE positives		Densité parasitaire en GE		Proportion PCR <i>Plasmodium</i> +		Taux d'hémoglobine		Prévalence splénomégalie		Température		Référence
					GE	p	Densité	p	PCR	p	Taux d'Hb	p	SMG	p	Temp	p	
2013	Mali	939	E/A	les 2	F<D	0.06	F<D	0.02	NF	NF	NF	NF	F>D	<0,0000 01	NF	NF	Maiga PLoS One
2014	Mali	712	E/A	les 2	F<D	0.03	ND	ND	NF	NF	NF	NF	F>D	<0,0000 01	NF	NF	Maiga Malar J
2014	Mali	939	E/A	les 2	F<D	0.06	F<D	0.02	NF	NF	NF	NF	F>D	<0,0000 01	F<D	0.03	Maiga Scand J Immunol
2014	Mali	104	E/A	P	D<F<M	NS voire inversé	ND	ND	NF	NF	NF	NF	D<F<M	NS voire inversé	ND	ND	Dolo Bull Soc Path Exo
2015	Mali	46	A	NA	F<D	0.1	F<D	0.59	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	Arama Open Forum Infect Dis
2016	Burkina Faso	242	E	les 2	ND	ND	F<D	<0.00 01	NF	NF	F<D	0.02	F>D	<0.0001	F<D	<0.000 1	Cherif Malar J
2017	Burkina Faso	56	A	fin P	ND	ND	F=M	NS	F<M	0.038 8	F=M	NS	NF	NF	F=M	NS	Quin eLife
2017	Mali	168	E/A	P	NF	NF	NF	NF	F<D	NS	NF	NF	NF	NF	NF	NF	Traore PLoS One
2018	Soudan	248	E	les 2	ND	ND	F<Ma	0.02	NF	NF	NF	NF	F>Ma	0.01	NF	NF	Nasr Acta Trop

Tableau 4 : Résumé des principales caractéristiques des études décrivant le phénotype clinico-biologique des sujets Peulh exposés à P. falciparum. N, nombre de sujets inclus ; E, enfants ; A, adultes ; GE, goutte épaisse ; PCR, Polymerase Chain Reaction ; SMG, splénomégalie ; S, saison sèche ; P, saison des pluies ; NF, non fait ; ND, donnée non disponible ; NS, non significatif ; F, ethnie Fulani (Peulh) ; D, ethnie Dogon ; M, ethnie Mossi ; R, ethnie Rimaibe.

Au total, la question du substratum génétique du «phénotype palustre Peulh» reste incomplètement élucidée. L'élément le plus fort semble l'absence de sur-représentation des polymorphismes génétiques classiquement associés à la résistance contre l'infection par *Plasmodium falciparum*, au premier rang desquels le trait drépanocytaire. Les travaux sur les polymorphismes de l'IL4 et du récepteur au Fc des immunoglobulines donnent des résultats variables, et n'expliquent que partiellement le phénotype. Il n'existe pas, dans le domaine de l'exploration de la susceptibilité ethnique au paludisme, d'étude d'association génome entier. Une telle étude permettrait potentiellement de faire de substantiels progrès dans la compréhension des mécanismes sous-tendant le «phénotype palustre des sujets Peulhs».

De nombreux facteurs non biologiques pourraient également influencer le « phénotype palustre » d'une population : degré d'exposition aux piqûres d'anophèle et compliance vis-à-vis des mesures préventives usuelles, niveau d'accès au système de soins...Ces éléments n'ont jusqu'ici pas fait l'objet de comparaisons inter ethniques détaillées.

IV. Physiologie splénique et paludisme à *P. falciparum*

A. Structure anatomique et histologique de la rate

1. Anatomie

La rate est un organe plein, impair, abdominal et rétro-péritonéal. Sa forme est tétraédrique et ses faces sont marquées par les empreintes des organes avoisinants (estomac, diaphragme, côlon). Ses dimensions chez l'adulte atteignent en moyenne 10 à 12 cm de long, 6 à 8 cm de large et 3 à 4 cm d'épaisseur ²⁶¹. Son poids est de 100 à 200 g environ chez l'adulte, et le rapport poids splénique rapporté au poids corporel reste relativement constant au cours de la vie, autour d'1/320 à 1/400 ²⁶². La rate est perfusée par l'artère splénique, branche du tronc coeliaque qui chemine le long du corps et de la queue du pancréas avant de perfuser la rate au niveau du hile splénique. Le sang veineux splénique est drainé par la veine splénique, qui rejoint ensuite le système porte après sa confluence avec la veine mésentérique inférieure (figure 15).

La partie périphérique de la rate est formée par la capsule, structure fibreuse et peu extensible. Macroscopiquement, le parenchyme splénique est rouge, très vascularisé, et spongieux.

Certains individus possèdent une ou des rates accessoires. Ces îlots de parenchyme splénique, de petite taille (une cerise environ) et séparés de la rate proprement dite ne sont pas rares (fréquence estimée 10 à 30% de la population générale), et sont en général situés à proximité de la rate (le hile dans 75% des cas), mais peuvent être rencontrés à tout endroit de l'abdomen. Ils sont uniques dans 90% des cas. Ceci ne doit pas être confondu avec la polysplénie, qui correspond à l'existence de multiples rates de structure similaire chez un même sujet, en général dans un contexte d'hétérotaxie ²⁶³.

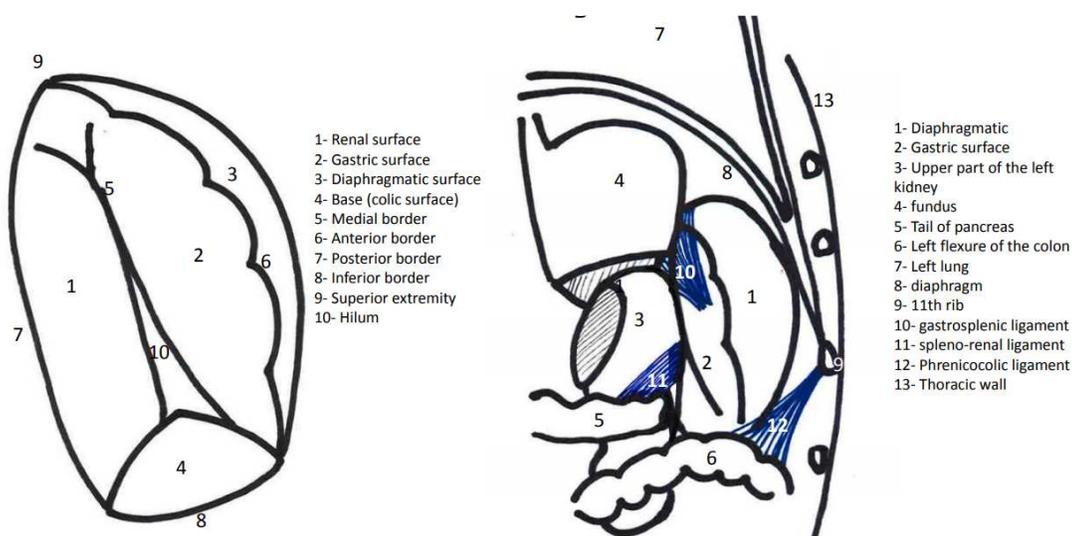


Figure 15 : Macro anatomie de la rate humaine et rapports anatomiques. D'après Roussel C et al. *The Spleen* ; in ²⁶⁴.

Certaines espèces animales, telles que le chien ²⁶⁵, le cheval ou certains cétacés ²⁶⁶, possèdent une rate contractile capable de stocker un volume important d'hématies (rates de stockage ou « storage spleens »); ceci leur permet, en cas d'effort physique important et brutal, ou de plongée en apnée d'augmenter leur hématoците et en conséquence leur performance aérobie. La présence d'une telle fonction chez l'être humain est sujette à débat : des travaux menés chez des pêcheurs sous-marins en Corée ²⁶⁷, puis chez des spécialistes de la plongée en apnée, ont mis en évidence un volume splénique moyen plus élevé que chez des sujets contrôles et suggéré une fonction contractile chez l'homme, sans preuve directe cependant qu'une authentique contractilité splénique opérait ^{268,269}.

2. Histologie

En sus de la capsule, des travées conjonctives et des vaisseaux intra-spléniques, le parenchyme splénique proprement dit comporte deux types de structure, la pulpe blanche et la pulpe rouge ; ces deux pulpes sont nommées ainsi en raison de leur aspect macroscopique, la pulpe blanche apparaissant sous formes de nodules blanchâtres d'un demi à 2 mm de diamètre au sein d'un parenchyme de couleur rouge (figures 16 et 17).

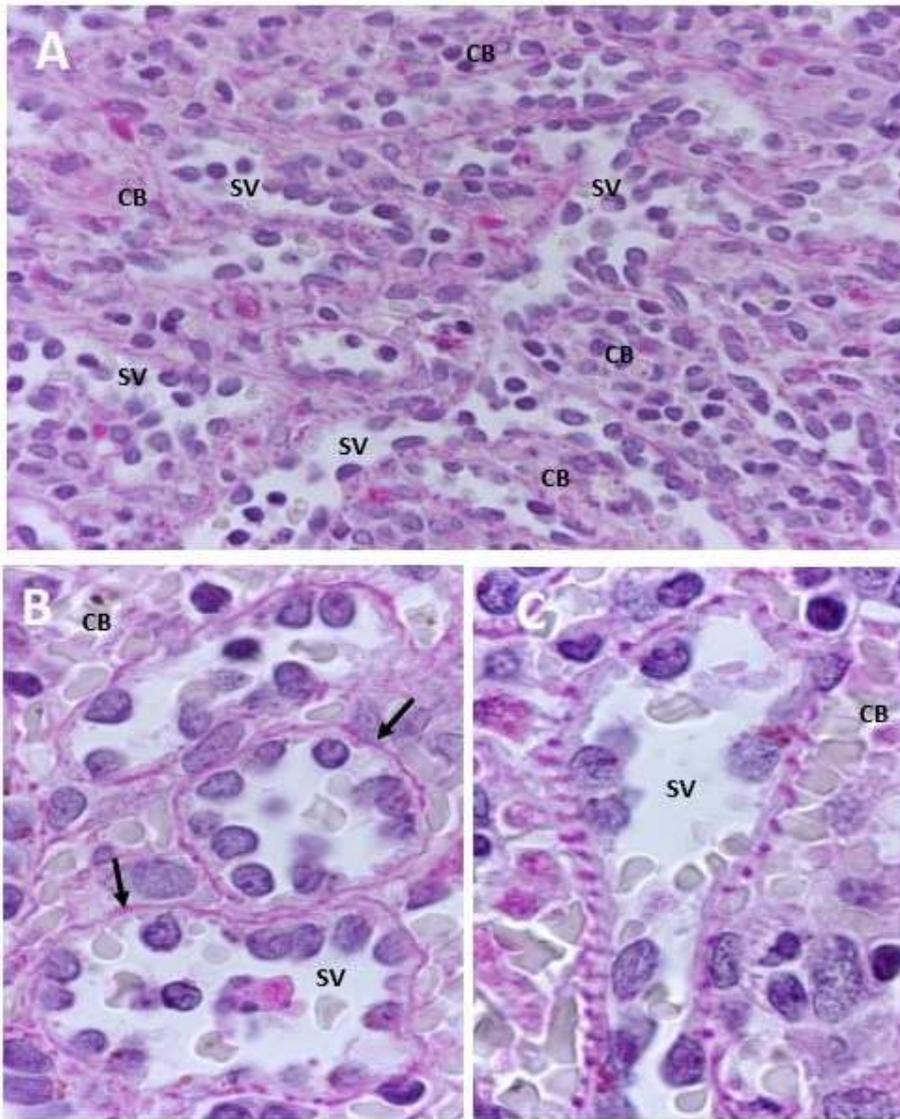


Figure 17 : Aspect histologique de la pulpe rouge de la rate humaine après coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS) qui souligne les fibres discontinues autour de la paroi sinusale. A, grossissement x 200 ; B et C, grossissement x 400. SV : sinus veineux ; CB : cordon de Billroth ; les flèches indiquent la position de la membrane basale D'après Roussel et al. in ²⁶⁴.

a. La pulpe blanche

La pulpe blanche, constituant majeur du tissu lymphoïde secondaire chez l'homme, correspond à des amas de cellules lymphoïdes groupées en structures formant des manchons péri-vasculaires (*periarterial lymphoid sheath, PALS*) et des amas de forme nodulaire nommés *follicules lymphoïdes*, eux-mêmes entourés par les zones marginale et périfolliculaire (Figure 15).

Les *manchons péri-vasculaires* sont composés principalement de lymphocytes T (cellules T CD4 auxiliaires « helper » plus souvent que cellules T CD8), de cellules dendritiques, soutenus par une

trame conjonctive lâche comportant des myofibroblastes. Les follicules lymphoïdes sont composés de lymphocytes B, et sont parfois siège de la formation de centres germinatifs. Les différentes sous-populations lymphocytaires sont recrutées dans ces zones spécifiques via un réseau finement régulé de production de chémokines (CXCL13 pour les lymphocytes B, CCL19 et CCL21 pour les cellules T notamment)²⁷⁰.

Les *follicules lymphoïdes* peuvent prendre deux formes selon leur niveau d'activité : les follicules primaires, non stimulés par l'antigène, se présentent sous la forme d'amas relativement homogènes de cellules B. Les follicules secondaires naissent après rencontre avec l'antigène, capturé par les cellules dendritiques folliculaires. La réaction du centre germinatif, qui permet, via les phénomènes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique, la production de cellules B mémoires spécifiques de l'antigène, se met en place. Architecturalement, les follicules lymphoïdes secondaires comportent une zone sombre, une zone claire et la zone du manteau. La zone sombre est faite de cellules B densément regroupées, en train de subir l'hypermutation somatique, nommées centroblastes. La zone claire comporte des cellules B nommées centrocytes, moins densément organisées, en étroite relation avec des cellules dendritiques folliculaires. Enfin, la zone du manteau, qui entoure les deux précédentes, est constituée de cellules B naïves, n'ayant pas rencontré l'antigène et se retrouvant « repoussées » en périphérie²⁷¹.

La *zone marginale* (figure 18) est séparée du reste de la pulpe blanche par le sinus marginal, bien défini et facilement observable chez la souris mais pas chez l'homme, et est composée de fibroblastes, de cellules dendritiques, de lymphocytes (notamment d'une population particulière, les lymphocytes B de la zone marginale), et de 2 types de macrophages : les macrophages métallophiles (observés seulement chez la souris) de la zone marginale et les macrophages de la zone marginale proprement dits. Des travaux menés chez la souris ont montré que ces 2 types cellulaires ont un rôle important dans la phagocytose de certains microorganismes susceptibles de circuler (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*...) ²⁷². Par la suite, ces mêmes cellules pourront présenter efficacement l'antigène aux cellules T après migration dans les zones T de la pulpe blanche. L'existence d'une zone marginale stricto sensu chez l'être humain fait l'objet de débats, et cette dénomination a été remplacée par certains experts par celle de zone périfolliculaire (peri follicular zone ; PFZ) voire de « superficial zone » ²⁷³.

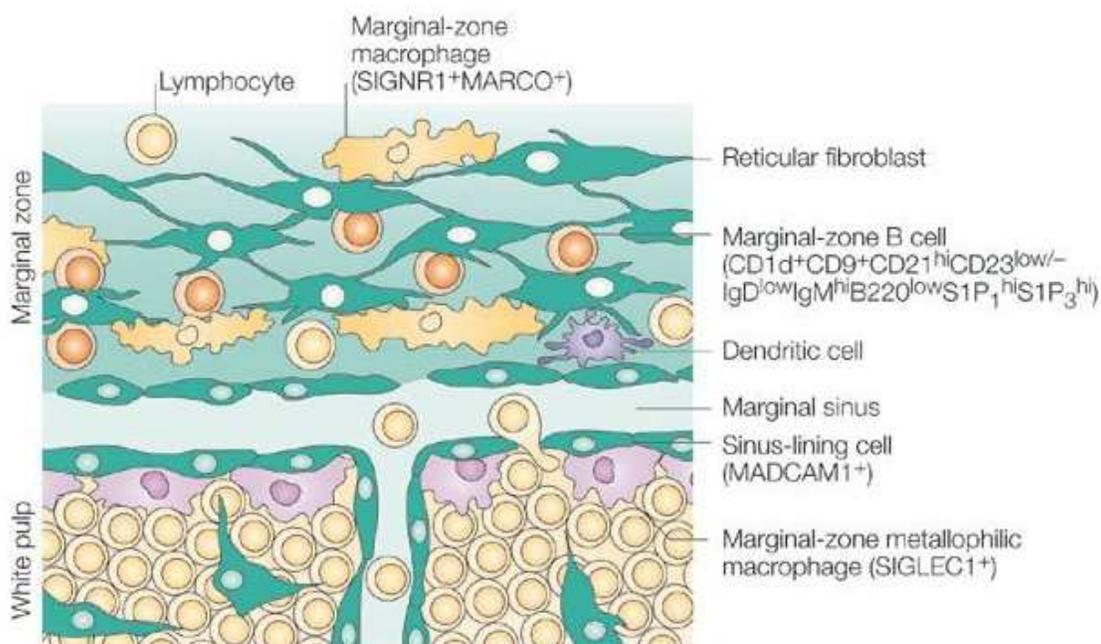


Figure 18 : Représentation, chez la souris, du sinus marginal et de la zone marginale (partie supérieure) entourant la pulpe blanche splénique (partie inférieure). Les principales populations cellulaires de la zone marginale (lymphocytes, macrophages de la zone marginale, cellules B de la zone marginale) sont indiquées. D'après ²⁷⁰.

b. La pulpe rouge

La pulpe rouge, qui représente trois quarts du volume splénique, est formée des cordons (dits de Billroth) et des sinus veineux (figure 19).

Les cordons sont des structures circulatoires « ouvertes » (c'est-à-dire non endothélialisées), uniques dans l'organisme, composées de fibroblastes et, pour moitié, de nombreux macrophages (appelés macrophages de la pulpe rouge ou Red Pulp Macrophages (RPM)) formant un maillage complexe et lâche. Quelques plasmocytes, cellules B en différenciation terminale vers la production d'anticorps, y résident également.

Les sinus veineux sont les structures par lesquelles se draine le sang provenant des cordons, et sont séparées de ces derniers par un endothélium discontinu, comportant des fentes inter endothéliales. Les cellules endothéliales des sinus veineux ont une forme allongée, sont attachées entre elles, mais seulement par endroits, par des jonctions serrées, et reposent sur une fibre basale hélicoïdale formant un maillage largement perméable. La paroi des sinus ménage entre les cellules endothéliales des espaces allongés, de 0.2 à 2 microns, nommés fentes inter endothéliales. C'est à travers ces fentes que les globules rouges doivent passer pour rejoindre la lumière du sinus veineux puis la veine splénique.

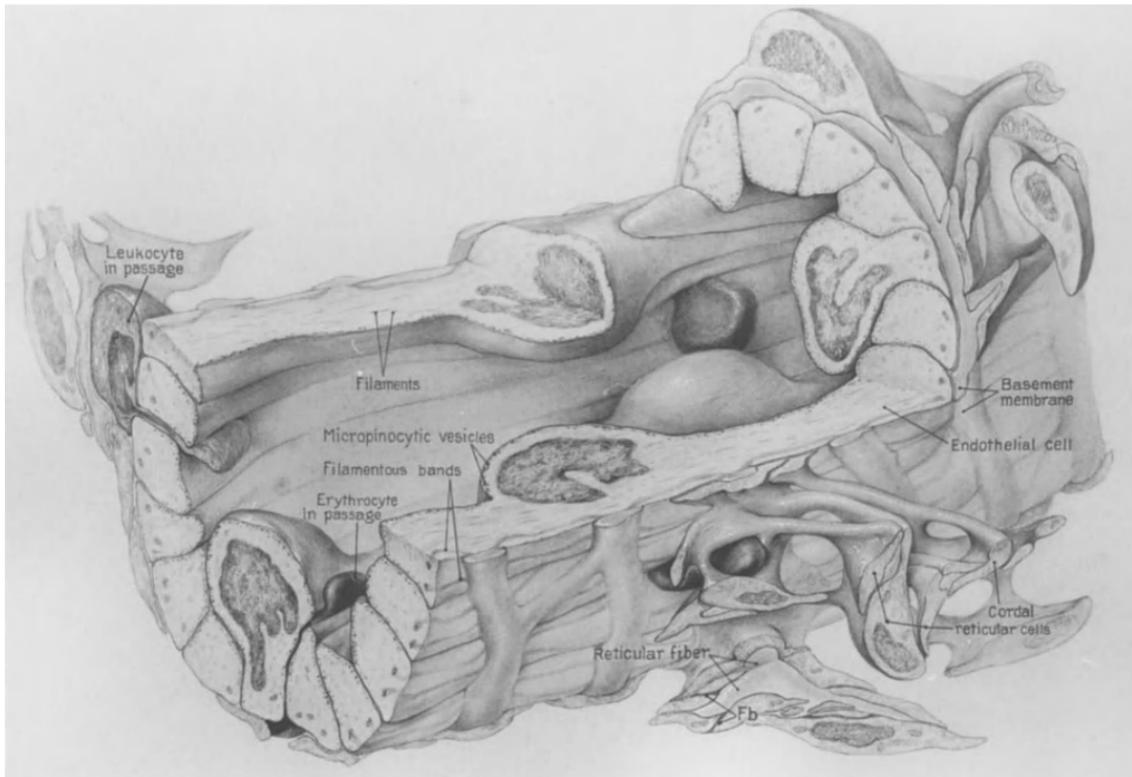


Figure 19 : Représentation tri dimensionnelle de la structure d'un sinus veineux de la pulpe rouge splénique en coupe à la fois longitudinale et transversale, vu de l'extérieur, c'est-à-dire depuis un cordon de Billroth ; le franchissement d'une fente inter endothéliale par un leucocyte (à gauche) et un globule rouge (à droite) sont représentées; d'après Chen et Weiss (1972) in ²⁷⁴.

c. La capsule splénique

Celle-ci est formée de tissu conjonctif fibro-élastique de 0.3 à 1.5 mm d'épaisseur et de couleur grise. En sus des fibres collagènes et élastiques, les cellules le composant sont des fibroblastes, et de très rares cellules musculaires lisses. De ce fait, la rate humaine est généralement considérée comme non contractile, au contraire de certaines espèces animales (chien, cheval...) qui peuvent utiliser la rate comme réservoir de globules rouges lors de l'effort ou du stress. La rate humaine semble toutefois réduire son contenu en globules rouges lors de l'effort intense ²⁷⁵. La capsule est recouverte d'une couche de cellules mésothéliales. De cette capsule partent vers la profondeur du parenchyme des travées du même tissu, qui délimitent des compartiments lobulaires et contiennent les gros vaisseaux intra spléniques (artères et veines de moyen calibre).

3. Principales populations cellulaires spécifiquement spléniques

a. Macrophages de la pulpe rouge (Red Pulp Macrophages : RPM)

Ces macrophages représentent la population cellulaire splénique la plus abondante. Leur développement est dépendant du facteur de transcription Spi-C (codé par le gène *Spic*), lui-même induit par la présence d'hème après dégradation de l'hémoglobine²⁷⁶. Les autres facteurs promouvant leur prolifération sont l'hème oxygénase 1, le Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)²⁷⁷. Ils sont caractérisés par une forte expression du CD163 (récepteur Scavenger ou « éboueur » jouant un rôle important dans la phagocytose des complexes hémoglobine-haptoglobine) et de Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1). Les RPM expriment les récepteurs au fragment constant (Fc) des Immunoglobulines de manière spécifique : FcγRIIIa (CD32a), FcγRIIIa (CD16), et FcγRI (CD64) de manière inductible²⁷⁸.

En étant en étroit contact avec les globules rouges qui passent à travers la pulpe rouge splénique et sa circulation à bas débit, les RPM éliminent les globules rouges vieillissants, par érythrophagocytose initiée via des altérations de surface des globules rouges : regroupement (« clustering ») de la protéine Band 3, exposition de phosphatidyl-sérine au feuillet externe de la membrane cytoplasmique, perte du CD47 et de l'acide sialique. Les RPM surexpriment plusieurs molécules impliquées dans l'érythrophagocytose (CD163, ferroportine, hème oxygénase)²⁷⁹.

Un second rôle des RPM est la production d'interféron via des molécules de type Interferon Responding Factor (IRF), pouvant jouer un rôle dans la défense innée anti-*Plasmodium*. Des données issues d'un modèle murin d'infection par *P. chabaudi* suggèrent que les RPM sont la principale source d'interféron gamma en réponse à l'infection plasmodiale²⁸⁰. Enfin, les RPM pourraient induire une différenciation des cellules T CD4 naïves vers un phénotype T régulateur via la production de Transforming Growth Factor β (TGF β).

Il est d'usage de considérer les macrophages métallophiles de la ZM et les macrophages de la ZM (décrits ci-dessous) comme des sentinelles immunologiques et des initiateurs de la réponse immune vis-à-vis des microorganismes circulants, en raison de leur situation micro anatomique, et *a contrario* de considérer les RPM comme opérateurs centraux du métabolisme du fer et de l'érythrophagocytose. La particularité du paludisme étant d'être une infection intra-érythrocytaire exclusive (hors cycle hépatique), la cellule phagocytaire splénique en première ligne dans la défense anti paludique est le RPM.

Des données expérimentales récentes suggèrent que le pool de macrophages résidant dans certains tissus, tels que les RPM dans la rate, est maintenu plus par auto-renouvellement que par afflux de monocytes circulants²⁸¹.

b. Macrophages métallophiles de la zone marginale

Ces cellules ont été décrites chez la souris, et n'existent probablement pas chez l'être humain.

Leur organisation est particulière, ces cellules formant une mono couche quasi continue à la frontière entre pulpe blanche et sinus marginal (Figure 18). Leur développement est hautement dépendant du récepteur nucléaire LXRα²⁸². Ces cellules expriment le CD169, la sialoadhésine (SIGLEC1), jouent un rôle dans la phagocytose des microorganismes circulants (à titre d'exemple, CD169 peut se lier au méningocoque ou à *Trypanosoma cruzi*), coopèrent avec les follicules B tout proches mais également

avec les cellules dendritiques pour activer les cellules T CD8²⁸³. Elles ont un possible rôle dans la défense anti virale via la production d'interférons alpha et beta. Dans un modèle murin d'infection par *P. chabaudi*, ces cellules disparaissent de la rate des animaux 8 jours après infection, via un mécanisme qui semble mettre en jeu les lymphocytes T CD8²⁸⁴.

c. Macrophages de la zone marginale

Ces cellules ont elles aussi été essentiellement décrites chez la souris. Elles expriment SIGN-R1, un homologue murin de DC-SIGN, et le récepteur de type scavenger MARCO (Macrophage Receptor with Collagenous Structure). Ces macrophages sont très impliqués dans la phagocytose de microorganismes circulants (pneumocoque par exemple) et fonctionnent en coopération étroite avec les cellules B de la zone marginale.

d. Macrophages de la pulpe blanche (« Tingible body macrophages »)

Ceux-ci, relativement peu connus, et situés à proximité des cellules dendritiques folliculaires, sont impliqués dans la phagocytose des cellules B apoptotiques au cours de la réaction du centre germinatif²⁸⁵.

	de la pulpe rouge	métallophiliques de la ZM	de la ZM	de la pulpe blanche
Localisation anatomique	Pulpe rouge	Versant externe du sinus marginal	Versant interne du sinus marginal	Centre germinatif
Espèces	H/M	M	M	H/M
Facteur de croissance	Spi-C; M-CSF; HO-1; IRF8 et 4	LXR α		?
Marqueurs de surface	CD163; VCAM1; CD16; CD32a; CD64; F4/80; CD11b faible; SIRP α ; CD68; alpha 9 intégrine	CD169 (SIGLEC1); MOMA1; F4/80; lymphotoxine; R du TNF	SIGN-R1, MARCO, F4/80; lymphotoxine; R du TNF	CD68; MFGE8
Molécules produites	Ferroportine; HO1; NRAMP; Lipocaline-2	Interférons α et β		
Fonctions	Erythrophagocytose, homéostasie du Fer, défense anti <i>Plasmodium</i> (IFN); induction de cellules T régulatrices	Phagocytose des microorganismes circulants; activation indirecte des cellules T CD8	Phagocytose des microorganismes circulants; réponse B thymo indépendante	Phagocytose des cellules B apoptotiques

Tableau 5 : Récapitulatif des principales caractéristiques des différentes populations de macrophages spléniques. ZM : zone marginale ; H : humain ; M : murin.

e. Lymphocytes B de la zone marginale

Ces cellules B résident au niveau de la zone marginale splénique, ou de son équivalent humain ; des cellules similaires sont retrouvées au niveau des plaques de Peyer intestinales, des amygdales, et dans les ganglions lymphatiques murins et humains.

Elles sont capables chez l'humain de recirculer ²⁸⁶, de migrer vers la pulpe blanche pour devenir des plasmablastes ou activer les cellules T ²⁸⁷. Phénotypiquement, ces cellules sont IgM^{high}, IgD^{low}, CD21+, CD23-, CD1c+, CD5-, CD9-, CD10-, CD23-. Leur fonction est très importante dans la réponse anticorps précoce, T indépendante, notamment dirigée contre les antigènes polysaccharidiques présents à la surface de certaines bactéries (une réponse T dépendante est aussi possible). Leur récepteur B présente un état de pré diversification par réarrangements des gènes VDJ des immunoglobulines (mais cette diversité est moindre que celle exprimée par une cellule B mémoire) et est muté de manière indépendante de l'antigène et de la réaction du centre germinatif. Ces cellules sont capables de produire des anticorps de faible affinité, de manière rapide, sans réaction du centre germinatif. Ces anticorps sont le plus souvent des IgM, mais une commutation de classe est possible (via une coopération avec des neutrophiles particuliers, les « B cell helper neutrophils ») permettant la production d'IgA ou IgG.

Il s'agit donc de lymphocytes B « innés », positionnés à l'interface avec le milieu extérieur (amygdales, plaques de Peyer...) ou avec le compartiment circulant, qui permettent une première réponse anticorps rapide contre les antigènes circulants, avant la mise en place d'une réponse plus spécifique. Une partie de leur répertoire est auto-réactif. Elles sont assez dépendantes des signaux induits par les Toll-like Receptors (TLR) pour leur développement ²⁸⁸.

Dans le paludisme humain, ces cellules ont jusqu'ici été très peu étudiées. Un travail récent mené sur des sujets Espagnols (non exposés) et des femmes enceintes de Papouasie exposées au parasite a récemment mis en évidence une diminution, en proportion, de l'équivalent circulant des cellules B de la zone marginale chez les sujets exposés ²⁸⁹.

f. Cellules endothéliales des sinus veineux

Ces sinus veineux définissent le caractère sinusal de la rate humaine. Les cellules endothéliales qui le composent reposent sur une membrane basale filamenteuse hélicoïdale donc très discontinue. Les sinus sont donc entourés par ces fibres annulaires, orthogonales au grand axe du sinus, appelées aussi fibres intermédiaires et composées notamment de laminine et de collagène de type IV (Figures 17 et 19). Les cellules endothéliales allongées laissent entre elles des espaces de l'ordre du micron, nommés fentes inter-endothéliales. Des fibres comportant des éléments contractiles (actine & myosine) occupent la partie basale du cytoplasme de ces cellules et sont parallèles à leur grand axe. Le caractère contractile des fibres basales a été montré, laissant penser que la taille des IES est modulable, même si ceci est extrêmement difficile à prouver *in vivo*.

3. Différences entre rate humaine et rate murine

Deux différences importantes existent entre les rates humaine et murine : l'existence d'une érythropoïèse intra splénique murine absente chez l'être humain (à l'exception d'une courte période fœtale), et l'absence de sinus dans la rate de la souris. Des orifices veinulaires dans la rate murine sollicitent toutefois la biomécanique érythrocytaire comme le font les fentes inter-endothéliales de la rate humaine. La pertinence du modèle murin pour l'exploration des mécanismes de filtration érythrocytaire fait l'objet de débats ²⁷³.

B. Physiologie de la circulation sanguine intra splénique

Elle a été étudiée, d'abord chez l'animal, puis chez l'être humain, via l'examen de sous populations cellulaires dans l'artère et la veine spléniques au cours de perfusions *ex vivo*, ainsi que par moulage du compartiment circulatoire, et par histologie post-perfusion *ex vivo* ²⁷⁴.

Le flux sanguin entrant dans la rate (environ 5% du débit cardiaque) est séparé en deux types de circulation ^{90,274} (figure 20).

La circulation rapide, reçoit environ 85% du débit sanguin splénique. Elle ressemble à une microcirculation conventionnelle, à débit relativement élevé, dans des artérioles puis des capillaires endothélialisés se drainant dans le réseau veineux. Cette circulation « fermée et rapide » perfuse la zone périfolliculaire et, indirectement, la pulpe blanche. Les cellules sanguines entrent dans la pulpe blanche via la zone marginale, qui est donc un lieu privilégié de la réaction immune contre les microorganismes circulants. La morphologie microcirculatoire périfolliculaire est originale car constituée d'espaces aplatis moulés sur le follicule lymphoïde.

La circulation lente reçoit environ 15% du débit sanguin splénique, perfuse la pulpe rouge au sein de laquelle les cordons de Billroth constituent un espace microcirculatoire non endothélialisé. Pour rejoindre la circulation générale à haut débit, les globules rouges doivent passer à travers les fentes inter endothéliales, espaces mesurant environ 1 micron de large. Cette circulation lente est unique dans l'organisme.

Il est possible que ces proportions de distribution du flux sanguin entre ces deux circulations puissent varier selon l'abondance relative de facteurs vasoconstricteurs ou vasodilatateurs. Ceci n'a pu être étudié chez l'homme de manière fiable.

Le sang des sinus veineux rejoint la circulation systémique après passage par les veines pulpaire puis trabéculaires.

Les différents composants du sang (éléments figurés et plasma) se distribuent par ailleurs de manière inhomogène dans la circulation splénique : le plasma est préférentiellement dirigé vers la zone marginale (phénomène de « *skimming* »), les leucocytes vers la pulpe blanche et la zone marginale, les globules rouges et les plaquettes vers la pulpe rouge ²⁷⁴, ce qui explique l'hématocrite très élevé (70%

environ) qui règne dans la pulpe rouge. Par ailleurs, la rate contient en permanence environ un tiers des plaquettes de l'organisme.

Il faut également noter que la rate est dépourvue de vaisseaux lymphatiques afférents propres.

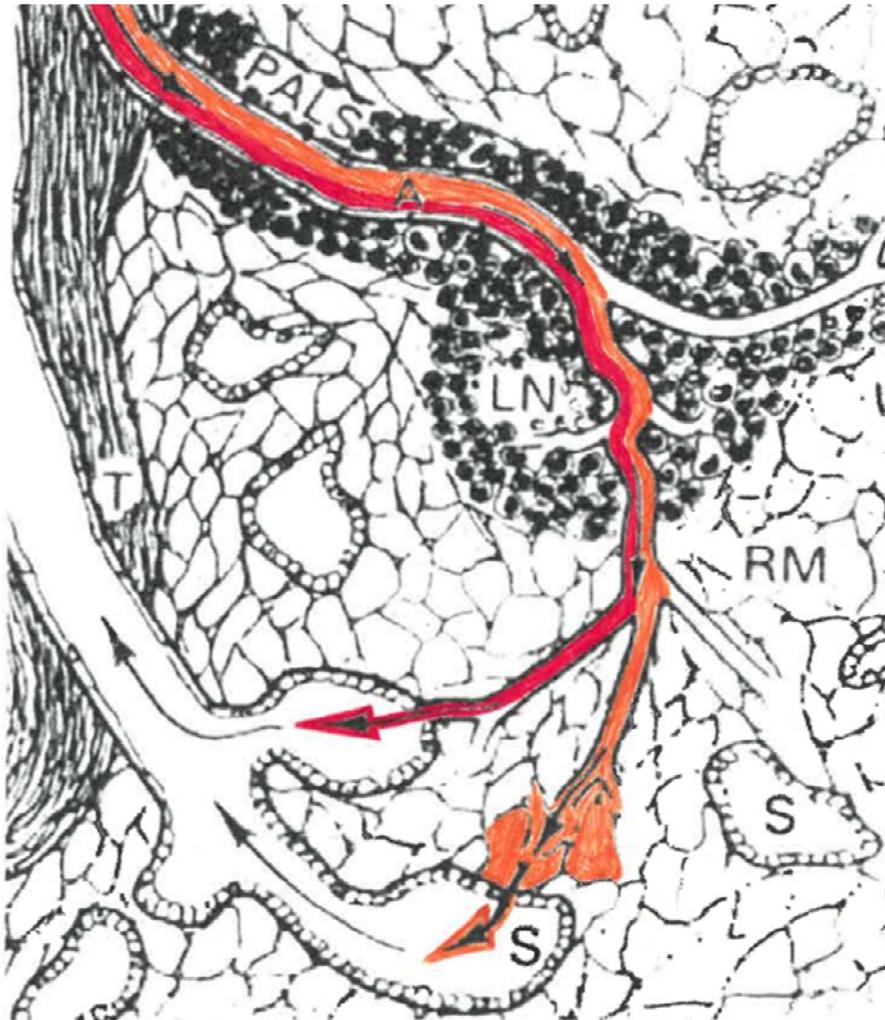


Figure 20 : Représentation de la double circulation sanguine intra splénique. En rouge est figurée la circulation rapide, majoritaire, et en orange, la circulation lente qui utilise les cordons de Billroth. PALS : manchon lymphatique péri vasculaire ; LN : nodule lymphoïde ; RM : réseau réticulaire des cordons de Billroth ; S : sinus veineux. D'après ²⁷⁴, modifié.

C. Rôles physiologiques & pathologiques de la rate

1. Initiation de la réponse immune

La pulpe blanche contient une biomasse importante de cellules immunitaires, et est à ce titre un site privilégié de la mise en place de la réponse immunitaire innée puis adaptative déclenchée à la présence d'antigènes microbiens circulants.

La majorité du flux sanguin intra-splénique passe par la zone marginale, qui représente donc une zone « sentinelle » privilégiée du compartiment circulant, grâce à l'abondance de cellules de l'immunité innée qui y résident (macrophages, cellules B de la zone marginale). De nombreux travaux ont mis en évidence l'implication des macrophages de la zone marginale dans la phagocytose de microorganismes amenés à circuler (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*...).

La zone marginale contient aussi des cellules dendritiques. Ces cellules peuvent migrer vers la pulpe blanche pour présenter un antigène circulant, et ainsi initier une réponse adaptative spécifique.

2. Transition réponse immune innée/adaptative

Après prise en charge de microorganismes circulants par les macrophages et les cellules dendritiques, ces cellules sont capables de migrer vers la pulpe blanche de la rate pour initier la réponse cellulaire et humorale spécifique. Les cellules B de la zone marginale sont ici d'une particulière importance, car capables de produire très rapidement une première « vague » d'anticorps peu affins, avant la mise en place d'une réponse plus spécifique.

La réponse immune adaptative humorale se met en place majoritairement dans la rate, au sein des follicules lymphoïdes B au sein desquels se déclenche la réaction du centre germinatif.

3. Filtration des globules rouges

Une fonction majeure de la pulpe rouge est le contrôle de la qualité des globules rouges circulants: ceux-ci, en passant dans les cordons de Billroth, doivent pour rejoindre la circulation générale, se déformer suffisamment pour passer à travers les fentes inter endothéliales. Les globules rouges vieillissants perdant progressivement leur déformabilité, resteraient bloqués dans les cordons de Billroth, ne pouvant regagner la lumière des sinus veineux et seraient phagocytés par les RPM. Ce processus est bien établi pour les globules rouges pathologiques tels que les sphérocytes, les globules rouges opsonisés par des auto anticorps, ou les globules rouges infectées par *Plasmodium*. Ainsi, environ 2×10^{11} globules rouges sont détruits par jour possiblement dans la pulpe rouge splénique.

4. Expulsion des corps intra érythrocytaires : le pitting

Le « pitting », traduit par « épépinage » en français, correspond à la faculté qu'a la rate d'éliminer des corps anormaux intra-érythrocytaires ²⁹⁰, tels que des reliquats de protéines et d'acides nucléiques originaires de l'érythropoïèse (corps de Howell-Jolly), ou des produits de dégradation de l'hémoglobine (corps de Heinz), ou encore des agrégats de fer possiblement associés à des reliquats de mitochondrie (corps de Pappenheimer ²⁹¹) et ce sans détruire l'hématie elle-même, qui est remise en circulation. La présence de globules rouges contenant des corps de Howell-Jolly en circulation après splénectomie s'explique par le défaut de cette fonction d'épépinage.

Plasmodium jouant le rôle d'un corps étranger intra splénique, le pitting s'applique aussi aux globules rouges contenant des résidus de formes jeunes de *P. falciparum* ^{292,293}, les formes matures étant probablement responsables de modification trop importantes pour que le pitting puisse avoir lieu. Ce pitting ne concerne qu'une petite minorité de globules rouges parasités avant traitement ²⁹⁴⁻²⁹⁷ mais est nettement majoré par les traitements à base de dérivés de l'artémisinine. La situation est différente lorsque l'on étudie des populations prémunies chez qui la clairance post-thérapeutique semble liée à l'immunité adaptative et survenir très rapidement, avant même que le pitting ait lieu.

Même si les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant le phénomène de pitting restent incomplètement compris, il est généralement admis que ce processus a lieu lorsque l'hématie se déforme pour passer les fentes inter endothéliales de la pulpe rouge. Les corps solides intra-érythrocytaires ne passent pas la fente inter endothéliale et restent donc dans les cordons. Ceci a pu être confirmé lors de perfusions *ex vivo* de rates humaines ²⁹⁸ et de l'observation d'une rate chez un patient décédé en début de traitement par artésunate ⁹⁰. L'intervention des macrophages de la pulpe rouge ne peut toutefois être exclue.

5. Métabolisme du fer

La majorité du fer contenu dans l'organisme humain se situe dans les globules rouges. La phagocytose des globules rouges dans la pulpe rouge (par les RPM) dégrade l'hémoglobine : la globine est soumise à une protéolyse et l'hème se transforme en biliverdine, monoxyde de carbone et fer (Fe^{2+}). Le fer est pris en charge par la protéine Divalent Metal Transporter 1 (DMT1), et soit stocké en association à la ferritine dans le cytosol, soit exporté pour faire face aux besoins de l'organisme, via la ferroportine, puis transporté associé à la transferrine ²⁹⁹.

La prise en charge du fer par les macrophages spléniques joue également un rôle dans la défense innée contre un certain nombre de microorganismes, notamment des bactéries qui ont besoin du fer pour leur croissance. Les RPM expriment la protéine NRAMP1 (natural resistance associated macrophage protein-1), qui est capable d'expulser le fer des phagolysosomes, en privant ainsi les microorganismes.

La production d'IFN γ augmente la production de NRAMP1. Par ailleurs, les RPM sont capables de produire de la lipocaline 2, qui se complexe avec les sidérophores, protéines bactériennes qui captent le fer, limitant ainsi également leur accès au fer ²⁷⁶.

6. La rate : sentinelle de l'immunité anti tumorale ?

Une étude réalisée aux Etats-Unis sur 8149 patients splénectomisés et pris en charge par le système de santé des vétérans entre 1969 et 1996 a révélé une augmentation significative du risque de cancer solide (risque relatif (RR) global : 1.51 (1.42-1.6)), notamment ORL, oesophagien, hépatique, colique, pancréatique, pulmonaire, prostatique), ainsi que d'hémopathie maligne (lymphomes hodgkiniens ou non, myélomes, leucémies aiguës et chroniques) avec un risque relatif global allant d'1.8 à 6. Le risque de décès par cancer était significativement augmenté (RR = 1.53). Ce risque était maximal dans les 2 ans et demi post splénectomie mais persistait jusqu'à 25 ans après ³⁰⁰. Il est cependant à noter que d'autres études épidémiologiques conduites (sur des effectifs moindres) dans des populations de splénectomisés, ne retrouvaient pas de majoration du risque tumoral (³⁰¹ ; n=1295) et ³⁰² ; n=740). Les mécanismes en jeu restent incomplètement élucidés, mais le rôle de sentinelle immunologique que joue la rate pourrait s'appliquer à l'immunité anti tumorale.

D. Paludisme chez les sujets hypo ou aspléniques

1. Sur-incidence probable des formes graves chez les sujets hypo-spléniques non immuns

La littérature relative à la présentation du paludisme chez les patients splénectomisés est assez peu abondante. Nous avons recensé 103 cas publiés entre 1931 et 2018 : 68 dus à *P. falciparum* (30 cas isolés ou courtes séries, 38 issus du suivi de 2 cohortes de patients splénectomisés et vivant en zone endémique), 26 dus à *P. vivax* (5 cas isolés et 21 issus du suivi d'une cohorte de patients splénectomisés et vivant en zone endémique), 3 à *P. malariae*, 6 à *P. knowlesi*. Seules deux séries de patients splénectomisés, vivant en zone endémique et évalués quant au risque de paludisme ont été publiées, ^{303,304} l'une au Malawi, la seconde en Indonésie : dans les 2 cas, les sujets splénectomisés, en comparaison aux contrôles, présentaient un risque majoré d'accès palustre dans l'année suivant la splénectomie (figure 21).

L'expression clinique du paludisme semble plus intense et/ou plus grave chez les patients aspléniques : fièvre plus élevée et plus prolongée, formes neurologiques plus fréquentes. La parasitémie est plus élevée, et les formes parasitaires matures, normalement très rares en circulation, sont observées chez plus de 20% des patients splénectomisés pourtant immuns ³⁰³. Enfin, la clairance parasitaire semble

allongée chez les splénectomisés. Chez un patient asplénique drépanocytaire souffrant d'un accès palustre à *P. falciparum* la clairance parasitaire était nettement plus longue lorsqu'évaluée par les méthodes moléculaires en comparaison aux méthodes optiques³⁰⁵. Un excès de mortalité palustre, ainsi qu'un excès de formes graves ne sont en revanche pas formellement démontrés, en l'absence d'étude d'envergure. D'assez nombreux cas rapportés font état de formes graves, mais en l'absence de groupe contrôle apparié et du fait d'une tendance probable à publier plus les formes graves que les formes non compliquées, aucune conclusion solide n'est possible.

Ces constatations sont cependant à moduler en fonction du statut immunitaire du sujet vis-à-vis de *P. falciparum* : la sur-incidence de formes graves semble nette chez les sujets non immuns (jeune enfant vivant en zone endémique, voyageur de zone non endémique)⁹⁰. Ceci s'expliquerait par le fait que chez le sujet non immun la clairance de *P. falciparum* serait très dépendante de la fonction splénique, alors que chez le sujet immun, la clairance serait plus largement médiée par osponisation/phagocytose extra-splénique même si ce mécanisme est sans doute moins efficace. Comme indiqué ci-dessus, cette théorie n'est pas solidement établie.

A propos de *P. vivax*, un accès-post splénectomie chez une patiente marocaine a également été décrit³⁰⁶. Le suivi d'une cohorte de splénectomisés indonésiens a mis en évidence un risque élevé d'accès palustre en post-splénectomie particulièrement marqué pour *P. vivax* (risque relatif ajusté à 3 et 7.8 pour *P. falciparum* et *P. vivax*, respectivement)³⁰⁴.

Enfin, un accès grave à *P. knowlesi* a été décrit chez un sujet splénectomisé, sans que nous disposions à ce jour de données plus robustes quant à un sur-risque chez l'asplénique³⁰⁷. Dans une série malaisienne d'accès palustres à *P. knowlesi*, une patiente splénectomisée avait présenté un temps de clairance parasitaire allongé³⁰⁸.

Les mécanismes physiopathologiques menant à cette modification du phénotype palustre sont complexes, débattus et sans doute intriqués⁹⁰. Nous les développerons au cours du chapitre « la rate dans l'accès aigu ».

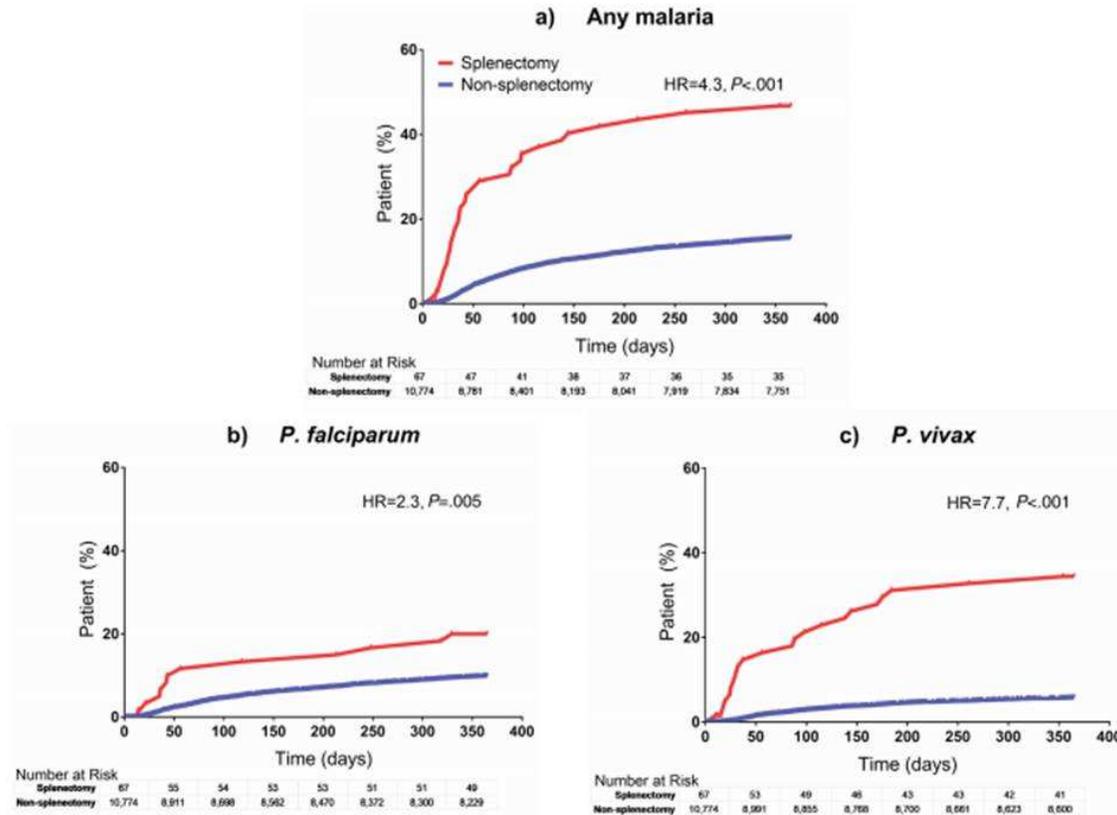


Figure 21 : Surincidence précoce des accès palustres (a), toutes espèces confondues (b) dus à *P. falciparum*, ou (c) à *P. vivax* dans une cohorte de 67 sujets splénectomisés (courbe rouge) en comparaison aux sujets contrôles (courbe bleue), vivant en Papouasie et suivis un an après splénectomie. D'après ³⁰⁴.

2. Le paludisme peut révéler une dysfonction splénique

Les sujets aspléniques, et dans une moindre mesure hypospléniques, sont exposés à un sur-risque d'infections par bactéries encapsulées (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*...), et par certaines bactéries plus rares (*Capnocytophaga canimorsus*...) mais aussi par les hématozoaires d'intérêt médical (*Plasmodium* et *Babesia*) ³⁰⁹. Certains accès aigus palustres peuvent révéler une dysfonction splénique. Un accès aigu à *P. malariae* révélant un syndrome drépanocytaire S/β+ chez un patient de 31 ans préalablement asymptomatique a été rapporté ³¹⁰.

En outre, un consortium hispanico-néerlandais a émis l'hypothèse que le risque, bien connu, de co-infection bactérienne (en particulier par *Salmonelles* mineures) chez les enfants atteints de paludisme grave, était lié à une dysfonction splénique, notamment via une profonde altération de la zone marginale ³¹¹. La démonstration de ce phénomène chez l'homme n'a cependant pas été apportée.

3. Paludisme et altération partielle de la fonction splénique

Il n'existe actuellement pas de donnée précise sur l'impact d'une altération partielle des fonctions spléniques sur l'infection palustre. L'un des écueils principaux est le flou de la définition d'un hyposplénisme partiel. Un très grand nombre de situations pathologiques peuvent être responsables d'une dysfonction splénique³¹² mais il n'existe pas de lien évident entre le paludisme et la très grande majorité de ces situations.

E. Prévalence de la splénomégalie et intensité de la transmission du paludisme

Dans l'accès palustre aigu, chez le jeune enfant vivant en zone endémique il y a fréquemment une splénomégalie. Cet élément clinique a été utilisé à des fins épidémiologiques.

Dès le milieu du 19^{ème} siècle, alors que le paludisme était une maladie définie, mais sans agent étiologique ni mode de transmission connus, le Dr Dempster, chirurgien militaire britannique exerçant en Inde, et ses collègues, pointaient le parallélisme entre la prévalence de la splénomégalie chez les habitants de différentes régions du nord de l'Inde et celle des accès palustres (« *the amount of spleen disease found in any tract of country is fair average measure of the amount and intensity of the malarious influences to which its inhabitants have been exposed !* »^{313,314}).

S'est alors développé le concept d'indice splénique, qui représente la proportion d'individus splénomégaliés au sein d'une population donnée. Cet indice a longtemps été utilisé comme mesure de l'endémicité palustre, notamment à l'époque où la recherche d'une parasitémie était trop complexe techniquement.³¹⁵ A titre d'illustration, plusieurs travaux ont montré la décroissance parallèle de l'indice splénique et de la parasitémie lorsque l'altitude allait croissant³¹⁶.

L'OMS a fait entrer l'indice splénique dans les critères de définition de l'intensité de transmission d'une région donnée (hypo, méso, holo et hyper endémiques) (tableau 6)³¹⁷. L'indice splénique et autres indices malariométriques tels que la proportion de gouttes épaisses positives, ou les valeurs d'anticorps anti *Plasmodium* ont ensuite été étudiées simultanément. Une corrélation positive était souvent mais inconstamment notée entre indice splénique et taux d'anticorps anti *Plasmodium*, comme par exemple au Brésil (prédominance de *P. vivax* ;³¹⁸), ou en Gambie, où il existait une corrélation entre indice splénique et anticorps anti-sporozoïtes, suggérant que les enfants splénomégaliés avaient été plus exposés au parasite;³¹⁹. Une corrélation positive entre indice splénique et densité parasitaire circulante a également été notée³²⁰. L'indice splénique a ainsi été utilisé dans de nombreuses études épidémiologiques, notamment pour mesurer l'impact de mesures préventives. Cet indice s'est cependant avéré moins pertinent chez les adultes que chez les enfants, l'acquisition graduelle de l'immunité humorale anti-*Plasmodium* rendant moins crucial le rôle de la rate (figure 22), comme illustré par un travail récent au Liberia, où la taille de la rate était maximale vers 4 ans, pour redevenir quasi impalpable vers 10 ans³²¹.

Lorsque le niveau d'endémicité palustre décroît dans une zone géographique, comme en Tanzanie entre 1985 et 2010, cet indice diminue plus vite que les marqueurs sérologiques d'immunité anti-plasmodiale ³²².

La splénomégalie n'est pas due qu'à un accès palustre aigu où elle est inconstante. Elle peut nécessiter quelques semaines pour régresser après clairance du parasite, voire persister en cas de portage chronique. Elle peut manquer chez un enfant drépanocytaire homozygote, et peut être présente pour une autre raison (hypertension portale, leishmaniose viscérale, hémopathie...). Enfin, l'expertise nécessaire à une palpation splénique fiable rend cet indice plus imprécis que les marqueurs parasitologiques. Il est également apparu que l'indice splénique était moins fiable dans les zones de transmission instable du parasite. Pour l'ensemble de ces raisons, l'indice splénique est désormais supplanté par les mesures directes de la présence du parasite, ou par la mesure de l'immunité humorale.

WHO Criteria for Classification of Endemicity by Spleen Rates

Endemicity	Children aged 2–9yr (%)	Adults (>16 yr)
Hypoendemic	0–10	No measure
Mesoendemic	11–50	No measure
Hyperendemic	>50	“High” ($\geq 25\%$)
Holoendemic	>75	“Low” ($< 25\%$)

Tableau 6 : Critères OMS de classification des zones d'endémicité palustre selon l'intensité de transmission, via l'indice splénique. D'après ³¹⁷.

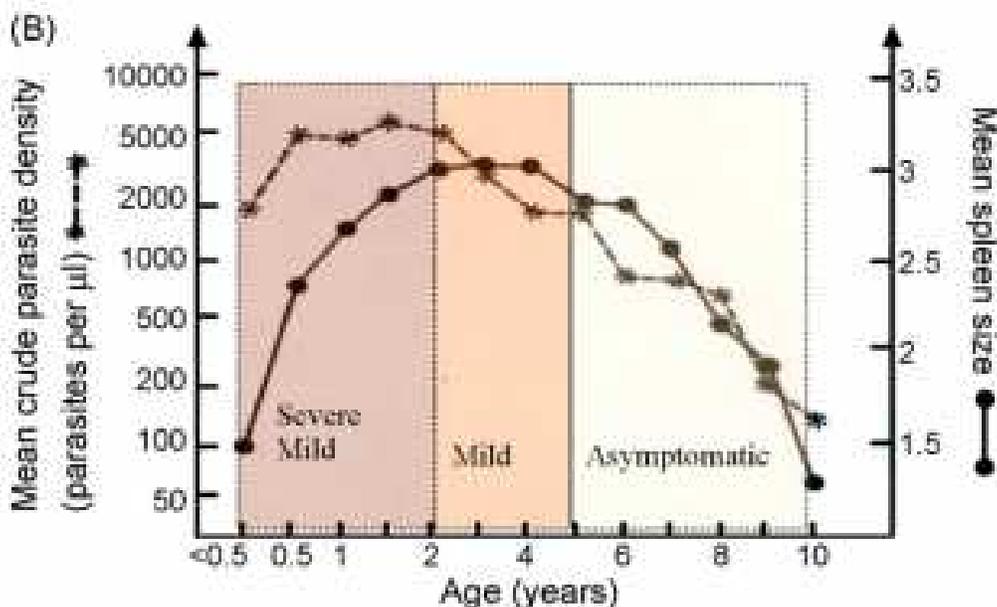


Figure 22 : Densité parasitaire (étoiles) et taille moyenne de la rate (points) selon la classification de Hackett en fonction de l'âge dans un collectif d'enfants vivant en zone holoendémique (Liberia), mettant en évidence un parallélisme marqué entre les deux paramètres. D'après ³²¹.

F. La rate dans l'accès aigu

1. Rôle protecteur

Le rôle protecteur de la rate dans le paludisme aigu est probable mais non prouvé. La surincidence du paludisme grave chez les patients hypo ou aspléniques, quoique non formellement démontrée, est fortement suspectée (cf supra).

a. La déformabilité des hématies infectées est altérée

Les hématies infectées par des formes matures (trophozoïtes et schizontes) de *Plasmodium falciparum* sont moins déformables que des hématies non infectées. Ceci a été initialement démontré dans un modèle d'infection *in vitro* par *P. knowlesi* ³²³, puis confirmé avec des hématies infectées par *P. falciparum* ³²⁴. Les mécanismes sous tendant cette modification ont été progressivement élucidés, essentiellement via des expériences de microfluidique, d'aspiration d'hématies par micropipettes ou de pinces optiques. La déformabilité érythrocytaire est sous la dépendance de trois paramètres : les propriétés viscoélastiques de la membrane, la viscosité intracytoplasmique (essentiellement liée à la présence de l'hémoglobine et à l'état d'hydratation), et le rapport surface/volume de l'hématie. Il existe ainsi un certain degré de rigidification membranaire ^{325,326} des hématies infectées. Cette rigidification est possiblement induite par le stress oxydatif consécutif à la présence de produits de dégradation de l'hémoglobine ³²⁷ quoique les données expérimentales dans ce domaine soient contradictoires ³²⁸ ; la liaison entre la protéine parasitaire EBA175 et son ligand érythrocytaire, la glycophorine A pourrait aussi contribuer à cette rigidification. De nombreuses interactions entre protéines parasitaires et protéines du cytosquelette érythrocytaire ont été décrites, notamment la liaison Knob-associated Histidin Rich Protein (KHARP) avec l' α spectrine, l'ankyrine, et le complexe 4.1R ³²⁹, ou entre la protéine parasitaire Pf332 et l'actine ³³⁰ notamment en présence de protubérances membranaires appelés knobs, secondaires à l'export de protéines parasitaires ³³¹. Ces interactions contribuent à rigidifier la membrane érythrocytaire. Par ailleurs, le rapport surface/volume de l'hématie infectée est modifié par la présence même du parasite, lui-même peu déformable, dans l'hématie ³³².

Les hématies infectées par des formes jeunes du parasite (anneaux ou rings) présentent également, dans une moindre mesure, une réduction de leur déformabilité ^{324,333}. Leur rapport surface/volume est diminué ³³² et l'expression de la protéine RESA en surface semble jouer un rôle dans la diminution de leur déformabilité ³³⁴, la rigidification étant déclenchée par l'hyperthermie ³³⁵. En outre, les événements moléculaires précoces suivant le contact entre mérozoïte et hématie déclenchent une

cascade de signalisation modifiant notablement le cytosquelette sous membranaire et donc les propriétés visco-élastiques de la membrane érythrocytaire ³³⁶.

A contrario, l'existence d'une diminution constitutionnelle de la déformabilité érythrocytaire, comme dans le cas de l'ovalocytose du Sud-Est asiatique, semble être un facteur limitant l'invasion parasitaire ^{157,337} tout au moins *in vitro*.

b. La déformabilité des hématies non infectées est aussi altérée

La constatation initiale fut que l'exposition d'hématies non infectées à du surnageant de culture de *P. falciparum* diminuait leur déformabilité ³³⁸.

Plusieurs travaux utilisant l'ektacytométrie pour mesurer la déformabilité érythrocytaire de sujets atteints de paludisme, sévère ou non, ont mis en évidence une réduction de cette déformabilité, proportionnelle à la gravité clinique. Au vu du caractère très minoritaire, dans le sang total, des hématies parasitées, une altération plus globale de la déformabilité érythrocytaire, incluant les hématies non parasitées, est ici très probable ³³⁹⁻³⁴¹.

Un travail de microfluidique utilisant une technique essentiellement sensible aux variations du rapport Surface/Volume a également montré que la déformabilité des hématies non infectées était altérée, en parallèle de celle des infectées ³³³.

Enfin, des expériences utilisant les pinces optiques pour la mesure de la déformabilité érythrocytaire ont également montré *in vitro* que la déformabilité d'hématies co cultivées avec *P. falciparum*, mais non infectées, était également réduite ³⁴².

c. La rate humaine retient les formes matures, mais aussi une partie des rings

Notre équipe a montré, grâce à des expériences de perfusion splénique *ex vivo*, que non seulement la grande majorité des hématies parasitées par des formes matures de *P. falciparum* était retenue dans la pulpe rouge, mais aussi qu'une fraction substantielle (environ 50%) des hématies infectées par les rings était retenue ³⁴³. La rétention des formes matures est un mécanisme protecteur, en empêchant la persistance en circulation de formes capables de cytoadhérence et donc de séquestration. Le mécanisme de rétention des rings, initialement considéré comme une réinvasion inefficace, contribuerait également à une limitation de l'augmentation de parasitémie en périphérie et donc de la séquestration. Une analyse plus fine des populations érythrocytaires en amont et en aval de filtres composés de microbilles mimant la filtration splénique a montré que la majoration de la sphéricité et la perte de surface (donc une altération du rapport surface/volume) contribuaient à cette rétention des rings dans la rate ³³² (figure 23). Un modèle de microfluidique, utilisé au Malawi chez des sujets dont le phénotype palustre était soigneusement défini, a permis d'estimer que pour un ring restant en circulation, un ring était retenu dans la rate ³⁴⁴. La démonstration *in vivo* de ce phénomène, qui se heurte à d'évidentes difficultés techniques et logistiques, n'a cependant pas pu être obtenue à ce jour.

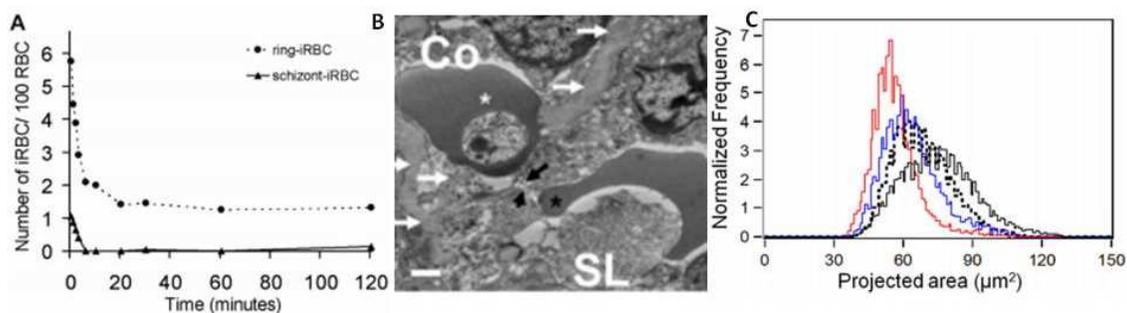


Figure 23 : Rétention des hématies infectées dans la rate humaine. A, Persistance en circulation au cours du temps, d'hématies infectées par des formes matures (schizont-iRBC) ou des rings (ring-iRBC) au cours d'expériences de perfusion *ex vivo* de rates humaines, montrant la disparition très rapide des hématies infectées par des schizontes, mais également, dans une moindre mesure et plus progressivement, par des rings. B, Microscopie électronique à transmission d'une rate humaine après perfusion *ex vivo*, montrant une hématie infectée par un ring retenue en amont d'un sinus veineux (SL), dans un cordon de Billroth (Co), les flèches pointent les cellules endothéliales discontinues des sinus veineux. C, Analyse via l'imagerie en flux (AMNIS) de la surface projetée d'hématies infectées par des formes matures (rouge), des rings (bleu), d'hématie non infectées provenant de la culture (pointillés), et d'hématie normales (courbe pleine noire) illustrant la perte de surface projetée marquée pour les formes matures, mais déjà présente pour les formes rings. D'après ^{332,343}.

d. La fonction splénique d'épuration des hématies est activée au cours de l'accès aigu (figure 24)

Il est possible, chez l'être humain, d'évaluer *in vivo* la capacité « d'épuration érythrocytaire » de la rate humaine en injectant des hématies exposées 20 minutes à 51°C, ce qui provoque la formation de sphérocytes rigides puis marquées par radioactivité (chrome 51). On mesure ensuite leur persistance en circulation par prélèvements veineux périphériques successifs suivis d'un compte de la radioactivité. Looaresuwan *et al.* ont ainsi démontré qu'au cours de l'accès palustre aigu, et dans les jours qui suivent, la fonction d'épuration par la rate d'hématies altérées était activée, et ce de manière d'autant plus importante qu'il existait une splénomégalie. La clairance des hématies chauffées est aussi accélérée 48 heures après démarrage du traitement antipaludique ³⁴⁵.

Enfin, il semble que même la fonction d'épuration d'hématies normales (marquées au Chrome 51 mais non altérées par ailleurs) soit également majorée au décours immédiat d'un accès palustre aigu ³⁴⁶.

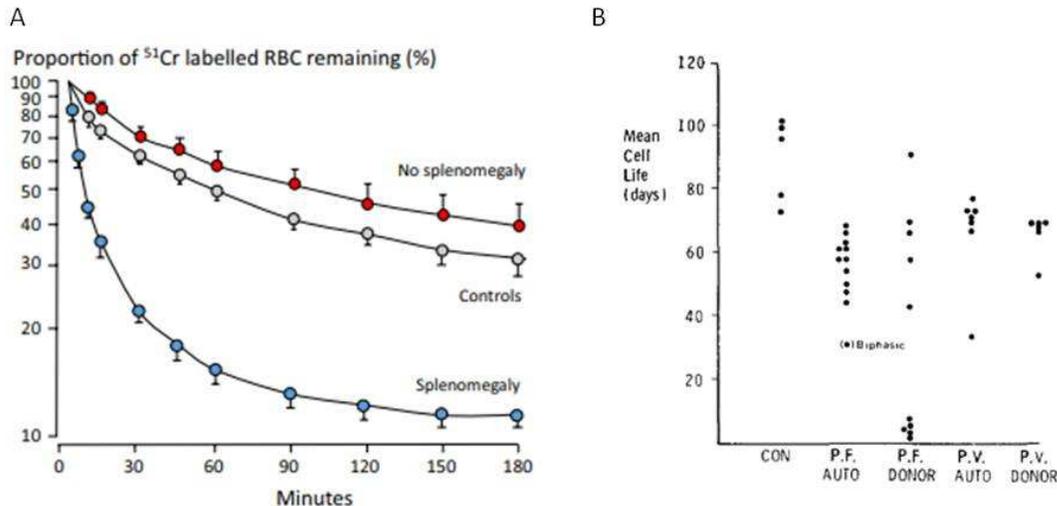


Figure 24 : Activation de la fonction d'épuration de la rate humaine au cours de l'accès palustre. A, Persistence en circulation, au cours du temps, d'hématies rigidifiées et marquées au chrome 51 chez des sujets contrôles (gris), atteints d'accès aigus à *P. falciparum* et non splénomégaliques (rouge) ou splénomégaliques (bleu), illustrant la clairance accélérée chez les sujets impaludés splénomégaliques. In ³⁴⁷, d'après ³⁴⁵. B, Protocole identique mais utilisant des hématies non rigidifiées provenant de donneurs sains (« donor ») ou les propres hématies de patients atteints d'accès à *P. falciparum* (« P.F. ») ou à *P. vivax* (« P.V. »). Est représentée ici la demi-vie des hématies étudiées, un point équivalant à un sujet. D'après ³⁴⁶.

e. La splénomégalie est rare dans le neuropaludisme

Il a été démontré que le volume splénique, mesuré par échographie dans une cohorte d'enfants souffrant de paludisme grave au Malawi, était moins important dans le groupe atteint de neuropaludisme que dans les anémies graves ³⁴⁸, ce qui rejoint les observations faites par Cserti-Gazdewich *et al.* montrant que la splénomégalie s'associait plus volontiers à l'anémie grave qu'aux formes neurologiques ^{48,349}.

f. Séries autopsiques

Plusieurs séries autopsiques de patients décédés d'accès palustres sévères ont mis en évidence une séquestration intrasplénique d'hématies parasitées particulièrement importante. En outre, en comparaison aux patients décédés de formes non neurologiques, il existait moins d'érythrophagocytose en cas de neuropaludisme ³⁵⁰.

g. Au total

La pulpe rouge splénique peut contribuer de plusieurs façons à la défense innée anti palustre au cours de l'accès aigu: la grande majorité des formes matures cytoadhèrent hors de la rate, mais les globules rouges parasités parvenant tout de même à la rate sont eux-mêmes majoritairement retenus dans la pulpe rouge. La rate humaine semble en outre capable de retenir des hématies parasitées par des

rings, ce qui pourrait contribuer au caractère « protecteur » de la rate dans l'accès aigu en limitant l'ascension de la charge parasitaire en périphérie, et donc le risque de cytoadhérence et de neuropaludisme. Ceci se fait cependant au prix d'une rétention accrue intra-splénique d'hématies non parasitées, et donc potentiellement d'une anémie plus importante, les mécanismes précis de ce « dommage collatéral » n'étant que partiellement compris. La mortalité du neuropaludisme étant supérieure à celle de l'anémie grave ⁴⁶, le bénéfice global de cette rétention serait supérieur à ses risques.

A l'inverse, du point de vue du parasite, le mécanisme de cytoadhérence des hématies infectées aux capillaires viscéraux représente une stratégie d'échappement du parasite au filtre splénique. Ceci a même probablement contribué à sélectionner ce phénomène de cytoadhérence au cours de la co-évolution *Plasmodium-Homo sapiens*.

2. Rôle délétère

a. anémie palustre aiguë

Mécanismes de l'anémie palustre

L'anémie de l'accès palustre, notamment l'anémie grave, est une pathologie complexe dont les mécanismes physiopathologiques sont multiples et associés : hémolyse intravasculaire mécanique lors de la rupture des schizontes, dysérythropoïèse (moelle hypocellulaire), hémolyse extravasculaire via une érythrophagocytose accrue ³⁵¹. La destruction des hématies dans l'accès aigu atteint, en proportion, plus souvent les hématies non infectées qu'infectées (environ 8 à 10 hématies non infectées pour une infectée par *P. falciparum* ^{352,353}).

Une rétention mécanique accrue dans la rate ?

La congestion de la pulpe rouge par des hématies infectées et non infectées est un élément majeur des études autopsiques réalisées dans le paludisme à *P. falciparum* ³⁵⁴. La présence de pigment malarique au sein des macrophages spléniques atteste également de la phagocytose de formes matures, puisque les formes plus jeunes ne produisent pas de pigment ³⁵⁵. On ne sait pas si ces formes matures phagocytées correspondent à des formes matures circulantes bloquées dans la rate ou à la maturation *in situ* de formes jeunes retenues quelques heures plus tôt.

Comme détaillé plus haut, dans l'accès palustre aigu, la diminution de la déformabilité des hématies concerne à la fois les hématies infectées et, à une intensité moindre, les hématies non infectées. Ces deux populations d'hématies moins déformables sont donc susceptibles d'être retenues dans la pulpe rouge splénique. Cette diminution de déformabilité, évaluée par ektacytométrie, est corrélée au nadir d'hémoglobine des patients. La rétention splénique pourrait donc contribuer à l'anémie de l'accès palustre aigu ³⁵⁶, voire à l'anémie palustre grave. Comme évoqué précédemment, après traitement antipaludique, une hyperactivité splénique a été directement observée par des expériences d'injection *in vivo* d'hématies altérées (rigidifiées par chauffage ou osponisées) mais aussi issues de poches de

transfusion sans altération autre que celles possiblement induites par le stockage pré-transfusionnel^{345,346}.

En outre, les données épidémiologiques de terrain provenant d'études pédiatriques ont montré que la splénomégalie est plus fréquente en cas d'anémie palustre grave, en comparaison au neuropaludisme^{348,349} (figure 25). Dans une cohorte d'accès palustres aigus chez des enfants kenyans, une corrélation inverse existait entre taille de la rate et taux d'hémoglobine³⁵⁷.

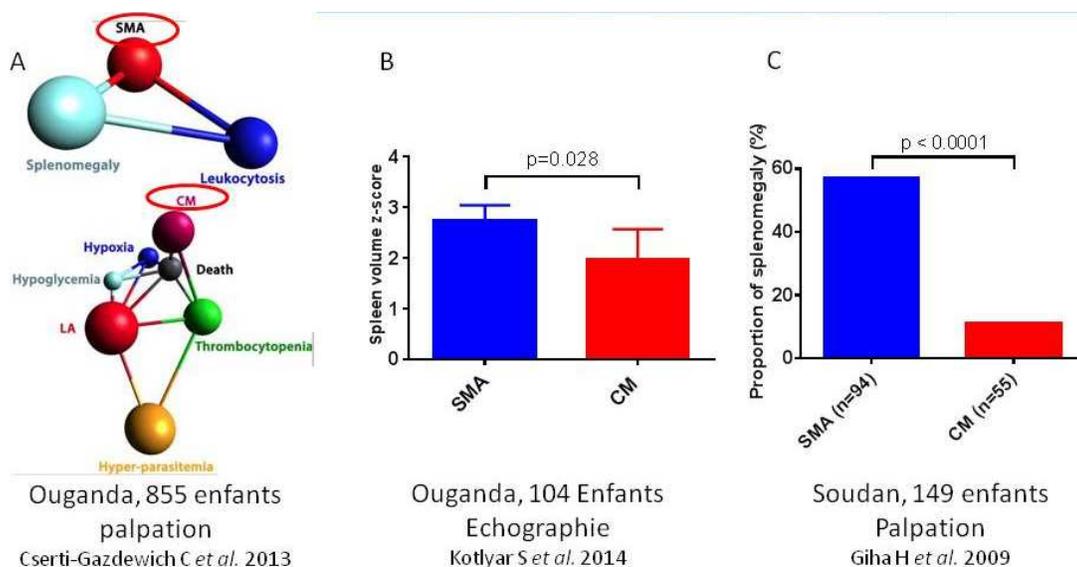


Figure 25 : Illustration de l'association statistique entre splénomégalie et anémie sévère, association absente en cas de neuropaludisme. A, regroupement syndromique des données clinico biologiques de 855 enfants ougandais montrant la force de l'association entre splénomégalie et anémie sévère (SMA : severe malarial anemia) mais un manque d'association avec le neuropaludisme (CM : cerebral malaria). D'après⁴⁸. B, Taille échographique de la rate dans une cohorte de 104 enfants ougandais atteints d'anémie sévère (SMA) ou de neuropaludisme (SM). D'après³⁴⁸. C, Proportion d'enfants splénomégaliques au sein d'une cohorte de 149 enfants soudanais atteints d'anémie sévère ou de neuropaludisme. D'après³⁴⁹.

Une érythrophagocytose intrasplénique accrue ?

Au cours de l'accès palustre, le compartiment monocyto-macrophagique est activé. La mise en présence de monocytes circulants provenant de sujets atteints d'anémie palustre grave et de leurs propres hématies a mis en évidence une érythrophagocytose plus importante chez ces patients que chez des sujets contrôles³⁵⁸.

Les modifications des hématies induites par l'infection palustre les rendent plus susceptibles d'être phagocytées: lors d'une étude menée au Kenya chez des enfants atteints d'anémie palustre grave, la co-incubation de monocytes U937 avec les hématies infectées et non infectées de ces jeunes patients a révélé un plus haut degré d'érythrophagocytose que dans le groupe contrôle³⁵⁹. Plusieurs travaux ont montré qu'il existait, au cours de l'accès palustre aigu, un dépôt de composés du complément,

notamment C3, à la surface des hématies (infectées ou non), ce qui peut opsoniser ces dernières, promouvoir la phagocytose et ainsi aggraver l'anémie. Ces dépôts de C3 semblent pouvoir activer les macrophages comme attesté par l'augmentation du taux de néoptérine chez des patients atteints d'anémie palustre ^{357,360}.

Cependant, même si l'existence d'une érythrophagocytose accrue est très probable, sa localisation intra splénique préférentielle n'est pas démontrée.

Données animales

Une étude menée chez le rat infecté par *Plasmodium berghei*, dont la rate a des sinus veineux proches des sinus humains, et chez qui, contrairement à la souris, il n'y a pas d'érythropoïèse intra-splénique, suggère que la destruction intra-splénique des hématies infectées par *Plasmodium* pourrait passer par les cellules T CD8 ³⁶¹. Un tel mécanisme n'a à ce jour pas été mis en évidence en pathologie humaine.

En résumé

L'impossibilité de quantifier les contributions respectives des différents mécanismes d'anémie palustre ne permet pas de valider un modèle physiopathologique cohérent. Toutefois, les phénomènes congestifs observés, la corrélation solide anémie-splénomégalie, la rétention splénique d'hématies altérées et l'activation de l'érythrophagocytose rendent une participation splénique très probable. Nous ne disposons pas de données sur les taux d'hémoglobine des patients aspléniques atteints de paludisme et cette analyse serait brouillée par l'impact de la splénectomie sur la cinétique de la charge parasitaire.

b. Rupture splénique

Epidémiologie

La rupture pathologique de la rate a été initialement décrite par Atkinson en 1874 ³⁶². En l'absence de recueil systématique de cet événement au sein des systèmes de surveillance épidémiologique du paludisme, l'incidence précise de la rupture splénique palustre est inconnue. Aucune série de plus de 5 patients n'a été publiée. Cette complication a été décrite dans toutes les zones endémiques. L'utilisation historique de la malariothérapie dans le traitement de la neurosyphilis a été l'occasion de constater l'existence de ruptures pathologiques de la rate lors d'infections à *Plasmodium*. L'incidence estimée de la rupture splénique dans cette situation très particulière est estimée à environ 1.2/1000 cas. La sur représentation des cas liés à *P. vivax* dans la littérature laisse penser que l'infection par cette espèce plasmodiale est associée à un risque plus élevé que l'infection par *P. falciparum* ³⁶³.

En dehors de l'infection à *P. falciparum*, une série de 341 patients atteints de paludisme à *P. vivax* en Corée du Sud a rapporté une incidence de rupture splénique de 0.3%, et d'infarctus splénique de 0.6% ³⁶⁴. Sur 17 autopsies post accès fatal à *P. vivax* au Brésil, 3 présentaient une rupture splénique ³⁶⁵. Enfin, 8% d'une série de patients coréens infectés par *P. vivax* et dont l'état clinique avait nécessité la réalisation d'une tomodensitométrie (TDM) abdominale présentaient une rupture splénique ³⁶⁶.

Facteurs de risque

Ils sont peu connus, mais la majorité des cas ont été décrits après un accès aigu, voire de récurrence mais pas ou très peu dans les formes chroniques, probablement en raison d'une expansion plus progressive de la rate, et possiblement d'une organisation fibreuse de la capsule. Des traumatismes parfois minimes déclenchent la rupture dans certains cas. Les sujets peu immuns et de sexe masculin semblent plus fréquemment atteints.

Diagnostic

Le diagnostic de rupture splénique repose sur l'existence de douleurs abdominales en général brutales, volontiers situées dans l'hypocondre gauche avec irradiations à l'épaule gauche (signe de Kehr) mais parfois plus diffuses, notamment lorsqu'un hémopéritoine est présent. Ces douleurs peuvent être reproduites à la palpation et s'accompagner de nausées, de vomissements et de modifications du transit. La rate est augmentée de volume, douloureuse. Un état de choc hémorragique n'est pas rare. Biologiquement, une anémie aiguë est possible mais inconstante. L'imagerie abdominale en urgence par échographie ou TDM permet de confirmer le diagnostic.

La rupture splénique doit donc être évoquée en cas d'hypotension artérielle survenant au cours d'un accès palustre aigu, au même titre qu'un sepsis sévère bactérien concomitant.

Physiopathologie

Celle-ci n'est pas connue avec précision et seules des hypothèses découlant de l'observation de pièces opératoires ou de nécropsies peuvent être avancées. La congestion de la pulpe rouge par des hématies infectées, certaines hématies non infectées, et des RPM ayant phagocyté des hématies est un phénomène avéré dans l'accès palustre aigu et joue très probablement un rôle dans la rupture. L'élévation de la pression intra abdominale résultant d'efforts de toux ou de vomissements pourrait être un facteur précipitant, mais dans un nombre très restreint de cas au vu de la discordance entre la fréquence de ces symptômes et la rareté de la rupture splénique³⁶³. La plus ou moins grande fragilité de la capsule splénique (notamment liée à l'âge) face à ces variations de pression exercée est également en jeu. Enfin, l'évolution péjorative d'un hématome intra splénique est possible. L'hypothèse d'une participation ischémique³⁶⁷ liée à l'hyperplasie du système phagocytaire, suivie de thrombose secondaire des gros vaisseaux intra spléniques puis sa complication hémorragique (comme parfois observé dans les infarctus cérébraux), est possible.

Prise en charge spécifique

Celle-ci est urgente. Quatre possibilités existent, dont les bénéfiques et risques potentiels n'ont pas été comparés.

Le traitement conservateur était historiquement très peu utilisé, mais a vu son utilisation s'étendre dans la rupture splénique palustre comme non palustre. Il consiste à laisser un tissu cicatriciel s'organiser en regard de la plaie capsulaire. Le patient est mis au repos strict durant plusieurs jours et étroitement surveillé avec voie veineuse en place. L'efficacité de cette mesure n'est pas mesurable précisément, mais plusieurs expériences positives ont été rapportées. Son bénéfice est la préservation ultérieure de la fonction splénique.

L'embolisation splénique par radiologie interventionnelle a été rapportée à 2 reprises avec succès^{368,369}.

La splénoorrhaphie est rarement utilisée. Elle consiste à tenter de suturer chirurgicalement la capsule splénique afin d'éviter la splénectomie.

La splénectomie est le traitement le plus souvent réalisé. Elle est indispensable s'il existe un saignement actif non contrôlable, mais pose le problème des complications de toute chirurgie abdominale urgente, a fortiori lorsque réalisée en milieu contraint au plan matériel, et de la susceptibilité accrue à certaines infections déjà évoquée.

Le devenir à long terme des patients ayant présenté une rupture splénique palustre n'est pas connu.

c. Hématome intra splénique

Cette complication a été très rarement décrite de manière isolée; elle est en revanche parfois associée à une rupture splénique qu'elle peut précéder. A notre connaissance, seuls 3 cas d'hématomes intra-spléniques isolés ont été décrits^{367,370,371}. Ils concernaient tous des hommes, de 30 ans en moyenne, infectés par *P. vivax* (2 cas) ou *P. malariae* (1 cas). Ces hématomes intra spléniques étaient diagnostiqués en médiane 3 jours après mise sous traitement. La présentation clinique était celle d'une douleur abdominale aiguë, parfois accompagnée de nausées. L'imagerie abdominale confirmait le diagnostic, et le traitement était conservateur dans les 3 cas.

d. Infarctus splénique

Les premières descriptions datent des années 1970³⁷². Tout comme l'hématome intra splénique, l'incidence des infarctus spléniques au cours de l'accès palustre aigu n'est pas connue, puisqu'il n'existe pas d'étude prospective ayant activement recherché cette complication par des examens d'imagerie systématiques. Là encore, il existe une sur représentation des accès à *P. vivax*. Sur une série de 341 accès aigus à *P. vivax*, Kwak *et al.* ont mis en évidence 2 cas d'infarctus splénique³⁶⁴. La maladie a été décrite en Asie et en Afrique, pas en Amérique latine à ce jour. Le diagnostic peut être difficile, car les formes asymptomatiques existent et il est donc assez probable que la pathologie soit sous-estimée. L'imagerie par échographie abdominale ou TDM est indispensable au diagnostic. La prise en charge est symptomatique, la splénectomie pouvant être évitée dans la très grande majorité des cas.

Le mécanisme de ces infarctus spléniques est mal connu, puisqu'un examen anatomopathologique de la rate n'est pas disponible la plupart du temps.

G. La rate et le patient traité

1. La rate est un contributeur majeur à la clairance parasitaire via le pitting

a. Concept

Le phénomène de pitting (cf supra) correspond à la faculté de la rate à expulser hors de l'hématie des particules anormales et à remettre la même hématie en circulation. C'est le défaut de cette fonction de pitting qui est responsable de la présence de corps de Howell-Jolly chez les sujets aspléniques.

b. Preuves expérimentales

A la fin des années 1990, une équipe thaïlandaise & anglaise a mis en évidence l'existence dans le sang périphérique de patients impaludés (mais pas en conditions de culture *in vitro*), d'hématies particulières. Celles-ci portaient la marque d'une infection récente par *P. falciparum* (notamment la protéine parasitaire ring-infected erythrocyte surface antigen, RESA) mais ne comportaient plus de parasite, signant ainsi la capacité de l'être humain à expulser activement le parasite sans détruire l'hématie ²⁹², donc de réaliser le pitting. Ce phénomène est significativement plus intense sous dérivés de l'artémisinine que sous quinine ^{294,295,297,373}.

Ce pitting peut être quantifié en mesurant dans le sang périphérique la proportion d'hématies portant la marque d'une infection récente (positives pour le marquage RESA après perméabilisation) mais ne portant pas trace du parasite (négatives pour un marqueur de l'ADN tel que le Hoechst) (figure 26). La responsabilité suspectée de la rate dans ce phénomène a pu être confirmée lors d'expériences de perfusion *ex vivo* de rates humaines ²⁹⁸. Le pitting parasitaire est d'ailleurs absent chez le patient asplénique.

Des études autopsiques ont mis en évidence la réalité de ce processus de pitting dans le paludisme traité par dérivés de l'artémisinine : les corps parasitaires morts après exposition à la molécule sont expulsés hors de l'hématie, probablement au niveau de la fente inter endothéliale, et restent bloqués dans la pulpe rouge alors que l'hématie précédemment parasitée est remise en circulation.

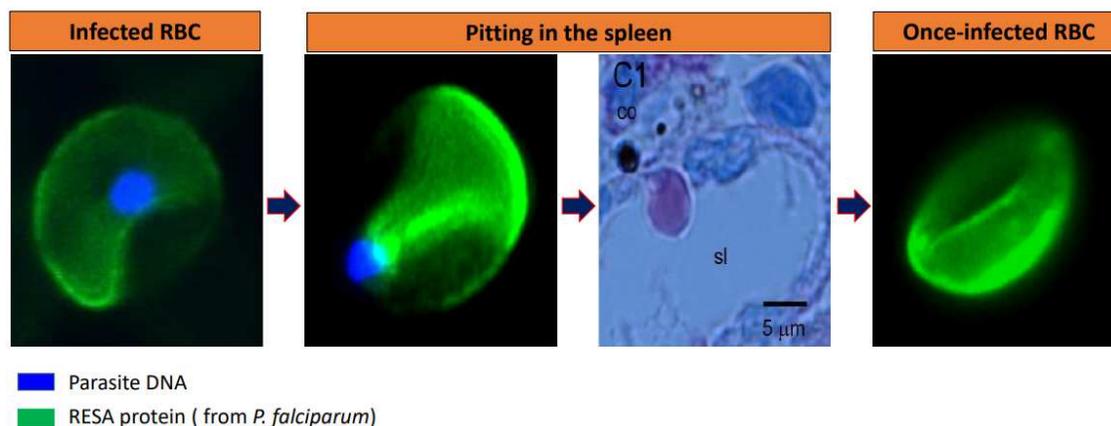


Figure 26 : Mise en évidence expérimentale du processus de pitting intrasplénique. L'hématie est marquée par un anticorps anti RESA couplé à un fluorochrome vert, le noyau parasitaire est marqué par le Hoechst et apparaît en bleu. Le pitting est visualisé sur une image d'histologie splénique après perfusion ex vivo, le résidu parasitaire (noir) restant coincé du côté abluminal du sinus veineux, et l'hématie rejoignant la lumière du sinus veineux, étant remise en circulation. Cette hématie débarrassée de son résidu parasitaire peut être individualisée car portant toujours la protéine RESA, mais dépourvue de marquage par le Hoechst. D'après ^{298,374}.

c. Place du pitting dans la clairance parasitaire

L'amplitude de la contribution du pitting à la clairance parasitaire globale post artésunate varie en fonction du statut immunitaire de l'hôte : chez les enfants immuns (âgés de plus de 5 ans), la clairance parasitaire ne semble pas être majoritairement médiée par le pitting, mais plutôt par l'immunité humorale, contrairement aux enfants plus jeunes. A l'instar de ces derniers, les voyageurs non immuns traités par dérivés de l'artémisinine semblent éliminer le parasite via un mécanisme retardé de quelques heures, et très dépendant du pitting ²⁹⁶.

L'artésunate pourrait aussi contribuer à diminuer la déformabilité des hématies infectées par des rings ³⁷⁵ ce qui pourrait participer à leur clairance chez les patients traités.

2. Le pitting est responsable d'un effet indésirable parfois délétère, l'hémolyse différée

a. Constatations initiales

Lors de la démonstration de la supériorité de l'artésunate sur la quinine dans le traitement du paludisme grave ^{63,64}, peu de toxicités significatives de l'artésunate avaient été notées. Cependant, en 2011, une équipe allemande a rapporté une série multicentrique rétrospective de 25 cas de paludisme grave d'importation traités par artésunate, et notait 6 cas d'hémolyse différée, survenant en médiane à J 16. Le mécanisme de ce nouvel effet indésirable restait à identifier ³⁷⁶. Un cas pris en charge en Italie a ensuite été rapporté ³⁷⁷, suivi d'une seconde série allemande de 3 cas d'hémolyse différée, au cours de laquelle les auteurs pointaient le rôle potentiel d'une parasitémie élevée dans la survenue de l'évènement ³⁷⁸.

b. Caractéristiques de l'anémie et amplitude du problème

Il s'agit d'une anémie hémolytique aiguë survenant en général entre 7 et 14 jours post traitement. Les causes usuelles d'hémolyse, corpusculaires (déficits enzymatiques, maladies génétiques de l'hémoglobine ou du cytosquelette de l'hématie) ou non corpusculaires (microangiopathie thrombotique, anémie hémolytique auto immune...) ne sont pas impliquées. L'anémie est en règle modérée (perte en médiane d'1,3 g/dl d'hémoglobine), mais dans une série française de 123 patients traités par artésunate, 27% ont présenté une hémolyse retardée, dont 15% à moins de 7 g/dl ³⁷⁹.

Dans une cohorte pédiatrique gabonaise et ghanéenne traitée par artésunate, l'incidence de l'hémolyse retardée était estimée à 7%, et les facteurs de risque de survenue étaient le jeune âge et

une parasitémie élevée ³⁸⁰. Une autre étude menée au Nigeria sur 609 enfants traités par ACT a retrouvé une incidence d'anémie retardée de 14%, mais sévère dans un seul cas ³⁸¹.

c. Le mécanisme progressivement élucidé

L'équipe conjointe Mahidol/Oxford avait déjà, il y a presque 20 ans, démontré que la durée de vie des hématies pitées était nettement plus longue que celle des hématies parasitées, mais plus courte que celle des hématies normales ²⁹⁷, et suspecté que le site de destruction des hématies pitées était la rate.

Notre équipe, via l'analyse des données épidémiologiques, cliniques et biologiques du paludisme d'importation en France, a pu démontrer que la survenue de l'hémolyse différée (PADH : Post Artesunate Delayed Hemolysis) était synchronisée de la disparition des hématies pitées. Les sujets atteints de PADH présentaient un plus haut taux de pitting en post-accès immédiat, et ces hématies pitées disparaissaient de la circulation de manière synchronisée de l'épisode hémolytique ²⁹⁵ (figure 27). Le mécanisme précis de la perte de ces hématies pitées est en cours d'exploration.

La PADH pouvant être cliniquement significative (nécessité de transfusion, voir insuffisance rénale aiguë par hémoglobinurie), sa prédiction en zone endémique est un enjeu majeur afin de suivre attentivement les patients les plus à risque dans un contexte de ressources contraintes. Une protéine plasmodiale (HRP2: Histidin-Rich Protein 2) s'est avérée être présente, au même titre que RESA, au sein des hématies pitées. HRP2 étant utilisé dans les bandelettes de diagnostic immunochromatographique du paludisme, notre équipe a pu montrer que la positivité d'une telle bandelette réalisée sur sang total dilué au 1 :500, 3 jours après le début du traitement par artésunate, permettait de prédire efficacement la survenue d'une PADH ⁶¹. Ces bandelettes étant déjà largement utilisées sur le terrain, ce test est particulièrement adapté à la pratique clinique en zone endémique.

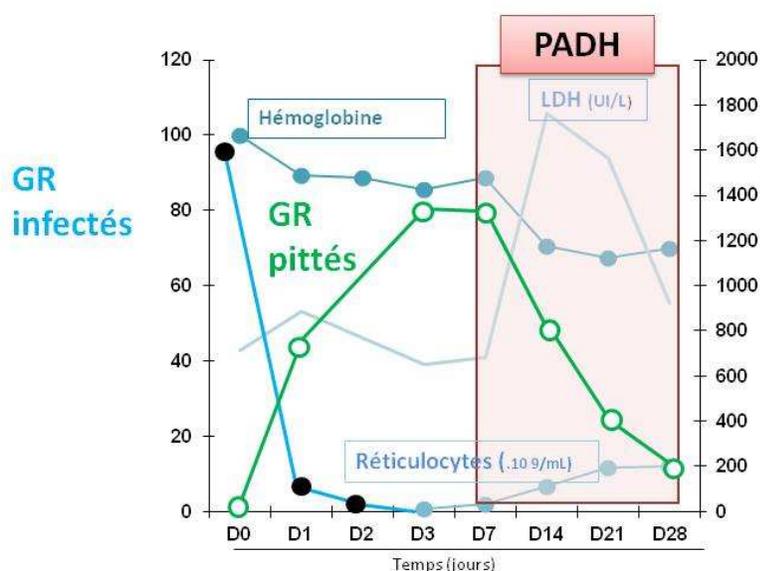


Figure 27 : Cinétique temporelle (de J0 à J28), chez un patient traité par artésunate, des taux d'hémoglobine, des réticulocytes, des LDH, des hématies infectées (en bleu) et pitées (en vert). La fenêtre

rouge correspond à l'apparition de l'hémolyse différée post-artésunate (augmentation des marqueurs d'hémolyse, baisse de l'hémoglobine et disparition des hématies pitées). D'après Buffet et Ndour.

H. Rôle dans la transmission de la maladie

1. La rate est une cible privilégiée des approches anti-transmission

a. Gamétocytogenèse chez *P. falciparum*

Les gamétocytes correspondent aux formes sexuées du développement de *Plasmodium*, et sont les seules responsables de sa transmission au moustique. On considère que 0,1 à 5% de la biomasse parasitaire, à chaque cycle de réplication, s'oriente vers la gamétocytogenèse.

Les gamétocytes mûrissent progressivement du stade I au stade V, sur une durée de 10 jours environ chez *P. falciparum*. Les réorganisations du cytosquelette parasitaire rendent compte de changements morphologiques : acquisition progressive d'une forme allongée, aspect de faucille des gamétocytes matures (à l'origine du nom d'espèce *falciparum*). Les facteurs modulant l'intensité de la gamétocytogenèse chez *P. falciparum* sont nombreux : âge, statut immunitaire vis-à-vis du parasite, anémie, biomasse parasitaire, exposition aux antipaludiques...³⁸². Le parasite s'oriente vers la gamétocytogenèse en reprogrammant son expression génique, notamment sous l'influence du facteur de transcription PfAP2-G. De profonds remaniements du transcriptome et du protéome, en comparaison aux stades asexués, ont été mis en évidence au sein des gamétocytes.

b. Rétention intra splénique des gamétocytes

La distribution tissulaire des gamétocytes au cours de leur maturation est particulière : les stades I à IV sont séquestrés dans les espaces extravasculaires de la moelle osseuse^{5,7} (plus précisément dans les îlots érythroblastiques,⁶) de manière prédominante, ainsi que dans la rate.

Les études autopsiques réalisées à la fin du 19^{ème} siècle avaient déjà mis en évidence une accumulation de gamétocytes dans le tissu splénique⁷. La rétention intra-splénique est également suggérée par la présence de gamétocytes immatures en circulation chez les patients aspléniques³⁸³, alors qu'ils n'y sont que très rarement vus chez le patient dont la rate est fonctionnelle. La déformabilité des gamétocytes est très réduite du stade I à IV, puis est rapidement restaurée au stade V, permettant la circulation des gamétocytes matures dans le sang périphérique et leur possible absorption par l'anophèle^{384,385}.

Les déterminants de cette localisation médullaire et splénique des gamétocytes immatures ne sont pas encore précisément connus. La diminution de la déformabilité des gamétocytes immatures rend une rétention dans la pulpe rouge de la rate très vraisemblable. Il est bien sûr possible que des interactions moléculaires entre hématies contenant des gamétocytes et populations cellulaires

médullaires et spléniques (macrophages, cellules résidentes, cellules endothéliales sinusales ou non) participent également à cette rétention.

c. Intérêt du sildénafil ?

Après avoir décrit la rétention mécanique des globules rouges parasités dans la rate humaine isolée - perfusée, le groupe de chercheurs pasteurien ayant posé les fondations de mon équipe d'accueil a conceptualisé dès 2008 une stratégie de blocage de la transmission du paludisme reposant sur la clairance mécanique chimio-induite des gamétocytes matures de *P. falciparum*³⁸⁶. En collaboration avec une autre équipe française³⁸⁵, la rétention mécanique spontanée des gamétocytes immatures et la déformabilité des gamétocytes matures de *P. falciparum* a été montrée expérimentalement ainsi que son lien avec la famille multi protéique parasitaire STEVOR, la kinase A et l'adénosine mono phosphate cyclique (AMPC), qui sont inhibés par une phosphodiesterase parasitaire, et modulent la déformabilité des gamétocytes³⁸⁷. Cette phosphodiesterase peut être pharmacologiquement inhibée, la conséquence étant donc une rigidification persistante des gamétocytes. Le sildénafil est un inhibiteur de la phosphodiesterase PDE5 utilisé dans la dysfonction érectile³⁸⁸ ou l'hypertension pulmonaire³⁸⁹ depuis plus de 10 ans. L'administration de sildénafil à visée anti transmission est donc une approche séduisante, qui cependant doit être tempérée par les résultats d'une récente étude évaluant le sildénafil dans la retard de croissance intra utérin, qui s'est hélas soldée par un arrêt prématuré pour excès de décès de nourrissons dans le bras sildénafil³⁹⁰.

d. criblage à haut débit de composés pharmacologiques anti transmission

La possibilité de soumettre à la microsiphiltraion un grand nombre simultané d'échantillons grâce à l'adaptation de la méthode aux microplaques 96 ou 384 puits^{391,392} a ouvert la voie à une stratégie de screening à haut débit de composés pharmacologiques. Des cultures de gamétocytes de *P. falciparum* sont réalisées³⁹³, puis exposées aux composés. Une campagne de screening est actuellement en cours via une collaboration entre l'équipe d'accueil et la Fondation OpenLab (GlaxoSmithKline Openlab Foundation, Tres Cantos, Espagne) (Carucci M *et al.*, in preparation).

2. La persistance de formes intra spléniques pourrait pérenniser la transmission

Comme développé ci-dessous, l'observation d'accès palustres aigus quelques semaines après splénectomie chez des sujets porteurs chroniques de parasites^{383,394} a, dans un cas pris en charge en Allemagne, permis une observation intéressante : la souche de *P. falciparum* en circulation était dépourvue d'adhésines parasitaires (en particulier PfEMP1) immédiatement après remise en culture. Cette expression est réapparue après un mois de culture³⁸³. Cette observation peut faire poser l'hypothèse d'une rétention splénique très stringente chez ces sujets⁹⁰, responsable d'une répllication parasitaire à bas bruit, intra pulpe rouge, et limitant au maximum la circulation des parasites dans le sang périphérique (en la maintenant sous le seuil de détection des méthodes optiques conventionnelles) (figure 28). La sélection de clones parasitaires dépourvus d'adhésines pourrait être la conséquence d'une immunité anti parasitaire humorale particulièrement intense. La rareté de cette

observation n'a pas permis de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse « hyper-rétensive » évoquée ci-dessus.

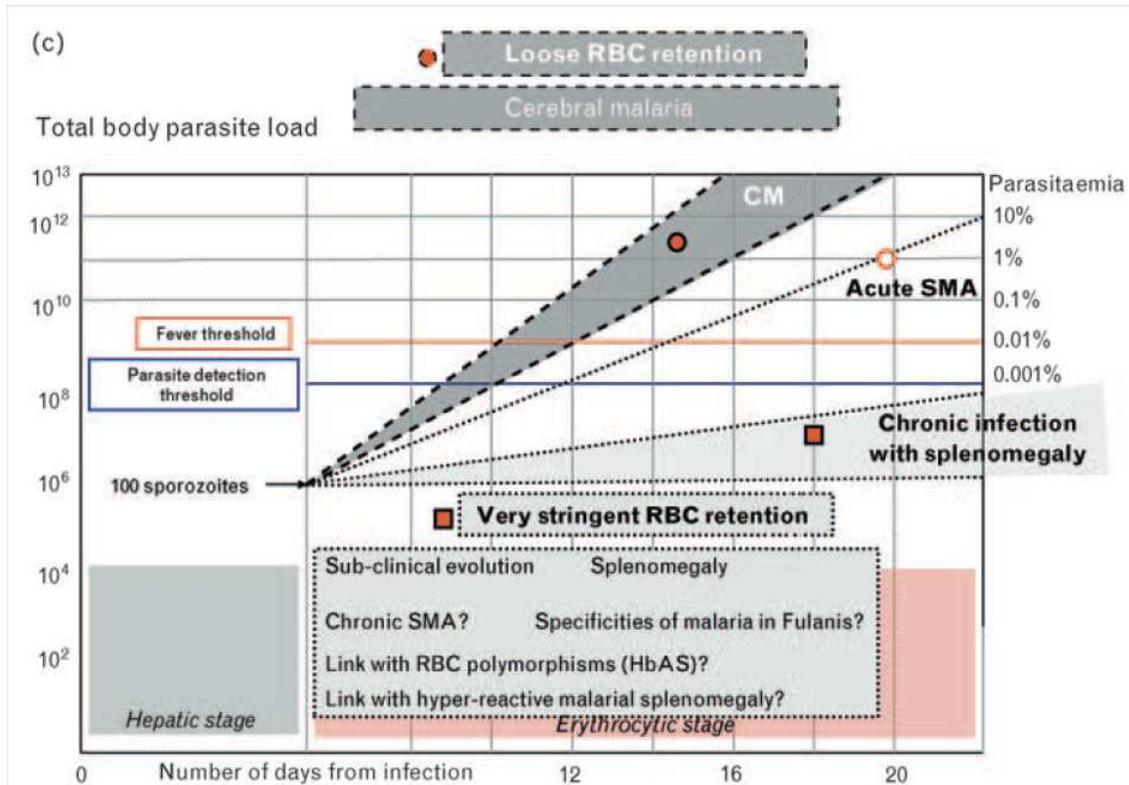


Figure 28 : Modélisation en fonction du temps (en abscisse) de la charge parasitaire globale (et de la parasitaémie) selon l'importance de la filtration splénique des hématies infectées et non infectées. La zone gris foncé correspond à une rétention modeste (« loose retention »), laissant ainsi la charge parasitaire périphérique s'élever à des niveaux importants et favorisant la séquestration, et donc le neuropaludisme. A l'inverse, une rétention très stricte est représentée en gris clair, ne laissant que très peu s'élever la charge parasitaire. D'après ³⁹⁵.

I. Rate et portage chronique de parasites

1. La rate pourrait limiter la densité parasitaire lors du portage chronique

La prévalence du portage chronique au sein d'une population exposée à *Plasmodium* varie avec l'âge, l'intensité de l'exposition préalable au parasite, l'accès aux antipaludiques, la saison, et la méthode diagnostique utilisée pour définir le portage.

Il n'existe que très peu de données cliniques sur l'existence d'une splénomégalie dans le portage chronique de parasites. Une étude transversale portant sur 214 enfants ghanéens a mis en évidence une association statistique entre portage chronique asymptomatique et splénomégalie (mesurée échographiquement) ainsi qu'avec une anémie³⁹⁶. D'autres études ont montré une association entre portage de parasites et splénomégalie en zone endémique mais ne précisent généralement pas la proportion de patients symptomatiques.

Fort de ces observations et du regroupement particulier des formes cliniques de paludisme grave (association fréquente anémie-splénomégalie-absence de symptômes neurologique) il est tentant de proposer que la capacité de la rate à retenir les hématies infectées et non infectées contribue au contrôle de la charge parasitaire circulante et donc au contrôle des symptômes liés à l'infection plasmodiale³⁹⁵. La contribution relative de ce phénomène par rapport à d'autres mécanismes physiologiques majeurs tels que l'immunité est cependant d'appréciation difficile chez l'être humain.

2. Participation splénique à l'anémie du portage chronique

a. Anémie et portage chronique

Il existe une association statistique entre anémie et parasitémie chronique en zone endémique³⁹⁶. La démonstration de cette association est cependant rendue complexe par le grand nombre de facteurs confondants qui ne sont que rarement entièrement pris en compte: dénutrition et carence martiale (parfois due à des infections helminthiques telles que l'ankylostomiase, fréquente en zone tropicale), la splénomégalie liée à une bilharziose chronique...

b. Participation splénique?

Le rôle de la rate dans l'anémie du portage chronique n'est pas formellement établi.

Au plan observationnel, quelques séries cliniques ont pointé une association entre splénomégalie et anémie en zone endémique³⁹⁷⁻⁴⁰⁰ sans que l'orientation d'un éventuel lien de causalité ait été établi.

J. En résumé.

La rate, via son rôle de sentinelle immunologique et de contrôle de la qualité des hématies circulantes, joue un rôle important dans la physiopathologie du paludisme. Malgré son exploration difficile en pratique chez l'être humain, et le manque de modèles animaux pertinents, plusieurs éléments convergent vers un rôle protecteur de la rate possiblement via la rétention de formes jeunes dans l'accès aigu, mais aussi potentiellement dans le portage chronique. Le rôle de la rate est également majeur dans la clairance parasitaire après traitement antiparasitaire, via le phénomène de pitting, qui génère des hématies « préalablement infectées » dont la disparition est à l'origine des hémolyses

retardées post-artésunate. La rate est également le lieu de rétention d'une importante proportion des gamétocytes de *P. falciparum*, en faisant ainsi une cible privilégiée des approches anti transmission. Un rôle délétère est cependant possible via une contribution à l'anémie palustre parfois grave, et beaucoup plus rarement, via une forme particulière de paludisme chronique, la splénomégalie palustre hyper réactive. Cette forme sera détaillée au chapitre suivant.

K. La splénomégalie palustre hyper réactive et ses complications

1. De la splénomégalie tropicale idiopathique à la splénomégalie palustre hyper réactive (figure 29)

Le démembrement de cette entité a été très progressif : le concept de splénomégalie tropicale a émergé au début du 20^{ème} siècle. Ce terme a été cité par Sir Charles Manson en 1904, à propos de tableaux cliniques de splénomégalie massive, chronique, essentiellement importés d'Inde et possiblement liés, en réalité, à des leishmanioses viscérales ^{401,402}.

En 1956, Chaudhuri *et al.*, au cours de l'exploration de patients atteints de splénomégalie chronique en Inde, remarquent des infiltrats lympho-plasmocytaires sur l'histologie hépatique ⁴⁰³. Simultanément, à Aden, Fawdry constate l'existence de tableaux associant splénomégalie persistante, anémie et hépatomégalie, qu'il suspecte d'être dues à l'infection palustre ⁴⁰⁴. Des tableaux cliniques analogues seront par la suite décrits dans toutes les zones de transmission du paludisme.

En 1957, Charmot *et al.*, à Madagascar, devant des tableaux similaires associés à une élévation des IgM totales, introduisent le concept de splénomégalie avec macroglobulinémie, et supposent, sans preuve formelle, un lien étiologique avec le paludisme, la maladie ne survenant qu'en zone d'endémie palustre. Le concept d'une réaction immunitaire exagérée à l'infection palustre est évoqué. En 1964, Gebbie *et al.* mettent en évidence des taux élevés d'anticorps anti *Plasmodium* chez 40 patients ougandais porteurs d'une splénomégalie tropicale (splénomégalie majeure et infiltrats lymphocytaires des sinusoides hépatiques) ⁴⁰⁵. En 1967, Watson-Williams et Allan, au Nigeria, constatent une régression de la splénomégalie après un traitement anti paludique prolongé par proguanil, ceci constituant un argument supplémentaire pour l'origine palustre de la splénomégalie tropicale ⁴⁰⁶. A la fin des années 1960, Wells, en Papouasie-Nouvelle-Guinée, entreprend une étude des caractéristiques immunologiques des patients atteints de splénomégalie tropicale, et met en évidence des stigmates d'auto-immunité ⁴⁰⁷, une élévation des IgM totales ⁴⁰⁸, et montre que cette élévation des IgM est d'aspect polyclonal ⁴⁰⁹. Ziegler montre également au même moment que l'hyper-IgM peut régresser après splénectomie ⁴¹⁰.

Les premiers critères diagnostiques de la splénomégalie tropicale apparaissent sous l'impulsion de Bryceson au Nigeria : IgM totales supérieures à 2 fois la déviation standard pour la population générale, lymphocytose sinusoidale hépatique, réponse des lymphocytes conservée après stimulation par la phytohématagglutinine, amélioration clinique sous proguanil ⁴¹¹.

C'est en 1983 que Decock *et al.* proposent de modifier les critères diagnostiques de la splénomégalie tropicale afin d'en expliciter l'origine palustre ⁴¹². Bryceson *et al.*, au même moment, proposent de remplacer le terme de splénomégalie tropicale par celui de splénomégalie palustre hyper réactive (SPH), terme jugé plus précis qui renvoie à l'origine palustre du syndrome, et aux anomalies immunitaires qui s'y rapportent ⁵⁸.

En 1997, Bates & Bedu-Addo proposent une modification des critères diagnostiques de la SPH afin de tenter de mieux différencier SPH et lymphoprolifération de bas grade, et de s'affranchir des critères histologiques hépatiques qui se sont avérés non spécifiques. Cette réflexion aboutit à proposer les critères suivants : splénomégalie de plus de 10 cm sous le rebord costal, IgM sériques totales supérieures à 2 fois la déviation standard après la moyenne, réponse à un traitement antipaludique (réduction de 40% de la taille de la rate) et prolifération lymphocytaire polyclonale ⁴¹³.

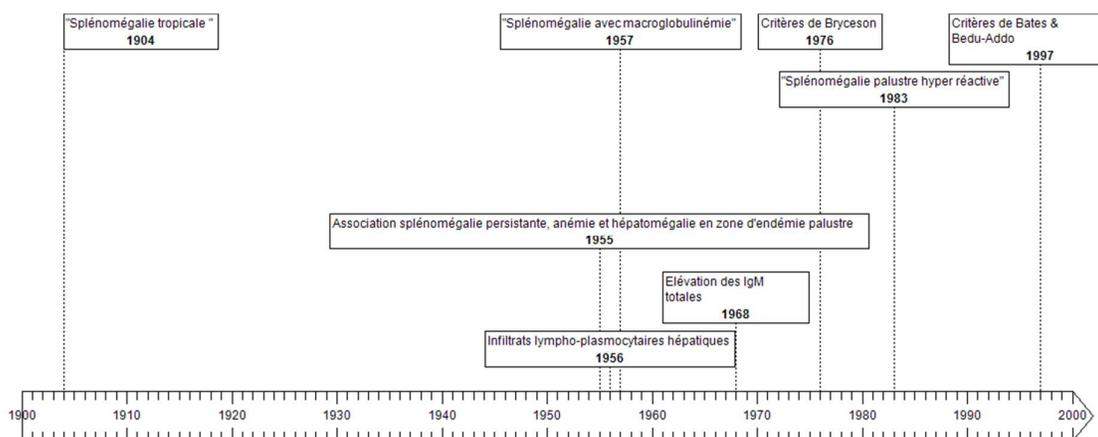


Figure 29 : Evolution temporelle des dénominations nosologiques et des principales découvertes physiopathologiques de la SPH.

2. Amplitude du problème

Il n'existe que très peu d'études épidémiologiques solides sur la prévalence de la SPH. En outre, la variabilité des définitions phénotypiques, l'évolution au cours du temps des critères diagnostiques, les disparités dans l'exhaustivité des diagnostics différentiels de la splénomégalie compliquent l'analyse. Une série de sujets splénomégaliques au Kenya a été rapportée par De Cock *et al.* en 1987: la SPH représentait 31% du total ⁴¹⁴. Une étude similaire menée au Nigeria sur 75 sujets splénomégaliques aboutissait au diagnostic de splénomégalie tropicale dans 40% des cas ⁴¹¹. Enfin, une étude menée plus récemment au Ghana chez 221 patients présentant une splénomégalie importante (débord de plus de 10 cm), posait un diagnostic de SPH dans 41% des cas ⁴¹⁵ après une enquête diagnostique soigneuse. Nous n'avons pas trouvé d'études plus récentes.

3. Une physiopathologie qui reste à élucider

Une agrégation familiale a été mise en évidence par une étude menée au Ghana : les apparentés à des sujets atteints de SPH étaient significativement plus susceptibles de présenter un tableau de splénomégalie, anémie et hyper IgM que les sujets contrôles ⁴¹⁶. Ziegler et Stuver, 34 ans plus tôt, avaient également observé une agrégation familiale de cas de splénomégalie tropicale en Ouganda ⁴¹⁷. Le mode de transmission de la SPH ne semble pas mendélien, et les études menées dans le domaine de la prédisposition génétique au paludisme n'ont jusqu'ici pas investigué le champ de la SPH.

Anatomopathologie splénique: des séries d'examens anatomopathologiques post-splénectomie dans des cas de splénomégalie tropicale existent, mais souffrent d'imperfections techniques. En 1967, Pryor *et al.* Au cours de l'examen d'une série de splénectomies réalisées pour splénomégalie tropicale, retrouvent une congestion de la pulpe rouge et une érythrophagocytose marquée. Une pièce de splénectomie réalisée sur un patient soudanais pris en charge au Texas montrait également une intense congestion de la pulpe rouge, qui était aussi siège de dépôts d'hémosidérine ⁴¹⁸. Un diagnostic de possible SPH fut fait rétrospectivement chez un patient chinois ayant présenté un accès aigu à *P. malariae* un mois après splénectomie. L'examen de la rate retrouvait là encore une congestion importante de la pulpe rouge, avec infiltration de plasmocytes ⁴¹⁹. Dans toutes ces études, la description de la pulpe blanche est sommaire ou absente.

Le modèle physiopathologique souvent proposé pour la SPH est essentiellement construit sur des explorations immunologiques réalisées dans le sang périphérique. Un déficit en cellules T régulatrices (par production d'anticorps anti lymphocytes) mènerait à une expansion B polyclonale après infection palustre, donc à une hyperproduction d'IgM, une formation d'immuns complexes destinés à être phagocytés dans le système réticulo-endothélial, ceci provoquant la splénomégalie. Ce mécanisme peut expliquer l'hyper-IgM mais est en contradiction avec les données anatomopathologiques, où l'expansion du compartiment phagocytaire n'a pas été décrite. Cette construction n'explique pas non plus l'anémie et la charge parasitaire particulièrement basse dans la SPH.

Une rétention intra-splénique intense d'hématies parasitées qui disparaît après splénectomie a également été évoquée, appuyée par la constatation d'accès palustres aigus survenant après splénectomie pour SPH en zone non endémique ^{383,394}. Il faut noter que dès 1935, alors que la splénomégalie tropicale était très mal comprise, un cas d'accès palustre aigu survenant très rapidement après splénectomie pour splénomégalie chronique inexplicée avait été décrit ⁴²⁰. Par ailleurs, en 1967, dans une cohorte de patients atteints de splénomégalie tropicale en Papouasie Nouvelle Guinée, Pryor avait étudié la masse globulaire et sa répartition grâce à la réinjection d'hématies autologues marquées au chrome 51. Dans le groupe splénomégalie, une diminution de la durée de vie de ces hématies, par destruction intra splénique, avait été notée ⁴²¹.

4. Tableau clinique

La présence d'une splénomégalie est un critère obligatoire du diagnostic. Celle-ci est massive, en règle mesurant 10 cm sous l'auvent costal (score de Hackett III-IV ²²⁹). Une hépatomégalie modérée a été décrite. Des accès fébriles en règle peu intenses ont été décrits, mais sont très inconstants. L'altération de l'état général est inconstante également, et doit faire suspecter une anémie profonde ou le développement d'un lymphome.

5. Anomalies biologiques

a. Examens parasitologiques

La parasitémie est en règle faible ou nulle lorsqu'évaluée par méthodes optiques. La PCR *Plasmodium* sanguine peut permettre de détecter une parasitémie à bas bruit. Quelques cas de SPH ont été décrits en association à des espèces non *falciparum* ^{419,422-424} mais la certitude de la responsabilité d'une espèce non *falciparum* dans la genèse d'une authentique SPH reste à démontrer. La sérologie *Plasmodium* est positive chez tous les patients.

b. Biochimie

On retrouve, par définition, une élévation des IgM totales, s'avérant polyclonale en immunofixation. Cette hyper IgM précède en règle la splénomégalie clinique.

c. Au plan hématologique

Il peut exister un certain degré de cytopénies, attribuées à un hypersplénisme. Le frottis sanguin peut rechercher la présence de lymphocytes villeux (présentant des ramifications décrites comme des cheveux), qui doivent faire suspecter une évolution vers un lymphome splénique de bas grade avec contingent circulant (leucémie/lymphome). La recherche d'une clonalité B par biologie moléculaire et cytométrie de flux est dans ce cas très importante.

d. Immunologie

Des signes biologiques d'auto immunité ont également été décrits dans la SPH, même s'ils ne font pas partie des critères diagnostiques officiels : cryoglobulinémie, facteur rhumatoïde, anticorps anti nucléaires ou anti érythrocytaires positivant le test de Coombs. Récemment, un aspect particulier des facteurs anti nucléaires en immunofluorescence (fluorescence cytoplasmique diffuse avec rehaussement périnucléaire, fluorescence intranucléaire mouchetée) a été décrit au cours de portages chroniques de *P. falciparum* ⁴²⁵ (figure 30).

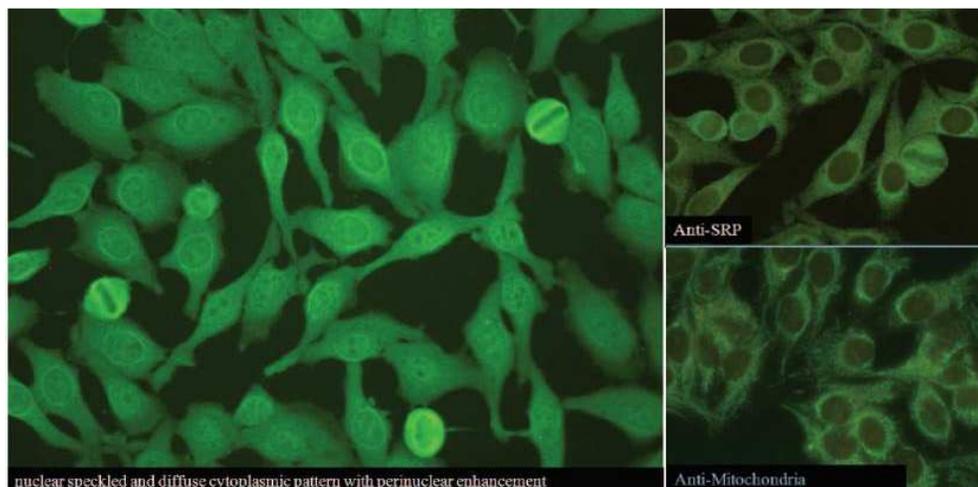


Figure 30 : Aspect en microscopie à fluorescence d'anticorps anti nucléaires associés à la SPH : aspect de fluorescence diffuse avec rehaussement péri nucléaire et aspect moucheté du noyau. A titre de comparaison sont présentés sur la droite un aspect d'anticorps anti SRP (associé à certaines myosites) et anti-mitochondries (associés à la cirrhose biliaire primitive). D'après ⁴²⁵.

6. Evolution

L'évolution de la SPH est mal connue. Des séries historiques décrites en Papouasie Nouvelle Guinée font état d'une mortalité importante, de l'ordre de 50%. Cette mortalité était attribuée à un excès d'infections bactériennes, par dysfonction splénique. En réalité, ces données sont assez imprécises, la cause du décès étant rarement établie de façon solide. A l'instar de l'épidémiologie, nous manquons de données actualisées sur la morbi-mortalité de la SPH, et ignorons s'il existe réellement une dysfonction splénique dans cette pathologie.

Des cas d'anémie hémolytique aiguë compliquant l'évolution d'une SPH, certains liés à des agglutinines froides, ont été décrits ⁴²⁶.

Un continuum allant d'un syndrome pré-SPH (splénomégalie modérée ne remplissant pas les critères de 1997 et hyperIgM chez des sujets dont la sérologie palustre était positive) jusqu'à forme typique de la SPH a été suggéré par une équipe belge ⁴²⁷, puis repris par une équipe italienne, l'évolution clinique en cas de pré-SPH se faisant la plupart du temps vers une SPH avérée en l'absence de traitement antiparasitaire ⁴²⁸. Après traitement, la régression du tableau est lente : l'hyper IgM régresse en moyenne en 4,6 mois, la splénomégalie en 8,8 mois ⁴²⁹.

Chez les sujets atteints de SPH et ré exposés au parasite après traitement, il existe une propension à la rechute sur le même mode, ceci renforçant l'hypothèse d'une prédisposition innée (Bisoffi Z *et al.* communication personnelle). Il existe enfin un risque d'évolution vers une lymphoprolifération de bas grade au cours de la SPH (cf infra).

7. Prise en charge

Le principe du traitement est de supprimer le stimulus antigénique parasitaire responsable du tableau.

Le traitement anti-parasitaire de la SPH n'est pas formellement codifié. Historiquement celui-ci était prolongé. Le proguanil a été notamment utilisé, ainsi que la chloroquine tant pour son efficacité antiparasitaire que pour ses propriétés immunomodulatrices qui ont parfois été considérées comme bénéfiques dans la SPH. Une équipe belge a montré ultérieurement qu'un traitement antipaludique court permettait de faire régresser progressivement une SPH ⁴²⁷. Ceci n'est cependant vrai que chez les patients n'étant pas soumis à une nouvelle exposition au parasite. L'efficacité de ses traitements antiparasitaires courts renforce l'hypothèse que l'élimination du stimulus parasitaire suffit à guérir la SPH si elle n'a pas encore évolué vers un lymphome autonomisé. La prise en charge de la SPH est plus délicate en zone endémique, où le traitement anti-parasitaire semble devoir être prolongé afin d'éviter la rechute ⁴³⁰.

La splénectomie doit si possible être évitée, afin d'éviter la morbidité liée à l'asplénie, a fortiori en zone endémique. En outre, il y a un risque de survenue d'un accès aigu en post splénectomie pour portage chronique de parasite. Ce risque est toutefois prévenu par un traitement antipaludique.

8. Le lymphome splénique non hodgkinien par stimulation chronique du système immunitaire

La possibilité que la splénomégalie tropicale se complique de lymphoprolifération avait déjà pointée lors d'une réunion organisée sur la splénomégalie tropicale à Londres en 1967 ⁴³¹. Par ailleurs, Allan & Watson-Williams, en 1964, signalaient l'existence d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC) particulière au Nigeria, comportant peu d'adénopathies, une splénomégalie très fréquente, et qui semblait régresser sous proguanil.

a. Les associations statistiques et mécanistiques entre paludisme et lymphomes non hodgkiniens.

Les liens ont été signalés entre exposition à *Plasmodium sp* et 3 types de lymphomes non hodgkiniens : le lymphome de Burkitt, le lymphome splénique de la zone marginale, et de manière encore plus rare le lymphome T $\gamma\delta$ hépatosplénique.

Le lymphome de Burkitt (du nom du chirurgien militaire anglais ayant décrit cette pathologie en Ouganda) est une pathologie lymphomateuse B très agressive, constituée de cellules B matures étant passées par la réaction du centre germinatif. Ce lymphome, dans sa forme endémique africaine, touche plus souvent les enfants, et atteint notamment la mandibule et le système nerveux central. La masse tumorale est souvent très importante, et son temps de doublement est particulièrement court. Une translocation chromosomique caractéristique de la maladie, la translocation (8;14), juxtapose l'oncogène MYC et le gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines. La forme dite endémique est liée au virus d'Epstein-Barr (EBV) et rend compte de la quasi-totalité des cas africains, l'autre est dite

sporadique. L'association épidémiologique avec le paludisme, pistée dès 1967, reposait sur le fait que les zones d'endémie pour le parasite et de répartition du lymphome se recouvraient; en outre les sujets ayant les taux d'anticorps anti *P. falciparum* les plus élevés étaient les plus à risque. La responsabilité de l'EBV, Herpesvirus oncogène infectant les lymphocytes B, dans la survenue du lymphome de Burkitt est connue depuis longtemps. L'infection à *P. falciparum* est responsable d'une dérégulation du contrôle immunitaire de l'EBV, favorisant ainsi la lymphomagenèse ⁴³². *P. falciparum* induit une augmentation du nombre de cellules B infectées par EBV qui entrent dans le centre germinatif, et une production dérégulée d'AID (Activation-induced Cytidine Deaminase), enzyme génératrice de coupures de l'ADN (figure 31). Ces phénomènes sont responsables d'une instabilité du génome et de translocations chromosomiques plus fréquentes, dont la translocation (8;14) ^{433,434}. Au plan moléculaire, le domaine cystein-rich inter-domain region 1alpha (CIDR1α) de la protéine PfEMP1 possède des propriétés d'activation lymphocytaire B polyclonale ⁴³⁵. Il a été montré *in vitro* que ce domaine CIDR1α est capable de faire passer les cellules B infectées de manière latente par l'EBV à la phase d'infection lytique, productrice de nouvelles particules virales. Cette activation pourrait favoriser la lymphomagenèse ⁴³⁶. Il faut cependant noter qu'une partie des travaux ayant mené à ces conclusions a utilisé le modèle murin d'infection à *P. chabaudi*. Aucun lien entre lymphome de Burkitt et SPH n'a été mis en évidence en dehors d'un cas isolé de probable coexistence des 2 pathologies ⁴³⁷.

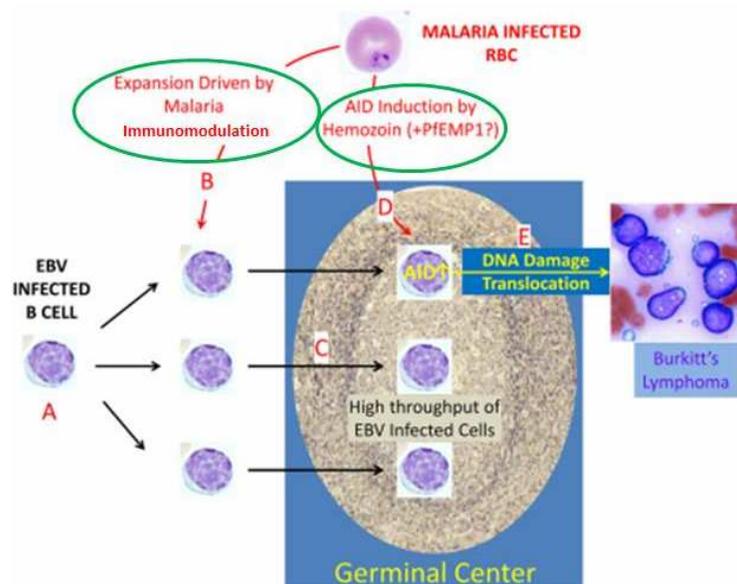


Figure 31 : Modèle physiopathologique du lymphome de Burkitt dans sa forme endémique illustrant les liens avec le virus EBV et *P. falciparum*. Les cellules B sont infectées par EBV (A). *P. falciparum* promeut une expansion du compartiment B (B) ce qui majore la quantité de cellules B entrant dans le centre germinatif. *P. falciparum* est également capable, dans ces cellules B, de majorer la production de l'enzyme AID, ce qui a pour conséquence une instabilité génétique des cellules B et donc un plus grand risque de transformation néoplasique. D'après ⁴³⁸.

Les liens épidémiologiques et physiopathologiques entre paludisme chronique et *lymphoproliférations de bas grade* ont été signalés après les études sur le lien avec le lymphome de Burkitt. Le lymphome splénique à lymphocytes villos (Splenic Lymphoma with Villous Lymphocytes : SLVL, qui est un lymphome de la zone marginale) a été décrit en Afrique pour la première fois au Ghana, et les auteurs

pointaient d'emblée les similitudes clinico-biologiques importantes entre ce lymphome et la SPH : splénomégalie importante, lymphocytose périphérique ⁴³⁹. Une équipe anglaise a montré la forte prévalence des lymphocytes villeux dans le sang périphérique de sujets SPH (figure 32). Chez certains de ces sujets SPH, la lymphocytose était clonale en Southern blot, confirmant l'existence d'une lymphoprolifération autonomisée ⁴⁴⁰. Des résultats similaires ont été obtenus en recherchant cette clonalité par biologie moléculaire ⁴⁴¹. L'existence d'un continuum entre la SPH avec lymphocytes villeux et le lymphome splénique avéré a donc été proposée. En outre, la splénomégalie semble plus fréquente dans un autre syndrome lymphoprolifératif, la LLC, en Afrique qu'en Europe. Afin de tenter de différencier plus finement la SPH du lymphome splénique, la première entité pouvant régresser sous traitement antipaludique seul, les critères diagnostiques de la SPH ont été modifiés pour ajouter l'exclusion d'une lymphocytose monoclonale circulante. Enfin, une étude épidémiologique cas-témoin réalisée sur une cohorte italienne de 2669 cas atteints de divers syndromes lymphoprolifératifs et 1718 contrôles a retrouvé une association entre accès palustres dans l'enfance de lymphoprolifération de bas grade. Ceci n'a cependant pas été confirmé ⁴⁴².

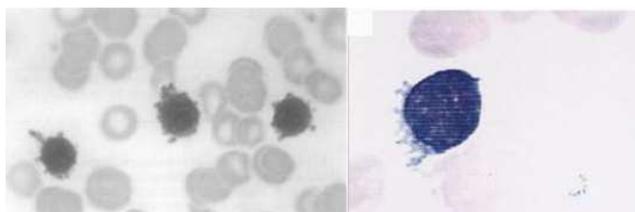


Figure 32 : Frottis sanguins mettant en évidence des lymphocytes villeux après coloration de Wright (à gauche) ou May-Grunwald-Giemsa (à droite) chez des patients atteints de SLVL. D'après ^{440,443}.

De manière beaucoup plus confidentielle, les liens entre *lymphomes T* et paludisme chronique ont été signalés: dans une série de 21 patients atteints de lymphome T $\gamma\delta$ hépatospléniques, 2 avaient rapporté des antécédents d'accès palustre, mais aucun n'était atteint de SPH ⁴⁴⁴. Deux cas de SPH se compliquant de lymphome T $\gamma\delta$ hépatosplénique ont été décrits, l'un en Guyane française ⁴⁴⁵, l'autre au Brésil ⁴⁴⁶, mais les tableaux clinico-biologiques étaient en réalité incomplets (absence d'hyper IgM, de sérologie palustre). Il faut cependant noter que ce type de lymphome prend son origine dans la pulpe rouge splénique, ce qui suggère un possible lien physiopathologique avec le paludisme.

Enfin, un autre type de lymphome, nommé *lymphome B splénique diffus de la pulpe rouge*, a été récemment décrit ⁴⁴⁷. Ce lymphome présente comme le SLVL un contingent circulant de lymphocytes villeux. En revanche, l'anatomopathologie splénique retrouve un infiltrat lymphocytaire limité à la pulpe rouge, une pulpe blanche atrophique, des particularités phénotypiques et mutationnelles. Le lien potentiel entre ce lymphome et le paludisme n'a pas encore été exploré.

b. Analogie avec l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC).

L'infection chronique par le VHC peut parfois se compliquer de cryoglobulinémie de type III, qui peut elle-même être compliquée de lymphome splénique de la zone marginale dans sa variante comportant des lymphocytes villeux circulants. Le traitement antiviral fait régresser le contingent tumoral circulant et la splénomégalie, et les rechutes virologiques s'accompagnent de réapparition des cellules tumorales ⁴⁴⁸. La stimulation antigénique chronique s'effectuant sur les cellules B de la zone marginale en cas de virémie VHC prolongée pourrait comporter un certain degré d'analogie avec celle de la SPH.

Une éventuelle régression d'une pathologie clonale non complètement autonomisée après traitement antipaludique n'a pas été objectivée, mais les moyens techniques pour mettre en évidence cette régression n'étaient jusqu'à maintenant pas disponibles en zone endémique.

D'autres agents infectieux ont été associés à des lymphoproliférations de bas grade de type lymphome de la zone marginale : *Campylobacter jejuni* et immunoprolifération de l'intestin grêle (qui appartient au sous-type des lymphomes du tissu lymphoïde associé aux muqueuses : MALT), *Borrelia* et lymphomes cutanés de bas grade, *Helicobacter pylori* et lymphome du MALT gastrique, *Chlamydia psittaci* et lymphome des annexes oculaires; dans ces modèles, la pathologie semble évoluer d'une prolifération polyclonale peu agressive à une prolifération monoclonale maligne, le premier stade étant sensible aux anti-infectieux, le second étant « autonomisé » et ne régressant pas sous anti-infectieux seuls ⁴⁴⁹. Un tel cheminement n'a pas été formellement objectivé au sein du continuum suspecté SPH – lymphome splénique. Cependant, une recherche de clonalité du récepteur B (B Cell Receptor : BCR) a été réalisée dans un collectif de sujets ghanéens atteints de SPH et séparés en 3 groupes selon la réponse clinique au proguanil (réponse complète, partielle, absente) : le réarrangement n'était jamais retrouvé en cas de réponse complète, toujours en cas de réponse absente et 2 fois sur 13 en cas de réponse partielle, ceci renforçant l'idée d'une évolution progressive vers une pathologie clonale ⁴⁵⁰. Déjà en 1970, une équipe nigériane notait que des patients atteints de splénomégalie tropicale et non répondeurs au proguanil évoluaient souvent vers un lymphome splénique ou une LLC ⁴⁵¹.

9. En résumé

La SPH reste une pathologie mystérieuse et nous ne connaissons pas précisément son incidence et sa prévalence. Son démembrement phénotypique a été très progressif, rendu complexe en partie par sa survenue très prédominante dans des régions du monde souvent pauvres en ressources sanitaires et technologiques. Sa physiopathologie comporte une part immunologique indéniable, mais une explication purement immunologique rendrait difficilement compte de la splénomégalie, qui semble être essentiellement congestive et non infiltrative. Son substratum génétique est suspecté sur des données épidémiologiques fiables, mais n'a pas encore été exploré plus finement. Enfin, la possibilité d'un continuum entre SPH et SLVL repose sur des données observationnelles intéressantes, mais là encore, nous manquons de données épidémiologiques et mécanistiques récentes à plus grande échelle.

10. Ethnie Peulh et splénomégalie palustre hyper-réactive

En 1987, Greenwood *et al.* avaient montré que la SPH était une pathologie sur-représentée chez les Peulhs ²¹².

Il existe de nombreuses similarités entre le « phénotype Peulh » et la SPH : la splénomégalie est très fréquente dans le premier cas (c'est le trait phénotypique le plus représenté dans les études publiées) et constante dans le second. L'hyper IgM, ainsi que la positivité de la sérologie palustre à titre élevé ont également été constatées dans les 2 situations. La charge parasitaire est volontiers faible chez les Peulhs, et souvent très faible dans la SPH. Enfin, le caractère possiblement héritable de la SPH expliquerait l'agrégation ethnique.

V. Problématique du travail de thèse

L'étude de la SPH est rendue désormais difficile par le très faible nombre de cas importés. En zone endémique, la prévalence est supposément plus importante, mais est mal connue et se heurte à la complexité du recueil de certains critères diagnostiques comme le dosage des IgM. Nous avons choisi de tirer parti des nombreuses similitudes phénotypiques entre « phénotype Peulh » (cf infra) et SPH pour tenter de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant cette forme atypique de portage chronique de parasites.

A. Retrouve-t-on au Bénin les mêmes différences inter-ethniques au plan du phénotype palustre qu'au cours des études déjà publiées ?

Nous avons, pour ce faire, tenté de répondre à plusieurs questions :

L'analyse de la littérature conduite au chapitre III de cette introduction amène à définir le « phénotype palustre Peulh » comme l'existence, en cas d'exposition chronique à *P. falciparum*, d'une splénomégalie, d'une charge parasitaire périphérique faible, d'une anémie, et d'une réponse immunitaire humorale anti palustre intense.

Le Bénin possède une communauté Peulh, mais les ethnies sympatriques sont différentes de celles des pays où les travaux sur l'ethnicité & le paludisme ont été menés (majoritairement le Burkina Faso et le Mali). Une analyse attentive de la littérature disponible nous a par ailleurs appris que le « phénotype Palustre Peulh » n'est pas constant, et est donc probablement aussi influencé par des facteurs environnementaux, parasitaires ou comportementaux. Ce phénotype est-il toujours retrouvé en 2016 au Bénin ?

B. Pouvons-nous aller plus loin dans l'exploration d'éventuelles variations inter-ethniques de la réponse immunitaire B ?

La plus grande amplitude et diversité de la réponse humorale des Peulhs semble acquise, mais ses mécanismes précis restent mal compris.

C. Quelle est la faisabilité technique et logistique d'une exploration de terrain d'un phénotypage érythrocytaire inter ethnique étendu ?

L'étude des interactions entre rate et hématies, notamment, est rendue complexe par les changements affectant les hématies après prélèvement.

D. Quel est la place des interactions rate-hématie (infectée ou non) dans la physiopathologie du phénotype Peulh-SPH ?

Nous avons en effet postulé dans ce travail que le niveau de stringence de la rétention splénique des hématies, dû à des facteurs spléniques et/ou érythrocytaires, pouvait influencer la présentation phénotypique de l'infection palustre ³⁹⁵. Si la rétention est stringente, une splénomégalie congestive, une anémie et une parasitémie faible pourraient survenir.

E. Quelle est la fonction splénique des Peulhs ?

Il n'existe pas de donnée solide sur d'éventuelles différences de fonctionnalité splénique inter ethniques en Afrique de l'ouest. L'apport de données dans ce domaine pourrait contribuer à éclaircir la morbi-mortalité de la SPH, qui est insuffisamment connue.

F. Quel est le substratum génétique du phénotype palustre Peulh ?

Nous savons que la protection partielle des Peulhs vis-à-vis du paludisme n'est pas portée par l'un des variants génétiques classiquement associés à la protection. Pouvons-nous aller plus loin dans l'exploration de cette protection ?

Résultats

Cette section est articulée en 2 parties :

la première correspond à la caractérisation soigneuse, aux plans clinique, biologique et parasitologique d'une cohorte multi-ethnique de sujets béninois vivant en zone hyper-endémique, en collaboration étroite avec nos collègues de l'UMR261 (Mère et Enfant face aux Infections Tropicales, Institut de Recherche pour le Développement et Université Paris Descartes), au cours de 8 passages transversaux.

la seconde partie est centrée sur l'étude des interactions rate/globule rouge dans ce contexte d'étude de la variabilité inter-ethnique de l'adaptation phénotypique à l'exposition à *P. falciparum*. Cette partie sera présentée sous la forme de l'article soumis à eLife. La description phénotypique dans cet article correspond à celle effectuée lors du dernier des 8 passages transversaux réalisés.

Première partie : caractérisation phénotypique de l'infection palustre chez les membres d'une cohorte multi-ethnique au Bénin.

I. Etude principale et explorations cliniques, biologiques et échographiques complémentaires

A. L'étude Biocultural Adaptation to malaria in Atacora, north Benin (BAObAB)

1. Présentation générale de l'étude

Cette étude prospective de cohorte a été conçue par le Dr Audrey Sabbagh et le Dr André Garcia (UMR 261, mère et enfant face aux infections tropicales, Institut de Recherche pour le Développement, Université Paris Descartes). Son objectif est d'explicitier les déterminants génétiques, parasitologiques, et comportementaux de la moindre susceptibilité de l'ethnie Peulh au paludisme (décrite en détail au chapitre 3 C).

L'étude BAObAB a été mise en place en 2015 et a recruté environ 800 individus, répartis en 193 familles, et 4 groupes ethniques : Bariba, Gando, Otamari, Peulh. Ces sujets vivent au sein de 4 villages (Kouboro, Tamande, Gorgoba, Goufanrou) au sein de l'arrondissement de Birni, dans le département de l'Atacora, dans un rayon de 40 km environ autour de Natitingou, la 4^{ème} ville du Bénin en termes de population (figure 33). Pour être incluses, les familles devaient être non mixtes, et avoir au moins deux enfants de moins de 8 ans. L'ethnicité était recueillie sur la base de l'auto déclaration, et confirmée par les autorités du village. L'étude BAObAB a obtenu l'accord du comité d'éthique de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (No 61/CER/ISBA/15) et a été mise en place en collaboration étroite avec le Pr Achille Massougboji et le Dr Roch Hounghin (Université d'Abomey-Calavi), ainsi qu'avec

le Programme National de Lutte Contre le Paludisme (PNLP) du Bénin. Chaque sujet inclus, ou ses parents dans le cas des enfants, a donné son consentement éclairé par écrit.

L'étude BAOBAB a débuté en juin 2015. Huit passages transversaux ont été réalisés à ce jour : juin, septembre, et novembre 2015 ; février, mai, juillet, et octobre 2016 ; décembre 2017.

2. Principales caractéristiques des groupes ethniques étudiés.

Les Bariba représentent un groupe ethnique originaire du Nigeria qui a constitué jusqu'au XIX^{ème} siècle une classe dominante, princière (royaume de Nikki, fondé aux alentours du XV^{ème} siècle), organisée de manière féodale et de culture équestre. Les Bariba sont de nos jours un groupe essentiellement composé d'agriculteurs, établi dans le Nord du Bénin, notamment le Nord-Est.

Les Gando sont historiquement un groupe issu d'enfants Bariba (mais aussi d'autres groupes ethniques) considérés comme « sorciers » ou « mal nés » en raison de diverses circonstances, notamment la naissance par le siège ou le visage tourné vers le sol, ou encore l'apparition des premières incisives sur l'arcade dentaire supérieure. Ces enfants étaient délaissés par leurs familles, mais recueillis par les Peulh et employés comme main d'oeuvre. Ils ont donc adopté progressivement un mode de vie Peulh mais se sont individualisés en tant que groupe ethnique distinct. Leur émancipation a été difficile et progressive en raison de leur manque de considération ⁴⁵², et certains continuent ainsi à se définir comme Peulh ou Peulh Gando.

Les Otamari (appelés aussi Betamarribe) sont un groupe d'agriculteurs venus du Burkina Faso, établis essentiellement dans le Nord-Ouest du Bénin et le Togo tout proche. Leur habitat traditionnel nommé Takyenta est inscrit au patrimoine mondial de l'UNESCO.

Les Peulh (appelés aussi parfois Fulani, Fula, Fulbe, Ffulde) sont un groupe ethnique de répartition géographique large en Afrique subsaharienne (du Sud du Soudan à l'Est du Sénégal). Historiquement nomades et éleveurs, ils tendent de plus en plus à se sédentariser. Ils se sont installés dans le nord du Bénin au XVIII^{ème} siècle. Comme au sein des 3 groupes précités, l'endogamie est stricte. L'alimentation des Peulhs est riche en produits laitiers en raison de leur passé d'éleveurs, et leur phénotype particulier, jugé protecteur, vis-à-vis de l'infection palustre a été décrit au chapitre 3 C. La répartition géographique des groupes ethniques vivant au Bénin est présentée au chapitre 3 B.

3. Le programme BAOBAB comporte trois volets

3.1 Le volet épidémioclinique évalue le phénotype clinique et parasitologique des 4 groupes susmentionnés afin de confirmer les données déjà acquises chez les sujets Peulh, et explorer le phénotype de groupes qui partagent l'aire géographique des Peulh voire leur mode de vie (Gando): évaluation clinique (principaux signes fonctionnels, mesure de la température auriculaire et de la pression artérielle, palpation splénique), parasitologique (goutte épaisse, test diagnostique rapide immunochromatographique du paludisme à *P. falciparum*, utilisant la détection de l'antigène Histidine Rich Protein 2). Cette évaluation a été réalisée par le même clinicien au cours de tous les passages (Dr Hilaire Akpovi) (figure 34). Une évaluation du taux d'hémoglobine par méthode spectrophotométrique (Hemocue®, Radiometer, Bronshoj, Danemark) intégrée à un appareil portatif a également été réalisée. La fièvre a été définie comme une température tympanique supérieure ou égale à 38°C. L'anémie a été définie selon la définition de l'OMS qui tient compte du sexe et de l'âge (tableau 7), en omettant cependant la notion de grossesse (pour laquelle le seuil d'hémoglobine est à 11 g/dl) car cette donnée n'était pas systématiquement recueillie.

3.2 Le volet génétique, qui ne fait pas directement l'objet de cette thèse, vise à identifier de nouveaux variants génétiques associés à la protection contre le paludisme (si celle-ci est confirmée), via le génotypage génome entier sur puce à ADN (puce Illumina® Infinium Omni5 BeadChip, Illumina, San Diego, CA, USA) de chaque individu inclus. La puce choisie permet d'explorer plus de 4.3 millions de polymorphismes, ce qui représente une des meilleures couvertures du génome humain actuellement disponibles. Une étude d'association génome entier sera ensuite réalisée, en se basant sur les phénotypes recueillis.

3.3 Le volet anthropologique, qui ne sera pas non plus abordé ici, évalue la contribution aux différences phénotypiques inter ethniques de certaines composantes du mode de vie (alimentation, habitat...), du recours aux soins et de la perception du risque palustre (utilisation de moustiquaires par exemple).

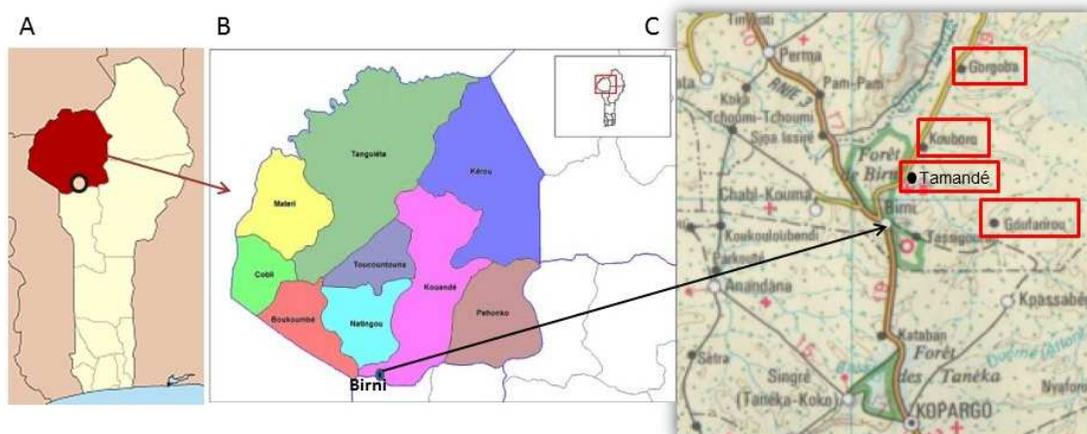


Figure 33 : Situation géographique de l'étude BAOBAB. A, département de l'Atacora (rouge) au sein du Bénin. B, description des différents arrondissements de l'Atacora. L'équipe de l'étude est basée à Natitingou durant les missions. C, détail de l'arrondissement de Birni, où figurent les 4 villages participant à l'étude BAOBAB (encadrés en rouge).

Haemoglobin levels to diagnose anaemia at sea level (g/l)[‡]

Population	Non -Anaemia*	Anaemia*		
		Mild [‡]	Moderate	Severe
Children 6 - 59 months of age	110 or higher	100-109	70-99	lower than 70
Children 5 - 11 years of age	115 or higher	110-114	80-109	lower than 80
Children 12 - 14 years of age	120 or higher	110-119	80-109	lower than 80
Non-pregnant women (15 years of age and above)	120 or higher	110-119	80-109	lower than 80
Pregnant women	110 or higher	100-109	70-99	lower than 70
Men (15 years of age and above)	130 or higher	110-129	80-109	lower than 80

Tableau 7 : Seuils retenus par l'OMS pour la définition de l'anémie. Les valeurs d'hémoglobine sont ici données en grammes par litre. D'après ⁴⁵³.



Figure 34 : Photographies prises lors des missions transversales de 2016. A, véhicules utilisés pour se déplacer au sein des 4 villages de l'étude. B, examen clinique (palpation splénique) réalisée sur l'un des enfants inclus par le Dr Hilaire Akpovi. C, recueil du consentement écrit de l'une des familles incluses par le Dr André Garcia. D, prélèvements de sang veineux périphérique en vue du phénotypage érythrocytaire, et réalisation immédiate d'une détermination de l'hémoglobine, du TDR du paludisme et collecte du sang veineux sur papier buvard.

B. Concordance inter-observateurs de la palpation splénique.

L'étude a été conduite en mai 2016, au cours du passage dans le village de Goufanrou. Trois cliniciens (Hilaire Akpovi, Pierre Buffet, Benoît Henry) ont palpé la rate de 67 sujets Peulh, en position allongée (10 hommes, 21 femmes, 36 enfants) et noté en triple aveugle les résultats en précisant le stade selon la classification de Hackett ²²⁹ en cas de splénomégalie. Le niveau de concordance inter observateur a été calculé via le coefficient kappa de Fleiss à l'aide du logiciel R© (version 3.4.4), et RStudio© (version 1.1.442). Le kappa de Fleiss représente l'équivalent du kappa de Cohen lorsqu'il existe plus de deux observateurs ⁴⁵⁴.

C. Concordance radio clinique de la palpation splénique via l'échographie.

Afin de valider la précision de la palpation splénique, une évaluation de la taille de la rate par mesure échographique a été réalisée dans les villages de Goufanrou, Gorgoba et Tamande sur un sous-ensemble de 37 sujets (13 hommes, 24 femmes) également en position allongée. Nous avons pour ce faire utilisé un échographe portable Philips Visiq®. La formation à la mesure de la rate a été réalisée en collaboration avec le Pr Jean-Michel Correas (service de radiologie adulte, Hôpital Necker Enfants Malades, Université Paris Descartes). La référence clinique provenait de la palpation réalisée par le Dr Akpovi au cours de la même mission. La splénomégalie était définie échographiquement par un grand axe splénique strictement supérieur à 14 cm. Ce seuil, non formellement consensuel, est toutefois retenu dans plusieurs publications^{455,456}. L'évaluation échographique du grand axe splénique dans deux collectifs de sujets nigériens asymptomatiques a mis en évidence des valeurs très similaires aux chiffres européens^{457,458}.

D. Evaluation de la gamétocytémie.

Un sous-ensemble de 62 sujets inclus dans l'étude a été évalué : 38 présentaient une hyperIgM, dont 4 étaient également splénomégaliques ; 19 sans hyper IgM, dont 4 splénomégaliques. Cinq étaient des sujets contrôles sans valeurs disponibles d'IgM. Les sujets associant l'hyper-IgM et la splénomégalie étaient considérés comme approchant le phénotype de splénomégalie palustre hyper réactive.

Des gouttes épaisses de sang périphérique ont été réalisés lors de la mission de mai 2016 sur le site de l'étude, fixées au méthanol, colorés au Giemsa 10 %, et lues en microscopie optique (100 champs, grossissement 600 x). La présence ou l'absence de gamétocytes a été consignée. Notre objectif ici était de déterminer si les sujets qui présentaient un phénotype se rapprochant d'une splénomégalie palustre hyper-réactive pouvaient représenter un réservoir significatif de formes transmissibles, et donc ainsi représenter un obstacle à l'éradication du parasite.

E. Dosage des IgM totales plasmatiques.

Ce dosage a été réalisé en collaboration avec le service de biochimie générale de l'hôpital Necker-Enfants Malades (Dr Charles-Henry Cottart, Pr Jean-Louis Beaudeau, Mme Sandrine Majoux). Les plasmas collectés lors du passage transversal de mai 2016 ont été décongelés et aliquotés en microtubes adaptés aux automates de biochimie hospitalière. Le dosage a été réalisé sur un automate Abbott Architect C1600© par méthode immunoturbidimétrique. Le principe de cette méthode, également nommée immunoprécipitation en milieu liquide, est le suivant : une solution contenant des anticorps anti IgM est mélangée au plasma. La présence d'IgM (ici considérés comme antigènes) dans ce plasma entraîne une agglutination des complexes antigènes-anticorps, qui modifie la turbidité du milieu, et donc l'absorbance de la lumière à une longueur d'onde donnée. La lecture par un photomètre mesure donc le trouble de ce mélange, qui sera proportionnel à la quantité d'IgM totales présentes. La quantification est faite grâce à un étalonnage avec des solutions de concentrations connues. Les valeurs seuil retenues pour définir l'hyper IgM étaient : avant 6 mois, 1.02 g/l ; 7 à 9 mois, 1.26 g/l ; 10 à 12 mois, 1.49 g/l ; 1 an, 1.73 g/l ; 2 ans, 1.68 g/l ; 3 ans, 2 g/l ; 4 à 5 ans, 1.96 g/l ; 6 à 8 ans, 2.07 g/l ; 9 à 10 ans, 2.42 g/l ; après 10 ans, 3.52 g/ ⁴⁵⁹.

F. Evaluation du statut martial.

Cette évaluation a également été faite en collaboration avec le service de biochimie de l'hôpital Necker-Enfants Malades, selon des modalités similaires (dosage immunoturbidimétrique). Les échantillons de plasma utilisés étaient ceux recueillis en décembre 2017. Les paramètres mesures étaient la ferritinémie, ainsi que la C réactive protéine, utilisée ici pour pouvoir identifier les modifications du statut martial qui seraient liées à un éventuel syndrome inflammatoire.

Les valeurs seuil de ferritinémie au-dessous desquelles le sujet était considéré comme atteint de carence martiale étaient de 12 ng/ml chez l'enfant de moins de 5 ans, et de 15 ng/ml chez l'adulte ⁴⁶⁰. Les valeurs de ferritinémie des sujets dont la C réactive protéine était supérieure à 10 mg/l ont été exclues de l'analyse.

G. Analyse de la structure de la population par marqueurs microsatellites.

Sur un sous-ensemble de 268 sujets appartenant aux groupes Bariba, Gando et Peulh, une analyse microsatellite utilisant deux panels commerciaux réunissant 21 marqueurs a permis de déterminer la

structure génétique de ces groupes, leur degré de communauté génétique, et si besoin de réassigner leur affiliation à une ethnie de manière plus fiable que par les données de l'interrogatoire.

H. Analyse statistique

La comparaison inter groupes de données binaires a été effectuée à l'aide du test du Chi², et celle de variables continues à l'aide du test de Mann-Whitney (en cas de comparaison de 2 groupes) ou de Kruskal-Wallis (en cas de comparaison de plus de 2 groupes). Le logiciel GraphPad Prism® a été utilisé. Une valeur de p inférieure à 0.05 a été considérée comme significative.

II. Résultats

A. Données démographiques générales

L'étude BAOBAB a inclus au total 838 sujets, répartis en 193 familles (à Goufanrou: 63, Gorgoba: 76, Kouboro: 42, Tamande: 12), chaque sujet n'étant pas systématiquement évalué à chaque passage. La répartition des familles au plan ethnique était la suivante : 43 familles Bariba, 29 familles Gando, 46 familles Otamari, 75 familles Peulh.

La répartition ethnique était la suivante : 187 Bariba (22.3%), 123 Gando (14.7%), 170 Otamari (20.3%), et 357 Peulh (42.7%) ; un sujet est resté non classé. Cette répartition étant hétérogène quant aux villages considérés (figure 35). L'âge moyen en 2016 était de 22 ans (écart-type 18 ans, sur 498 sujets pour lesquels cette donnée était disponible), mais la répartition des effectifs par âge était inhomogène (cf figure 36), les enfants d'âge scolaire n'étant en général pas inclus dans l'étude. La distribution de l'âge au sein des différents groupes ethniques était comparable (figure 36). Le sex-ratio était de 380 femmes pour 371 hommes (50.6% de femmes, sur les 751 sujets pour lesquels cette donnée était disponible).

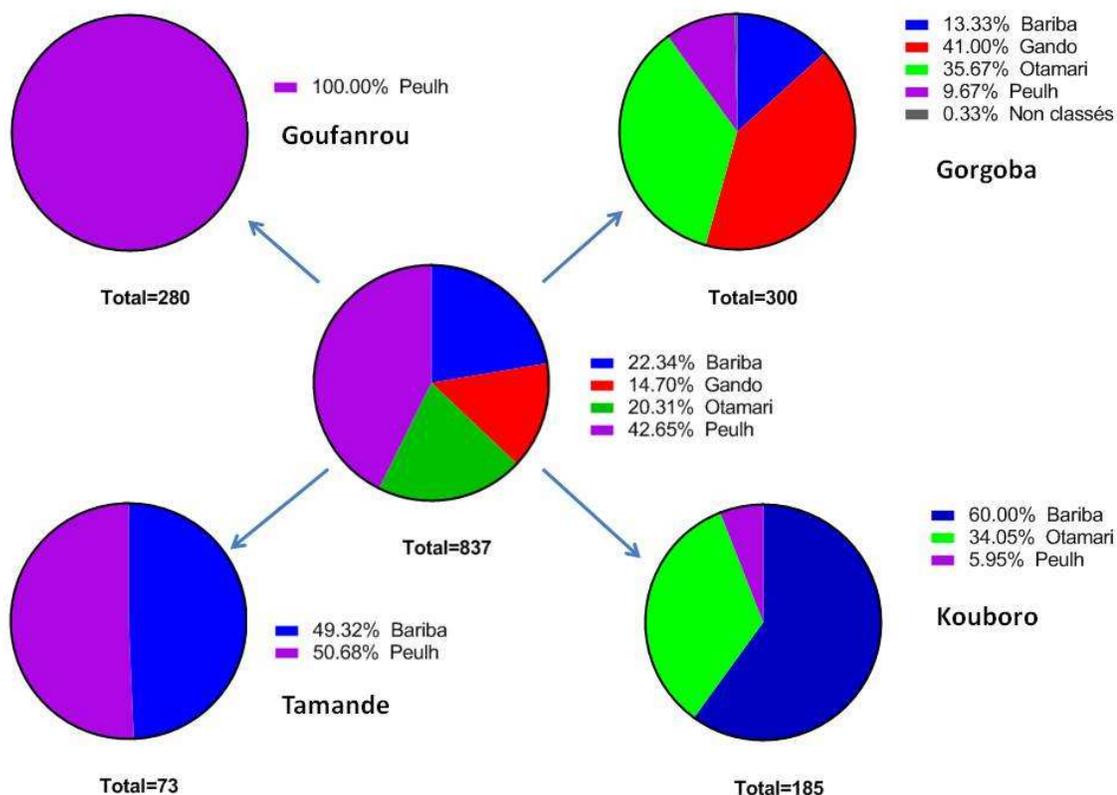


Figure 35 : Répartition ethnique de la population globale de l'étude (au centre) et dans chacun des 4 villages participant (en périphérie de la figure).

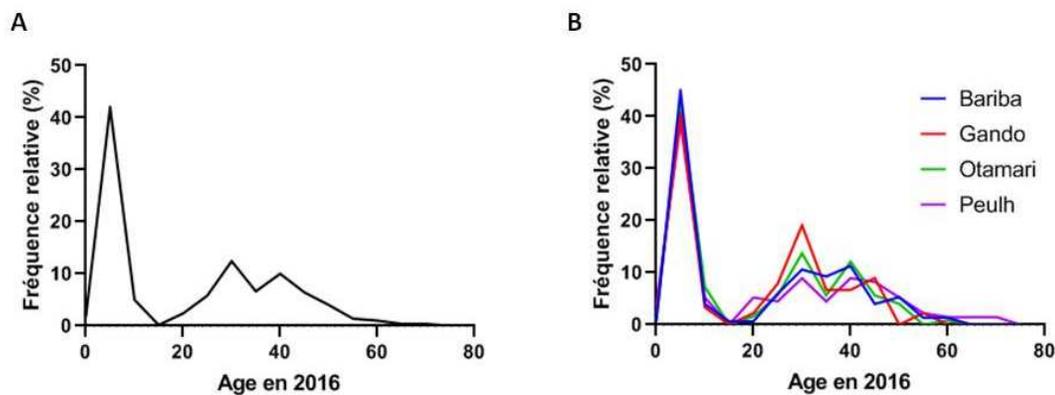


Figure 36 : Fréquence relative (en % de la population totale) des âges des sujets participants. Panel A : population entière. Panel B, selon l'ethnie.

B. Le groupe Peulh a une expression phénotypique singulière liée à l'infection palustre.

Les paramètres cliniques et biologiques suivants ont été évalués au cours de 8 passages transversaux : splénomégalie (toujours évaluée par le Dr Akpovi), fièvre, positivité du TDR, anémie. Ces résultats sont présentés figure 37.

1. Splénomégalie palpable.

Au début et à la fin de l'étude, la prévalence de la splénomégalie était significativement plus élevée chez les Peulhs que chez les sujets des autres ethnies (20.7% et 41.2% en juin 2015 & décembre 2017, respectivement), les Gando présentaient les prévalences les plus basses (1.6% et 15.5%), et les Bariba et Otamari avaient une prévalence de splénomégalie intermédiaire. Entre ces deux passages transversaux, les écarts de prévalence étaient moindres. Cependant, les différences inter ethniques étaient significatives 7 fois sur 8 (figure 37 ; test du Chi-2).

2. Fièvre.

La prévalence globale de la fièvre était très faible, variant de 0% à 4.8%, et en moyenne toutes ethnies confondues de 0.43% en juin 2015, à 2.35% en décembre 2017. Aucune tendance inter-ethnique claire ne s'est dégagée au cours des 8 passages transversaux et les différences inter-ethniques restaient constamment non significatives. Nous n'avons pas noté, à l'échelle de l'ensemble de la population étudiée, de tendance à une prévalence plus élevée de la fièvre au cours des saisons de transmission.

3. Prévalence de l'infection à *P. falciparum*.

La positivité du TDR oscillait entre 22.3% et 68.6% au cours de l'étude. On notait une décroissance globale de cette prévalence entre juin 2015 et mai 2016, suivie d'une importante réascension en juillet 2016. Les différences inter ethniques étaient significatives 2 fois sur 8 (février 2016 et octobre 2016), mais d'orientation variable.

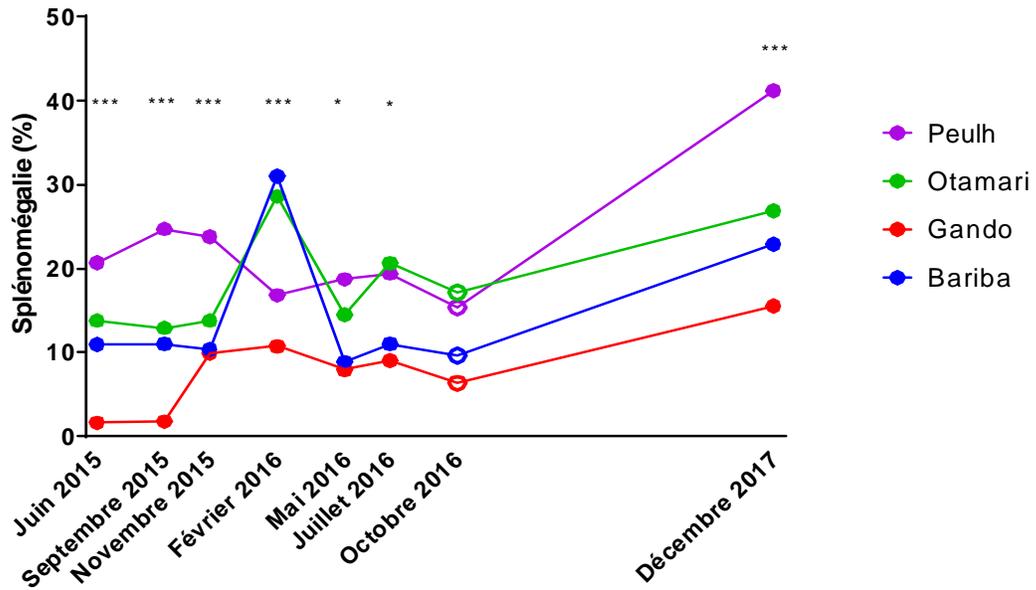
Nous n'avons pas analysé les tendances temporelles de positivité de la goutte épaisse, car nous ne disposons à ce jour de résultats finalisés que pour le passage de décembre 2017.

4. Anémie.

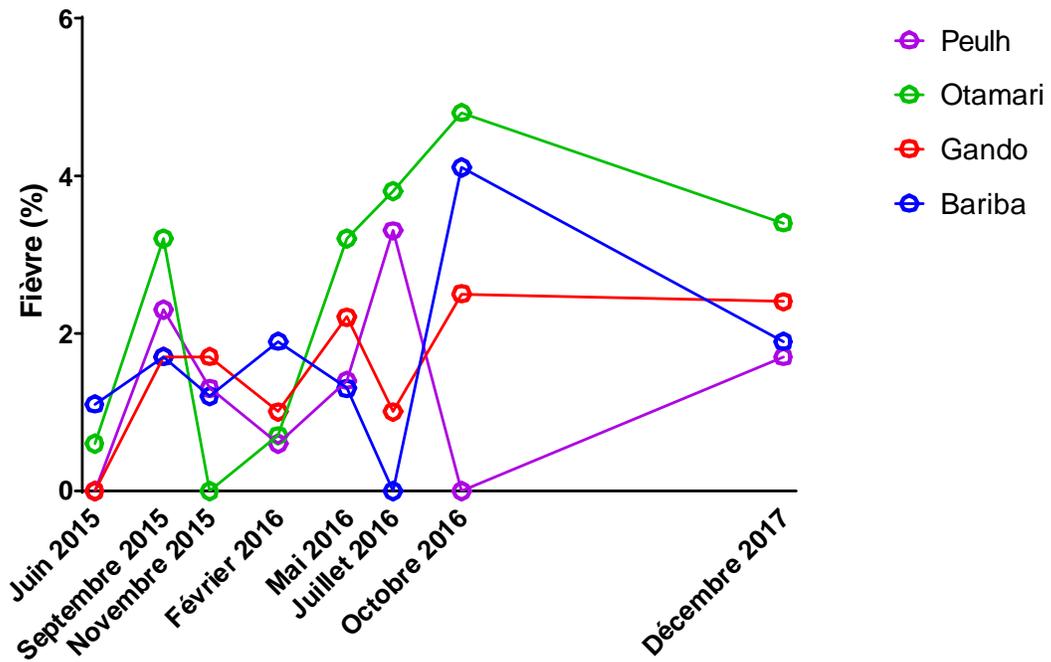
Ce paramètre a été évalué à partir de septembre 2015.

Une tendance à une plus grande prévalence de l'anémie dans le groupe Peulh a été notée au cours de 2 passages sur 7 (juin 2015, décembre 2017) mais n'était significative qu'en juin 2015. Cette tendance était inversée lors du passage d'octobre 2016. Les différences inter ethniques en termes de valeurs brutes d'hémoglobine restaient très modestes (figure 38).

Prévalence Splénomégalie



Prévalence Fièvre



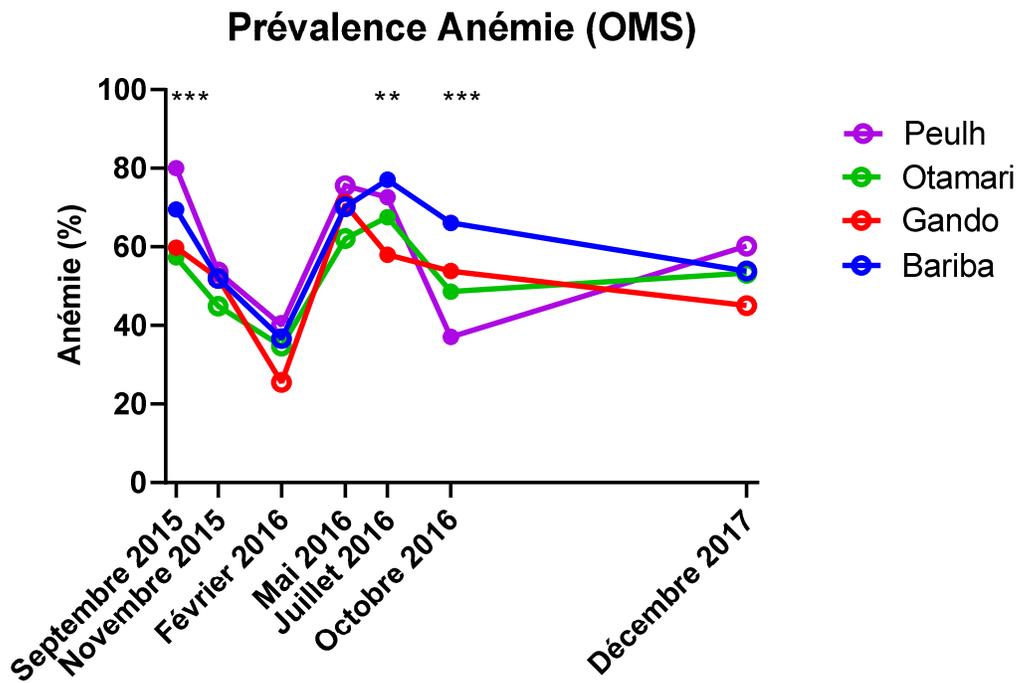
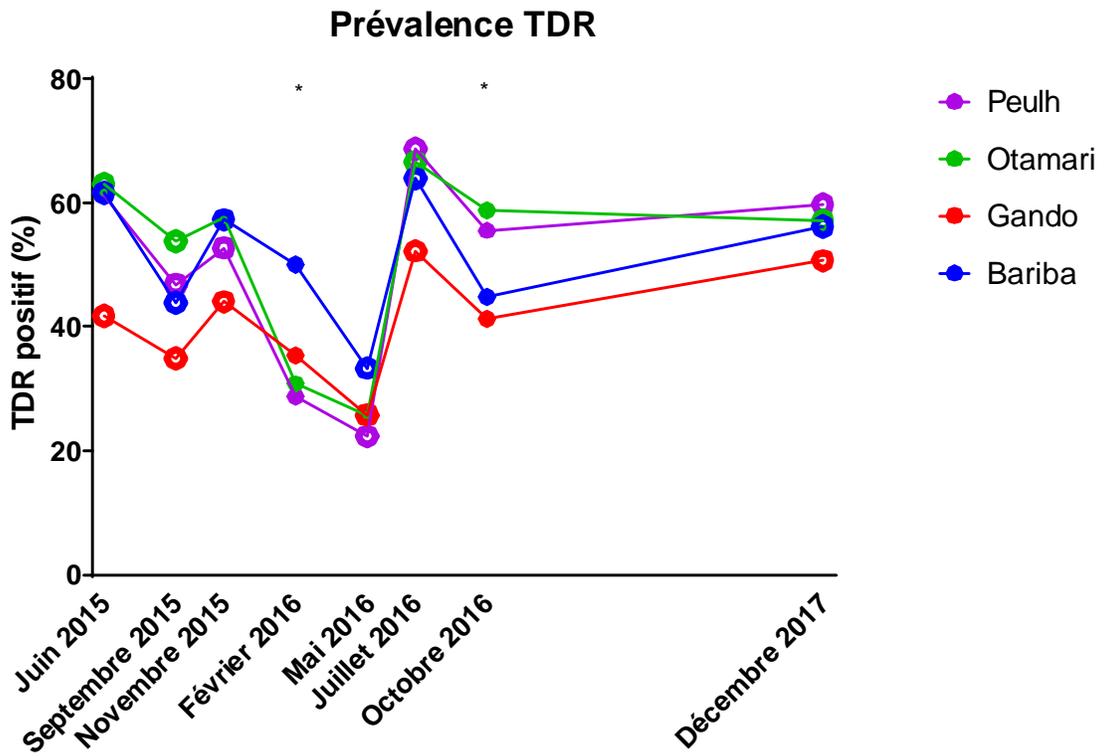


Figure 37 : Fluctuations temporelles (8 passages transversaux de juin 2015 à décembre 2017) de la prévalence (en pourcentage de la population totale) de la splénomégalie, de la fièvre (seuil à 38°C), de la positivité du test diagnostique rapide palustre et de l'anémie (selon la définition OMS) en fonction du groupe ethnique. Les points temporels sont pleins en cas de différence significative inter ethnique, et vides dans le cas contraire. * : $p=0.01$ à 0.05 ; ** : $p=0.001$ à 0.01 ; *** : $p < 0.001$ (test du Chi 2).

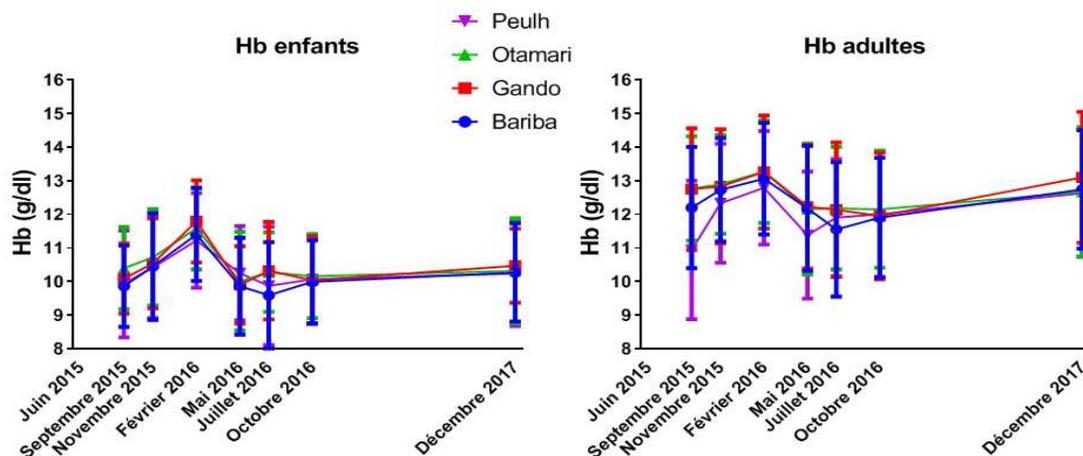


Figure 38 : représentation au cours du temps (8 passages transversaux) du taux (moyen et écart-type) d'hémoglobine mesuré par spectrophotométrie selon la catégorie d'âge et l'ethnie.

L'analyse longitudinale de la prévalence de la splénomégalie, de l'anémie et de la positivité du TDR a montré que les variations temporelles sont souvent plus amples que les différences inter-ethniques, à l'exception possible – quoique partielle – de la splénomégalie.

C. Concentration plasmatiques d'IgM totales

En 2016, les valeurs médianes d'IgM étaient de 1.44 g/l et 1.23 g/l, dans les groupes Peulh et non Peulh, respectivement ($p=0.0021$, test de Mann-Whitney).

En 2017, les valeurs médianes étaient de 1.57 g/l et 1.41 g/l, respectivement chez les Peulhs et non-Peulhs ($p=0.009$, test de Mann-Whitney).

Lors de ces 2 passages, la concentration plasmatique d'IgM était donc significativement plus élevée chez les sujets Peulh que chez les sujets appartenant aux autres groupes ethniques (figure 39).

Chez les enfants, le taux médian d'IgM était d'1.25 g/l en 2016, et de 1.21 g/l en 2017. La même analyse chez les adultes a retrouvé des valeurs médianes de respectivement 1.36 et 1.84 g/l en 2016 et 2017 (figure 40).

La persistance au cours du temps de certains traits phénotypiques a été évaluée : celle de la positivité du TDR est rapportée figure 1 du chapitre 2 des résultats.

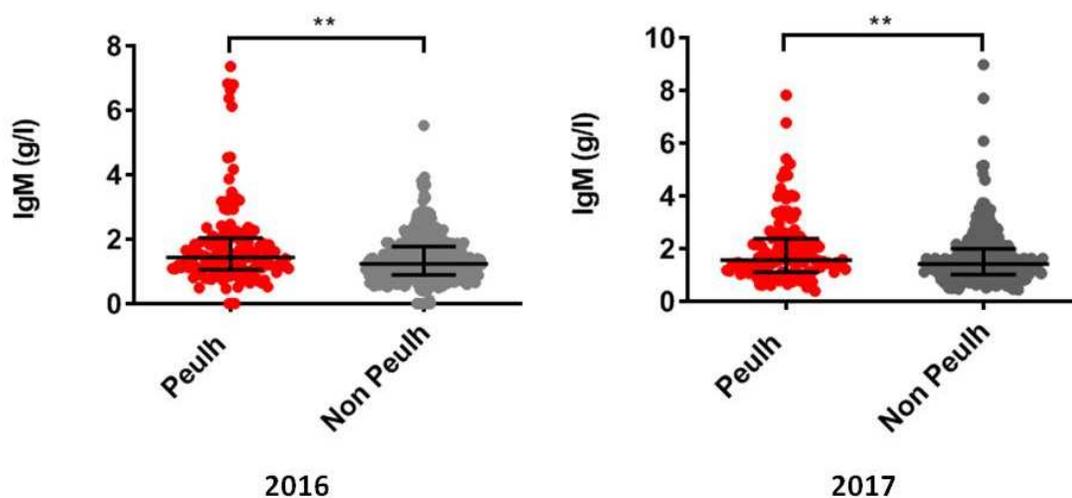


Figure 39 : Concentration plasmatique (médiane et interquartiles) des IgM totales chez les sujets Peulhs (rouge) et non-Peulhs (gris), en 2016 et 2017. * : $0.01 < p < 0.05$; ** : $0.001 < p < 0.01$ (test de Mann-Whitney).

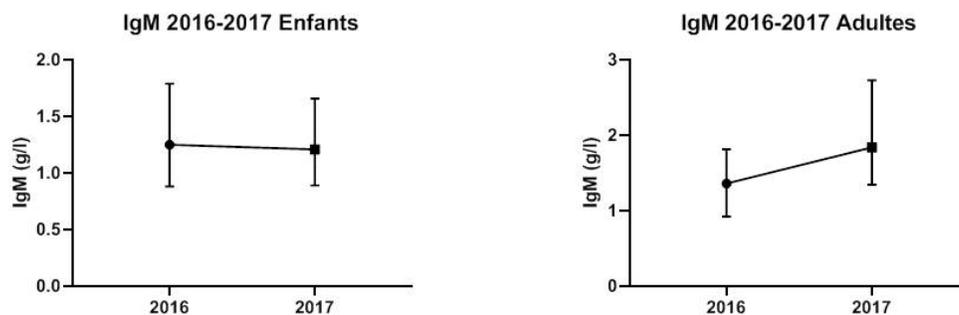


Figure 40 : Fluctuations temporelles entre 2016 et 2017 de la concentration plasmatique d'IgM totales (médiane et interquartiles), dans un groupe de 147 enfants (à gauche) et 141 adultes (à droite) pour lesquels 2 mesures ont été effectuées.

D. Concordance interobservateurs de la palpation splénique.

La mesure de la concordance de la palpation splénique entre 3 évaluateurs cliniciens, en considérant l'existence ou l'absence d'une splénomégalie indépendamment de son grade, a mis en évidence un coefficient kappa de Fleiss de 0.378 ($p=2.52 \times 10^{-7}$), indiquant un accord moyen ⁴⁶¹.

Sur 62 sujets examinés, 15 présentaient une splénomégalie pour au moins un des observateurs. La répartition de la concordance inter-observateurs est présentée figure 41.

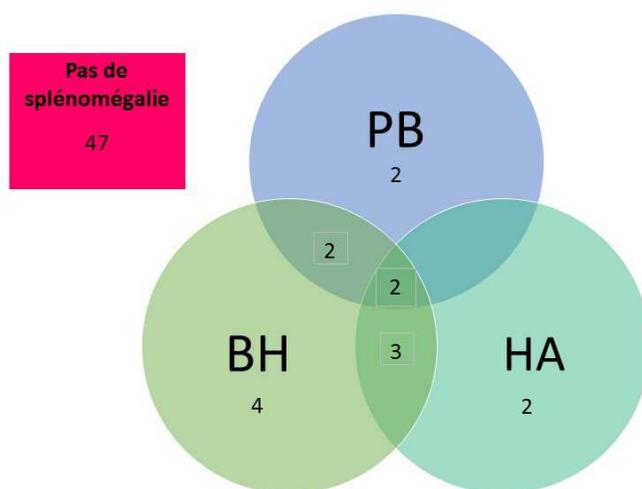


Figure 41 : Evaluation de la concordance inter-observateurs de la palpation splénique sur un groupe de 62 sujets Peulh, 47 sans splénomégalie et 15 splénomégaliques. Le diagramme de Venn représente le degré d'accord inter observateurs des 15 sujets splénomégaliques. PB : Pierre Buffet ; HA : Hilaire Akpovi ; BH : Benoît Henry.

E. Evaluation échographique de la taille de la rate.

La mesure échographique de la rate n'a pas posé de difficulté technique majeure. Chez 37 adultes, la concordance du critère binaire "splénomégalie" (défini cliniquement, sans classification selon Hackett, ou échographiquement par un grand axe splénique supérieur ou égal à 14 cm) a été obtenue dans 33

observations sur 37 (89.2%). Le kappa de Cohen a été calculé à 0.302 (intervalle de confiance à 95% : - 0.161 à 0.764), indiquant un accord modeste (figure 42).

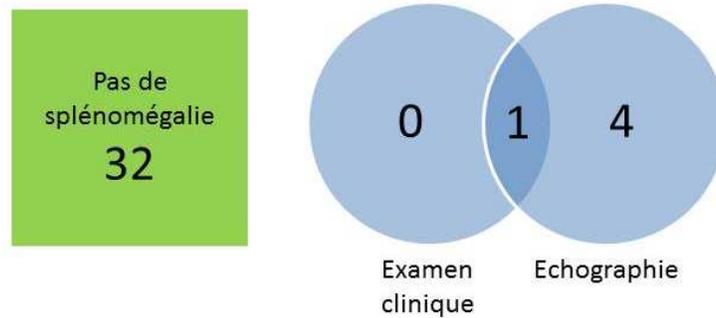


Figure 42 : Concordance entre examen clinique et échographie splénique chez 37 adultes inclus dans l'étude BAObAB.

F. Les marqueurs clinico-biologiques de "pré-Splénomégalie Palustre Hyper-réactive" ne sont pas associés à un portage accru de gamétocytes.

Soixante-deux sujets ont été analysés : sur 38 présentant une hyperIgM (incluant 4 splénomégaliques), un seul sujet était porteur de gamétocytes, et ce sujet n'était pas splénomégalique. Parmi 19 sujets sans hyper IgM (dont 4 splénomégaliques), un seul également portait des gamétocytes, et ce sujet n'était pas non plus splénomégalique. Aucun des 5 sujets contrôles sans valeurs disponibles d'IgM ne portait de gamétocytes.

G. Statut martial

Lors du passage de décembre 2017, 128 sujets Peulhs et 291 non-Peulhs étaient évaluables.

La valeur médiane de ferritinémie était respectivement de 88.5 ng/ml et 92 ng/ml dans les groupes Peulh et non Peulh. Cette différence n'était pas significative ($p=0.79$, test de Mann-Whitney). De même, la proportion de sujets atteints de carence martiale était de 1.87% chez les Peulh et 1.27% chez les non-Peulhs, là encore sans différence significative ($p>0.99$, test du Chi-2) (figure 43).

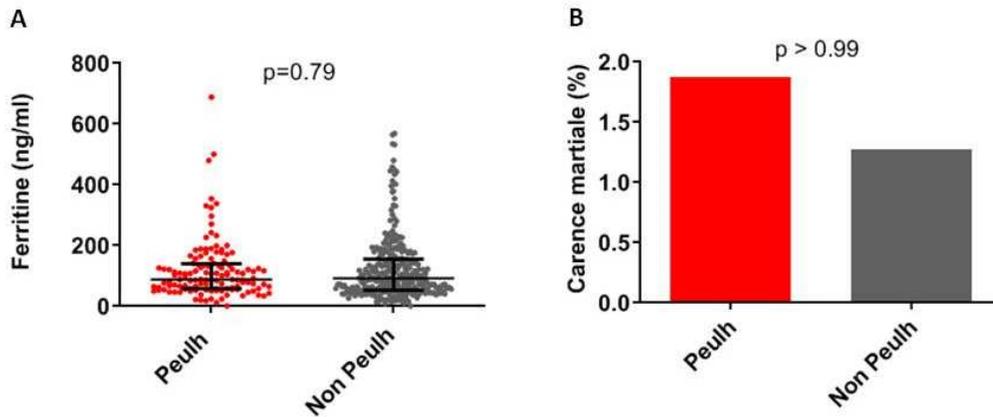


Figure 43 : A, valeurs individuelles de ferritinémie chez 419 sujets évalués en décembre 2017. Les barres représentent les valeurs médianes et les interquartiles. B, proportion (%) de sujets atteints de carence martiale dans les groupes Peulh et non Peulh, après exclusion des 72 sujets présentant un syndrome inflammatoire (CRP > 10 mg/l).

H. Concordance ethnie déclarative et ethnie génomique.

Une caractérisation de la structure génétique de la population d'étude a été réalisée par analyse de microsatellites (Dr Sabbagh, Dr Palstra, UMR261) : sur 727 sujets évaluables, seuls 6 présentaient une discordance entre l'ethnie déclarative et l'ethnie génomique ; 1 sujet a été reclassé d'Otamari vers Bariba, et 5 sujets de Peulh vers Gando. Le taux de concordance est donc de 99.2% dans notre population.

Seconde partie: la variabilité de la déformabilité érythrocytaire en lien avec l'infection à *Plasmodium falciparum* chez des sujets africains est un trait héritable.

Manuscrit soumis à eLife.

Malaria-related diversity of red blood cell deformability in African subjects is an inheritable trait

Authors: Benoît Henry^{a,b,c,d,e,f}, Geoffroy Volle^{a,b,c,d,e,1}, Hilaire Akpovi^{g,1}, Camille Roussel^{a,b,c,d,e}, Papa Alioune Ndour^{a,b,c,d,e}, Félicien Tossou^{h,i}, Felipe Suarez^{d,j,k}, Friso Palstra^{d,l}, Aurélie Fricot^{a,b,c,d,e}, Charlotte Chambrion^{a,b,c,d,e}, Julien Solinc^{a,b,c,d,e}, Julie Nguyen^{d,l}, Mathilde Garég^g, Florentin Aussenac^g, Charles-Henry Cottart^m, Christine Keyser^{e,n}, Etienne Crickx^o, Matthieu Mahévas^{o,p}, Rafiou Adamou^g, Geneviève Milon^q, Nadine Fievet^{d,g,l}, David Courtin^{d,l}, Jérôme Clain^{d,l}, Olivier Hermine^{d,j,k}, André Garcia^{d,g,l}, Audrey Sabbagh^{d,l,2}, Pierre Buffet^{a,b,c,d,e,2}

1: GV and HA equally contributed to this work 2: AS and PB equally supervised this study

a: Université de Paris, Biologie Intégrée du Globule Rouge, UMR_S1134, BIGR, INSERM, F-75015, Paris, France

b: Université des Antilles, Biologie Intégrée du Globule Rouge, UMR_S1134, BIGR, F- 97157, Pointe-à-Pitre, France

c: Université de la Réunion, Biologie Intégrée du Globule Rouge, UMR_S1134, BIGR, F-97744, Saint-Denis de la Réunion, France

d: Laboratoire d'Excellence Gr-Ex, 24, boulevard du Montparnasse, F-75015 Paris, France

e: Institut National de la Transfusion Sanguine, 6, rue Alexandre Cabanel, F-75015, Paris, France

f: Service des maladies infectieuses et tropicales, APHP, Hôpital Necker Enfants Malades, Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur, Institut Imagine, 149, rue de Sèvres, F-75015 Paris, France

g: IRD, UMR 261, Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE), Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou, Bénin

h: Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable (CIFRED), Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526, Cotonou, Bénin

i: Ministère de la Santé, 01 BP 882, Cotonou, Bénin

j: Service d'hématologie adultes, APHP, Hôpital Necker Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, F-75015 Paris, France

k: Université de Paris, INSERM U1163, CNRS ERL 8654, F-75015, Paris, France

l: Université de Paris, Institut de Recherche pour le Développement, UMR 261 MERIT, Mère et Enfant face aux Infections Tropicales, Faculté de Pharmacie, 4, avenue de l'observatoire, F-75006, Paris, France

m: Service de biochimie générale, APHP, Hôpital Necker Enfants Malades, Faculté de pharmacie, 149, rue de Sèvres, F-75015, Paris, France

n : Université de Paris, CNRS, FRE 2029-BABEL, F-75006, Paris, France.

o: Institut Necker-Enfants Malades-INSERM U1151/Centre National de la Recherche (CNRS) UMR8633, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, 14 Rue Maria Helena Vieira da Silva, CS61431, F-75014 Paris, France

p: APHP, Hôpital Henri Mondor, Service de médecine interne, Centre de Référence des Cytopénies Auto-immunes de l'Adulte, Université Paris Est Créteil, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, F-94010, Créteil, France

q: Institut Pasteur, Département de Parasitologie et Mycologie, Unité d'Immunophysiologie et Parasitisme, 25-28, rue du docteur Roux, F-75015 Paris, France

Corresponding author :

Pierre Buffet, MD, PhD, Institut National de la Transfusion Sanguine, UMR_1134, 6, rue Alexandre Cabanel, 75015 Paris, France. Phone number: +331 44 49 3000. Email: pabuffet@gmail.com

Abstract

In West Africa, prevalence of malaria-related splenomegaly varies between ethnic groups. In Benin, red blood cells (RBC) were more deformable in 149 Fulani than in 314 non-Fulani, as assessed by ektacytometry and filtration. In Fulani, RBC were more deformable upon recent or ongoing *Plasmodium falciparum* infection. The heritability of RBC filterability was high in this group. Parasite growth *in vitro* was similar across groups, but was faster in more deformable RBC. IgM levels and IgM memory B cells were higher in Fulani, pointing to splenic activation. RBC-related, spleen-activating processes acting upstream from adaptive immunity may produce splenomegaly, anemia and enhanced antimalarial response in Fulani. In this model, splenic filtration increases upon exposure to malaria or infection is enhanced in more deformable RBC. In both cases, circulating RBC are more deformable in infected subjects and the spleen is activated, producing anemia. Identifying genetic determinants of these new, inheritable traits is envisioned.

Keywords: malaria, *falciparum*; spleen; erythrocytes; ethnic groups; heritability; splenomegaly

Introduction

Malaria due to *Plasmodium falciparum* is one of the most frequent acquired red blood cell (RBC) diseases worldwide. Asexual stages of the parasite develop in RBC, causing signs and symptoms of the disease, although carriage of parasitized RBC is most frequently asymptomatic in immune subjects living in endemic areas (Lindblade et al., 2013). Natural protection against malaria has been extensively studied, predominantly leading to the identification of RBC polymorphisms such as sickle cell trait as protective genotypes (Allison, 2009; Haldane, 1949; Mangano and Modiano, 2014). Fulani, traditional nomadic pastoralists living in West Africa, display a specific phenotype in relation to malaria. Compared to other ethnic groups living in sympatry, Fulani have a higher prevalence of splenomegaly (Bereczky et al., 2006; Bryceson et al., 1976; Dolo et al., 2005; Greenwood et al., 1987; Modiano et al., 1996; Oomen et al., 1979), higher total IgM levels (Bolad et al., 2005), and a stronger humoral immune response against plasmodial antigens (Arama et al., 2015a, 2015b). In some but not all studies, malaria-related fever and parasitemia are lower and/or less prevalent in Fulani than in other groups (Arama et al., 2011; Cherif et al., 2016; Creasey et al., 2004; Dolo et al., 2005, 2012b; Bakary Maiga et al., 2014; Modiano et al., 1996), and hemoglobin levels are generally lower (Dolo et al., 2012b). The immune response against *P. falciparum* in Fulani displays specificities with regards to cytokines production (Boström et al., 2012; McCall et al., 2010), monocytes activity (Quin et al., 2017), B-cell subpopulations (Portugal et al., 2012), and regulatory T-cell function (Torcia et al., 2008).

Most of the immune stimulation in malaria is related to blood stages of the parasite. Intra-erythrocytic stages are mostly confined to the blood circulation (Buffet et al., 2011). The mechanical properties of *P. falciparum*-infected RBC have been extensively studied over the last 40 years. A decrease in deformability of RBC infected with mature, but also ring-stage parasites, has been observed and is a contributor to vascular flow obstruction observed in severe malaria cases (Cranston et al., 1984; Miller et al., 1971). Moreover, this reduced deformability extends to uninfected RBC (Dondorp et al., 2002) and is correlated with disease severity (Dondorp et al., 1997). After observing the mechanical retention

of parasitized RBC in human spleens perfused *ex-vivo* (Safeukui et al., 2008), we had proposed that in malaria-infected subjects, the splenic sensing of infected (and possibly uninfected) RBC by the spleen could modulate the size of the parasite biomass as well as where the antigenic stimulus predominates. A stringent retention of RBC in the spleen would confer protection by reducing the parasite biomass in circulation, but would also be pathogenic by precipitating splenomegaly and anemia (Buffet et al., 2009). Using a filtration method that mimics the mechanical sensing of RBC by the human spleen (Deplaine et al., 2011), we have quantified the deformability of circulating RBC in a multi-ethnic cohort of Beninese subjects living in sympatry in an area of high malarial transmission. The objectives were to deliver a more precise definition of malaria-related phenotypes in African groups with regards to RBC and spleen, and to investigate the genetic component of any new phenotype.

Results

Splenomegaly is more frequent in Fulani.

We examined 521 subjects (mean age, 21.9 +/- 17.7 years; range, 3 months to 72 years; 48% female) of whom 157 (30.1%) were Fulani, 86 (16.5%) Gando, 159 (30.5%) Bariba, and 119 (22.8%) Otamari. Splenomegaly was more prevalent in Fulani than in non-Fulani (40.1% vs 23.5%; $p=0.003$; Figure 1A). There was a trend towards more prevalent anemia in Fulani that did not reach statistical significance (60.2% vs 51.5%, $p=0.12$; Figure 1B). Fever was rare with a slight and non-significant difference between Fulani and non-Fulani (1.3% vs 2.5%; $p=0.52$; Figure 1C). There was a trend towards a more prevalent parasite carriage in Fulani that did not reach statistical significance (63.8% vs 56.6% for rapid diagnostic test (RDT) positivity $p=0.14$, and 44.9% vs 42.1% for thick smear $p=0.57$, Figure 1D-E). Median *Plasmodium falciparum* densities were insignificantly lower in Fulani than in non-Fulani (2500 vs 3440/ μl , $p=0.28$, Figure 1 F1-3). On a longitudinal analysis of 6 cross-sectional studies performed in

the same cohort from November 2015 through December 2017, the proportion of subjects who remained RDT-negative across time was greater in Fulani than in non-Fulani (Figure 1H). Antimalarials had been used in the last 30 days by 7.04% and 11.23% of Fulani and non-Fulani subjects, respectively ($p=0.17$). In a multivariate analysis of factors influencing splenomegaly, we observed a strong association with the Fulani ethnicity ($p=0.0007$), the other significantly associated factors being young age, low hemoglobin levels and RDT positivity (supplemental Table 1).

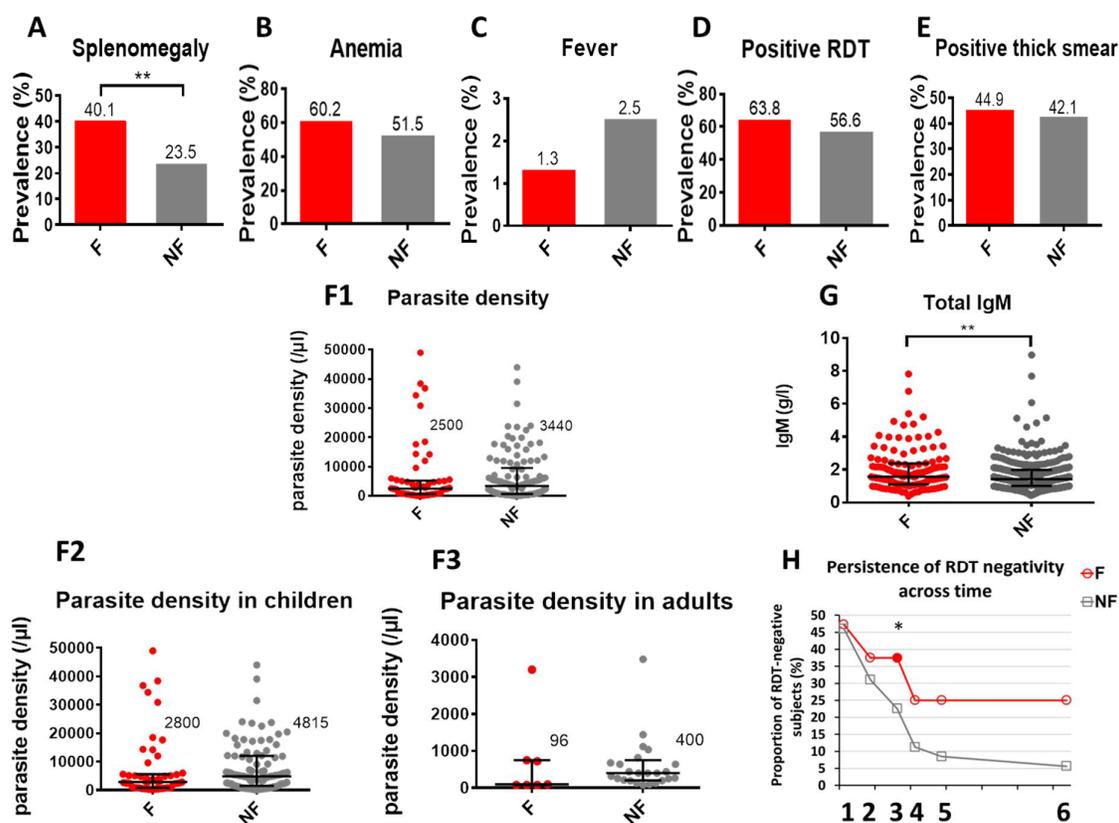


Figure 1. Splenomegaly is more prevalent in Fulani than in subjects from other ethnic groups (A-E): Prevalence (%) of (A) splenomegaly, (B) anemia according to the WHO definition, (C) fever (tympenic temperature above 38°C), (D) positive rapid diagnostic test for malaria, (E) and positive thick smears in Fulani (F) and non-Fulani (NF). (F1) *Plasmodium falciparum* density (median, IQR) in Fulani and non-Fulani, shown separately in children (F2) and adults (F3) on thick smears (only positive values are shown). (G) Concentration of total IgM (median, IQR) in plasma from Fulani and non-Fulani. (H) Proportion of subjects initially RDT-negative, then remaining negative across 6 consecutive cross-sectional studies. Filled symbol indicates a significant difference between Fulani and Non Fulani. Dates of cross-sectional studies: 1: November, 2015; 2: February, 2016; 3: May, 2016; 4: July, 2016; 5: October, 2016; 6: December, 2017. *: 0.01pvalue<0.05; **: 0.001pvalue< 0.01. No symbol is shown

if the difference is not significant. Categorical variables were compared through Chi-Squared test or Fisher's exact test, as appropriate; parasite densities and total IgM values were compared through Mann-Whitney test.

Circulating RBC are more deformable in Fulani than in other ethnic groups

Ektacytometry was performed on RBC from 248 randomly selected subjects (108 Fulani, 140 non-Fulani; 48.4% adults). Median elongation indexes (EI) of RBC measured at a shear stress of 30 Pascals (Figure 2A) were higher in Fulani than in non-Fulani (0.595 vs 0.589, $p=0.039$). Differences were also significant when comparing the four ethnic groups separately ($p=0.0057$; Supplemental Figure 1). Upon univariate analysis, splenomegaly and ethnicity were significantly associated with EI at the 0.05 threshold ($p=0.026$ and $p=0.013$, respectively; table 1). Upon multivariate analysis, only ethnicity remained significantly associated with EI ($p=0.016$; Table 1).

Microspherulization (MS) was performed on blood samples from 463 subjects (149 Fulani, 314 non-Fulani; 47.1% adults). For the 16 microplates used, negative control values were within the expected $\pm 20\%$ range, with a mean (IQR) of -7.66% (-13.91% ; -6.71%). All positive controls displayed retention rates $> 75\%$ with a mean (IQR) value of 96.47% (95.87% ; 99.66%). Retention or Enrichment Rates (RER) were significantly and markedly different between ethnic groups. Fulani had higher median enrichment rates, indicating enhanced deformability of their circulating RBC, compared to non-Fulani (30.1% vs 11.73% , $p<0.0001$; Figure 2B). RBC deformability was highest in Fulani, lowest in Bariba and intermediate in Gando and Otamari (Supplemental Figure 1). In univariate analysis, RER was influenced by ethnicity, parasite density and RDT positivity ($p=8.1 \times 10^{-12}$, 0.046 and 0.008 , respectively); in the multivariate analysis, factors still significantly affecting deformability were ethnicity and RDT positivity ($p=8.74 \times 10^{-11}$ and 0.016 , respectively) (Table 1). In summary, circulating RBC were more deformable in Fulani than in subjects from other ethnic groups, with two different methods bringing consistent results. In the multivariate analysis, apart from ethnicity, the only factor associated with the deformability of circulating RBC was a positive RDT.

A	Ektacytometry (elongation index at 30 Pa)			
		Univariate		Multivariate
Parameter	Test	Correlation r or mean comparison	p-value	p-value
Age	Correlation	0.055	0.430	
Hemoglobin	Correlation	0.114	0.075	0.104
Anemia	Mann-Whitney	0.571 (vs 0.581)	0.575	
Splenomegaly	Mann-Whitney	0.577 (vs 0.575)	0.026	0.640
RDT positivity	Mann-Whitney	0.579 (vs 0.571)	0.369	
Parasite density	Correlation	0.062	0.348	
Ethnicity (all groups)	Kruskal-Wallis		0.013	0.016
Temperature	Correlation	-0.052	0.422	
B	Microsphiltration (retention or enrichment rate)			
		Univariate		Multivariate
Parameter	Test	Correlation r or mean comparison	p-value	p-value
Age	Correlation	-0.040	0.409	
Hemoglobin	Correlation	0.003	0.944	
Anemia	t test	17.123 (vs 15.042)	0.451	
Splenomegaly	t test	17.471 (vs 16.341)	0.702	
RDT positivity	t test	20.060 (vs 12.885)	0.008	0.016
Parasite density	Correlation	0.096	0.046	0.149
Ethnicity (all groups)	ANOVA		8.1x10⁻¹²	8.74x10⁻¹¹
Temperature	Correlation	-0.018	0.703	

Table 1. Univariate and multivariate analysis of factors associated with RBC deformability assessed by ektacytometry (A: upper panel) or microsphiltration (B: lower panel). Variables with a p-value of 0.2 or less in univariate analysis were included in the multivariate analysis. Variables with a significant association with deformability measures after multivariate analysis are displayed in bold.

Markers of infection with P. falciparum in Fulani are associated with a greater deformability of circulating RBC.

Because differences were greater with microsphiltration than with ektacytometry we focused further analyses on results obtained with this method. When considering only subjects with a negative RDT, RBC deformability was mildly (and insignificantly) higher in Fulani than in non-Fulani (median RER: 14.04% vs 11.72%, $p=0.46$). In subjects with a positive RDT, RBC deformability was markedly and significantly higher in Fulani than in other ethnic groups (median RER: 38.7% vs 11.96%, $p<0.001$). Within Fulani, RBC deformability was markedly greater in RDT-positive than in RDT-negative subjects (38.7% vs 14.04%, $p=0.0007$).

To analyse how markers of infection may impact the deformability of circulating RBC, we then compared results from three groups, i.e. subjects in whom RDT and thick smears were both negative (a surrogate for absence of infection), subjects in whom RDT and thick smear were both positive (a surrogate for ongoing infection), and subjects in whom only the RDT was positive (a surrogate for recently resolved infection (Bell et al., 2005)). Subjects in whom only thick smear was positive were very rare (4 Fulani and 7 non-Fulani) and were not included in this analysis. In the context of this framework, marked differences were observed between Fulani and other ethnic groups (Figure 2C). In the Fulani group, RBC deformability was lowest in subjects with negative markers of infection, intermediate in subjects with markers suggesting ongoing infection (thick smear and RDT both positive) and highest in subjects with markers suggesting recent infection (only RDT positive; median RER: 16.63%, 36.97% and 53.55% for both negative, both positive, and only RDT positive subjects, respectively, $p=0.0022$). By contrast, markers of infection correlated only mildly with RBC deformability in other ethnic groups (Figure 2C). PCR performed on a subset ($n=422$) of the study sample showed similarly that circulating RBC are more deformable in Fulani subjects with a positive PCR than in those with a negative PCR (RER=33.29% vs 18.91%, $p=0.02$, Figure 2D). No significant difference was observed when comparing PCR-negative and PCR-positive subjects from non-Fulani groups (RER=11.85% vs 15.55%, $p=0.19$, Figure 2D).

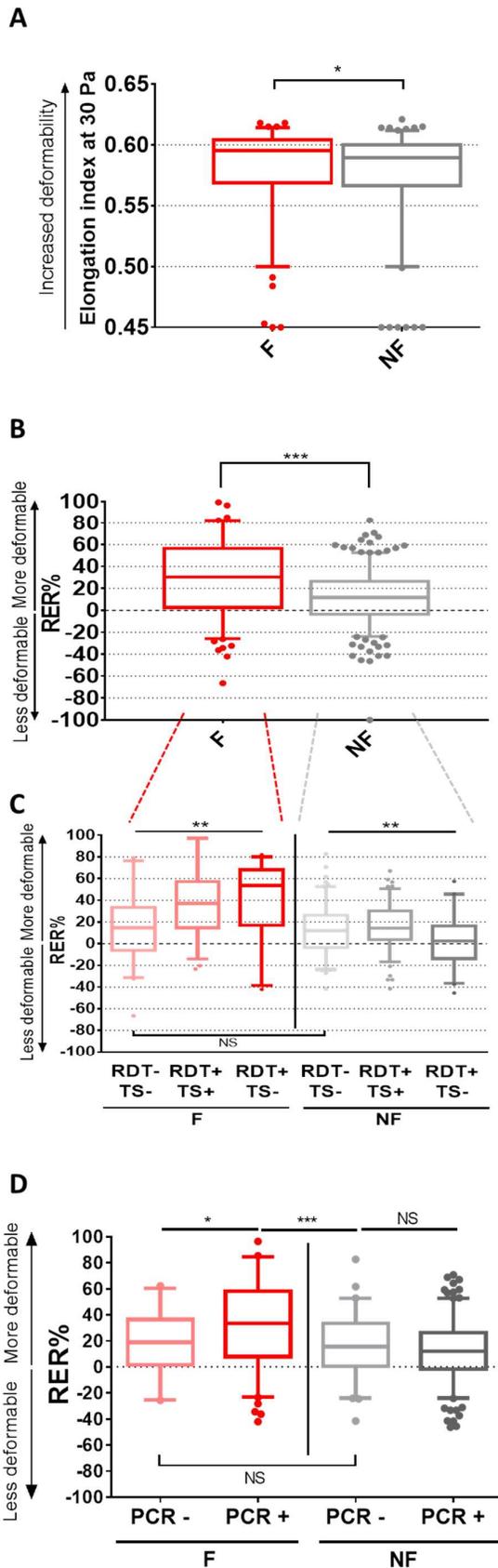


Figure 2. Circulating RBC are more deformable in Fulani than in subjects from other groups, and markers of recent *P. falciparum* infection are associated with enhanced RBC deformability in Fulani. (A) Elongation index (EI) of RBC measured by rotational ektacytometry at 30 Pa in Fulani (F) and non-Fulani (NF) (n=248). Higher EI values indicate enhanced RBC deformability. **(B)** Retention or enrichment rates (RER%) of circulating RBC from Fulani (F) and non-Fulani (NF) determined by filtration through microsphere layers (microsphiltration) (n=463). Positive RER (i.e., enrichment in test RBC downstream from filter) indicate enhanced RBC deformability (n=463). **(C)** RER determined by microsphiltration in Fulani (n=131) and non-Fulani (n=282) subjects with both RDT and thick smear negative for malaria parasites (RDT- TS-), or with both tests positive (RDT+ TS+) or with only RDT positive (RDT+ TS-). **(D)** RER values in Fulani (n=136) and non-Fulani (n=271) when considering subjects with negative or positive PCR for *P. falciparum*. Box plots indicate median and IQR values; bars indicate 5th and 95th percentiles. NS: no significant difference; *: 0.01<p value<0.05; **: 0.001<p value<0.01; ***: p value<0.001. Ektacytometry data were analyzed through Mann-Whitney test; Microsphiltration data were analyzed through Student's t-test and ANOVA, as appropriate.

Upon in vitro infection, deformability of parasitized RBC and parasite growth are similar in all ethnic groups but higher RBC deformability correlates with higher parasite multiplication rates.

RBC from 120 subjects were infected *in vitro* with the same parasite strain (NF54). In contrast with the aforementioned experiments, which quantified the retention of all circulating RBC compared to a batch of RBC from a single control donor, this set of experiments quantified the mechanical retention of the small fraction of ring-infected RBC diluted in the uninfected RBC from the same subject (Supplemental Figure 2). The median retention of 14- to 16-hour ring-infected RBC (relative to surrounding uninfected RBC in the same culture flask) was 62.63% in Fulani and 63.70% in non-Fulani ($p=0.58$; Figure 3A), this range of values being consistent with previously published experiments (Safeukui et al., 2013). In the same subgroup, the median fold increase of parasitemia between day 0 and day 3, according to the ethnicity of the RBC donor, was 2.38 and 2.24 in Fulani and non-Fulani, respectively ($p=0.58$; Figure 3B). Using linear regression, a positive correlation was found between RBC filterability and parasite growth ($r^2=0.103$, $p=0.0004$), the correlation being stronger in Fulani ($r^2=0.17$, $p=0.010$) than in Non-Fulani ($r^2=0.056$, $p=0.032$) (Figure 4). Based on the correlation equation in Fulani ($Y = 0.0095X + 2.057$, where X is the RER and Y the parasite multiplication rate per cycle) parasites would grow 16% faster in RDT-positive than in RDT-negative Fulani, who display a RER of 53.6% and 16.6%, respectively. This would correspond to a multiplication of parasite biomass 1.91 greater after 8 days (4 cycles) in infected compared to uninfected Fulani.

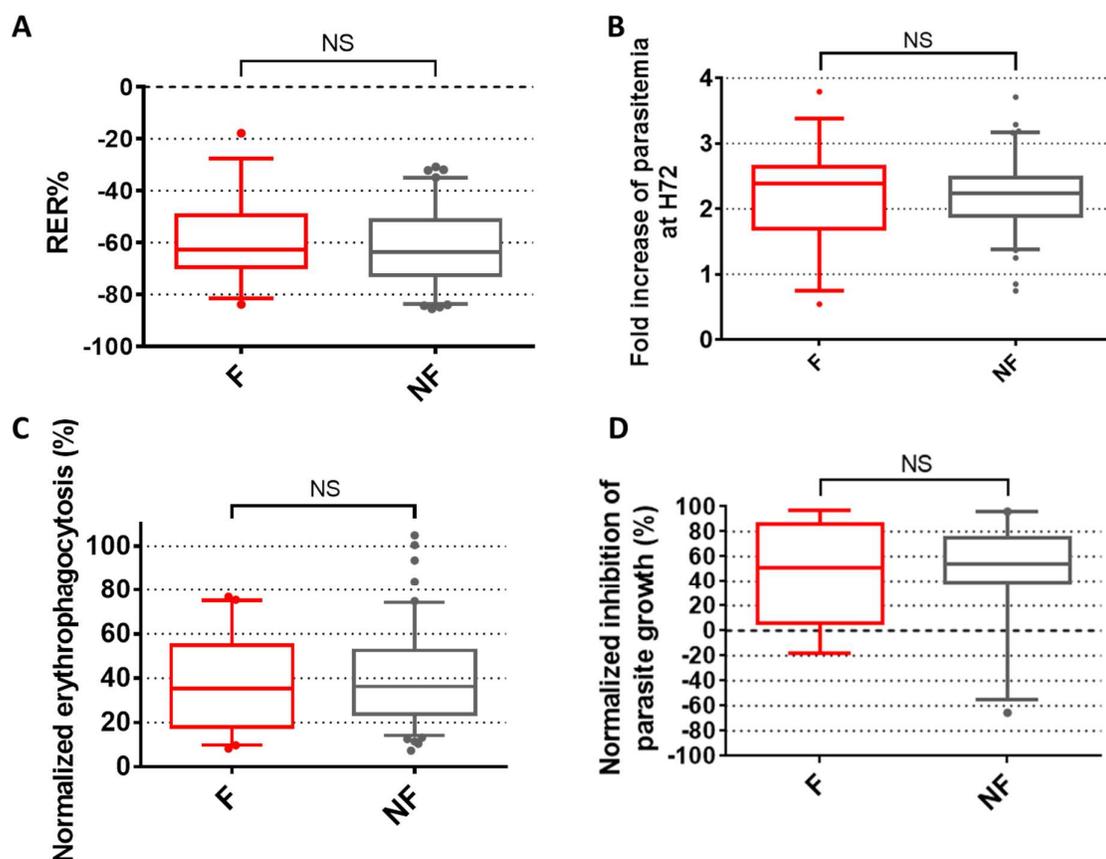


Figure 3. The mechanical retention of *Plasmodium falciparum*-infected RBC, parasite growth in vitro, opsonic capacity of plasma and parasite growth inhibitory capacity of plasma are similar across ethnic groups. (A) Median (IQR) retention rates (assessed by microfiltration) of ring-infected RBC from 120 Beninese subjects (30 per ethnic group) infected *in vitro* with *Plasmodium falciparum* NF54 strain. **(B)** Relative H0 to H72 increase in parasitemia upon *in vitro* culture in RBC from 120 Beninese subjects (30 per ethnic group). **(C)** Proportion of THP1 monocytes containing at least one infected RBC (trophozoite or schizont) after coincubation in the presence of plasma from 150 Beninese subjects (42 Fulani and 108 non-Fulani). Values are normalized to the positive control. **(D)** Normalized parasite growth inhibition (%) after coincubation of *P. falciparum* infected RBC with plasma from 46 subjects (16 Fulani and 30 non-Fulani), according to the ethnic group. Values are normalized to the control plasma. Boxes indicate median and IQR values. Bars indicate 5th and 95th percentiles. F: Fulani; NF: non-Fulani; RER%: retention or enrichment rates (%); NS: no significant difference. Variables were compared through Mann-Whitney test.

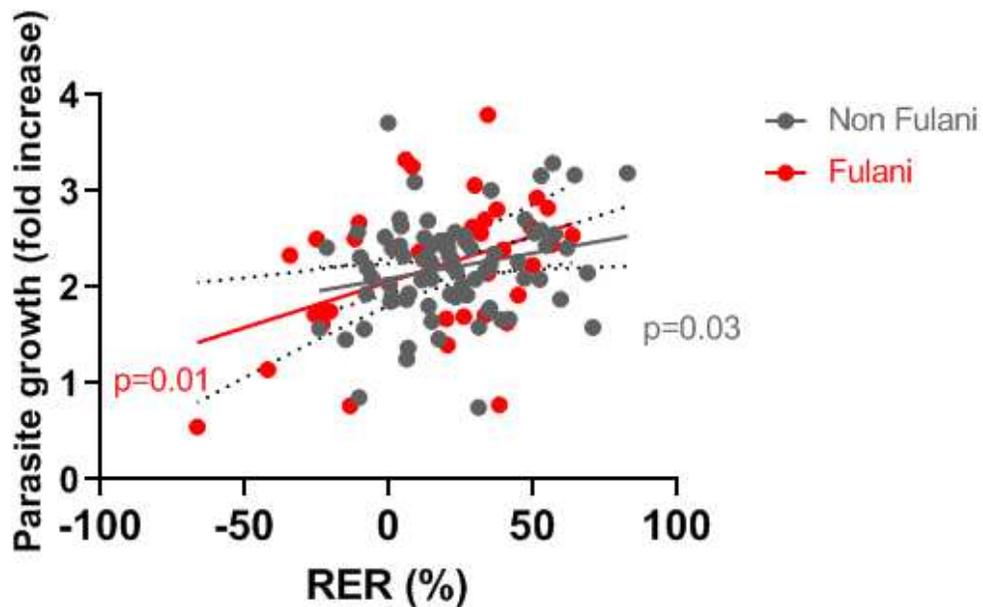


Figure 4. A positive correlation exists between circulating RBC deformability and *Plasmodium falciparum* growth after in vitro infection. In 120 subjects (30 Fulani and 90 non-Fulani), parasite growth after in vitro with *P. falciparum* was measured. Here is displayed the correlation between RBC deformability as measured through microspherulometry (x axis), and the parasite growth (y axis) in the same 120 subjects, Fulani (in red) or non-Fulani (in grey). Linear regression slopes in Fulani and non-Fulani, along with 95% intervals of these lines, are also shown. RER: retention or enrichment rate.

Impact of subject plasma on phagocytosis of parasitized RBC and parasite growth in vitro.

In vitro phagocytosis by THP-1 monocytes of O+ RBC, infected with mature stages of the NF54 strain, and opsonized with plasma from 150 subjects (42 Fulani, 36 Gando, 37 Bariba, 35 Otamari) showed only mild differences (median values 35.29% in Fulani and 36.15% in non-Fulani; $p=0.75$; Figure 3C). Results when considering the four ethnic groups separately are displayed on Supplemental Figure 3A-C. A growth inhibition assay was performed on 46 subjects (16 Fulani, 30 non-Fulani, 50% adults). Median inhibition of parasite growth after adjustment to control was 51.49% and 53.62% in Fulani and non-Fulani, respectively ($p=0.90$; Figure 3D). Results in the 4 ethnic groups are displayed on Supplemental Figure 3D.

The adaptive IgM-related immune response is greater in Fulani than in non-Fulani subjects (Figure 5)

Total plasma IgM values (Figure 1G) were determined in 421 subjects. Median values were 1.41 g/L, and 1.57 g/L in non-Fulani and Fulani, respectively ($p=0.009$). As published previously (Arama et al., 2015b; Bolad et al., 2005; Israelsson et al., 2008), there was an enhanced humoral (IgG and IgM) anti-*P. falciparum* response among Fulani (Henry et al., 2017). To further explore a potential association between IgM memory B cells and splenic function (Kruetzmann et al., 2003), we performed a comprehensive B cell subpopulations analysis in a subgroup of 63 adults (22 Fulani, 41 non-Fulani). In Fulani, a higher proportion of circulating atypical IgM⁺ memory B cells (median 37.7% vs 11.7%, $p=0.0097$) and classical IgM⁺ memory B cells (10.8% vs 7.63%, $p=0.061$) was observed, while IgG memory B cells were less abundant in Fulani than in non-Fulani (classical IgG⁺ memory B cells: 47.5% vs 57.5%, $p=0.022$; atypical IgG⁺ memory B cells: 25.7% vs 45.2%, $p=0.0085$). The proportion of plasma cells (among CD19⁺ cells) was 0.64% and 1.27% in Fulani and non-Fulani, respectively ($p=0.02$).

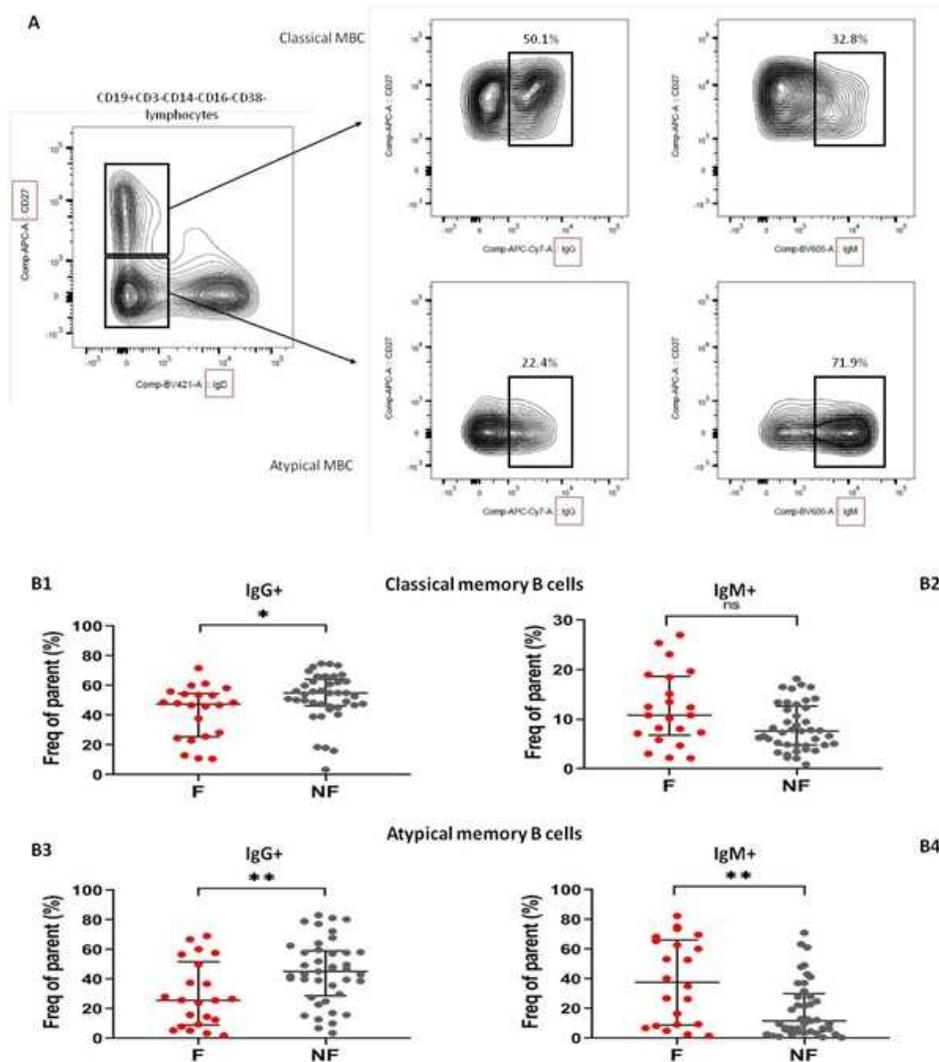


Figure 5. Fulani subjects have a higher proportion of circulating IgM-positive memory B cells. Circulating B cells phenotyping was performed in a subset on 63 adults (22 Fulani (F) and 41 non-Fulani (NF)). **(A)** Example of gating strategy from CD19+ cells, allowing to identify atypical (CD27-IgD-) and classical (CD27+IgD-) memory B cells, and their IgG+ and IgM+ subsets. **(B)** Proportion of classical (CD19+CD38-CD27+IgD-) IgG+ (**B1**), classical IgM+ (**B2**), atypical (CD19+CD38-CD27-IgD-) IgG+ (**B3**), atypical IgM+ (**B4**) memory B cells are displayed, as the percentage of the parent population. Bars indicate median and IQR. *: 0.01<p value<0.05 ; **: 0.001<p value<0.01. ns: non-significant.

Heritability analysis of circulating RBC deformability

Variance components analysis was used to estimate the genetic and environmental components of variance of circulating RBC deformability, as assessed by microspherulometry, after adjustment for

relevant covariates (RDT positivity and ethnicity). In a model incorporating household effects, the global heritability (h^2) of RBC deformability for the whole sample of 420 subjects was 0.36 ($p = 0.007$). A stratified analysis by ethnicity revealed striking differences between Fulani and non-Fulani, with a very high and highly significant heritability estimate in the 135 Fulani ($h^2 = 0.71$, $p = 0.0028$) and a near zero and nonsignificant one in the 285 non-Fulani ($h^2=0.01$, $p=0.49$) (Figure 6). The variance component attributable to shared household environmental factors (c^2) was only significant in non-Fulani ($c^2 = 0.30$, $p = 0.02$). These results are consistent with the patterns of phenotypic correlations among relative pairs observed in Fulani, with correlations being highest between first-degree relatives, with similar correlation values between siblings and parent–offspring pairs ($r=0.65$, $p < 10^{-5}$ and $r=0.51$, $p = 0.005$, respectively), lower but still significant between second-degree relatives ($r= 0.37$; $p = 0.015$) and even lower and not significant between more distant relatives ($r=0.23$; $p=0.22$) (Supplemental Table 2). This supports the existence of a strong, mainly additive, genetic component determining RBC deformability in Fulani.

In the 160 subjects without markers of infection (thick smear and RDT both negative), the heritability of RBC deformability was almost identical to that observed in the whole cohort ($h^2=0.38$, $p=0.15$) but raised to 0.72 ($p=0.0002$) in the 173 subjects with both markers positive, and to 0.99 with wide dispersion ($p=0.07$) in the 73 subjects with a positive RDT and a negative thick smear. This indicates that variations in the deformability of circulating RBC are under a strong influence of genetic determinants in Fulani and in subjects with positive markers of infection. The heritability of RBC deformability in Fulani with a positive RDT reached the maximum value of 1 ($p<10^{-5}$) with a household effect estimated to be zero.

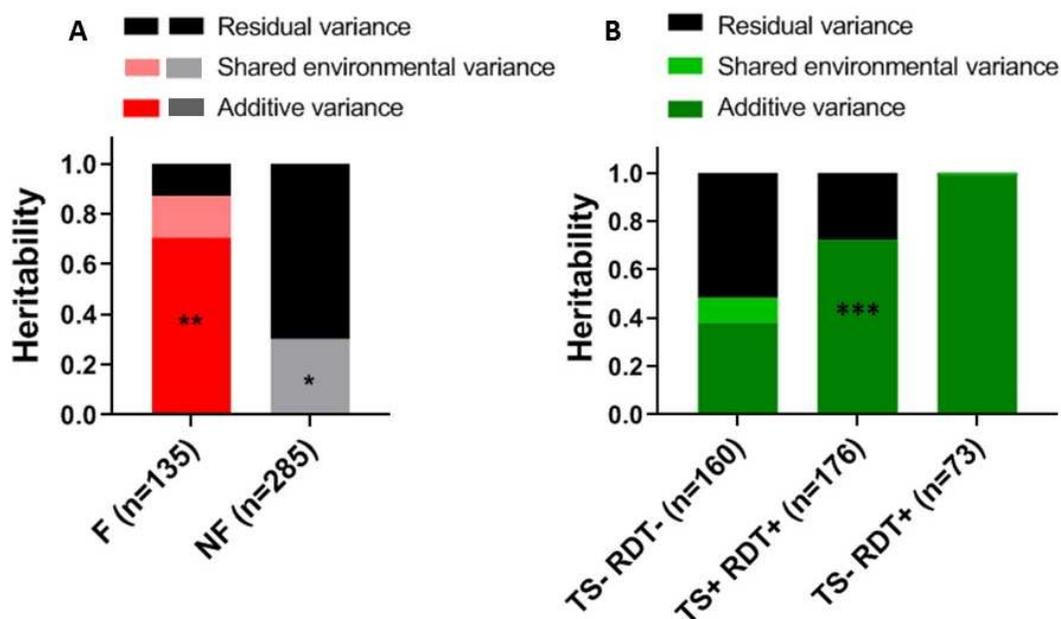


Figure 6. Heritability analysis of splenic RBC filtration. Heritability of circulating RBC deformability was calculated using a variance component approach with the SOLAR software in different groups according to ethnicity **(A)** or *P. falciparum* infection status **(B)**. Additive heritability is estimated as the ratio of the additive genetic variance component to the total phenotypic variance. The shared variance component represents the shared environmental effect related to the household. Residual component corresponds to the proportion of phenotypic variability that remains unexplained by the two previous ones. **(A)**, representation of heritability when comparing Fulani (F) and non-Fulani (NF). **(B)**, representation of heritability in the whole population, according to the malarial infection status. P-values were estimated using likelihood ratio tests. n: number of evaluated subjects; *: 0.01 < p value < 0.05; **: 0.001 < p value < 0.01; ***: p value < 0.001; TS: thick smear; RDT: rapid diagnostic test for malaria.

Discussion

Many high-quality studies have explored malaria-related phenotypes in African groups (Arama et al., 2015b, 2011; Boström et al., 2012; Cherif et al., 2016, 2012; Dolo et al., 2014, 2012a, 2012b, 2005; Farouk et al., 2005; Israelsson et al., 2008; Lopera-Mesa et al., 2015; Bakary Maiga et al., 2014; B. Maiga et al., 2014; Maiga et al., 2013; Mangano et al., 2008; McCall et al., 2010; Modiano et al., 1996; Nasr et al., 2018; Paganotti et al., 2006, 2004; Portugal et al., 2012; Quin et al., 2017; Sanou et al., 2012;

Traore et al., 2017; Vafa et al., 2009, 2007). The mechanisms underlying the high prevalence of splenomegaly in some groups, sometimes associated with anemia, immune activation and variable patterns of antimalarial protection are not fully understood yet. We performed a large multi-ethnic cohort study in Benin to test a previously proposed hypothesis (Buffet et al., 2009) whereby innate interactions between RBC and the spleen would contribute to malaria-related phenotypes in sub-Saharan Africa. More than five hundred children and adults participated in this study, which confirmed that, in Benin like in other African countries, splenomegaly is robustly more prevalent in Fulani subjects than in subjects from other groups living in sympatry (Arama et al., 2015b, 2011; Boström et al., 2012; Cherif et al., 2016, 2012; Dolo et al., 2014, 2012a, 2012b, 2005; Farouk et al., 2005; Israelsson et al., 2008; Lopera-Mesa et al., 2015; Bakary Maiga et al., 2014; B. Maiga et al., 2014; Maiga et al., 2013; Mangano et al., 2008; McCall et al., 2010; Modiano et al., 1996; Nasr et al., 2018; Paganotti et al., 2006, 2004; Portugal et al., 2012; Quin et al., 2017; Sanou et al., 2012; Traore et al., 2017; Vafa et al., 2009, 2007). Applying two different methods, ektacytometry and microspherulometry on an unprecedented number of samples, this study revealed that circulating RBC are significantly more deformable in Fulani subjects than in subjects from other groups. This inter-group difference in RBC deformability was observed only in parasite-positive subjects, enhanced RBC deformability being particularly obvious in Fulani with a positive malaria RDT. The heritability of RBC deformability, which was significant in the whole cohort, was very high in infected Fulani. The enhanced deformability of circulating RBC in a particular ethnic group and its independent correlation with markers of infection are original findings, as well as the high heritability of these new phenotypic traits.

A more stringent splenic filtration is expected to leave only the most deformable RBC in circulation (Buffet et al., 2011; Pivkin et al., 2016). We thus initially interpreted the enhancement of RBC deformability in Fulani as fully consistent with our initial hypothesis (Buffet et al., 2009). This model linking RBC deformability to malaria-related features in African groups requires however some adjustment to now fit all available data. The initial hypothesis predicted indeed that the “hyper-

stringent” splenic filtration of RBC would be present at baseline in Fulani. This was not confirmed by our recent findings as non-infected Fulani and non-infected subjects from other groups displayed similar RBC deformability. Differences were observed only in subjects carrying parasites or parasite antigens (referred to here as ‘parasite positivity’). The strong association between enhanced deformability of circulating RBC and parasite positivity in Fulani was unexpected. A refined version of our initial model is thus considered, whereby Fulani display an enhanced, more stringent splenic threshold for RBC filtration only when they are parasite-positive, a reactive process that would be absent in non-Fulani. Enhanced RBC deformability in parasite-positive Fulani was observed by ektacytometry only at 30 Pascals, a surrogate for shear stress across inter-endothelial slits in the splenic red pulp (Chien, 1987). In addition, differences in RBC deformability were particularly pronounced with microspherultration, which mimics the mechanical filtration of RBC by the spleen (Deplaine et al., 2011). Experimental transfusion of chromium-labelled RBC in humans (Lee et al., 1989; Looareesuwan et al., 1991, 1987a, 1987b; Woodruff et al., 1979) has shown that splenic clearance of altered and normal RBC is enhanced after malaria, especially when splenomegaly is present. This refined interpretation of previous data and recent findings, where RBC deformability is increased in parasite-positive Fulani due to an enhanced splenic clearance of less deformable infected and uninfected RBC, is therefore plausible. It would explain the higher prevalence of splenomegaly, anemia, and immune activation in Fulani. Unfortunately, the cross-sectional structure of our study and the relatively small number of adults with clinically palpable splenomegaly does not enable an entirely robust confirmation or rejection of this otherwise parsimonious hypothesis. In particular, splenomegaly was not associated with RBC deformability in the multivariate analysis, an association expected to be present if spleen congestion by rigid RBC occurs rapidly and to a clinically palpable level. Interestingly, if a causal relationship exists between parasite positivity and enhanced RBC deformability, it may also operate in the opposite direction. Rather than parasite positivity increasing RBC deformability (through enhanced splenic filtration), an inherently enhanced RBC deformability

may conversely increase the risk of parasite positivity. A subgroup of Fulani may harbour a sub-population of more deformable, infection-prone RBC. Most of these subjects would thus be also almost constantly infected. This hypothesis is supported by our observation that parasite growth *in vitro* positively correlates with enhanced deformability of circulating RBC. Less deformable RBC are partially resistant to *P. falciparum* invasion or growth *in vitro* (Ma et al., 2018; Mohandas et al., 1984; Pasvol et al., 1989). Here, more deformable RBC in some Fulani would be more susceptible to invasion or growth, as recently observed in a different context with young RBC (Clark et al., 2014). This hypothesis may explain the mild trend towards more prevalent infection in Fulani observed in our study, which in turn would induce splenomegaly, anemia and enhanced immune activation. A third mechanism may explain a temporal and causal relationship between parasite positivity and RBC deformability: an inflow of more deformable RBC triggered by infection. Several observations suggest however that this is not the most likely explanation of our findings. The over-prevalence of anemia in Fulani was mild, not significant and there was no correlation between hemoglobin values and RBC deformability. In addition, the 20-36% enrichment in deformable RBC in infected Fulani vastly outweighs the 0.5-2% reticulocytes concentration usually seen in malaria patients (Jauréguiberry et al., 2014; Looareesuwan et al., 1987b; Woodruff et al., 1979).

In conclusion, two main hypotheses can explain why Fulani subjects carrying *P. falciparum* have more deformable RBC in circulation. Some Fulani subjects may inherently harbour infection-prone RBC. Alternatively, parasite carriage may enhance the stringency of RBC filtration by the spleen. Both hypotheses also explain the over-prevalence of splenomegaly and the enhanced antimalarial adaptive immune response generally observed in Fulani. As previously observed, plasma IgM levels and IgM-expressing B-cell populations were higher or more prevalent in Fulani than in subjects from other groups. IgM-positive memory B cells have been linked to spleen and splenic function (Cameron et al., 2011; Weller et al., 2004) and may explain the higher production of anti-plasmodial IgM in Fulani (Arama et al., 2015b) through a predominantly splenic stimulation (Kruetzmann et al., 2003). The

“Fulani phenotype” is also strongly reminiscent of hyper-reactive malarial splenomegaly (HMS) (Bryceson et al., 1976), a syndrome defined by gross splenomegaly, elevated antibody concentrations to *P. falciparum*, low parasitemia, and elevated total IgM levels (Bates and Bedu-Addo, 1997). HMS is frequent in Fulani (Bryceson et al., 1976; Greenwood et al., 1987; Oomen et al., 1979).

Future longitudinal studies will deconvolute the temporal events that connect infection and RBC deformability with splenomegaly, anemia, and the stimulation of adaptive immunity. In the BAoBAB study area, Gando subjects are genetically Bariba but live like Fulani. This along with the high heritability of the new, well-defined phenotypes uncovered by our study create a strong opportunity for the identification of key genetic determinants of malaria pathogenesis and RBC physiology. Natural selection on RBC-, spleen- or malaria-related processes has been recently identified, such as variants in the *PDE10A* and *BDKRB2* genes that affect the human ability to withstand diving-related hypoxia likely through pooling of RBC in the spleen (Ilardo et al., 2018), or gain-of-function mutations in the *PIEZO-1* gene that may protect human subjects against malaria (Ma et al., 2018). Taken together, our results suggest that interactions between RBC and the spleen may be the initial process driving phenotypic specificities in Fulani. The enhanced immune response in Fulani against *P. falciparum* would be a major consequence of these earlier RBC-related events, that are expected to put in contact a higher number of infected RBC with macrophages, dendritic and B cells in the spleen. In sickle cell trait carriers, the enhanced splenic clearance of infected RBC is thought to be responsible for an increased antigen presentation in the spleen, and consequently for the development of a stronger anti *Plasmodium* antibody response (Gong et al., 2012).

Methods

Study approval.

The BAOBAB research program was reviewed and approved by the ethics committee of the Research Institute of Applied Biomedical Sciences (CER-ISBA/Institut des Sciences Biomédicales Appliquées) in Benin (No 61/CER/ISBA/15). It received support from the Ministry of Health of Benin and has been carried out in close collaboration with the National Malaria Control Programme. All study participants were informed during meetings conducted in villages before the beginning of the study. Individual written informed consent was obtained from adults or from the parents or guardians of children, using a consent form translated in the subject's native language (Ditamari, Bariba or Fulani).

Study setting and clinical evaluation.

This study was embedded in a program led by the French Research Institute for Development (Institut de Recherche pour le Développement, IRD) and Université Paris Descartes, aiming at deciphering the genetic, parasitological, environmental and behavioural determinants of the relative protection of Fulani from malaria (BAObAB study: Biocultural AdaptatiON to malaria in Atacora, northern Benin). This study recruited nuclear families and, in some instances, extended families.

The study was conducted in 4 rural villages (Goufanrou, Gorgoba, Tamande, Kouboro) located 40 km from the Natitingou city center, 3-15 km apart, in the Birni district of the Atacora department (Figure 7), a region of northwestern Benin with one of the highest prevalence of malaria in the country (Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique (INSAE) and ICF International, 2013). Malaria transmission is seasonal and *Plasmodium falciparum* is the predominant parasite species transmitted by *Anopheles gambiae* s.s. (85 %) and *Anopheles arabiensis* (15 %) (Yadouléton et al., 2010). Highest infection rates occur during the rainy season, from May to late October, with mean sporozoite inoculation rates reaching two infective bites per person per night (A. Djèntonin, personal communication, September, 2018), and then drop during the dry season from November to April (Gnanguenon et al., 2014). Most of the field work and experiments were performed at the end of the transmission season in December, 2017. This cross-sectional survey systematically recorded clinical

and biological information related to malaria (i.e., temperature, spleen enlargement rate, hemoglobin level, parasite carriage and parasite density). Included subjects underwent a physical examination, including tympanic temperature measurement, spleen palpation, signs of portal hypertension in case of splenomegaly. A rapid hemoglobin determination using the Hemocue© (Radiometer, Brønshøj, Denmark), and a rapid diagnostic test for malaria (RDT; SD BIOLINE Malaria Ag P.f©, Abbott, Chicago, IL) using immunochromatographic detection of Histidine Rich Protein 2 (HRP2) of *P. falciparum* were also performed. A thick smear was prepared from all subjects, fixed with methanol, stained with Giemsa and read at x1000 magnification. Parasitemia was determined by counting parasites against 500 leucocytes and assuming a total leucocyte count of 8000/mm³. A thick blood smear was declared negative when no parasite was detected in 200 fields. Only *P. falciparum* mono infections were analyzed. Treatment of malaria (artemether-lumefantrine, as recommended by the Beninese National Malaria Control Program) was provided to the study population at no cost.

Individual information (age, gender, ethnic background, symptoms, recent use of antimalarial agents) was collected. Ethnicity was assessed through self-declaration, and, to be eligible for the study, participants must have identified their parents and four grandparents as belonging to the same ethnic group as themselves (Bariba, Otamari, Gando or Fulani). Self-declarations were controlled and confirmed by community health workers and community leaders from each village. Familial relationships were built by questioning each of the household members and were further confirmed by village authorities. In the case of conflicting information, the ambiguous kinship relationships were clarified by genotyping individuals with the GlobalFiler® kit (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA). Reconstruction of family relationships resulted in 116 distinct pedigrees, including 103 nuclear and 13 extended families. Among the 420 individuals included in the heritability and familial correlation analyses, we identified 337 parent-offspring pairs, 138 sibling pairs, 59 half-sibling pairs, 16 grandparent-grandchild pairs, 47 avuncular pairs, 54 cousin pairs, 16 half-avuncular pairs, 6 great avuncular pairs and 4 half-cousin pairs. A field survey revealed that the 116 studied families lived in

189 distinct households at the time of study. Close members of a same pedigree did not always live in the same house and thus did not share the same household environment. Conversely, there were many cases where unrelated individuals or distant relatives (higher than the first degree) shared the same house.

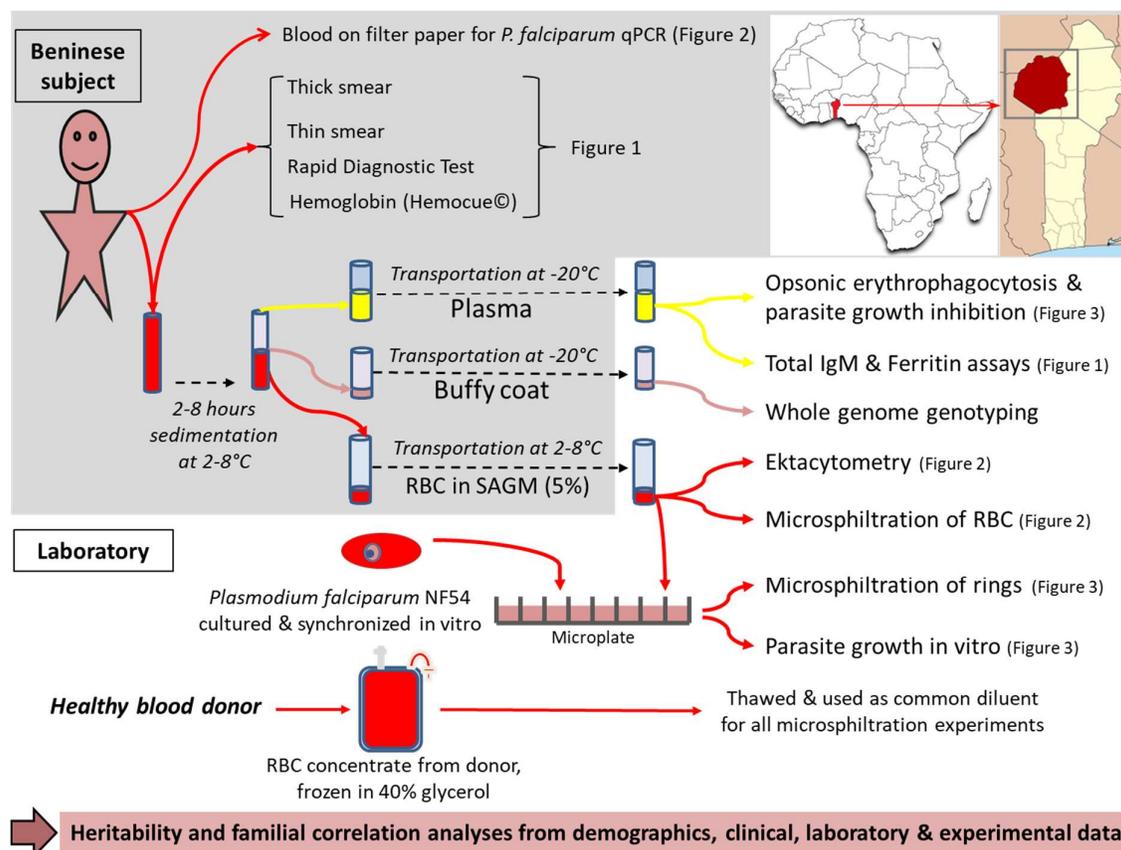


Figure 7. Overview of experimental procedures. Study location is indicated in the upper right corner (Birni district, Atacora department, Benin). The corresponding figures are indicated next to the experiment description. SAGM: saline, adenine, glucose, mannitol. Ektacytometry was performed on 212 samples because of a shortage of polyvinylpyrrolidone. In vitro infection of subject's RBC was performed on a subset of 120 subjects because of logistical and time constraints (obligation to perform many experiments in a short period of time, before storage-induced RBC degradation). PCR was performed on 424 samples because whole blood on filter paper could not be obtained in 97 subjects.

Blood samples.

Processing of blood samples is shown in Figure 7. Venous peripheral blood (4-6 ml for adults, 1-3 mL for children and infants) was collected on-site on EDTA (BD vacutainer®, Franklin Lakes, NJ) and immediately stored at 4-8°C until use. After sedimentation, plasma was collected and cryopreserved at -20°C, then -80°C and shipped to the central laboratory on dry ice. RBC were transferred into SAGM (saline, adenine, glucose, mannitol, Macopharma®, Tourcoing, France) a preservation medium used for transfusion, at 5% haematocrit, and shipped to the central laboratory at 4°C for phenotypic analysis. We had previously shown the stability of measures for up to 3 weeks under these storage conditions (Supplemental Figure 4A and 4B).

Total IgM measurement.

Immunoturbidimetric measurement was performed on an Architect C1600 analyzer (Abbott Laboratories Diagnostics Division, IL) according to the manufacturer recommendations (Abbott technical sheet: 1E01-21).

Circulating RBC deformability assays.

Ektacytometry (Bessis et al., 1980) was performed on SAGM-preserved RBC, diluted in viscous iso-osmolar polyvinylpyrrolidone (PVP; RR Mechatronics®, Zwaag, the Netherlands) at 0.5% haematocrit, temperature 37°C, between 9 and 17 days post sampling. We used a Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (RR Mechatronics®, Zwaag, the Netherlands), which evaluates the diffraction pattern of RBC through a laser, when elongated between two rotating cylinders at different shear stresses between 0.3 and 30 Pascals (Pa). Results were expressed as an Elongation Index (EI), which is the ratio of the difference between the 2 axes of the ellipsoidal diffraction pattern and the sum of these 2 axes. We collected EI at low (0.3 Pa, 3 Pa), intermediate (1.69 Pa), and high shear stress (30 Pa), the latter being close from what is encountered in the splenic red pulp microcirculation (Chien, 1987).

Microspherulometry (“microsphere filtration”; MS) assesses the ability of RBC to squeeze through narrow slits between metallic microbeads. This technique reflects the filtration of normal and abnormal RBC

in the splenic red pulp, as assessed by direct comparison with retention rates in isolated-perfused human spleens (Deplaine et al., 2011). It has been adapted to 96 and 384-wells microplates, allowing us to process numerous blood samples over a short period of time (Duez et al., 2018, 2015). Microspherulization was performed using frozen (-20°C) 96-wells plates thawed just before use. Plates were prepared with a Tecan® automat as described (Duez et al., 2015). Control RBC were obtained from an O-negative healthy blood donor (Etablissement Français du Sang, Lille, France), and were carboxyfluorescein diacetate succinyl ester (CFSE)-stained (20 µmol/l; Life Technologies, Carlsbad, CA). For each sample tested, the cell mix consisted of 95% control stained RBC, and 5% tested RBC (left unlabelled) from Beninese subjects. The hematocrit of the mix was 1%, and cells were diluted in Krebs-Henseleit buffer (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) modified with 2.1 g/l of sodium bicarbonate and 0.175 g/l of calcium chloride, and supplemented with Albumax® (0.5%; Life Technologies, Carlsbad, CA), at a pH of 7.4. Each RBC sample was tested in triplicate. Results were expressed as retention or enrichment rates (RER), using flow cytometry analysis of upstream and downstream samples (BD FACS Cantoll®, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). RER was calculated as follows: $([\text{proportion of unlabelled RBC in downstream sample}] - [\text{proportion of unlabelled RBC in upstream sample}]) / [\text{proportion of unlabelled RBC in upstream sample}]$. Positive values, called enrichment, indicate that RBC from the subject are more deformable than control RBC, whereas negative values, called retention, indicate the opposite. Positive controls were glutaraldehyde (0.8%)-treated RBC, which are completely retained; negative controls were unstained control RBC. For each subject, the mean value of RER was calculated after exclusion of outliers, and results were normalized to the negative control value. Experiments were performed 15 to 17 days after RBC collection. Cytometric data were acquired with FACSDIVA software v6.1.3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and analyzed with FlowJo v10.0 software (FlowJo, LLC, Ashland, OR).

Deformability of P. falciparum-infected RBC.

Plasmodium falciparum NF54 strain was propagated in culture as described (Trager and Jensen, 1976). The day of the experiment, enrichment in mature forms (late trophozoites and schizonts) was performed through magnetic activated cell sorting (MACS, Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Germany). RBC from 120 selected subjects (30 Fulani, 30 Gando, 30 Bariba, 30 Otamari, 50% adults, 50% children) were put into 96-well microplates in triplicate and washed with RPMI. Schizont-infected erythrocytes were then added, to obtain a final haematocrit of 2% at 0.8-1% parasitemia. Plates were then incubated overnight at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. The next day, cultures containing ring-infected RBC 12-16 hours post invasion, were directly processed by microfiltration. Upstream and downstream samples were fixed with 0.5% glutaraldehyde then stained with SYBR Green® (final concentration 2X; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) before flow cytometry analysis. SYBR Green® stains DNA, which is present in parasites but absent in uninfected RBC enabling the discrimination between infected and uninfected RBC. Retention or enrichment rates were then quantified.

Parasitic growth evaluation in culture.

In parallel with the infected RBC deformability assay, for the same aforementioned 120 subjects, a 96-well microplate containing washed RBC was seeded at 0.4-0.5% parasitemia, and incubated at 37°C, with 5% CO₂. Parasitemia was quantified at day 0 and day 3, after two reinvasion cycles, through DNA staining with SYBR Green® (dilution 1/5000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and flow cytometry analysis. Results were expressed as fold change in parasitemia (day 3 value divided by day 0 value).

Opsonic erythrophagocytosis assay.

Human cell line-derived THP1 monocytes were cultivated in RPMI supplemented with 20% Fetal Calf Serum, 1% penicillin-streptomycin, sodium bicarbonate (1.5 g/l). *P. falciparum* NF54 strain was cultured as previously described. On the day of the experiment, plasma samples previously collected

in North Benin (3 μ l) were poured in duplicate in a 96-well plate, diluted in RPMI. Enrichment in mature parasite forms was obtained by MACS and assessed on Giemsa-stained thin films. RBC were then stained with CFSE, and thoroughly washed. CFSE-stained infected RBC were co-incubated (500 000 RBC per well) with each subject plasma during 30 minutes at 37°C. THP1 monocytes were counted with a Casy© device (Omni Life Sciences, Bremen, Germany) to adjust concentration at 500 000/mm³. Finally, in each well, 50 000 monocytes were co-incubated with RBC (ratio monocytes/infected RBC 1/10) during one hour at 37°C. The positive control was infected RBC opsonized with a pool of hyperimmune sera originating from malaria-exposed subjects. Reaction was stopped with a cold PBS washing. To eliminate RBC that were adherent, but not phagocytosed by THP1 cells, wells were stained with a PE-conjugated anti glycoporphin A (CD235a) antibody (1 μ l in 100 μ l of PBS; Miltenyi Biotec©, Bergisch Gladbach, Germany). Erythrophagocytosis was measured through flow cytometry analysis of the proportion of anti GPA-negative, CFSE-positive monocytes. At least 5000 events per well were collected and the mean value of each duplicate was considered. Results were expressed as percentage of phagocytosis normalized to the positive control value.

Inhibition of Plasmodium falciparum growth by immune plasma.

In 46 subjects, 5 μ l of thawed plasma (without heat inactivation) were dispatched in microplates, added to 100 μ l of parasite culture medium, in duplicate. *P. falciparum* NF 54 strain cultured as described was enriched in mature forms by MACS. Parasitized RBC were poured in plates at 0.5%, parasitemia, 2% hematocrit. Plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 72 h before fixation with 0.25% glutaraldehyde, staining with Hoechst 34580 (1 μ g/ml; BD Bioscience, Franklin Lake, NJ) and quantification of parasitemia using a BD FACS Canto II© flow cytometer. Control plasma was from a French malaria-naive blood donor. Growth inhibition was calculated as follows: $100 - (\text{parasitemia with subject plasma} / \text{parasitemia with control plasma}) \times 100$. For each subject, mean value of the duplicate was considered.

Nucleic acid extraction and real-time quantitative PCR (qPCR)

Total nucleic acids were extracted from filter papers containing approximately 10 µL of dried whole blood using an optimized Chelex protocol. Final eluate volume was 140 µL. Two species-specific qPCRs were performed. The first qPCR targeted a single-copy gene (human albumin or *alb* ; forward and reverse primers were GCTGTCATCTCTTGTTGGGCTG and AAACATCATGGGAGCTGCTGGTT, 140-bp amplicon (Sabbagh et al., 2013)) and served as an internal extraction control. The second qPCR targeted a multiple copy *P. falciparum* gene (*cytochrome b* or *pficytb*, with an average 20 copies per parasite; forward and reverse primers were TTGGTGCTAGAGATTATTCTGTTCCCT and GGAGCTGTAATCATAATGTGTTTCGTC, 188-bp amplicon). qPCRs were carried out in 15 µl in a 384-well plate using SensiFAST™ SYBR Hi-ROX kit (Bioline, London, UK), 0.5 µM of each forward and reverse primer and 2.5 µl of template DNA. Amplifications were performed in an Applied-Biosystems 7900 HT Fast Real Time PCR machine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA): 95°C for 3 min; then 40 cycles of 95°C for 15 sec, and 63°C for 1 min. Several controls were run on each 384-well plate: water, *Plasmodium*-free human DNA, and seven DNA from *Plasmodium*-infected from blood isolates (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, and four different *P. falciparum*). For tested DNA samples, the *alb* and *pficytb* qPCRs were performed once and as duplicates, respectively, on each plate. Tested DNA samples were scored as *P. falciparum*-positive when two conditions were met: 1) the *alb* qPCR gave a threshold value (Ct) < 28 with a melt curve and temperature similar to corresponding positive controls; and 2) the two *pficytb* qPCR replicates gave a Ct ≤ 38 with a melt curve and temperature similar to corresponding positive controls. All amplification and melt curves were individually inspected by eye.

Definitions used for phenotypic analysis.

Anemia was defined according to WHO criteria (WHO, 2011), based on the age-related hemoglobin levels as follows: lower than 11 g/dL in 0-4-year-olds; lower than 11.5 g/dL in 5-11-year-olds; lower

than 12 g/dL in 12-14-year-olds; lower than 12 g/dL in in adult women and lower than 13 g/dL in adult men. Fever was defined as a tympanic temperature of 38°C or more.

Statistics.

Binary variables were compared between groups using Chi-squared or Fisher's exact test, as appropriate. Continuous variables were compared through Student's t test or Mann-Whitney test, when comparing 2 groups; and through ANOVA or Kruskal-Wallis test, when comparing more than 2 groups, as appropriate. Multivariate analyses were performed using regression models, logistic or linear according to the dependent variable. Variables with p-value < 0.2 in univariate analysis were included in multivariate models, along with variables with potential strong interaction with the results, based on pathophysiological findings. All tests were 2-sided and a p-value lower than 0.05 was considered significant. Analyses were performed with GraphPad Prism 6© (La Jolla, CA), R© (version 3.4.4), and RStudio© (version 1.1.442) softwares.

Heritability analysis.

Heritability (h^2) was estimated using the variance-components approach implemented in the SOLAR package, which simultaneously utilizes data on all family relationships (Almasy and Blangero, 1998). This method applies maximum likelihood estimation to a mixed effects model that incorporates fixed effects for known covariates and variance components for genetic and environmental effects. The genetic component is assumed to be polygenic with no variation attributable to dominance components. A variance component was included in the model to represent the possible shared environmental effect related to the household (environmental exposures shared by individuals living in the same house at the time of study), also referred to as 'household effects' (c^2). Heritability was estimated as the ratio of additive genetic variance to the total phenotypic variance unexplained by covariates. Estimates of the means and variances of components of the models were obtained by maximum likelihood methods and significance was determined by likelihood ratio tests.

Intrafamilial correlation coefficients were estimated using the pairwise weighting scheme for all available pairs of relatives in the pedigrees using the FCOR program within the SAGE v6.3 software package (S.A.G.E. [2016] *Statistical Analysis for Genetic Epidemiology*, Release 6.4: <http://darwin.cwru.edu>). Correlations were calculated for the residual trait values obtained from a multivariate linear regression model, including relevant covariates (here RDT positivity and ethnicity). Homogeneity testing of correlations among subtypes (e.g. mother-offspring and father-offspring) within main type (e.g. parent-offspring) was also performed. Under the null hypothesis of homogeneity, the test statistic has an approximate χ^2 distribution with degrees of freedom equal to the number of subtypes minus one.

Circulating B cell phenotyping

In a sub-cohort of 63 adult subjects, venous blood was collected on heparin, and PBMC were isolated through the Ficoll density gradient method, then frozen in 90% FCS, 10% DMSO and shipped to France on dry ice. PBMC were thawed, washed in RPMI/FCS 50%, and resuspended in RPMI. The following antibodies were used for phenotyping: IgM MHM88 (BV605) (BioLegend, San Diego, CA), CD38 HIT2 (PerCPCy 5.5), CD27 MT271 (APC) (Sony, San Jose, CA), CD3 UCHT1 (AF700), CD14 M5E2 (AF700), CD16 3G8 (AF700), IgD IA6-2 (BV421), CD19 HIB19 (PECF594), IgG G18-145 (APCH7), CD24 ML5 (FITC), CD10 Hi10a (PE), CD21 BLY4 (PECy7) (BD Biosciences, San Jose, CA). Viability was assessed with LiveDead Aqua© (Thermofisher, Waltham, MA) staining. Analysis was made on a BD LSRFortessa© (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) cytometer and cytometric data were analyzed through FlowJo v10.0 software. The following B cell subpopulations were analyzed: total B cells (CD19+CD3-CD14-CD16-), classical memory B cells (CD19+CD38-CD27-IgD-), atypical memory B cells (CD19+CD38-CD27-IgD-), IgM+/IgD+ memory B cells (CD19+CD38-CD27+IgD+), IgM-only memory B cells (CD19+CD38-CD27+IgD-IgM+), plasma cells (CD19+CD38^{high}CD24-CD27+), naïve B cells (CD19+CD38-CD27-IgD+) and transitional B cells (CD19+CD38+CD27-IgD+CD24+CD10+).

Author contributions

AS, AG, PB and BH designed the study; BH, GV, CR, P-A N, AF, CC, JS, C-H C, EC, MM, FA, RA, NF, JC, AS and PB performed the experiments; HA, AS, AG, MG, FT, DC, JC, PB, BH collected clinical data; FP, CK and AS analyzed genetic data; GM, FS, OH provided scientific insights to experiments design; BH and PB wrote the initial draft of the manuscript; all authors critically reviewed and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank all the subjects who participated in the study; Michaël Dussiot, Mickaël Marin, Sylvestre Biligui and Nathalie Chartrel for outstanding technical support; the research team in Benin for excellent technical and logistical achievements: Séverin Vignigbe, Pépin Kounou, Arnaud Fara Sarre, Guerelle Gnamou, Sabi N'Dah Kouagou, Wilson Houssou, Francis Homegnon; Jehane Fadlallah and Marc Pineton de Chambrun for their help in the recruitment of control patients; Nicolas Bréchet for his logistical help; Adrian Luty and Jacques Lebras for giving scientific guidance and participating in discussions during the course of this research. This research was supported by a grant from Labex GR-Ex and from the National Geographic Society Committee for Research and Exploration (Grant 9804-15). The labex GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051 is funded by the program Investissements d'avenir of the French National Research Agency, reference ANR-11-IDEX-0005-02. It also received funding from IMEA (Institut de Médecine et d'Epidémiologie Appliquée) and IRD (Institut de Recherche pour le Développement); BH was supported by a grant from Région Ile de France (DIM Malinf ; grant dim150030).

This work is dedicated to the memory of Professor Ogobara Doumbo (1956-2018), whose global contribution to this field of malaria research was considerable, among numerous other major achievements.

Competing interests

The authors have declared that no conflict of interest exists.

References

Allison AC. 2009. Genetic control of resistance to human malaria. *Curr Opin Immunol* **21**:499–505.

doi:10.1016/j.coi.2009.04.001

Almasy L, Blangero J. 1998. Multipoint quantitative-trait linkage analysis in general pedigrees. *Am J Hum Genet* **62**:1198–1211. doi:10.1086/301844

Arama C, Giusti P, Boström S, Dara V, Traore B, Dolo A, Doumbo O, Varani S, Troye-Blomberg M.

2011. Interethnic differences in antigen-presenting cell activation and TLR responses in Malian children during *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS ONE* **6**:e18319.

doi:10.1371/journal.pone.0018319

Arama C, Maiga B, Dolo A, Kouriba B, Traoré B, Crompton PD, Pierce SK, Troye-Blomberg M, Miller

LH, Doumbo OK. 2015a. Ethnic differences in susceptibility to malaria: what have we learned from immuno-epidemiological studies in West Africa? *Acta Trop* **146**:152–156.

doi:10.1016/j.actatropica.2015.03.023

Arama C, Skinner J, Doumbo D, Portugal S, Tran TM, Jain A, Traore B, Doumbo OK, Davies DH,

Troye-Blomberg M, Dolo A, Felgner PL, Crompton PD. 2015b. Genetic Resistance to Malaria Is Associated With Greater Enhancement of Immunoglobulin (Ig)M Than IgG Responses to a

- Broad Array of Plasmodium falciparum Antigens. *Open Forum Infect Dis* **2**:ofv118.
doi:10.1093/ofid/ofv118
- Bates I, Bedu-Addo G. 1997. Review of diagnostic criteria of hyper-reactive malarial splenomegaly. *Lancet* **349**:1178. doi:10.1016/S0140-6736(05)63061-9
- Bell DR, Wilson DW, Martin LB. 2005. False-positive results of a Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2-detecting malaria rapid diagnostic test due to high sensitivity in a community with fluctuating low parasite density. *Am J Trop Med Hyg* **73**:199–203.
- Bereczky S, Dolo A, Maiga B, Hayano M, Granath F, Montgomery SM, Daou M, Arama C, Troye-Blomberg M, Doumbo OK, Färnert A. 2006. Spleen enlargement and genetic diversity of Plasmodium falciparum infection in two ethnic groups with different malaria susceptibility in Mali, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **100**:248–257. doi:10.1016/j.trstmh.2005.03.011
- Bessis M, Mohandas N, Feo C. 1980. Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices. *Blood Cells* **6**:315–327.
- Bolad A, Farouk SE, Israelsson E, Dolo A, Doumbo OK, Nebié I, Maiga B, Kouriba B, Luoni G, Sirima BS, Modiano D, Berzins K, Troye-Blomberg M. 2005. Distinct interethnic differences in immunoglobulin G class/subclass and immunoglobulin M antibody responses to malaria antigens but not in immunoglobulin G responses to nonmalarial antigens in sympatric tribes living in West Africa. *Scand J Immunol* **61**:380–386. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01587.x
- Boström S, Giusti P, Arama C, Persson J-O, Dara V, Traore B, Dolo A, Doumbo O, Troye-Blomberg M. 2012. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to Plasmodium falciparum infection in children living in sympatry in Mali. *Malar J* **11**:109. doi:10.1186/1475-2875-11-109
- Bryceson AD, Fleming AF, Edington GM. 1976. Splenomegaly in Northern Nigeria. *Acta Trop* **33**:185–214.

- Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, Turner GD, Mercereau-Puijalon O. 2011. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood* **117**:381–392. doi:10.1182/blood-2010-04-202911
- Buffet PA, Safeukui I, Milon G, Mercereau-Puijalon O, David PH. 2009. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. *Curr Opin Hematol* **16**:157–164. doi:10.1097/MOH.0b013e32832a1d4b
- Cameron PU, Jones P, Gorniak M, Dunster K, Paul E, Lewin S, Woolley I, Spelman D. 2011. Splenectomy Associated Changes in IgM Memory B Cells in an Adult Spleen Registry Cohort. *PLOS ONE* **6**:e23164. doi:10.1371/journal.pone.0023164
- Cherif M, Amoako-Sakyi D, Dolo A, Pearson J-O, Gyan B, Obiri-Yeboah D, Nebie I, Sirima SB, Doumbo O, Troye-Blomberg M, Bakary M. 2016. Distribution of FcγR gene polymorphisms among two sympatric populations in Mali: differing allele frequencies, associations with malarionometric indices and implications for genetic susceptibility to malaria. *Malar J* **15**:29. doi:10.1186/s12936-015-1082-8
- Cherif MK, Sanou GS, Maiga B, Israelsson E, Ouédraogo AL, Bougouma EC, Diarra A, Ouédraogo A, Ouattara AS, Troye-Blomberg M, Dolo A, Cavanagh DR, Theisen M, Modiano D, Sirima SB, Nebié I. 2012. FcγRIIIa polymorphism and anti-malaria-specific IgG and IgG subclass responses in populations differing in susceptibility to malaria in Burkina Faso. *Scand J Immunol* **75**:606–613. doi:10.1111/j.1365-3083.2012.02690.x
- Chien S. 1987. Physiological and pathophysiological significance of hemorheology. *Clinical Hemorheology. Developments in Cardiovascular Medicine*. Springer. pp. 125–164.
- Clark MA, Goheen MM, Fulford A, Prentice AM, Elnagheeb MA, Patel J, Fisher N, Taylor SM, Kasthuri RS, Cerami C. 2014. Host iron status and iron supplementation mediate susceptibility to erythrocytic stage *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications* **5**:4446. doi:10.1038/ncomms5446

- Cranston HA, Boylan CW, Carroll GL, Sutera SP, Williamson JR, Gluzman IY, Krogstad DJ. 1984. Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability. *Science* **223**:400–403.
- Creasey A, Giha H, Hamad AA, El Hassan IM, Theander TG, Arnot DE. 2004. Eleven years of malaria surveillance in a Sudanese village highlights unexpected variation in individual disease susceptibility and outbreak severity. *Parasitology* **129**:263–271.
- Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, Biligui S, Guillotte M, Guitton C, Dokmak S, Aussilhou B, Sauvanet A, Cazals Hatem D, Paye F, Thellier M, Mazier D, Milon G, Mohandas N, Mercereau-Puijalon O, David PH, Buffet PA. 2011. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood* **117**:e88-95. doi:10.1182/blood-2010-10-312801
- Dolo A, Maïga B, Dara V, Tapily A, Tolo Y, Arama C, Daou M, Doumbo O. 2012a. [Place of malaria among febrile illnesses in two ethnic tribes living in sympatry in Mali from 1998 to 2008]. *Bull Soc Pathol Exot* **105**:377–383. doi:10.1007/s13149-012-0249-6
- Dolo A, Maïga B, Guindo A, Diakité S a. S, Diakite M, Tapily A, Traoré M, Sangaré B, Arama C, Daou M, Doumbo O. 2014. [Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (A-376/202) in three Malian ethnic groups]. *Bull Soc Pathol Exot* **107**:165–170. doi:10.1007/s13149-014-0372-7
- Dolo A, Maïga B, Tolo Y, Tapily A, Arama C, Daou M, Baby M, Traore B, Doumbo O. 2012b. [Relationship between malaria and anemia in two ethnic groups living in sympatry in Mali]. *Bull Soc Pathol Exot* **105**:370–376. doi:10.1007/s13149-012-0265-6
- Dolo A, Modiano D, Maïga B, Daou M, Dolo G, Guindo H, Ba M, Maïga H, Coulibaly D, Perlman H, Blomberg MT, Touré YT, Coluzzi M, Doumbo O. 2005. Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am J Trop Med Hyg* **72**:243–248.

- Dondorp AM, Angus BJ, Hardeman MR, Chotivanich KT, Silamut K, Ruangveerayuth R, Kager PA, White NJ, Vreeken J. 1997. Prognostic significance of reduced red blood cell deformability in severe falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* **57**:507–511.
- Dondorp AM, Nyanoti M, Kager PA, Mithwani S, Vreeken J, Marsh K. 2002. The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe falciparum malaria and its restoration by blood transfusion. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **96**:282–286.
- Duez J, Carucci M, Garcia-Barbazan I, Corral M, Perez O, Presa JL, Henry B, Roussel C, Ndour PA, Rosa NB, Sanz L, Gamo F-J, Buffet P. 2018. High-throughput microfiltration to assess red blood cell deformability and screen for malaria transmission-blocking drugs. *Nat Protoc* **13**:1362–1376. doi:10.1038/nprot.2018.035
- Duez J, Holleran JP, Ndour PA, Loganathan S, Amireault P, Français O, El Nemer W, Le Pioufle B, Amado IF, Garcia S, Chartrel N, Le Van Kim C, Lavazec C, Avery VM, Buffet PA. 2015. Splenic retention of Plasmodium falciparum gametocytes to block the transmission of malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **59**:4206–4214. doi:10.1128/AAC.05030-14
- Farouk SE, Dolo A, Bereczky S, Kouriba B, Maiga B, Färnert A, Perlmann H, Hayano M, Montgomery SM, Doumbo OK, Troye-Blomberg M. 2005. Different antibody- and cytokine-mediated responses to Plasmodium falciparum parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. *Microbes Infect* **7**:110–117. doi:10.1016/j.micinf.2004.09.012
- Gnanguenon V, Govoetchan R, Agossa FR, Ossè R, Oke-Agbo F, Azondekon R, Sovi A, Attolou R, Badirou K, Tokponnon FT, Padonou GG, Akogbeto MC. 2014. Transmission patterns of Plasmodium falciparum by Anopheles gambiae in Benin. *Malar J* **13**. doi:10.1186/1475-2875-13-444
- Gong L, Maiteki-Sebuguzi C, Rosenthal PJ, Hubbard AE, Drakeley CJ, Dorsey G, Greenhouse B. 2012. Evidence for both innate and acquired mechanisms of protection from Plasmodium falciparum in children with sickle cell trait. *Blood* **119**:3808–3814. doi:10.1182/blood-2011-08-371062

Greenwood BM, Groenendaal F, Bradley AK, Greenwood AM, Shenton F, Tulloch S, Hayes R. 1987.

Ethnic differences in the prevalence of splenomegaly and malaria in The Gambia. *Ann Trop Med Parasitol* **81**:345–354.

Haldane J. 1949. Disease and evolution. *La Ricerca Scientifica* **19**:68–76.

Henry B, Roussel C, Ndour PA, Mbengue B, Albert S, Duboin J, Carucci M, Duez J, Fricot A, Aussenac F, Akpovi H, Clain J, Courtin D, Garcia A, Sabbagh A, Buffet P. 2017. Exploration of interethnic susceptibility to malaria in Benin. Abstract 17-LB-4411-ASTMH. Presented at the 66th meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Baltimore, MD: American Society of Tropical Medicine and Hygiene. doi:<https://doi.org/10.4269/ajtmh.abstract2017>

Ilardo MA, Moltke I, Korneliussen TS, Cheng J, Stern AJ, Racimo F, de Barros Damgaard P, Sikora M, Seguin-Orlando A, Rasmussen S, van den Munckhof ICL, Ter Horst R, Joosten LAB, Netea MG, Salingkat S, Nielsen R, Willerslev E. 2018. Physiological and Genetic Adaptations to Diving in Sea Nomads. *Cell* **173**:569-580.e15. doi:10.1016/j.cell.2018.03.054

Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique (INSAE), ICF International. 2013.

Enquête Démographique et de Santé du Bénin, 2017-2018.

Israelsson E, Vafa M, Maiga B, Lysén A, Iriemenam NC, Dolo A, Doumbo OK, Troye-Blomberg M, Berzins K. 2008. Differences in Fcγ receptor 1a genotypes and IgG subclass pattern of anti-malarial antibodies between sympatric ethnic groups in Mali. *Malar J* **7**:175. doi:10.1186/1475-2875-7-175

Jauréguiberry S, Ndour PA, Roussel C, Ader F, Safeukui I, Nguyen M, Biligui S, Ciceron L, Mouri O, Kendjo E, Bricaire F, Vray M, Angoulvant A, Mayaux J, Haldar K, Mazier D, Danis M, Caumes E, Thellier M, Buffet P, French Artesunate Working Group. 2014. Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins. *Blood* **124**:167–175. doi:10.1182/blood-2014-02-555953

- Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter H-H, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, Carsetti R. 2003. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med* **197**:939–945. doi:10.1084/jem.20022020
- Lee SH, Looareesuwan S, Wattanagoon Y, Ho M, Wuthiekanun V, Vilaiwana N, Weatherall DJ, White NJ. 1989. Antibody-dependent red cell removal during *P. falciparum* malaria: the clearance of red cells sensitized with an IgG anti-D. *Br J Haematol* **73**:396–402.
- Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. 2013. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **11**:623–639. doi:10.1586/eri.13.45
- Looareesuwan S, Davis TM, Pukrittayakamee S, Supanaranond W, Desakorn V, Silamut K, Krishna S, Boonamrung S, White NJ. 1991. Erythrocyte survival in severe *falciparum* malaria. *Acta Trop* **48**:263–270.
- Looareesuwan S, Ho M, Wattanagoon Y, White NJ, Warrell DA, Bunnag D, Harinasuta T, Wyler DJ. 1987a. Dynamic alteration in splenic function during acute *falciparum* malaria. *N Engl J Med* **317**:675–679. doi:10.1056/NEJM198709103171105
- Looareesuwan S, Merry AH, Phillips RE, Pleehachinda R, Wattanagoon Y, Ho M, Charoenlarp P, Warrell DA, Weatherall DJ. 1987b. Reduced erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients. *Br J Haematol* **67**:473–478.
- Lopera-Mesa TM, Doumbia S, Konaté D, Anderson JM, Doumbouya M, Keita AS, Diakité SA, Traoré K, Krause MA, Diouf A, Moretz SE, STullo G, Miura K, Gu W, Fay MP, Taylor SM, Long CA, Diakité M, Fairhurst RM. 2015. Impact of red blood cell variants on childhood malaria in Mali: a prospective cohort study. *Lancet Haematol* **2**:e140–e149. doi:10.1016/S2352-3026(15)00043-5
- Ma S, Cahalan S, LaMonte G, Grubaugh ND, Zeng W, Murthy SE, Paytas E, Gamini R, Lukacs V, Whitwam T, Loud M, Lohia R, Berry L, Khan SM, Janse CJ, Bandell M, Schmedt C, Wengelnik K,

- Su AI, Honore E, Winzeler EA, Andersen KG, Patapoutian A. 2018. Common PIEZO1 Allele in African Populations Causes RBC Dehydration and Attenuates Plasmodium Infection. *Cell* **173**:443-455.e12. doi:10.1016/j.cell.2018.02.047
- Maiga Bakary, Dolo A, Campino S, Sepulveda N, Corran P, Rockett KA, Troye-Blomberg M, Doumbo OK, Clark TG. 2014. Glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and susceptibility to mild malaria in Dogon and Fulani, Mali. *Malar J* **13**:270. doi:10.1186/1475-2875-13-270
- Maiga B., Dolo A, Touré O, Dara V, Tapily A, Campino S, Sepulveda N, Corran P, Rockett K, Clark TG, Blomberg MT, Doumbo OK. 2014. Fc gamma receptor IIa-H131R polymorphism and malaria susceptibility in sympatric ethnic groups, Fulani and Dogon of Mali. *Scand J Immunol* **79**:43–50. doi:10.1111/sji.12122
- Maiga B, Dolo A, Touré O, Dara V, Tapily A, Campino S, Sepulveda N, Risley P, Silva Nilupa, Silva Nipula, Corran P, Rockett KA, Kwiatkowski D, MalariaGEN Consortium, Clark TG, Troye-Blomberg M, Doumbo OK. 2013. Human candidate polymorphisms in sympatric ethnic groups differing in malaria susceptibility in Mali. *PLoS ONE* **8**:e75675. doi:10.1371/journal.pone.0075675
- Mangano VD, Luoni G, Rockett KA, Sirima BS, Konaté A, Forton J, Clark TG, Bancone G, Sadighi Akha E, Akha ES, Kwiatkowski DP, Modiano D. 2008. Interferon regulatory factor-1 polymorphisms are associated with the control of Plasmodium falciparum infection. *Genes Immun* **9**:122–129. doi:10.1038/sj.gene.6364456
- Mangano VD, Modiano D. 2014. An evolutionary perspective of how infection drives human genome diversity: the case of malaria. *Curr Opin Immunol* **30**:39–47. doi:10.1016/j.coi.2014.06.004
- McCall MBB, Hopman J, Daou M, Maiga B, Dara V, Ploemen I, Nganou-Makamdop K, Niangaly A, Tolo Y, Arama C, Bousema JT, van der Meer JW, van der Ven AJAM, Troye-Blomberg M, Dolo A, Doumbo OK, Sauerwein RW. 2010. Early interferon-gamma response against Plasmodium

- falciparum correlates with interethnic differences in susceptibility to parasitemia between sympatric Fulani and Dogon in Mali. *J Infect Dis* **201**:142–152. doi:10.1086/648596
- Miller LH, Usami S, Chien S. 1971. Alteration in the rheologic properties of Plasmodium knowlesi--infected red cells. A possible mechanism for capillary obstruction. *J Clin Invest* **50**:1451–1455. doi:10.1172/JCI106629
- Modiano D, Petrarca V, Sirima BS, Nebié I, Diallo D, Esposito F, Coluzzi M. 1996. Different response to Plasmodium falciparum malaria in west African sympatric ethnic groups. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:13206–13211.
- Mohandas N, Lie-Injo LE, Friedman M, Mak JW. 1984. Rigid membranes of Malayan ovalocytes: a likely genetic barrier against malaria. *Blood* **63**:1385–1392.
- Nasr A, Saleh AM, Eltoum M, Abushouk A, Hamza A, Aljada A, El-Toum ME, Abu-Zeid YA, Allam G, ElGhazali G. 2018. Antibody responses to P. falciparum Apical Membrane Antigen 1(AMA-1) in relation to haemoglobin S (HbS), HbC, G6PD and ABO blood groups among Fulani and Masaleit living in Western Sudan. *Acta Trop* **182**:115–123. doi:10.1016/j.actatropica.2018.02.030
- Oomen JM, Meuwissen JH, Gemert W. 1979. Differences in blood status of three ethnic groups inhabiting the same locality in Northern Nigeria. Anaemia, splenomegaly and associated causes. *Trop Geogr Med* **31**:587–606.
- Paganotti GM, Babiker HA, Modiano D, Sirima BS, Verra F, Konaté A, Ouedraogo AL, Diarra A, Mackinnon MJ, Coluzzi M, Walliker D. 2004. Genetic complexity of Plasmodium falciparum in two ethnic groups of Burkina Faso with marked differences in susceptibility to malaria. *Am J Trop Med Hyg* **71**:173–178.
- Paganotti GM, Palladino C, Modiano D, Sirima BS, Råberg L, Diarra A, Konaté A, Coluzzi M, Walliker D, Babiker HA. 2006. Genetic complexity and gametocyte production of Plasmodium falciparum in Fulani and Mossi communities in Burkina Faso. *Parasitology* **132**:607–614. doi:10.1017/S0031182005009601

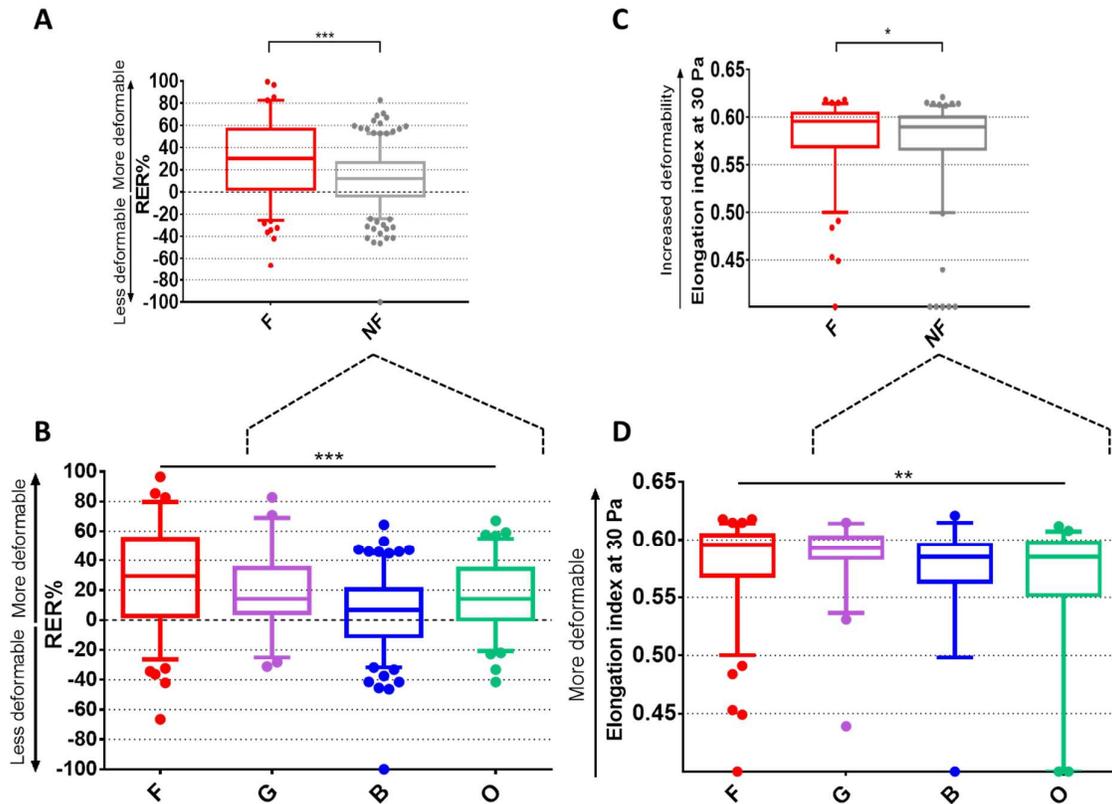
- Pasvol G, Chasis JA, Mohandas N, Anstee DJ, Tanner MJ, Merry AH. 1989. Inhibition of malarial parasite invasion by monoclonal antibodies against glycophorin A correlates with reduction in red cell membrane deformability. *Blood* **74**:1836–1843.
- Pivkin IV, Peng Z, Karniadakis GE, Buffet PA, Dao M, Suresh S. 2016. Biomechanics of red blood cells in human spleen and consequences for physiology and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**:7804–7809. doi:10.1073/pnas.1606751113
- Portugal S, Doumtable D, Traore B, Miller LH, Troye-Blomberg M, Doumbo OK, Dolo A, Pierce SK, Crompton PD. 2012. B cell analysis of ethnic groups in Mali with differential susceptibility to malaria. *Malar J* **11**:162. doi:10.1186/1475-2875-11-162
- Quin JE, Bujila I, Chérif M, Sanou GS, Qu Y, Vafa Homann M, Rolicka A, Sirima SB, O’Connell MA, Lennartsson A, Troye-Blomberg M, Nebie I, Östlund Farrants A-K. 2017. Major transcriptional changes observed in the Fulani, an ethnic group less susceptible to malaria. *Elife* **6**. doi:10.7554/eLife.29156
- Sabbagh A, Pasmant E, Imbard A, Luscan A, Soares M, Blanché H, Laurendeau I, Ferkal S, Vidaud M, Pinson S, Bellanné-Chantelot C, Vidaud D, Parfait B, Wolkenstein P. 2013. NF1 molecular characterization and neurofibromatosis type I genotype-phenotype correlation: the French experience. *Hum Mutat* **34**:1510–1518. doi:10.1002/humu.22392
- Safeukui I, Buffet PA, Perrot S, Sauvanet A, Aussilhou B, Dokmak S, Couvelard A, Hatem DC, Mohandas N, David PH, Mercereau-Puijalon O, Milon G. 2013. Surface area loss and increased sphericity account for the splenic entrapment of subpopulations of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes. *PLoS ONE* **8**:e60150. doi:10.1371/journal.pone.0060150
- Safeukui I, Correas J-M, Brousse V, Hirt D, Deplaine G, Mulé S, Lesurtel M, Goasguen N, Sauvanet A, Couvelard A, Kerneis S, Khun H, Vigan-Womas I, Ottone C, Molina TJ, Tréluyer J-M, Mercereau-Puijalon O, Milon G, David PH, Buffet PA. 2008. Retention of Plasmodium falciparum ring-

- infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen. *Blood* **112**:2520–2528. doi:10.1182/blood-2008-03-146779
- Sanou GS, Tiendrebeogo RW, Ouédraogo AL, Diarra A, Ouédraogo A, Yaro J-B, Ouédraogo E, Verra F, Behr C, Troye-Blomberg M, Modiano D, Dolo A, Torcia MG, Traoré Y, Sirima SB, Nébié I. 2012. Haematological parameters, natural regulatory CD4 + CD25 + FOXP3+ T cells and $\gamma\delta$ T cells among two sympatric ethnic groups having different susceptibility to malaria in Burkina Faso. *BMC Res Notes* **5**:76. doi:10.1186/1756-0500-5-76
- Torcia MG, Santarlasci V, Cosmi L, Clemente A, Maggi L, Mangano VD, Verra F, Bancone G, Nebie I, Sirima BS, Liotta F, Frosali F, Angeli R, Severini C, Sannella AR, Bonini P, Lucibello M, Maggi E, Garaci E, Coluzzi M, Cozzolino F, Annunziato F, Romagnani S, Modiano D. 2008. Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:646–651. doi:10.1073/pnas.0709969105
- Trager W, Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**:673–675.
- Traore K, Thera MA, Bienvenu A-L, Arama C, Bonnot G, Lavoignat A, Doumbo OK, Picot S. 2017. Interaction between environment, nutrient-derived metabolites and immunity: A possible role in malaria susceptibility/resistance in Fulani and Dogon of Mali. *PLoS ONE* **12**:e0189724. doi:10.1371/journal.pone.0189724
- Vafa M, Maiga B, Berzins K, Hayano M, Bereczky S, Dolo A, Daou M, Arama C, Kouriba B, Färnert A, Doumbo OK, Troye-Blomberg M. 2007. Associations between the IL-4 -590 T allele and *Plasmodium falciparum* infection prevalence in asymptomatic Fulani of Mali. *Microbes Infect* **9**:1043–1048. doi:10.1016/j.micinf.2007.04.011
- Vafa M, Maiga B, Israelsson E, Dolo A, Doumbo OK, Troye-Blomberg M. 2009. Impact of the IL-4 -590 C/T transition on the levels of *Plasmodium falciparum* specific IgE, IgG, IgG subclasses and total IgE in two sympatric ethnic groups living in Mali. *Microbes Infect* **11**:779–784. doi:10.1016/j.micinf.2009.04.017

- Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova J-L, Reynaud C-A, Weill J-C. 2004. Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **104**:3647–3654. doi:10.1182/blood-2004-01-0346
- WHO. 2011. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1) (<http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, accessed 2018).
- Woodruff AW, Ansdell VE, Pettitt LE. 1979. Cause of anaemia in malaria. *Lancet* **1**:1055–1057.
- Yadouléton A, N’Guessan R, Allagbé H, Asidi A, Boko M, Osse R, Padonou G, Kindé G, Akogbéto M. 2010. The impact of the expansion of urban vegetable farming on malaria transmission in major cities of Benin. *Parasit Vectors* **3**:118. doi:10.1186/1756-3305-3-118

Supplemental data

Supplemental figures



Supplemental Figure 1. Circulating RBC are more deformable in Fulani than in subjects from other groups. (A) Retention or enrichment rates (RER%) of circulating RBC from Fulani (F) and non-Fulani (NF) determined by filtration through microsphere layers (microsphiltration). Positive RER (i.e., enrichment in test RBC downstream from filter) indicate enhanced RBC deformability. **(B)** RER in the different non-Fulani ethnic groups. G: Gando; B: Bariba; O: Otamari. **(C)** Elongation index (EI) of RBC measured by rotational ektacytometry at 30 Pa in Fulani and non-Fulani. Higher EI values indicate enhanced RBC deformability. **(D)** EI at 30 Pa of RBC from the different ethnic groups. Boxes indicate median and IQR values. Bars indicate 5th and 95th percentiles. *: 0.01<p value<0.05; **: 0.001<p value<0.05; ***: p value<0.001. Microsphiltration data were analyzed through Student's t test and ANOVA, as appropriate; ektacytometry data were analyzed through Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests, as appropriate.

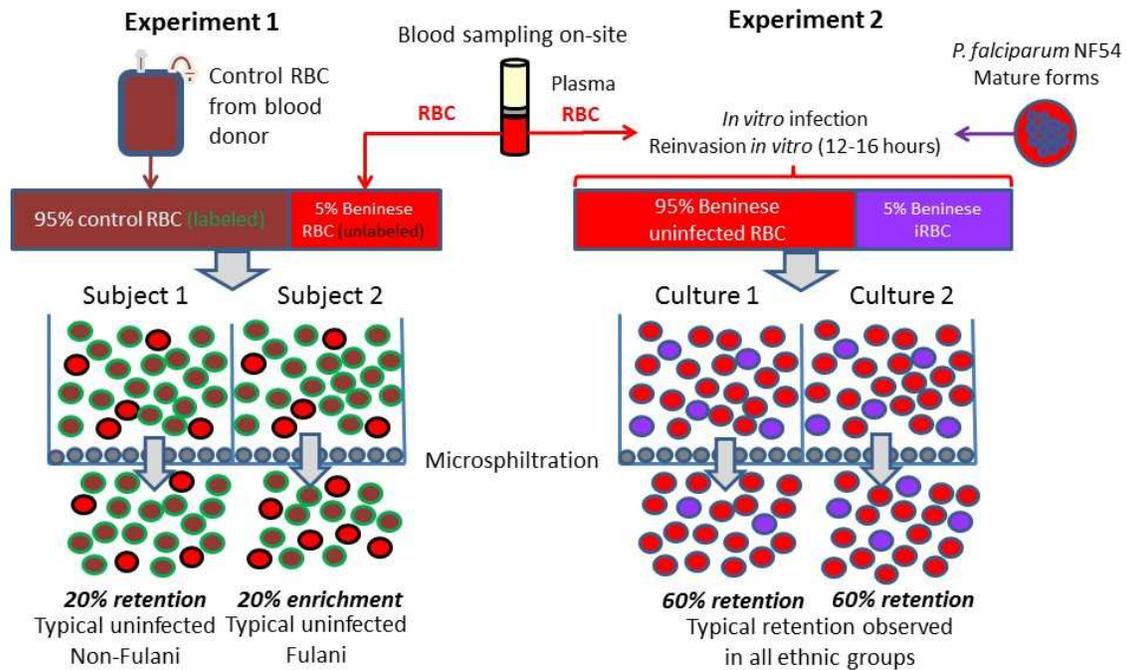


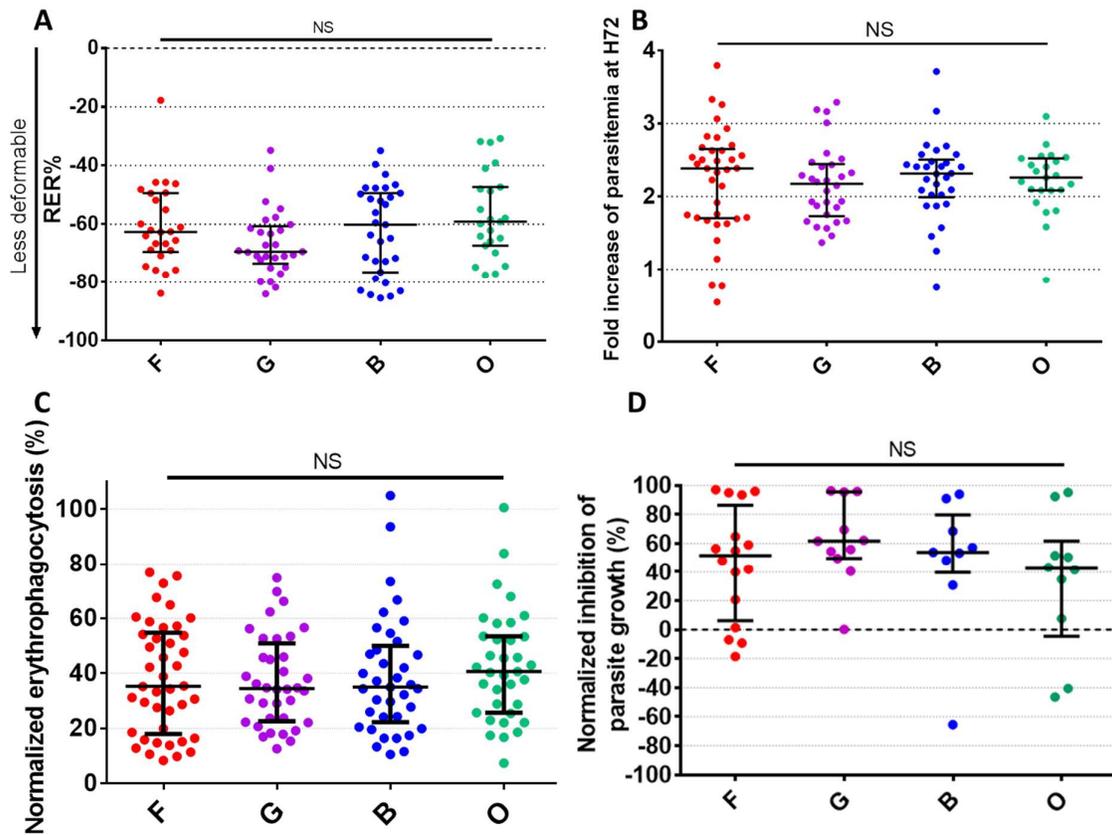
Figure 2

Quantifying the retention of the whole population of circulating RBC against a single batch of control RBC (the same frozen batch was used in all experiments).

Figure 3

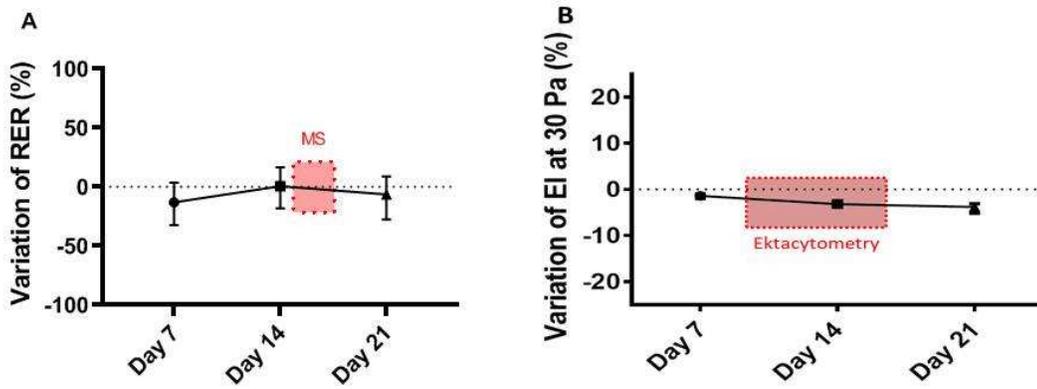
Quantifying the retention of ring-infected RBC against RBC from the same culture i.e., from the same subject

Supplemental Figure 2. Methodological differences between circulating RBC deformability assessment through microfiltration (experiment 1) and microfiltration of ring-infected RBC after *in vitro* infection with *Plasmodium falciparum*. In **experiment 1** (results being displayed in figure 2), circulating RBC from each subject are diluted in control RBC originating from a same blood donor. In **experiment 2** (results being displayed in Figure 3), a small proportion of control infected RBC are added to RBC from studied subjects, and after *in vitro* reinvasion, the retention of the infected population only is quantified through microfiltration.



Supplemental Figure 3. *Plasmodium falciparum* mechanical retention of infected RBC, growth *in vitro*, opsonic capacity of plasma and growth after coincubation with donor's plasma are similar across the different ethnic groups. (A) Median (IQR) retention rates (assessed by microfiltration) of ring-infected RBC from 120 Beninese subjects (30 per ethnic group) infected *in vitro* with *Plasmodium falciparum* NF54 strain. **(B)** Relative H0 to H72 increase in parasitemia upon *in vitro* culture in RBC from 120 Beninese subjects (30 per ethnic group). **(C)** Proportion of THP1 monocytes containing at least one infected RBC (trophozoite or schizont) after coincubation in the presence of plasma from 150 Beninese subjects (42 Fulani, 36 Gando, 37 Bariba, 35 Otamari). Values are normalized to the positive control. **(D)** Percentage of *P. falciparum* growth inhibition after 72 h of coincubation of plasma from 46 subjects (16 Fulani, 11 Gando, 9 Bariba, 10 Otamari) with *P. falciparum* NF54. Results are normalized to the negative control. F: Fulani; G: Gando; B: Bariba; O: Otamari; NS: no significant difference. Data were analyzed through Kruskal-Wallis test.

○



Supplemental Figure 4. Preservation of RBC in SAGM at 4°C allows delayed assesment of RBC deformability through microspiltration and ektacytometry. (A) Displayed are median and interquartile ranges of RER variation between day 0 and days 7, 14 and 21 post sampling in 18 healthy RBC donors. The mean RER variations were -0.9% at day 14 and -8.4% at day 21. The red rectangle indicates the timing of MS after collection of RBC in Benin. (B) In the same population, displayed are median and interquartile ranges of Elongation Index at 30 Pa variation between day 0 and days 7, 14 and 21 post sampling. The red rectangle indicates the timing of ektacytometry after RBC collection in Benin. MS : microspiltration.

Supplemental tables

Variable	Test	Univariate		Multivariate
		Mean or proportion comparison (with vs without splenomegaly)	p-value	p-value
Ethnicity (proportion of Fulani, %)	Chi 2	25,73 vs 43,07	0.0003	0.0002
Age (years)	Wilcoxon	26,57 vs 7,89	$< 2.2 \times 10^{-16}$	3.18×10^{-6}
Hemoglobin (g/dl)	t test	11,95 vs 9,89	$< 2.2 \times 10^{-16}$	0.0005
RDT positivity (%)	Chi 2	47,95 vs 81,02	1.42×10^{-10}	0.0615
Temperature (°C)	t test	37,02 vs 37,29	7.48×10^{-9}	0.019

Supplemental table 1. Univariate and multivariate analysis of the clinical and biological parameters associated, in the whole studied population, with palpable splenomegaly in December, 2017. RDT: rapid diagnostic test for malaria. Anemia and Fever have been omitted because of redundancy with hemoglobin and temperatures values.

	Number of pairs (N)	r	± se	p-value
Total population (422 individuals)				
Parent:offspring	337	0.47	0.06	***
Sibling	138	0.27	0.12	*
Total 1 st degree	475	0.41	0.04	***
Total 2 nd degree	122	0.24	0.13	*
Total ≥ 3 th degree	76	0.16	0.16	
Fulani (135 individuals)				
Parent:offspring	106	0.65	0.08	***
Sibling	55	0.51	0.15	**
Total 1 st degree	161	0.61	0.06	***
Total 2 nd degree	70	0.37	0.19	*
Total ≥ 3 th degree	66	0.23	0.20	
Non Fulani (285 individuals)				
Parents:offspring	231	0.29	0.08	***
Sibling	83	0.18	0.11	
Total 1 st degree	314	0.26	0.06	***
Total 2 nd degree	49	0.11	0.23	
Total ≥ 3 th degree	10	0.16	0.57	

Supplemental Table 2. Adjusted intrafamilial correlation coefficients for the RBC deformability trait assessed by microspiltration. All correlation coefficients were adjusted for RDT positivity and ethnicity. r: intrafamilial correlation coefficient; se: standard error; *: 0.01<p value<0.05 ; **: 0.001<p value<0.01; ***:p value<0.001.

Discussion

I. Préambule

Ce travail a permis la description détaillée des signes cliniques et biologiques associés à l'infection à *P. falciparum* chez des enfants et des adultes appartenant à plusieurs groupes ethniques en zone hyper endémique. Nous avons confirmé la sur-prévalence de la splénomégalie chez les sujets appartenant à l'ethnie Peulh. Les autres paramètres phénotypiques analysés (prévalence de l'infection palustre, densité parasitaire, anémie, fièvre) s'intégraient seulement partiellement dans le « phénotype Peulh » décrit dans la littérature et classiquement associé à une protection clinique.

Dans un second temps, une étude centrée sur les interactions GR-rate a mis en évidence une majoration de la déformabilité des GR circulants dans le groupe des sujets Peulhs infectés par *P. falciparum*. En revanche, l'infection *in vitro* par *P. falciparum* de GR provenant de ces différents groupes n'a pas mis en évidence de variabilité inter ethnique quant à la déformabilité ou à la croissance intra-érythrocytaire du parasite. Nous avons formulé plusieurs hypothèses sur les mécanismes phénotypiques putatifs d'adaptation à l'infection palustre intégrant l'ensemble de ces données.

Cette discussion vise d'abord à expliquer en quoi certains de nos résultats clinico-biologiques diffèrent des données antérieures, ensuite à intégrer les interactions rate-GR dans la réponse phénotypique à l'infection palustre ; enfin à indiquer les démarches permettant de progresser encore dans la compréhension des interactions hôte humain - parasite.

Quelques résultats complémentaires ponctuels seront présentés au fil de la discussion afin d'éclairer la réflexion.

II. Synthèse sur les données phénotypiques

A. Evolution de la problématique de la thèse : de l'objectif initial d'étude de la splénomégalie palustre hyper réactive et du lymphome splénique tropical à l'analyse des variations phénotypiques dans une cohorte multi-ethnique en zone hyperendémique.

Notre objectif initial était de parvenir à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques menant à la splénomégalie palustre hyper-réactive, notamment selon l'hypothèse d'un *primum movens* lié aux interactions spléno-érythrocytaires ⁴⁶².

Cette pathologie est très rare en zone endémique : les 2 seules séries de plus de 10 cas publiées à ce jour ont rapporté 44 sujets pris en charge en Italie sur une période de 25 ans ⁴³⁰, et 49 sujets en Belgique sur une période de 11 ans ⁴²⁷. Nous ne disposons pas de données précises sur l'amplitude du problème en France, mais dans un centre de référence en médecine tropicale, un à deux cas ont été pris en charge par an au cours des deux dernières décennies ⁴²⁵. Toutefois un appel à colliger les cas disponibles via le réseau national des infectiologues français (Infectio-Flash) n'a permis de recruter aucun cas supplémentaire, faisant supposer une raréfaction récente de cette forme clinique en France ⁴⁶³. Cette faiblesse du recrutement potentiel a amené à modifier la démarche de la thèse.

Qu'en était-il de la prévalence de la SPH au sein de la cohorte BAOBAB ? Les critères diagnostiques de la SPH ont progressivement évolué, mais les plus communément admis sont ceux de Bates et Beddu-Addo ⁵⁹. Il ne nous était pas possible, au cours de l'ensemble des passages transversaux de l'étude BAOBAB, de capturer tous les éléments correspondant à ces critères, mais si l'on approche le diagnostic en sélectionnant les sujets splénomégaliques, porteurs d'une hyper-IgM supérieure à 2 fois la déviation standard pour la population étudiée, et apyrétiques (pour tenter d'exclure les patients splénomégaliques dans le cadre d'un accès aigu), un seul sujet sur 413 évaluables était possiblement atteint de SPH. Ceci contraste avec les données de Bedu-Addo *et al.*, qui en 2002 au Ghana, avaient évalué la prévalence de la SPH à environ 40% dans un collectif de 221 sujets ghanéens ⁴⁶⁴. Il faut cependant souligner que la population d'étude était différente : il s'agissait de sujets atteints de splénomégalie massive évalués dans un centre de soins de recours, et non des sujets exposés mais non sélectionnés comme dans l'étude BAOBAB. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que la SPH, au Bénin à la fin des années 2010, semble devenir un problème nettement moins prévalent que précédemment décrit. Il est possible que l'amélioration de l'accès aux antipaludiques en Afrique subsaharienne en soit en partie responsable : la SPH semble nécessiter, pour apparaître, un stimulus antigénique intense et prolongé, que la prise d'antipaludiques permet de rompre. L'efficacité du traitement antipaludique court dans la régression des SPH prises en charge en zone non endémique ⁴²⁷ illustre ce concept.

L'analyse de la littérature relative aux disparités inter-ethniques en zone endémique montre que le phénotype Peulh partage de nombreuses caractéristiques avec la SPH : lorsque comparés aux ethnies sympatriques, les Peulhs présentent également une sur-prévalence de la splénomégalie, des charges

parasitaires faibles voire très faibles, un taux plus élevé d'IgM et une réponse immune humorale anti *P. falciparum* plus intense, autant de traits également présents chez les sujets atteints de SPH. Nous ne disposons pas en revanche de données fiables sur le risque de lymphome splénique dans le groupe Peulh. Les Peulhs représentant un groupe ethnique important en Afrique sub-saharienne, l'étude des mécanismes sous-tendant leur réponse phénotypique particulière nous a semblé être une voie intéressante et faisable pour aborder la physiopathologie de la SPH.

B. Les données recueillies par l'étude BAOBAB sont-elles cohérentes avec l'antériorité ?

1. Données en population globale.

L'étude BAOBAB nous a permis d'obtenir des données phénotypiques nouvelles dans l'étude de l'adaptation liée à l'ethnicité chez l'être humain exposé à *Plasmodium falciparum*. Cette étude a comporté plusieurs passages transversaux (8 à ce jour, sur une période de 25 mois) qui donnent un aperçu dynamique et robuste des variations phénotypiques inter-ethniques dans une zone fortement endémique.

La proportion de sujets infectés était globalement très élevée (entre 26.8 et 62.8%, moyenne 48.28% sur 8 passages), comme attendu en zone hyper endémique⁴⁶⁵. Le passage transversal de décembre 2017 a permis d'apprécier la prévalence de l'infection selon 3 techniques diagnostiques (TDR, goutte épaisse et PCR en temps réel sur sang total). Des disparités attendues de la prévalence de l'infection selon la technique ont été confirmées (figure 44). La PCR est désormais considérée comme la méthode de référence car la plus sensible. Le gain de sensibilité de la PCR a été en effet de 17.9% par rapport aux 2 autres techniques combinées (sur 296 sujets infectés, 53 ne sont positifs qu'en PCR). Sur 287 sujets positifs en goutte épaisse et/ou PCR, cette dernière permettait un gain de sensibilité de 18.5%. En comparaison au TDR et selon le même raisonnement, le gain diagnostique de la PCR était de 18%. Ces chiffres montrent la persistance d'une prévalence élevée de l'infection en 2017, malgré les progrès globaux observés en zone endémique en termes de prévention et de traitement. Plus de 95% des sujets évalués étaient asymptomatiques. Ces sujets constituent toutefois un réservoir parasite à prendre en compte dans une optique d'éradication⁴⁶⁶.

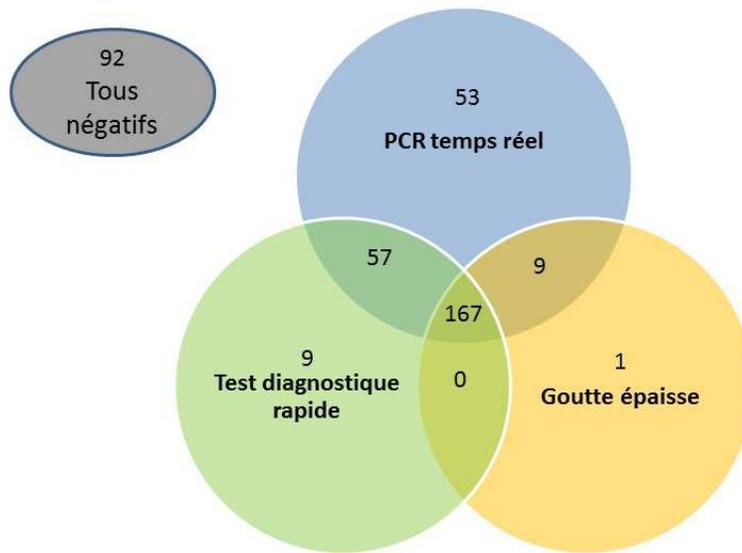


Figure 44: Représentation graphique du degré de concordance, en décembre 2017, entre les 3 tests diagnostiques de l'infection palustre à notre disposition (PCR en temps réel, goutte épaisse, test diagnostique rapide) sur un sous-ensemble de 388 sujets pour lesquels ces 3 résultats étaient disponibles.

L'anémie était également très prévalente tout au long de l'étude, ce qui est en accord avec les données de l'OMS, pour lesquelles le Bénin fait partie des pays pour lesquels l'anémie est un problème de santé publique majeur (prévalence globale supérieure à 40%)^{467,468}. On note un parallélisme net entre les tendances temporelles de l'anémie et celle de la positivité du TDR (figure 37), soulignant ici le rôle de l'infection palustre dans la prévalence de l'anémie en zone intertropicale⁴⁶⁹. De nombreux facteurs confondants, notamment carences nutritionnelles et vitaminiques, liées ou non à des infections helminthiques fréquentes en Afrique subsaharienne, et susceptibles d'influencer ces tendances temporelles n'étaient pas systématiquement recueillis dans l'étude BAOBAB.

Nous ne disposons que de rares données récentes sur la prévalence de la splénomégalie, indépendamment de sa cause, en Afrique subsaharienne. Dans la cohorte BAOBAB, celle-ci oscillait entre 12.2% et 27.1%. Ces chiffres se rapprochent de ceux observés préalablement au Mali⁴⁷⁰.

Au total, les données colligées par l'étude BAOBAB de 2015 à 2017 sur les marqueurs phénotypiques liés à l'infection à *Plasmodium falciparum* sont en adéquation avec les observations préalables en zone fortement endémique africaine, avec des prévalences du portage parasitaire, de l'anémie et de la splénomégalie de respectivement 48%, 56.3% et 16.6%.

2. Les spécificités phénotypiques des Peulhs observées préalablement au Mali et au Burkina Faso sont confirmées au Bénin.

La très grande majorité des études s'étant intéressées à la prédisposition ethnique vis-à-vis du paludisme en Afrique subsaharienne ont été menées au Mali et au Burkina Faso, même si certaines ont été conduites en Afrique de l'Est, notamment au Soudan (cf tableau 4). L'étude BAOBAB vient donc compléter ces données, en ajoutant le Bénin à la liste des pays étudiés, montrant ainsi que les particularités phénotypiques Peulh ne semblent pas restreintes à certaines zones. Il faut également noter que, même si cela n'est pas explicitement indiqué dans toutes les études réalisées sur les Peulhs, il est probable que dans des travaux antérieurs, la même cohorte a servi à plusieurs publications émanant du même groupe.

Même si des spécificités émergent, qui seront discutées au paragraphe suivant, la confirmation, pour la première fois au Bénin, de données relatives au phénotype Peulh comparables à celles acquises au Mali, au Burkina Faso et au Soudan renforce la robustesse de cette description phénotypique.

3. Au plan inter-ethnique.

a. Une spécificité phénotypique Peulhe confirmée mais incomplète

Le « phénotype Peulh », tel que précédemment décrit dans la littérature, associe splénomégalie, sur-risque d'anémie, charge parasitaire faible et réponse immune anti-*P. falciparum* intense. Cette spécificité phénotypique est globalement confirmée dans notre étude, mais la prévalence de certains éléments mérite une discussion détaillée.

La splénomégalie était plus fréquente chez les Peulhs que chez les sujets des autres ethnies, notamment au début et à la fin de l'étude. En revanche, la sur-prévalence d'anémie n'a été observée que lors de 3 passages sur 8 (septembre 2015, mai 2016, décembre 2017) ; il n'existait en outre pas de différence inter ethnique significative en termes de température corporelle tout au long de l'étude. Les sujets Peulhs étaient inconstamment moins infectés selon le critère TDR (seulement lors des passages de novembre 2015, février 2016 et mai 2016).

b. Mécanismes envisagés.

Ce « phénotype Peulh » apparaît donc, dans notre étude, comme souvent incomplet. Un examen approfondi de la littérature disponible sur ce sujet montre d'ailleurs que ceci est connu (faute d'être rarement souligné) : sur 28 études disponibles comparant Peulh et groupes sympatriques, la sur-prévalence significative de la splénomégalie était retrouvée dans 13 études sur 15 (86.7%), faisant de cet élément le trait de loin le plus stable. La tendance à l'anémie n'était retrouvée en revanche que dans 5 études sur 9 (55.6%) et dans 2 études, cette tendance était sujette à variation. La moindre prévalence de l'infection est d'appréciation plus complexe car les méthodes utilisées pour la mesurer ont varié d'une étude à l'autre : lorsque la PCR était utilisée, la proportion d'individus infectés était moindre chez les Peulhs dans 4 études sur 8 (50% des cas). Lorsque la goutte épaisse était utilisée, les sujets Peulh étaient moins souvent infectés dans 14 études sur 18 (77.8% des cas), mais cette différence n'était significative que dans 7 études (38.9%) (tableau 4). Avant l'étude BAOBAB, aucun travail n'avait utilisé le TDR pour mesurer le niveau d'infection palustre au sein d'une cohorte comparant Peulhs et non-Peulhs.

Le « phénotype Peulh » semble donc être un syndrome sujet à variation, et finalement rarement complet. La notion de protection clinique, si elle n'est pas ici totalement remise en cause, doit cependant être relativisée à la lumière de nos résultats. Le paramètre le plus franc et le plus constant, dans notre étude comme dans les précédentes, semble être la sur-prévalence d'une splénomégalie palpable. La proportion de sujets infectés n'était globalement pas moins élevée chez les Peulhs ; la prévalence globalement très faible des sujets symptomatiques (parasitémiques et fébriles) rend l'analyse de la protection vis-à-vis des accès cliniques impossible dans cette étude qui n'a inclus que peu de nourrissons (6.2%). Certains travaux ont également montré que les différences inter ethniques étaient moins marquées en saison sèche^{222,471}, ce qui suggère une variabilité de ces paramètres selon la saison de transmission. Nous ne disposons pas de données entomologiques concomitantes de nos passages transversaux, mais il est envisageable que le caractère non significatif de certaines différences inter ethniques soit lié à une intensité de transmission faible au moment de la mesure.

Les différences phénotypiques inter ethniques semblent marquées aux deux extrémités temporelles de l'étude, mais le sont en revanche nettement moins entre ces deux passages. Une explication possible tient au fait que le protocole de l'étude BAOBAB prévoyait de traiter par ACT tous les sujets dont le TDR était positif. Le huitième passage transversal a été effectué presque un an après le précédent. Même si cette donnée n'a été recueillie que lors du 8ème passage, il semble que les sujets inclus dans l'étude aient eu un accès globalement limité aux antipaludiques (9.1% d'entre eux rapportaient une utilisation d'antipaludiques dans le mois précédent), et aient donc peu été traités

entre le 7ème et le 8ème passage transversal. Les différences inter ethniques observées semblent donc refléter un phénotype « naturel », inné, observé essentiellement en l'absence d'accès facile aux antipaludiques : lorsque l'ensemble des sujets étudiés a accès aux antipaludiques, les différences inter ethniques semblent gommées, mais réapparaissent si la « pression thérapeutique » retombe, comme ce fut le cas entre les 7ème et 8ème passages (figure 37).

En résumé, la sur-prévalence de la splénomégalie chez les Peuhls est quasi constante et statistiquement significative. La prévalence globale de l'anémie est élevée, tout comme celle du portage parasitaire dans cette zone hyper-endémique. Les différences inter-ethniques quant à ces deux paramètres restaient cependant moins marquées qu'attendu. L'exposition plus marquée aux antipaludiques a possiblement modifié ce phénotype qui semble plus correspondre à un phénotype « inné », s'exprimant plus fortement en l'absence d'intervention extérieure.

4. Robustesse de la détection clinique de la splénomégalie.

L'évaluation de la concordance inter observateurs de la palpation splénique, sur un sous-groupe de 62 sujets Peuhls dans le village de Goufanrou, n'a révélé qu'un degré de concordance modéré. Ceci incite à relativiser la précision de notre évaluation phénotypique, particulièrement lorsque des analyses par corrélations sur données individuelles sont effectuées. Cette imprécision ne remet probablement pas en cause l'observation d'une sur-prévalence de la splénomégalie chez les Peuhls. Tous les travaux antérieurs sur les différences inter ethniques de susceptibilité au paludisme ont utilisé la palpation splénique. Les études utilisant la prévalence de la splénomégalie comme composante de la présentation phénotypique du paludisme ont aussi, dans leur grande majorité, été basées sur l'évaluation clinique^{48,349} à de rares exceptions près³⁴⁸. Dans l'étude BAoBAB la palpation splénique a été effectuée par le même clinicien (Dr. Hilaire Akpovi), ce qui minimise le risque de variabilité. Les contraintes logistiques (temps disponible sur place, niveau de formation) nous ont empêché de procéder à une évaluation échographique très précise et à grande échelle de la taille de la rate. L'évaluation du volume splénique à partir de mesures échographiques (plus précis et pertinent que la simple taille du grand axe) n'est de toutes façons pas parfaitement standardisée⁴⁵⁵. Dans le contexte précis du paludisme, cette faible corrélation entre mesure échographique et appréciation clinique de la splénomégalie a déjà été notée^{472,473}.

La concordance inter-observateurs de la palpation de la rate est modérée. Sans remettre en cause l'évaluation de prévalence dans chaque groupe ethnique, elle incite à la prudence lors d'analyse de corrélations entre marqueurs basées sur des données individuelles.

III. Interprétation des données : vers un nouveau modèle physiopathologique de la variabilité inter-ethnique d'adaptation phénotypique à l'exposition à *P. falciparum* ?

A. Résumé des principaux résultats

En utilisant deux techniques de mesure de la déformabilité érythrocytaire, nous avons montré lors de la mission de décembre 2017 que la déformabilité des hématies circulantes des sujets Peulh était significativement plus importante, en comparaison aux groupes sympatriques. L'analyse des facteurs cliniques et biologiques recueillis a montré que le paramètre majeur influençant ces différences de déformabilité circulante, hormis l'ethnie, était la présence de marqueurs d'infection par *P. falciparum*.

Cette influence de l'ethnie était retrouvée quelle que soit la méthode de mesure ; en revanche l'influence de la positivité du TDR n'était plus retrouvée pour les données d'ektacytométrie. Cette différence est possiblement due au fait qu'en raison d'une rupture de stock de polyvinylpyrrolidone, un effectif de sujets moins important a pu être évalué par ektacytométrie. Or, le haut taux de recouvrement des données de déformabilité, dont attestent par exemple les valeurs d'écart-type de filtrabilité (34.6% chez les Peulhs et 24.9% chez les non-Peulhs), laisse penser que ces différences inter ethniques sont subtiles et nécessitent, pour être mises en évidence, un grand nombre d'observations. Les différences quant aux paramètres réellement évalués par ces 2 techniques ont pu également jouer un rôle, et seront détaillés au paragraphe E de cette section.

L'infection expérimentale *in vitro* a pu être menée dans une sous-cohorte de 120 sujets, sélectionnés sur l'ethnicité et appariés sur l'âge. Nous avons évalué si le devenir intra-érythrocytaire du parasite après infection *in vitro* différait selon l'ethnicité du donneur de GR. Nous n'avons pas mis en évidence de différences inter ethniques significatives en termes de déformabilité (évaluée par microsphiltration) de GR infectés par des rings âgés de 12 à 16 heures, ni en termes de multiplication parasitaire, après évaluation par marquage de l'ADN parasitaire au SYBR Green. La déformabilité des GR infectés par des

rings diminue de manière attendue, et ce dans des proportions similaires à ce qui avait déjà été trouvé par notre équipe ³³². Le taux de rétention de l'ordre de 62% était identique dans les 4 groupes ethniques. Ces résultats suggèrent que les propriétés intrinsèques des GR infectés ne diffèrent pas d'un groupe ethnique à l'autre, mais qu'un élément extérieur intervient pour expliquer les résultats de déformabilité circulante. Cet élément pourrait être l'intensité de la filtration splénique des GR (ce seuil étant fixe dans toutes les microfiltrations réalisées au cours de l'étude).

B. Eléments de validité technique

1. Considérations relatives à l'ektacytométrie.

Les différences inter-groupes d'index d'élongation en ektacytométrie étaient d'amplitude très faible (de l'ordre de 1%), mais ceci est habituel lorsque cette technique est utilisée : à titre d'exemple, lorsque dans les travaux de Dondorp *et al.*, la déformabilité du sang total chez des sujets Thaïlandais impaludés était évaluée par ektacytométrie, l'amplitude des variations était de 2.43% dans le groupe accès non grave, et de 6.65% dans le groupe accès grave, les valeurs d'index d'élongation à 30 Pascals de volontaires sains servant de référence ³³⁹. Nous avons dans notre étude évalué la déformabilité d'une solution quasi pure de GR, et non le sang total. Par ailleurs, lorsque nous mettons en perspective nos résultats expérimentaux avec les index d'élongation obtenus par Dondorp *et al.*, nous observons un crescendo depuis les sujets exposés, voire infectés (mais en grande majorité asymptomatiques) inclus dans l'étude BAOBAB, jusqu'aux sujets décédés de formes sévères (figure 45). Ceci renforce donc l'idée d'une corrélation entre gravité du paludisme et réduction de la déformabilité érythrocytaire. L'évaluation par ektacytométrie de la déformabilité érythrocytaire de sujets exposés à *P. falciparum* mais asymptomatiques n'avait à notre connaissance pas été réalisée jusqu'ici. Ces comparaisons inter-études doivent toutefois être interprétées avec prudence, car les mesures ont été effectuées par des machines différentes et en l'absence de contrôle interne.

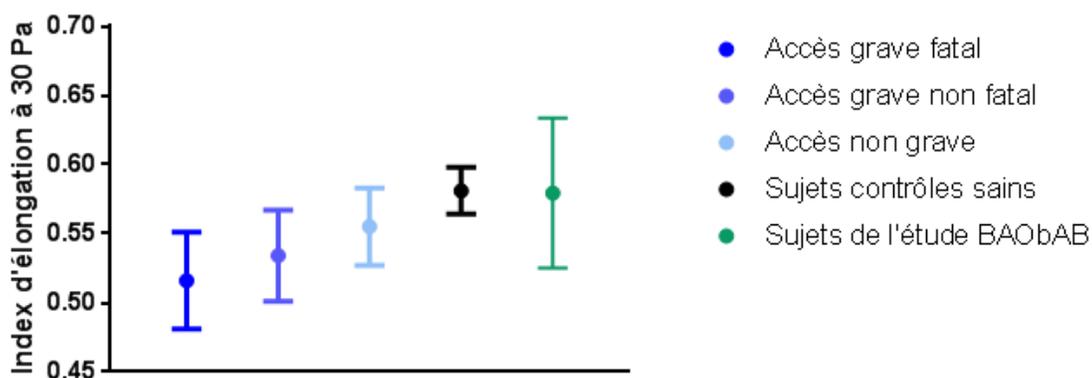


Figure 45 : Mise en perspective des valeurs (moyennes et écart-type) de l'index d'élongation à 30 pascals du sang total évalué par ektacytométrie sur des sujets atteints de paludisme grave, fatal ou non, d'accès non grave, et des volontaires sains³³⁹, avec les valeurs mesurées au sein de la cohorte BAOBAB (Peulhs et non Peulhs) sur suspension d'hématies.

La procédure validée d'ektacytométrie, lorsqu'utilisée pour le diagnostic des pathologies érythrocytaires telles que la sphérocytose héréditaire, implique en effet l'utilisation de GR contrôles normaux prélevés au même moment et dans les mêmes conditions que ceux du sujet étudié. L'analyse est également idéalement faite dans les heures suivant le prélèvement. Le transport au Bénin d'un ektacytomètre n'a pas été logistiquement réalisable, et pour des raisons identiques, les valeurs d'index d'élongation n'ont pas été normalisées sur des valeurs contrôles. Nous avons, préalablement à notre mission de terrain, étudié, chez des donneurs sains, la variation des valeurs d'index d'élongation au cours du temps après conservation des hématies en SAGM, hématoците 5%. Cette variation modeste après 14 jours de conservation nous a permis d'envisager une analyse différée (cf Figure 2 des données supplémentaires de la partie 2 de la section résultats). Notre objectif ici était une comparaison inter-ethnique à l'intérieur de la population de l'étude.

2. Considérations techniques relatives à la microsphiltration.

Les valeurs de microsphiltration obtenues étaient dans la fourchette de valeurs attendues, pour les sujets étudiés comme pour les contrôles. Des données préliminaires acquises au début de ce travail de thèse nous ont mis sur la piste d'une augmentation de la déformabilité des hématies circulantes chez les sujets Peulhs, grâce à la réalisation de microsphiltrations sur le terrain, quelques heures après recueil du sang veineux, à l'aide de plaques séchées plutôt que congelées⁴⁷⁴. Cependant, de fortes

contraintes techniques et le caractère suboptimal de la microfiltration effectuée dans ces conditions (résistance nettement augmentée au passage des hématies, comme en attestent des valeurs d'enrichissement en aval des microbilles allant jusqu'à 1000%) nous ont incité à adopter une attitude identique à l'ektacytométrie et à analyser à Paris des GR prélevés au Bénin puis conservés en SAGM à 4°C jusqu'à analyse au laboratoire. La grande stabilité des valeurs de microfiltration après conservation des GR en SAGM a permis ce mode opératoire (cf. Figure 2 des données supplémentaires de la partie 2 de la section résultats).

Les contraintes logistiques fortes inhérentes aux missions de terrain nous ont conduit à adapter notre protocole de phénotypage érythrocytaire, finalement pratiqué sur échantillons stockés en SAGM et analysés de façon différée au laboratoire central. Les données acquises et leurs contrôles étaient valides dans ces conditions et soulignent l'intérêt de la microfiltration pour l'analyse simultanée, sur une période courte, d'un grand nombre d'échantillons. Le nombre d'échantillons analysés dans notre étude est de l'ordre de 10 fois supérieur à toutes les analyses antérieures.

C. Temporalité de l'infection et filtrabilité des GR

L'analyse des valeurs de microfiltration selon les marqueurs d'infection palustre (goutte épaisse et TDR), a révélé des différences inter ethniques marquées : chez les Peulhs, en comparaison aux sujets négatifs pour les deux tests, la déformabilité augmentait significativement dans le groupe TDR et goutte épaisse positifs, et se majorait encore plus dans le groupe dont seul le TDR était positif. Une telle différence ne s'observait pas dans le groupe non-Peulh (figure 2C du chapitre de résultats 2). En outre, les valeurs de microfiltration étaient identiques d'un groupe ethnique à l'autre si l'on ne sélectionnait que le groupe dont goutte épaisse et TDR étaient négatifs (présupposés non infectés). Le groupe dont la goutte épaisse était isolément positive n'a pas été considéré car il ne comportait que 4 individus Peulhs et 7 individus non-Peulhs. Au-delà des possibles erreurs techniques et différences de sensibilité de ces différentes techniques, nous avons émis l'hypothèse que les sujets dont le TDR était isolément positif pouvaient représenter des sujets semi-récemment infectés, dont la parasitémie serait descendue sous le seuil de détection de la goutte épaisse, mais possédant encore en circulation des antigènes de *P. falciparum*. Une différence majeure de sensibilité entre les 2 techniques semble assez peu probable au vu des données de la littérature. La persistance d'une positivité de l'antigène HRP2 après traitement, notamment par ACT, est bien établie^{60,61}. La clairance totale ou partielle d'une parasitémie détectable, sans prise d'un traitement, mais médiée par l'immunité, est également très

probable. Ceci a été notamment mis en évidence par les travaux de Djimdé *et al.* qui ont étudié des sujets maliens infectés par des souches de *P. falciparum* s'avérant résistantes à la chloroquine. En dépit d'un traitement par chloroquine, donc inefficace, chez certains de ces sujets la parasitémie s'est négativée²⁴⁷. On peut donc concevoir que les sujets dont le TDR est isolément positif représentent des sujets récemment infectés, dont la parasitémie serait redescendue sous le seuil de détectabilité de la goutte épaisse, mais possédant encore des antigènes plasmodiaux en circulation. La séquence temporelle serait donc la suivante ; négativité de tous les tests, puis positivité de la goutte épaisse et du TDR (en même temps, du fait de seuils globalement similaires), puis positivité du TDR seulement, et enfin négativité des 2 tests (figure 46). Cette hypothèse reste difficile à démontrer formellement car dans l'immense majorité des cas, les études de cohorte réalisées en zone endémique prévoyaient de traiter par antipaludiques les sujets dont le TDR et/ou la goutte épaisse étaient positifs, ne permettant donc pas d'observer la réponse phénotypique « spontanée » à ces épisodes de parasitémie patente.

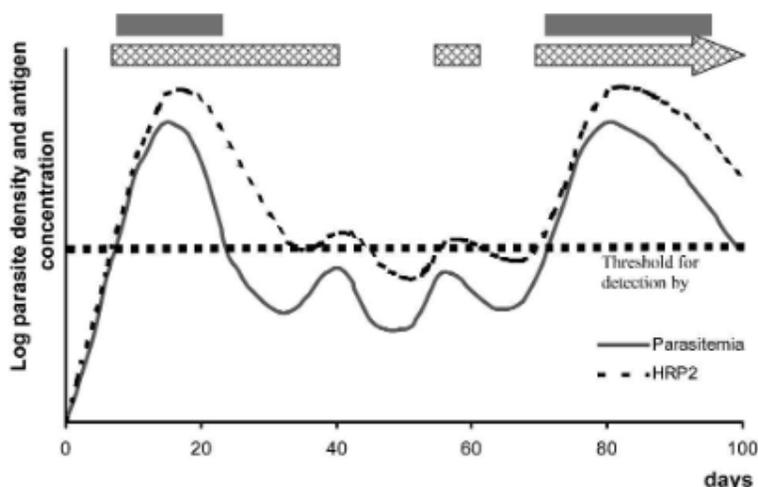


Figure 46 : Oscillations de parasitémie illustrant la possibilité, après la clairance d'une parasitémie patente, de la persistance en circulation d'antigènes palustres et donc d'une positivité du TDR. La ligne pleine représente la charge parasitaire détectable en optique, la ligne pointillée celle détectable par TDR HRP2. D'après⁴⁷⁵.

Nous proposons ici un modèle d'évolution temporelle de la parasitémie chez un sujet vivant en zone hyper endémique, où la persistance de la positivité du TDR suit celle de la positivité simultanée du TDR et des méthodes optiques. L'application de ce modèle aux données de filtrabilité recueillies montre des différences inter ethniques marquées qui laissent penser que les interactions spléno-érythrocytaires chez les Peulhs sont des processus dynamiques qui nécessitent plusieurs jours, voire semaines pour exercer leurs effets.

D. Pouvons-nous proposer un modèle cohérent liant l'ensemble des données obtenues ?

1. Une réponse hématopoïétique exacerbée chez les Peulhs ?

Une première hypothèse met en jeu, dans le groupe Peulh, une production de GR jeunes et donc plus déformables en réaction à l'infection palustre. L'apparition d'une population plus déformable pourrait ainsi augmenter la déformabilité médiane des hématies circulantes dans ce groupe.

Éléments de validité interne : l'aspect de l'histogramme de fréquence des valeurs de filtrabilité dans les populations Peulh et non-Peulh, infectées et non infectées, peut être en accord avec cette hypothèse : une population de plus grande déformabilité est présente (figure 2 de la seconde partie de la section résultats) dans le groupe Peulh dont le TDR est positif. En outre, après infection *in vitro*, lorsque la déformabilité des hématies infectées par les rings est évaluée, celle-ci est plus importante dans le groupe Peulh TDR positif, en comparaison aux Peulhs TDR négatif. Enfin, l'apparition d'une population de GR plus jeunes et donc potentiellement plus infectables ⁴⁷⁶ pourrait expliquer la corrélation observée entre déformabilité des hématies circulantes et croissance *in vitro* du parasite. Toutefois la croissance *in vitro* n'a pas été plus rapide dans les GR du groupe des sujets Peulhs avec TDR positif. Enfin, il est difficile d'expliquer les différences inter ethniques de réponses immunes par cette hypothèse.

Éléments de validité externe : la production d'hématies plus jeunes et donc plus infectables pourrait expliquer la plus grande prévalence de l'infection dans le groupe Peulh. L'on s'attendrait, en cas de réponse érythropoïétique exacerbée en réponse à l'infection dans le groupe Peulh, à une plus grande proportion de réticulocytes, ce qui n'a hélas pas pu être mesuré dans notre étude. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'association forte entre valeurs de filtrabilité et valeurs d'hémoglobine. En outre, pour expliquer une augmentation de déformabilité liée à la présence de réticulocytes, cette proportion devrait être vraisemblablement supérieure à 10%, ce qui dépasse très nettement les valeurs de reticulocytémie usuellement constatées chez les sujets infectés par *P. falciparum*. Ce contre-argument doit être à son tour relativisé : si l'on conçoit la déformabilité des hématies circulantes comme un continuum entre des hématies jeunes déformables, et des hématies plus âgées moins déformables ⁹⁰ (figure 48), on peut imaginer qu'une réponse érythropoïétique exacerbée, après

quelques jours, soit responsable de la présence en circulation d'une quantité substantielle de GR jeunes « post-réticulocytaires » déformables.

En résumé : une réponse réticulocytaire post-infection à *P. falciparum* particulièrement intense chez les Peuhls expliquerait l'association entre déformabilité des GR circulants et marqueurs d'infection dans ce groupe. Cette hypothèse n'explique en revanche pas bien ni la sur-prévalence de l'anémie, ni l'activation splénique observée chez les sujets Peuhls. N'ayant pas pu quantifier les réticulocytes au cours de la mission de décembre 2017 nous ne pouvons toutefois pas l'écartier formellement.

2. Une sous-population de GR plus déformables et plus infectables chez certains Peuhls ?

Alternativement, la pré-existence, chez un sous-groupe de sujets Peuhls, de GR globalement plus déformables, et plus infectables pourrait rendre compte du lien observé entre déformabilité plus élevée des GR circulants et marqueurs d'infection par *P. falciparum*.

Éléments de validité interne : si l'on propose la pré-existence chez certains sujets Peuhls d'une population érythrocytaire plus déformable et plus infectable, on peut concevoir une plus grande déformabilité des hématies circulantes chez les sujets Peuhls infectés. De manière indirecte, une plus grande propension à l'infection dans le groupe Peuhl pourrait, expliquer l'installation d'une réponse immune anti palustre plus intense. Cette sous population érythrocytaire « déformable et infectable », si elle est en proportion suffisante, expliquerait la corrélation entre déformabilité circulante des GR et croissance parasitaire *in vitro*.

Éléments de validité externe : l'hétérogénéité de déformabilité des populations érythrocytaires a été constatée dans nombre de pathologies érythrocytaires, comme la drépanocytose ou la sphérocytose héréditaire. L'influence de l'hydratation des hématies sur leur infectabilité par *P. falciparum* a été également démontrée ¹⁹¹. Les mutations gain de fonction de PIEZO1 déshydratant le GR semblent le rendre résistant à l'infection par *P. falciparum* au moins *in vitro* ¹⁹²; on peut donc concevoir le phénomène inverse, qui lui favoriserait l'infection des GR.

3. Modification du seuil de rétention splénique des GR en réponse à l'infection chez les Peuhls ?

Enfin, l'on peut également concevoir qu'en réaction à l'infection palustre, le seuil de rétention splénique des GR (infectés et non infectés) soit plus rigoureux chez les sujets Peulh.

Eléments de validité interne : une clairance plus intense des GR par la rate dans le groupe Peulh ne laisserait donc en circulation que les GR plus déformables, lorsque comparés aux GR des groupes sympatriques. L'absence de différence inter ethnique dans le degré de rétention splénique des GR infectés par des rings est compatible avec cette hypothèse. En effet, c'est la différence relative de déformabilité des rings par rapport aux GR non infectés du même sujet qui est évaluée. Elle peut rester stable même en présence de différence interethnique de la déformabilité globale des GR. Dans cette expérience, les GR parasités sont ici dilués dans les GR dans lesquels ils ont été cultivés, chaque fois issus d'un sujet différent, et non dans un type unique de GR contrôles provenant de la même poche de transfusion comme dans la première expérience de microsphiltration.

Par ailleurs, la rétention d'une plus grande proportion de GR parasités dans la pulpe rouge de la rate pourrait être responsable d'une présentation antigénique plus intense, ce qui pourrait expliquer la réponse humorale plus intense chez les Peulhs. Les sous populations de cellules B mémoires IgM positives ont été, dans certains travaux, liées à la fonction splénique ⁴⁷⁷. Leur disparition a été objectivée chez le splénectomisé. Même si cela est difficile à formellement prouver chez l'être humain, on peut à l'inverse supposer qu'une suractivation splénique soit associée à une majoration de la proportion de ces cellules mémoires IgM positives. Idéalement, une étude histologique (par exemple via l'immunohistochimie) des populations B intra spléniques serait nécessaire pour le prouver.

Eléments de validité externe : en cas de rétention plus rigoureuse des GR infectés et non infectés, la congestion de la pulpe rouge qui en résulterait pourrait expliquer l'excès de splénomégalie rencontré dans le groupe Peulh. Un certain nombre de données autopsiques et expérimentales laissent supposer que l'exposition chronique à *P. falciparum* est responsable d'une expansion, par congestion, de la pulpe rouge (Kho S *et al.* in preparation, ³⁵⁴) plutôt que de la pulpe blanche. Le phénotype Peulh, tel que classiquement décrit, comporte une charge parasitaire plus faible, une tendance à l'anémie, et une réponse immune anti palustre plus intense. La rétention splénique des GR infectés pourrait diminuer la charge parasitaire circulante. La rétention associée des GR non infectés pourrait participer à l'anémie. Enfin, la rétention intra-splénique pourrait favoriser la présentation antigénique, amplifiant ainsi la réponse immune anti *P. falciparum*.

4. En résumé (figure 47).

En l'absence de corrélation entre splénomégalie palpable (trait phénotypique majeur et significatif dans la population Peulh au moment de l'évaluation en décembre 2017) et mesures de déformabilité circulante, aucune des 3 hypothèses énoncées ci-dessus ne rend pleinement compte de l'ensemble de nos données phénotypiques et expérimentales.

L'hypothèse de la réponse érythropoïétique exacerbée en réponse à l'infection dans le groupe Peulh n'est pas la plus convaincante du fait de l'absence de corrélation entre déformabilité des GR circulants et valeurs d'hémoglobine (ou présence d'une anémie) et parce que ce mécanisme n'explique pas l'activation plus forte de l'immunité adaptative chez les Peuhls.

La seconde hypothèse d'une sous population de sujets Peuhls porteurs de GR plus infectables et plus déformables a le principal avantage d'expliquer la corrélation entre la déformabilité augmentée des GR circulants et la présence de marqueurs d'infection. Elle est aussi cohérente avec la corrélation entre croissance parasitaire après infection *in vitro* et déformabilité des GR. Elle rend compte des données immunologiques car une multiplication parasitaire augmentée (facteur 2 en 1 semaine) suffirait sans doute à expliquer une sur-stimulation de l'immunité adaptative. Ce même mécanisme expliquerait aussi la surprévalence de la splénomégalie. Toutefois, une déshydratation du GR, à l'instar de ce qui est observé dans les mutations gain de fonction du gène *PIEZO1*, pourrait le rendre plus déformable, mais la moindre infectabilité de ce type de GR est discordante par rapport à notre observation d'une plus grande prévalence de l'infection.

Enfin, la troisième hypothèse d'une modification du seuil de stringence splénique en réponse à l'infection dans le groupe Peulh a l'avantage d'apporter une explication aux principaux éléments du phénotype Peulh tel que décrit dans la littérature, mais n'est pas totalement en accord avec notre observation d'une absence de corrélation entre filtrabilité et splénomégalie palpable. Toutefois, la concordance moyenne de la palpation splénique (seules 79 % des palpations sont parfaitement concordantes) doit également nous faire relativiser cette absence d'association : il est possible que l'imprécision de l'évaluation de la splénomégalie ainsi que ses fluctuations aient masqué cette association.

Quelle que soit l'hypothèse envisagée, un mécanisme lié directement ou indirectement à la physiologie érythrocytaire est très probablement impliqué. Il peut s'agir d'une érythropoïèse exacerbée en réponse à l'infection (hypothèse 1), d'une susceptibilité à l'infection liée à une déformabilité intrinsèquement augmentée des GR (hypothèse 2) ou d'une hyperréactivité du seuil de perception des

anomalies mécaniques des GR par la rate (Hypothèse 3). Ces éléments apportent un canevas qui sera sans doute utile pour l'interprétation des données du génotypage ou de séquençage en cours.

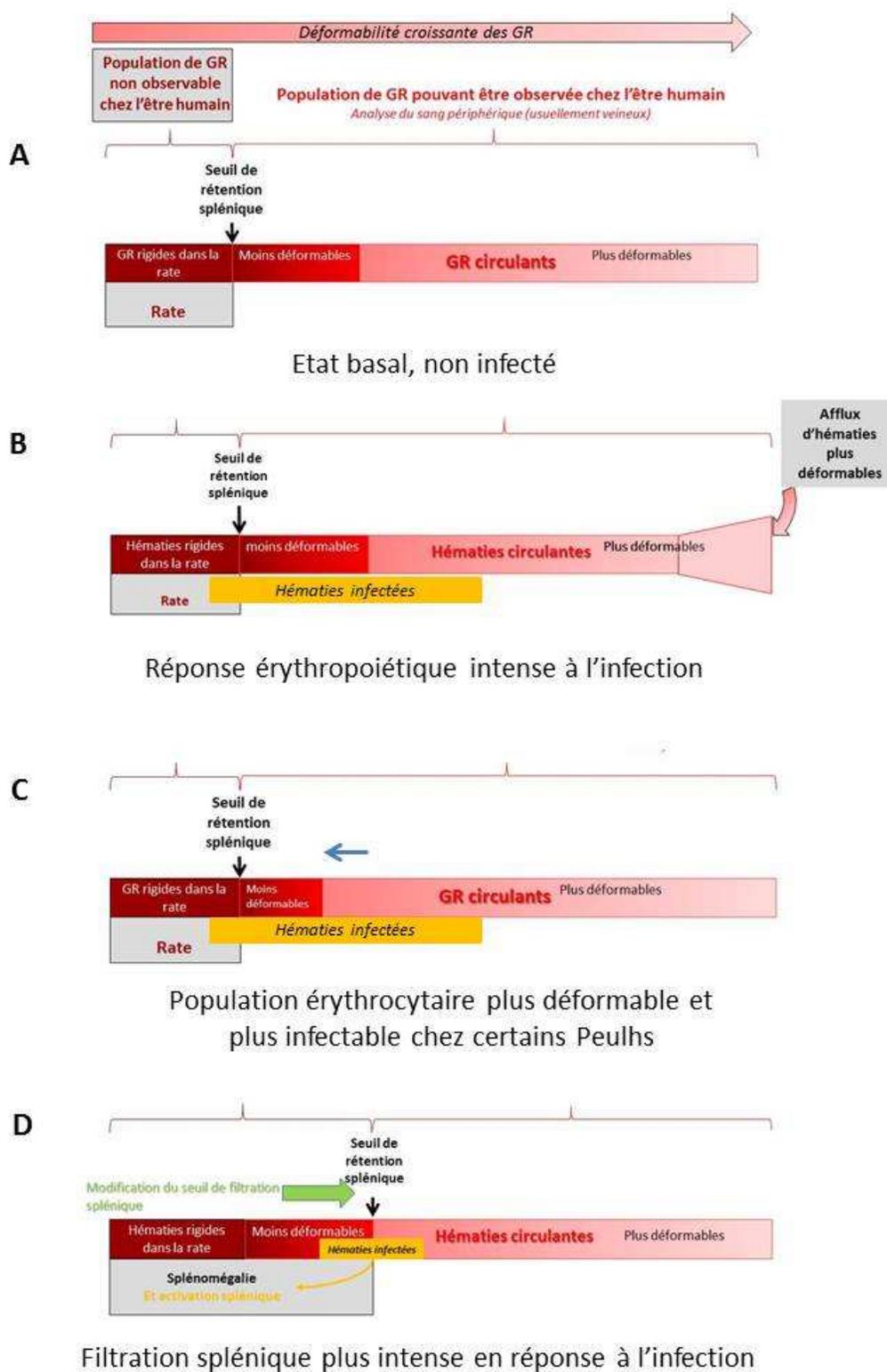


Figure 47 : Représentation graphique des populations érythrocytaires circulantes et non circulantes putatives chez un sujet Peulh, selon les 3 hypothèses interprétatives proposées. A, à l'état basal (non infecté), les GR circulants (seuls explorables) présentent une déformabilité variable, notamment liée à leur âge, et les moins déformables sont retenus dans la pulpe rouge splénique. B, dans l'hypothèse d'une réponse érythropoïétique exacerbée à l'infection palustre, un afflux de GR jeunes majore la déformabilité du contingent circulant. C, dans l'hypothèse de la pré-existence d'une population érythrocytaire plus déformable dans un sous-groupe de sujets Peulhs, la splénomégalie (non représentée ici) pourrait être la conséquence de la prévalence augmentée de l'infection. D, dans l'hypothèse d'une modification du seuil de filtration splénique, la splénomégalie est congestive, et l'anémie est secondaire à la clairance de GR non infectés et infectés.

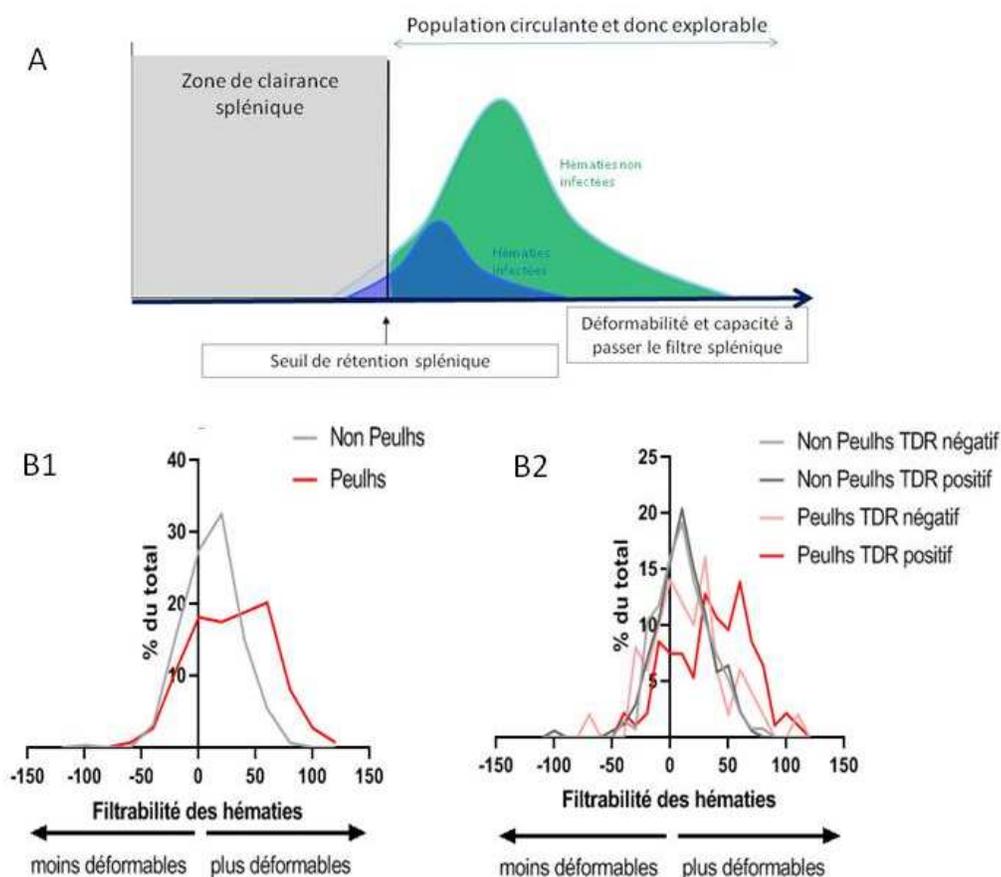


Figure 48 : **A**, histogramme de fréquence des différentes populations circulantes et non circulantes de GR chez un être humain infecté par *P. falciparum*. La déformabilité des GR va croissant de la gauche vers la droite, et la zone grise correspond à la rétention splénique des hématies les moins déformables qui ne sont donc pas accessibles dans la circulation périphérique. **B1**, représentation en % de l'effectif total des valeurs de filtrabilité des GR obtenues par microfiltration en décembre 2017 chez les sujets de l'étude BAOBAB. Les populations Peulhs (en rouge) sont séparées des non-Peulhs (en gris). **B2**, représentation des mêmes valeurs en séparant les sujets TDR négatifs (en gris et rouge clair) et TDR positifs (en gris et rouge foncé).

E. Quels mécanismes cellulaires peuvent être potentiellement impliqués?

1. Quels pourraient être les mécanismes cellulaires d'une hyper réactivité splénique à l'infection palustre chez les Peulhs ?

Le globule rouge s'engageant dans la circulation splénique ouverte, à bas débit, va successivement passer par les artères spléniques, les artérioles pénicillées, puis les cordons de Billroth, les fentes inter-endothéliales, enfin les sinus veineux et la veine splénique^{90,274}. A différentes étapes de ce cheminement, et dans le cadre de notre hypothèse d'une hyper-réactivité de la filtration splénique en réponse à l'infection chez les Peulhs, des mécanismes distincts, mais possiblement associés, peuvent modifier le seuil de perception mécanique des GR par la rate.

Régulation macro et micro vasculaire : la circulation sanguine intra splénique est sous la dépendance, comme dans tout autre organe, de facteurs vasoactifs (vasodilatateurs ou constricteurs) tels que les catécholamines ou le monoxyde d'azote. Une régulation spécifique de ces facteurs chez les Peulhs pourrait, après infection, engager plus de GR dans la circulation lente, promouvant ainsi la splénomégalie congestive mais aussi possiblement la clairance d'une partie de ces GR. L'exploration de ces mécanismes serait très complexe : la mesure du taux plasmatique de certains de ces facteurs est en théorie possible, mais leur variation temporelle est très rapide, rendant délicate cette mesure après des prélèvements réalisés sur le terrain. En outre, rien ne dit que les quantités respectives de ces facteurs dans le sang périphérique reflèteraient précisément la situation intra splénique. L'innervation sympathique des vaisseaux intra spléniques est un autre déterminant connu de la vasoactivité, qui pourrait aussi jouer un rôle.

Une autre approche pourrait être l'évaluation de la microcirculation splénique par échographie-doppler, voire échographie de contraste. Le doppler ne peut actuellement fournir que des informations parcellaires car est limité à l'étude de la macro vascularisation. L'échographie de contraste, quant à elle, utilise un produit de contraste (microbulles) injecté par voie intraveineuse sous forme de bolus ou de perfusion continue³⁴³. L'aspect classique dans les premières secondes suivant son administration est celui d'aspect zébré. Il existe, aux temps plus tardifs, un rehaussement persistant du tissu splénique, de mécanisme imparfaitement compris mais potentiellement en lien avec la circulation lente intrasplénique des hématies. On pourrait donc mesurer une hétérogénéité inter individuelle, voire inter ethnique de la rétention intrasplénique tardive des bulles de contraste.

Régulation à l'échelle de la fente inter endothéliale : les cellules de la paroi sinusale délimitant des fentes inter endothéliales spléniques comportent des éléments contractiles (fibres d'actine et de myosine) ²⁷⁴. Les cellules fibroblastiques réticulaires qui font partie de l'architecture des cordons de Billroth sont également pourvues d'éléments contractiles (actine). Il est donc concevable que la régulation de la contractilité de ces fibres soit à l'origine d'une rétention splénique différente d'un sujet à l'autre. Des variations temporelles du flux de GR par les fentes inter-endothéliales ont été quantifiées par vidéomicroscopie chez le rat (dont la rate contient des sinus structurellement proches des sinus humains) ²⁷⁴. Nous ne disposons pas, à l'heure actuelle, de techniques permettant l'exploration de tels phénomènes chez l'être humain. La structure spécifique de la pulpe rouge murine, qui est non sinusale contrairement à la rate humaine, rend les modèles murins d'infection palustre utilisant *Plasmodium berghei* ou *Plasmodium chabaudi* invalides dans ce contexte précis.

Régulation de l'activité macrophagique : l'activité de cellules macrophagiques spécialisées, les macrophages de la pulpe rouge, dans les cordons de Billroth, pourrait être régulée de manière différente d'une ethnie à l'autre. On peut concevoir qu'une érythrophagocytose exacerbée chez les Peulhs, en réaction à l'infection, puisse également participer à une clairance accélérée des GR les moins déformables, et des GR infectés. L'exploration de tels phénomènes est difficile : il n'est pas certain que les caractéristiques des monocytes, aisément accessibles via le sang périphérique, soient superposables à celles des RPM. Nous disposons depuis peu de données laissant penser que le renouvellement des macrophages intra tissulaires se fait plus par repopulation à partir des cellules déjà présentes in situ, plutôt que par migration intraparenchymateuse et différenciation de monocytes circulants ²⁸¹. Des données intéressantes de transcriptomique différentielle entre Peulhs et non-Peulhs ont été obtenues au Burkina Faso, faisant état d'une suractivation, chez les Peulhs, de nombreux gènes impliqués dans la réponse immune innée ²³⁹. Ceci a motivé la conception d'une expérience d'érythrophagocytose utilisant des monocytes de sujets Peulhs et non-Peulhs, via des cellules mononuclées du sang périphérique collectées et isolées fin 2017 ; cette expérience s'est heurtée à un trop faible nombre de cellules viables.

En résumé, même si l'exploration des processus cellulaires sous-tendant une variation du seuil de clairance splénique des GR constitue un défi expérimental et logistique, on peut toutefois concevoir qu'une variabilité de l'hémodynamique intra splénique, qu'une modification de la régulation des fentes inter-endothéliales de la pulpe rouge, ou qu'une exacerbation de l'activité d'érythrophagocytose intra splénique puissent expliquer une sur-activation splénique après infection chez les Peulhs.

2. Dans l'hypothèse qu'une population de GR plus déformables et plus infectables existe chez certains Peulhs, quels mécanismes peuvent être envisagés pour leur genèse ?

La déformabilité érythrocytaire est sous la dépendance de 3 facteurs : la rigidité membranaire (et du cytosquelette sous-jacent), les propriétés géométriques du GR (essentiellement liées à son rapport surface/volume) et l'état d'hydratation intracellulaire, fonction notamment de la concentration en hémoglobine et de l'activité des canaux ioniques⁴⁷⁸. Les pathologies constitutionnelles du globule rouge altérant sa déformabilité sont nombreuses (sphérocytose héréditaire, drépanocytose, stomatocytose déshydratée...). Nous n'avons pas connaissance de pathologies innées du GR responsables d'une majoration permanente de la déformabilité globale.

Pouvons-nous être plus précis? Les 2 techniques utilisées dans ce travail pour l'évaluation de la déformabilité érythrocytaire, microsphiltration et ektacytométrie, ne semblent pas sensibles aux mêmes facteurs : des travaux menés au sein de notre équipe et d'autres, mesurant la déformabilité de GR soumis à un traitement par lysophosphatidylcholine (qui altère leur rapport surface/volume), diamide (qui rigidifie leur membrane) ou nystatine (qui modifie leur hydratation intracellulaire) ont montré des résultats hétérogènes : l'altération du rapport surface/volume réduit l'index d'élongation en ektacytométrie, mais à hautes contraintes de cisaillement seulement ; en microsphiltration, la rétention dans les microbilles est importante à partir d'un certain seuil de perte de volume^{332,479}. *A contrario*, la rigidification membranaire altère notablement l'index d'élongation quelle que soit la force appliquée, mais n'est responsable que d'une rétention modérée en microsphiltration⁴⁸⁰. Enfin, la déshydratation érythrocytaire ne modifie pas significativement les valeurs d'index d'élongation⁴⁸¹; nous ne disposons pas de données sur le taux de rétention en microsphiltration de GR déshydratés. Au total, nos données expérimentales (différences plus marquées en microsphiltration qu'en ektacytométrie, absence de différence en ektacytométrie à contraintes de cisaillement basses) pourraient plaider pour une modification du rapport surface/volume des GR chez les Peulhs. L'extrapolation à partir de données expérimentales purement *in vitro* doit cependant rester prudente.

3. Que pourrait sous-tendre une réponse érythropoïétique plus intense dans le groupe Peulh ?

L'érythropoïèse est un phénomène très complexe et très finement régulé, les acteurs les plus importants dans ce domaine étant l'érythropoïétine, le métabolisme du fer, mais également de très nombreux facteurs de transcription et ARN non codants ⁴⁸². Une anomalie constitutive de l'érythropoïèse telle que décrite dans la polyglobulie de Vaquez apparaît improbable, car elle s'exprimerait en permanence et non en réponse à l'infection. En outre, un nombre important de travaux a montré que l'infection à *P. falciparum* a plutôt tendance à inhiber l'érythropoïèse qu'à l'activer ³⁵¹.

F. Comment nos données d'évaluation de la réponse immune B s'intègrent-elles dans cette analyse ?

1. Réponse anticorps

Nous confirmons, pour la seconde fois à notre connaissance ²⁵², l'existence d'une réponse IgM totale plus ample dans le groupe Peulh. Nous n'avons pu formellement prouver dans ce travail que ces IgM étaient dirigées contre *P. falciparum*, même si les travaux de l'équipe de P. Crompton le laissent entendre ²⁴². Ceci nécessiterait un ELISA IgM anti *P. falciparum*.

En décembre 2017, selon les critères classiques ⁴⁵⁹, 10.74% (45/419) de notre population (21 enfants et 24 adultes) présentait une élévation des IgM totales. Une telle élévation n'est pas très fréquente, une prévalence de 10.7% peut donc être considérée comme très élevée. Les autres causes d'hyperIgM, qui correspondent à des pathologies rares voire très rares (déficits immunitaires primitifs comportant un défaut de commutation isotypique tels que les mutations de CD40 ligand, cirrhose biliaire primitive, lymphocytose à lymphocytes bi nucléés) ne rendent très probablement pas compte du nombre important de cas d'hyper IgM. Le lien entre paludisme et hyper IgM est donc ici très probable.

2. Immunité cellulaire B.

Notre analyse des sous populations B circulantes a montré des proportions discrètement plus faibles de plasmocytes (formes circulantes, donc plus probablement des plasmablastes). Ceci peut sembler contre-intuitif dans un groupe qui produit plus d'anticorps, mais il faut garder en mémoire que la très grande majorité des plasmocytes réside dans la moelle osseuse.

La proportion de cellules B naïves et transitionnelles en circulation est moindre dans le groupe Peulh. Ceci peut être lié à une activation B plus importante dans ce groupe, qui engage un plus grand nombre de cellules B vers la réaction du centre germinatif.

Les cellules B mémoires atypiques correspondent à une sous-population B comportant des caractéristiques spécifiques (faible production d'anticorps, transduction du signal d'aval du BCR plus faible ³⁴), et dont l'expansion a été bien décrite chez les sujets exposés à *P. falciparum* ³¹, et ce de manière proportionnelle à l'intensité de l'exposition ^{32,33}. Cette plus grande proportion chez les sujets Peulh pourrait donc être corrélée à une plus grande exposition.

Nous avons également trouvé, au sein des sous-populations de cellules B mémoires des sujets étudiés, plus de cellules IgM+ qu'IgG+ chez les Peulhs. Ceci peut être mis en parallèle avec la production plus abondante d'IgM dans ce groupe. Le lien entre fonction splénique et cellules mémoires IgM+ a été étudié. Il est possible que cette population IgM+ plus abondante chez les Peulhs soit le reflet d'une suractivation splénique. Nous n'avons pas analysé assez de sujets Peulhs avec TDR positif pour apprécier de manière fiable les différences de populations cellulaires entre sujets infectés et non infectés.

L'analyse isolée et quantitative des populations circulantes ne peut pas aisément permettre d'expliquer la réponse immune plus abondante du groupe Peulh, et il ne s'agissait pas de l'objectif de cette thèse. L'analyse fine et fonctionnelle des sous-populations B circulantes serait intéressante. La notion d'anticorps protecteurs à large spectre a émergé au cours des dernières années, notamment dans le domaine de l'infection à VIH ⁴⁸³. Ces anticorps ont pour point commun d'être dirigés contre des domaines constants d'antigènes soumis à variation, et d'être responsables de réponses B neutralisantes très protectrices. L'existence de tels anticorps dirigés contre *P. falciparum* est encore discutée mais est très probable. Il pourrait être bien sûr intéressant de déterminer si les anticorps produits par les Peulhs possèdent des caractéristiques d'anticorps naturels protecteurs. Disposer de cellules B spléniques, voire médullaires pour mieux appréhender la réponse anticorps anti palustre dans sa globalité serait idéal, mais se heurte à des obstacles logistiques et techniques.

Nous confirmons ici l'existence d'une réponse IgM (totales) plus intense chez les sujets Peulh que chez les membres des autres ethnies. La proportion plus importante de cellules B mémoires IgM+ suggère l'existence d'une suractivation splénique dans le groupe Peulh.

IV. Vers l'identification de nouveaux variants du génome liés à la réponse phénotypique à l'infection palustre

A. Données d'héritabilité

1. Considérations générales.

L'héritabilité d'un trait phénotypique donné, dans sa définition communément admise, correspond à la proportion de la variation de ce trait qui est liée à des variations du génome, par opposition à des variations d'exposition environnementale.

Deux types de variabilité génétique sont décrits (figure 49) : la variance additive, qui est la somme des effets de différents loci ; et la variance non additive, qui représente les interactions inter alléliques, soit au même locus (notion de dominance) ou à des loci différents (notion d'épistasie). L'héritabilité au sens strict ou étroit (parfois nommée h^2) se restreint à la composante additive. L'héritabilité au sens large, quant à elle, correspond à la somme des variances additives et non additives divisée par la variance phénotypique totale.

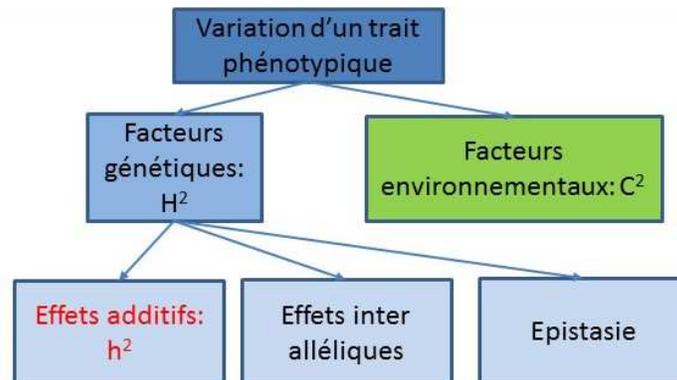


Figure 49 : Hiérarchie des différentes composantes de l'héritabilité. L'héritabilité h^2 , indiquée en rouge, est celle que nous avons évalué via les études familiales du projet BAoBAB.

Notre méthode bioinformatique utilisant le logiciel SOLAR évalue l'héritabilité au sens strict (h^2). Nous avons donc négligé les éléments de dominance et l'épistasie, ainsi que les éléments d'interaction gènes-environnement. Le programme est capable de quantifier un rapport de vraisemblance de l'héritabilité : en cas de significativité de ce rapport, cela signifie que l'hypothèse nulle, qui

correspondrait à une absence d'influence des éléments génétiques sur la variabilité du phénotype observé, n'est pas vérifiée, et que l'hypothèse supposant que ce trait est sous la dépendance de facteurs génétiques est plus vraisemblable.

2. Héritabilité de la déformabilité des hématies circulantes

La première analyse des valeurs de déformabilité des GR obtenues par microsphiltration, a montré une héritabilité plus importante de ce trait dans le groupe Peulh, de manière très significative. La composante environnementale était ici minimale.

La seconde analyse a montré que dans la population dont le TDR était positif, cette héritabilité (déjà importante dans la population TDR négatif) atteignait son maximum. Ceci renforce donc l'idée que le fait d'être infecté par *P. falciparum* déclenche des mécanismes cellulaires sous la dépendance d'éléments génétiques qui, *in fine* influenceront la déformabilité des GR circulants. Dans cette analyse, il aurait bien sûr été idéal se séparer sujets Peulh et non-Peulh, mais compte tenu des effectifs étudiés, la puissance statistique était insuffisante.

Ces éléments indiquent qu'une analyse génome entier dans cette cohorte multi-ethnique peut identifier de gènes intervenant dans l'adaptation phénotypique à l'infection par *P. falciparum*.

B. Le cas particulier du groupe Gando

Comme indiqué au chapitre 3 de l'introduction, les Gando sont un groupe issu d'enfants considérés comme « maudits », et recueillis par les Peulhs dont ils ont adopté le mode de vie. L'endogamie persistant, ce groupe est donc génétiquement toujours distinct des Peulhs, mais a un mode de vie qui s'en rapproche fortement. Cette dualité est à mettre en perspective avec les données phénotypiques : en termes de splénomégalie, malgré leur proximité avec le mode de vie Peulh, les Gando sont les plus éloignés des Peulhs. Cette observation renforce le postulat qu'un facteur inné, génétique, plutôt qu'environnemental, sous-tend cette plus grande tendance à la splénomégalie chez les Peulhs.

C. Quelles mutations génétiques pourraient être en jeu ?

Les variants génétiques associés à la protection contre le paludisme ayant déjà fait l'objet d'une exploration chez les sujets Peulhs sont le trait drépanocytaire, l'hémoglobine C, la thalassémie, le déficit en G6PD, le groupe sanguin O ^{256,257,484}. Certains polymorphismes érythrocytaires connus comme protecteurs n'ont pas été encore explorés, tels que les mutations d'*ATP2B4* et des glycophorines, ou l'elliptocytose héréditaire. L'ovalocytose et l'hémoglobinosose E ne sont très probablement pas impliquées car très rares en Afrique (cf tableau 2). L'approche génome entier incluse dans l'étude BAOBAB permettra donc de compléter cette exploration des polymorphismes érythrocytaires. Compte tenu des éléments phénotypiques nouveaux présentés dans cette thèse l'analyse ne portera pas que sur la « protection » mais aussi sur les déterminants présentant les plus fortes différences interethniques tels que la splénomégalie et la filtrabilité des GR.

Un travail récent mené en Indonésie s'est intéressé à la population Bajau, dont les capacités de plongée en apnée sont particulièrement développées et utilisées pour la pêche sous-marine. Une équipe danoise a ainsi mis en évidence une prévalence élevée de splénomégalie dans ce groupe. Par une analyse génome entier et via une comparaison à un autre groupe ethnique, les auteurs ont mis en évidence des polymorphismes des gènes *PDE10A* et *BDKRB2* chez les sujets Bajau qui semblaient associés à la présence d'une splénomégalie. Les mécanismes cellulaires et moléculaires pouvant sous-tendre cette association génotype-phénotype restent encore mal élucidés mais pourrait concerner les cellules musculaires lisses ²⁶⁸. L'hypothèse proposée est celle d'une contraction splénique en apnée relarguant les GR stockés pour compenser l'hypoxie, processus bien étudié chez les cétacés. Cette fonction splénique dite de « de stockage » n'est pas encore solidement établie chez l'être humain. Il semble cependant important d'évaluer ces variants dans la population Peulh.

Un second travail récent portant sur le gène *PIEZO1* a mis en évidence une fréquence particulière d'un variant de *PIEZO1* (E756del) dans des populations originaires d'Afrique sub-saharienne. Une lignée de souris portant une mutation gain de fonction de *PIEZO1* s'avérait moins affectée par le neuropaludisme expérimental dû à *Plasmodium berghei*. Les GR humains portant la délétion E756del étaient quant à eux moins aisément infectables par *P. falciparum* ¹⁹². Même si la pertinence physiopathologique du modèle murin infecté par *P. berghei* n'est pas pleinement validée, il s'agit là d'une piste qu'il conviendra d'explorer dans la cohorte BAOBAB. La déshydratation des GR mutés *PIEZO1* pourrait en effet rendre compte d'une moindre infectabilité et donc d'une charge parasitaire moindre chez les Peulhs. Elle est toutefois en désaccord avec l'hypothèse, détaillée plus haut, d'une population de GR à la fois plus infectables et plus déformables chez les Peulhs. La déshydratation modérée des GR, en diminuant leur volume, augmente le rapport surface-volume (à surface supposée constante) et donc leur déformabilité. Si cette théorie de la déformabilité érythrocytaire est opérante ici, les GR porteurs

d'allèles gain-de-fonction *PIEZO1* doivent être plus déformables. L'expérience publiée par Ma stipule une plus grande résistance et non une plus grande susceptibilité à l'infection, ce qui n'est donc pas entièrement cohérent avec notre hypothèse. La mutation elle-même ne rend pas directement compte de la splénomégalie ¹⁹⁰.

La multiplicité des pistes physiopathologiques rend le nombre de variants génétiques potentiellement impliqués (sans même aborder la piste épigénétique) très important. Ceci souligne l'intérêt de l'approche génome entier. Des publications récentes désignent toutefois des candidats à explorer en priorité.

D. Concordance génotype/ethnie déclarative.

A notre connaissance, l'intégralité des études publiées jusqu'ici dans le domaine de la susceptibilité ethnique vis-à-vis du paludisme se basait sur l'ethnie déclarative. La possibilité de génotyper chaque individu inclus dans l'étude nous a permis de déterminer la structure génétique précise de la population et de s'affranchir d'un potentiel biais déclaratif. On pouvait par exemple concevoir qu'en raison de la connotation parfois péjorative d'une appartenance au groupe Gando, certains sujets génétiquement Gando se définissent comme Peulh. Ceci ne s'est pourtant produit qu'à d'exceptionnelles occasions (6 sujets), et le taux de concordance déclaratif/génotypique était globalement de 99.2%. L'ethnie déclarative semble donc être d'une très grande fiabilité dans cette zone géographique.

V. Limites de ce travail

A. Données phénotypiques

Alors que l'étude BAOBAB bénéficie de données longitudinales, nos résultats expérimentaux sont le reflet de l'état clinique des sujets inclus dans notre cohorte en décembre 2017, à la fin d'une saison de transmission. C'est au cours de cette mission que les différences inter-ethniques de prévalence de la splénomégalie ont été les plus marquées.

Les traits phénotypiques que nous avons observés peuvent être influencés par nombre de facteurs :

La prévalence de l'infection dépend, entre autres, de l'intensité de transmission au cours de chaque saison des pluies, du degré de compliance aux mesures préventives, du niveau d'accès aux médicaments antipaludiques, et du degré d'automédication des sujets inclus.

La prévalence et l'importance de la splénomégalie dépendent aussi de la prévalence respective des autres pathologies responsables de splénomégalie. Celles-ci sont nombreuses et il n'a pas été possible d'éliminer tous les diagnostics différentiels. Cependant, les signes cliniques d'hypertension portale ont été systématiquement cherchés chez tout sujet splénomégalique, et étaient très rares, avec un taux d'hépatomégalie associée à la splénomégalie inférieur à 3%. Il aurait été idéal de disposer d'un hémogramme complet chez chaque sujet, notamment afin d'éliminer de possibles néoplasies myéloprolifératives ; ceci n'a pu être fait pour des raisons logistiques. Dans la population d'enfants, qui représentent la moitié des sujets inclus, l'hypothèse d'une néoplasie myéloproliférative est peu probable, ce groupe de pathologies affectant en règle les sujets de plus de 50 ans ⁴⁸⁵.

Il existe une part d'imprécision et de subjectivité lors de l'évaluation clinique d'une splénomégalie. Le degré imparfait de concordance entre les 3 observateurs cliniciens constaté lors de la mission de 2016 en atteste. Cependant, la palpation splénique a été effectuée par le même praticien au cours de toutes les missions transversales. La très grande majorité des études qui se sont intéressées à la prévalence et/ou au degré de splénomégalie dans le paludisme reposaient également sur une évaluation clinique.

B. Données de déformabilité

L'analyse de déformabilité a été faite sur des GR conservés en milieu de préservation entre 15 et 17 jours après prélèvement (pour la microsphiltration) et entre 9 et 17 jours pour l'ektacytométrie. Il aurait été idéal de réaliser ces expériences sur des GR tout récemment prélevés, mais les contraintes logistiques d'installation d'un tel laboratoire auraient été trop importantes. Un élément nous préservant d'une trop grande erreur, à notre sens, est le fait que tous les échantillons ont été traités de manière identique sur un laps de temps court (3 jours pour la microsphiltration et 8 pour l'ektacytométrie).

Au plan expérimental, l'analyse en ektacytométrie de l'ensemble de la cohorte n'a pu être réalisée pour des raisons logistiques (rupture de notre stock de polyvinylpyrrolidone). Cependant, le sous-ensemble de sujets étudiés l'a été au hasard, ce qui peut à notre sens minimiser le risque de biais de

sélection. De même, les 120 sujets analysés au cours des expériences d'infection *in vitro* ne différaient pas significativement de l'ensemble de notre cohorte.

Le caractère fluctuant des traits phénotypiques et des anomalies biologiques observés rend leur analyse à un instant donné suboptimale. Il aurait été idéal de répéter les observations et expériences réalisées fin 2017 à une ou deux reprises.

L'analyse morphologique des GR circulants s'est là aussi heurtée à des contraintes logistiques fortes : celle-ci n'a pu être menée que sur un nombre réduit de sujets, à un moment où la préparation soignée d'échantillons de GR en vue de leur analyse ultérieure à Paris prévalait. Nous avons mis en évidence une proportion plus faible de formes anormales en circulation chez les sujets Peulhs, mais de manière non significative. A l'occasion de futures missions, l'inclusion dans cette étude morphologique d'un plus grand nombre de sujets permettra d'augmenter la puissance de l'analyse.

C. Difficultés logistiques.

L'étude du paludisme, lorsqu'elle ne se limite pas à la pathologie d'importation ou aux phénomènes cellulaires reposant sur l'utilisation de souches parasitaires de laboratoire, impose de travailler, au moins pour partie, en zone endémique.

Notre travail a été réalisé au Bénin, pays de haute endémie palustre. La mise en place logistique des missions de terrain qui ont servi de base à ce travail a été complexe. Lors des deux premières missions, les expériences d'évaluation de la déformabilité érythrocytaire par microfiltration ont été conduites directement au Bénin, grâce à l'installation d'un laboratoire de terrain dans une pièce louée à l'hôpital de Zone de Natitingou. Les conditions expérimentales étaient suboptimales par rapport aux conditions dans lesquelles ces techniques ont été développées et évaluées. L'accès à l'électricité était inconstant. La nécessité de transporter des plaques de microfiltration sur le terrain a conduit à utiliser des plaques séchées et conservées dans des emballages hermétiques, plutôt que congelées après fabrication et décongelées 2 heures avant utilisation, ce qui correspond à notre protocole usuel. Ces plaques ont de plus subi des chocs lors des phases de transport aérien et routier. Même si cela n'est pas prouvé, il reste possible que ces conditions expérimentales modifiées et par certains aspects, dégradées, aient joué un rôle dans les difficultés rencontrées dans l'interprétation des 2 expériences de microfiltration conduites sur site. Nous avons validé la faisabilité d'une évaluation différée de la

déformabilité érythrocytaire en conservant les GR en milieu de préservation (SAGM) durant 2 à 3 semaines avant analyse (cf section résultats).

La faisabilité de cette approche nous a conduit à proposer une approche d'évaluation différée, au laboratoire, du phénotype de GR prélevés sur le terrain. Les conditions expérimentales s'en sont trouvées simplifiées et améliorées, mais les contraintes logistiques liées au transport d'échantillons biologiques une période de temps très brève, furent également importantes.

Ce travail a bénéficié de la grande expérience de l'équipe de l'UMR216, qui grâce à son implantation double, à Cotonou et Paris, et au grand nombre d'études de terrain menées dans le champ des infections tropicales, a permis de surmonter les contraintes logistiques, des plus triviales aux plus complexes, qui ont jalonné ces missions.

VI. Réflexion sur la poursuite des explorations

Afin de s'affranchir des aléas liés à l'instabilité probable des traits phénotypiques observés, l'observation de notre cohorte de manière plus rapprochée dans le temps, sur un nombre restreint de sujets pour rester logistiquement réaliste, serait sans doute d'un grand apport. Etudier le phénotype érythrocytaire, les données cliniques (splénomégalie, température) et la prévalence de l'infection tous les 2 à 3 jours au cours d'une période de 15 jours au moins, permettrait d'affiner les observations et de préciser les hypothèses. En effet, capturer une réponse médullaire exacerbée, ou des variations de déformabilité érythrocytaire, elles-mêmes reflet d'une activation de la rétention splénique, nécessite sans doute des prélèvements répétés à quelques jours d'intervalle.

A. Préciser le phénotype clinico-biologique.

Une mesure échographique de la taille de la rate permettrait une plus grande finesse de caractérisation, en mesurant les dimensions dans plusieurs axes, voire en calculant, grâce à ces dimensions, le volume splénique⁴⁵⁵. Dans le cadre du diagnostic différentiel, cet examen permettrait aussi de rechercher une splénomégalie tumorale, et, de manière plus précise, une hypertension portale. Idéalement même, une technique utilisant de bulles de contraste nous permettrait d'apprécier des variations de l'hémodynamique intra splénique comme évoqué plus haut. Un

hémogramme permettrait d'éliminer certaines néoplasies myéloprolifératives, eux-mêmes cause de splénomégalie. En outre, la mesure de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) donnerait une indication de l'état d'hydratation des GR.

Une autre approche permettant d'éliminer des splénomégalies dues à une néoplasie myéloproliférative est l'utilisation des données de génotypage à notre disposition : la majorité des néoplasies myéloprolifératives est liée à des mutations somatiques des gènes Janus Kinase 2 (*JAK2*)⁴⁸⁶, Calréticuline (*CALR* ;^{487,488}) et récepteur de la thrombopoïétine (*MPL* ;⁴⁸⁹). Les principales mutations de ces 3 gènes associées aux néoplasies myéloprolifératives étant connues, leur recherche peut être réalisée par analyse bio-informatique des données de génotypage de la cohorte BAOBAB.

B. Etoffer l'analyse phénotypique érythrocytaire.

L'utilisation d'autres méthodes de mesure de la déformabilité des GR, sensibles à d'autres paramètres, comme l'ektacytométrie en gradient osmotique (Osmoscan®), compléterait utilement le phénotype. L'Osmoscan est un ektacytomètre mesurant l'index d'élongation d'une solution de GR à force de cisaillement constante, mais dans un milieu dont l'osmolalité varie. Cette technique est plus précise, notamment pour l'évaluation de modifications de l'hydratation érythrocytaire. La déformabilité des GR pourrait également, dans le même ordre d'idées, être étudiée par microfluidique.

L'étude morphologique fine des populations érythrocytaires circulantes, par microscopie optique standard, voire, beaucoup plus avantageusement par imagerie en flux (AMNIS®) nous permettrait d'étoffer potentiellement l'hypothèse d'une modification du rapport surface/volume chez certains sujets Peulhs, ainsi que d'apprécier leur fonction splénique via la proportion de formes morphologiquement « anormales » circulantes.

C. Tester l'hypothèse d'une hyperfiltration splénique en réponse à l'infection.

Dans le cadre de l'exploration d'une potentielle sur-activation splénique après infection chez les Peulhs, la reproduction des expériences de transfusion de GR marqués pour étude de la survie érythrocytaire *in vivo* dans notre cohorte serait d'un très grand intérêt. Il est en effet possible, dans cette hypothèse, que l'hyper-filtration splénique observée chez les Peulhs représente le phénotype extrême de ce qui avait déjà été observé par Looareesuwan *et al.* chez des sujets récemment

impaludés^{345,346}. On observerait dans ce cas une survie particulièrement brève en circulation de GR rigidifiés dans le groupe Peulh, en comparaison aux non-Peulh, voire même de GR normaux. Les contraintes éthiques et logistiques sont considérables. Cependant, le développement d'autres techniques d'étude de la survie érythrocytaire comme l'injection d'hématies biotinylées allégeraient ces contraintes. Ces hématies, après prélèvement veineux, sont coincubées avec de la streptavidine liée à un fluorochrome, et quantifiées par cytométrie en flux, permettant leur quantification différée, plus compatible avec des conditions expérimentales de terrain. Toutefois, contrairement au marquage radioactif, le marquage à la biotine ne permet pas de mesurer l'accumulation des GR retenus dans un organe⁴⁹⁰.

Une autre piste exploratoire serait de parvenir à obtenir des GR de sujets Peulh et non-Peulh, n'ayant jamais été modifiées par le filtre splénique. Ceci n'est bien sûr pas possible *in vivo*, mais le développement récent de techniques d'érythropoïèse *in vitro* pourrait théoriquement permettre, à partir de cellules mononuclées du sang périphérique, d'obtenir de faibles quantités d'hématies matures⁴⁹¹. Ceci passe par l'obtention de cellules souches, soit via du sang de cordon, soit des progéniteurs médullaires, soit du sang périphérique⁴⁹². Le principe repose sur l'induction d'une prolifération intense des progéniteurs hématopoïétiques et leur orientation vers la lignée érythroïde via l'ajout de Stem Cell Factor (SCF), érythropoïétine (EPO) et interleukine 3 (IL3), puis une tentative de reconstitution du micro environnement médullaire via l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses murines ou humaines, et enfin une étape de différenciation sans facteur de croissance. L'étude du phénotype érythrocytaire avant et après infection *in vitro* d'hématies Peulh et non-Peulh générées *in vitro* permettrait d'évaluer la contribution de phénomènes purement érythrocytaires et de phénomènes nécessitant l'intervention d'un processus extra-érythrocytaire, en l'occurrence la rate. Dans l'hypothèse d'une activation splénique en réponse à l'infection, l'on s'attendrait dans ce schéma expérimental à une absence de différences inter ethniques en termes de déformabilité post-infection, puisque la filtration splénique n'intervient pas dans ce système expérimental *in vitro*.

L'observation anatomopathologique de pièces de splénectomie issues de sujets Peulh, et leur comparaison à des sujets sympatriques non Peulhs permettrait d'aborder les questions suivantes: existe-t-il une congestion plus importante de la pulpe rouge chez les sujets Peulhs, argument supplémentaire pour une réponse splénique particulière à l'infection dans ce groupe ? Même question concernant une expansion plus importante de la pulpe blanche ou une dissolution de l'équivalent humain de la zone marginale comme montré par Urban *et al.*⁴⁹³ ? La mise en place d'une analyse rétrospective de pièces de splénectomies chez des sujets appartenant à diverses ethnies africaines et

vivant en zone endémique s'est heurtée à des contraintes logistiques et organisationnelles importantes. A titre d'exemple, nombre de départements d'anatomopathologie d'hôpitaux d'Afrique sub-saharienne ne disposent pas de moyens d'archiver à long terme les pièces opératoires.

D. Tester l'hypothèse d'une réponse érythropoïétique intense chez les sujets Peulhs infectés.

L'hypothèse d'une réaction érythropoïétique exacerbée bénéficierait de la mesure du nombre de réticulocytes. Ceci peut être réalisé via le marquage retic-count© (qui utilise le Thiazol Orange, marqueur d'ADN, persistant en faible quantité à l'intérieur des réticulocytes et absent des GR matures) suivi d'une lecture cytométrique ; ou sur frottis sanguin non fixé, en utilisant la coloration du bleu de Crésyl. Idéalement, une mesure différentielle, pour chaque individu, des populations très jeunes, jeunes, d'âge moyen et vieillissantes permettrait d'affiner l'analyse, mais en l'absence de méthode fiable, le taux de réticulocytes est considéré comme un marqueur solide de la proportion d'hématies jeunes et donc plus déformables en circulation. La réponse érythropoïétique différentielle d'une ethnie à l'autre pourrait être évaluée via la technique d'érythropoïèse *in vitro* évoquée plus haut : cette érythropoïèse, réalisée en présence d'antigènes plasmodiaux, présenterait-elle des disparités inter-ethniques ? Ceci doit cependant être tempéré par les importantes difficultés techniques prévisibles de la réalisation d'une telle technique à grande échelle, rendant cette exploration inenvisageable à court terme.

E. Confrontations aux données génotypiques.

Un élément majeur de la suite du projet BAOBAB sera la corrélation phénotype-génotype. Le phénotypage soigneux et répété sur nombre la température, les marqueurs d'infection et la taille de la rate, ainsi que la mesure du taux d'IgM, permettra d'affiner cette étude. L'identification de variants génétiques associés au « phénotype Peulh » pourrait contribuer de façon décisive à la compréhension de ces phénomènes.

VII. Que nous a appris cette approche dans le contexte général du paludisme ?

L'étude du phénotype Peulh peut à première vue sembler confidentielle et affaire d'ultra-spécialistes. Cependant, la population Peulh vivant en zone d'endémie palustre représente entre 20 et 40 millions de personnes au total (source : www.inalco.fr). Mieux comprendre l'adaptation d'un groupement de population si vaste à une infection extrêmement fréquente ne semble pas futile.

En outre, l'intensité de la réponse immune des Peulh contre *Plasmodium* étant bien établie, la compréhension des déterminants de cette réponse peut déboucher sur de nouvelles approches thérapeutiques et/ou vaccinales contre le paludisme.

La splénomégalie palustre hyper-réactive est une pathologie rare et donc d'exploration difficile, mais dont les similitudes clinico-biologiques avec le « phénotype Peulh » sont frappantes. Comprendre l'un (le phénotype) nous aidera sans doute à comprendre l'autre (la SPH), associée en zone endémique à de forts taux de mortalité. La propension à rechuter sur un même mode chez les sujets atteints de SPH pose la question de la durée de la prophylaxie qui devrait être proposée chez les sujets amenés à être ré exposés au parasite.

Le phénotype Peulh est très souvent associé à la notion de protection anti palustre. Même si cette notion est assez robuste en ce qui concerne les formes cliniques aiguës^{231,233}, on peut également considérer ce phénotype comme une forme de persistance à bas bruit d'une parasitémie sans maladie. Le rôle de ces phénomènes dans la pérennisation de la transmission est possible et mériterait d'être pris en compte dans un contexte d'élimination du paludisme.

VIII. Au-delà du paludisme, que peut nous apprendre ce travail de thèse?

Le concept de régulation splénique et érythropoïétique des sous-populations érythrocytaires chez l'être humain est central dans la physiopathologie du paludisme, pathologie quasi exclusivement érythrocytaire et au cours de laquelle la rate doit parfois faire face à un afflux massif et rapide de GR altérés.

Nous pouvons aussi envisager que dans d'autres situations médicales telles que la séquestration splénique aiguë du sujet drépanocytaire homozygote, ou la réponse splénique à la transfusion massive de GR soumis à la lésion de stockage, les données acquises durant ce travail permettent d'identifier de nouvelles pistes physiopathologiques.

IX. Conclusion générale.

Ce travail multidisciplinaire soumis à de fortes contraintes pratiques a permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques sous-tendant la réponse phénotypique particulière de l'ethnie Peulh au paludisme, et par extension la splénomégalie palustre hyper-réactive et ses complications potentielles. Via un phénotypage étendu des GR circulants, complété par une étude de ces mêmes GR après infection expérimentale par *P. falciparum*, nous avons émis l'hypothèse que les interactions spléno-érythrocytaires, via l'existence d'une sous-population érythrocytaire spécifique du groupe Peulh, plus infectable et plus déformable, ou via une hyper activation splénique après infection, pouvaient participer à la constitution du phénotype clinico-biologique. Ces processus agiraient en amont de la réponse immune adaptative. Cette hypothèse vient donc compléter les nombreuses explorations à prédominance immunologique antérieurement publiées. Elle fait écho aux études de grande envergure menées dans le domaine des déterminants génétiques du paludisme grave qui ont, dans leur grande majorité, débouché sur l'identification de polymorphismes érythrocytaires plutôt que sur des déterminants immunologiques conventionnels. Elle s'en démarque cependant, car le phénotype observé ici est plus subtil que la gravité du tableau clinique aigu, et s'adresse à l'expression d'une infection chronique. Les différences interethniques en termes de déformabilité érythrocytaire sont très marquées et pourraient constituer un levier crucial de l'analyse génétique à venir.

Annexes

I. Communications scientifiques en rapport avec le travail de thèse

A. Communication affichée présentée au 58ème congrès de l'American Society of Hematology en décembre 2016 à San Diego

Abstract:

Introduction: malaria is one of the most frequent hematological diseases worldwide. Because the malaria parasite *Plasmodium falciparum* develops mainly in red blood cells (RBC), splenic retention of infected and uninfected RBC is likely a key player in the variable susceptibility of humans to malaria. Age and ethnicity are important determinants of the manifestations of malaria in Africa (Reyburn JAMA 2005, Dolo Am J Trop Med Hyg 2005; Greenwood Ann Trop Med Parasitol 1987; Torcia PNAS 2008), Asia (Price Am J Trop Med Hyg 2001), and in travelers (Seringe Emerg Infect Dis 2011). We had speculated that variations in the splenic sensing of RBC contribute to the innate protection/susceptibility of infants against distinct forms of severe malaria and to the pathogenesis of chronic malaria (Buffet Curr Opin Hematol 2009; Buffet Blood 2011). Here, we explore the deformability and morphology of circulating RBC in populations living in a malaria-endemic area.

Materials and methods: experiments were embedded in an integrated study driven by Institut de Recherche pour le Développement, which aims at the identification of genetic, epidemiologic and anthropologic determinants of susceptibility to malaria. IRB approval was obtained from Institut des Sciences Biomédicales Appliquées, Benin. Clinical and biological data were collected at the beginning of the rainy season from 627 individuals, belonging to 4 different ethnic groups living in sympatry in Atakora, North Benin and included age, gender, ethnicity, body temperature, presence and grade of splenomegaly, rapid diagnostic test for malaria (RDT), thick film and rapid hemoglobin determination with HemoCue®. Venous blood was collected for determination of RBC morphology and deformability. Using microspherultration, a RBC filtering method that uses microsphere layers to mimic the mechanical retention of RBC in the splenic red pulp (Deplaine Blood 2011) we quantified the ability of a mix of labeled and non-labeled RBCs to squeeze between calibrated slits, results being expressed as retention or enrichment rates (RER) of subject's RBC compared to normal RBC (from a single French O-positive donor) stored in blood bank conditions. Microspherultration has been adapted to high-throughput experimentation using microplates (Duez AAC 2015). Experiments were performed in a

field laboratory established on site; microplates were prepared in Paris and brought to North Benin in luggage with constant care to avoid shocks during transportation. All RBC samples were filtered in triplicate less than 8 hours after blood collection. Up- and downstream samples were brought back to France at 4°C in sealed micro-well plates and analyzed for individual RER calculation in the next 2 weeks by flow cytometry.

Results: over 10 days, 262 adults and 249 children were included, 31% Bariba, 17% Gando (genetically related to Bariba), 24% Otamari, 27% Peulhs. Prevalences of splenomegaly, positive RDT, and fever were 13%, 27%, and 2%, respectively. Of 629 blood samples collected, 511 could be analyzed. RER of controls remained stable with time and across 17 microfiltering plates, with a median (IQR) retention rate of 12% (5% - 21%). Ethnicity and age were the only two factors associated with statistically significant differences in RER (figures 1 and 2). Infants (less than 2 year-old) had a more important enrichment than older children and adults (median in 2 years old or less 287%; 3 to 5 years 103%; 6 to 10 years: 64%; more than ten years: 91%; $p=0.0161$). Peulhs and Otamari also had higher median enrichment rates than Bariba and Gando (RER: 122% and 118%, 75%, 64%, respectively; $p=0.0246$). Conversely, splenomegaly, gender, positivity of RDT or anemia at the time of sampling were not associated with RER.

Discussion: higher averaged enrichment rates in specific ethnic subgroups, namely Peulhs and Otamari, likely result from a more stringent splenic retention, leaving more deformable RBC in circulation. An innate spleen-RBC interaction process was also observed in infants, which is consistent with the higher incidence of severe malarial anemia and splenomegaly observed in this population (Reyburn JAMA 2005; Price Am J Trop Med Hyg 2001). Our results show that innate factors (e.g. ethnicity and age) tend to influence the deformability of RBC, and therefore the phenotypic expression of malaria in Africa. Ongoing experiments aim at deciphering the mechanisms responsible for these differences.

B. Communication affichée présentée au 66ème congrès de l'American Society of Tropical Medicine and Hygiene en novembre 2017 à Baltimore

Abstract:

17/08/2017 cOASIS, The Online Abstract Submission System



[Print this Page for Your Records](#) [Close Window](#)

Control/Tracking Number: 17-LB-4411-ASTMH
Activity: Late Breaker Abstract
Current Date/Time: 8/16/2017 7:12:17 PM

Exploration of interethnic susceptibility to malaria in Benin.

Author Block: Benoît Henry¹, Camille Roussel², Papa Alioune Ndour³, Bineta Mbengue⁴, Solène Albert⁴, Juliette Duboin², Mario Carucci², Julien Duez², Aurélie Fricot², Florentin Aussenac⁵, Hijaire Akpovi⁵, Jérôme Clain⁴, David Courtin⁴, André Garcia⁴, Audrey Sabbagh⁴, Pierre Buffet³

¹Institut National de la Transfusion Sanguine, UMR1134, Necker-Pasteur Center for Infectious Diseases and Tropical Medicine, Paris, France, ²Institut National de la Transfusion Sanguine, UMR1134, Paris, France, ³Institut National de la Transfusion Sanguine, UMR1134, Université Sorbonne-Paris-Cité, Paris, France, ⁴Institut de Recherche pour le Développement, UMR216, MERIT, Université Sorbonne-Paris-Cité, Université Paris Descartes, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Paris, France, ⁵Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance, Cotonou, Benin

Abstract:

Age and ethnicity are important determinants of malaria presentation, as are heterogeneity of antibody (Ab) responses and possibly variations in the splenic sensing of red blood cells (RBC). Here we explored the deformability, morphology of RBC and the Ab responses against *Plasmodium falciparum* in malaria-exposed individuals. Experiments were embedded in an integrated study which aims at identifying the determinants of interethnic malaria susceptibility in Benin. In 627 individuals of 4 sympatric ethnic groups, we collected age, gender, ethnicity, temperature, spleen size, malaria RDT and hemoglobin count. Using microspheres, a method that uses microspheres layers to mimic the mechanical retention of RBC in the spleen, we quantified the ability of a mix of labeled and non-labeled RBC to squeeze between calibrated slits, results being expressed as retention or enrichment rates (RER) of subject's RBC compared to normal RBC. RBC Morphology was determined through imaging flow cytometry. Ab responses against the CSP and GLURP proteins of *P. falciparum* were quantified through ELISA. We included 262 adults and 249 children: 31% Bariba, 17% Gando, 24% Otamari, 27% Fulani. Prevalences of splenomegaly, positive RDT, and fever were 13%, 27%, and 2%, respectively. In deformability assays, ethnicity and age were the only factors associated with significant differences in RER: infants had a more important enrichment than older children & adults ($p=0.0161$). Fulani and Otamari also had higher median enrichment rates than Bariba & Gando ($p=0.0246$). Analysis of RBC morphology showed no striking differences among ethnic or age groups. ELISA revealed higher Ab rates in adults than in children (CSP: $p<2*10^{-16}$, GLURP: $p=1.25*10^{-8}$), and also higher in Fulani compared to other ethnic groups (CSP: $p=1.04*10^{-4}$; GLURP: $p=3.75*10^{-5}$). An innate spleen-RBC interaction in some groups (infants, Fulani) could result in more stringent splenic retention, leaving more deformable RBC in circulation, and influencing malarial infection pattern. Ongoing experiments on Ab responses, B cells and RBC aim at deciphering the underlying mechanisms.

Category (Complete): Basic Science/Molecular Biology - Malaria
Presentation Preference (Complete): Oral
Keyword (Complete): Malaria ; Ethnicity ; Red blood cell phenotyping
Disclosures (Complete):
Response : Relationship does not affect presentation content.
Please Select: confirm
Response: confirm

C. Communication orale présentée au 67ème congrès de l'American Society of Tropical Medicine and Hygiene en octobre 2018 à New Orleans

Abstract:

78

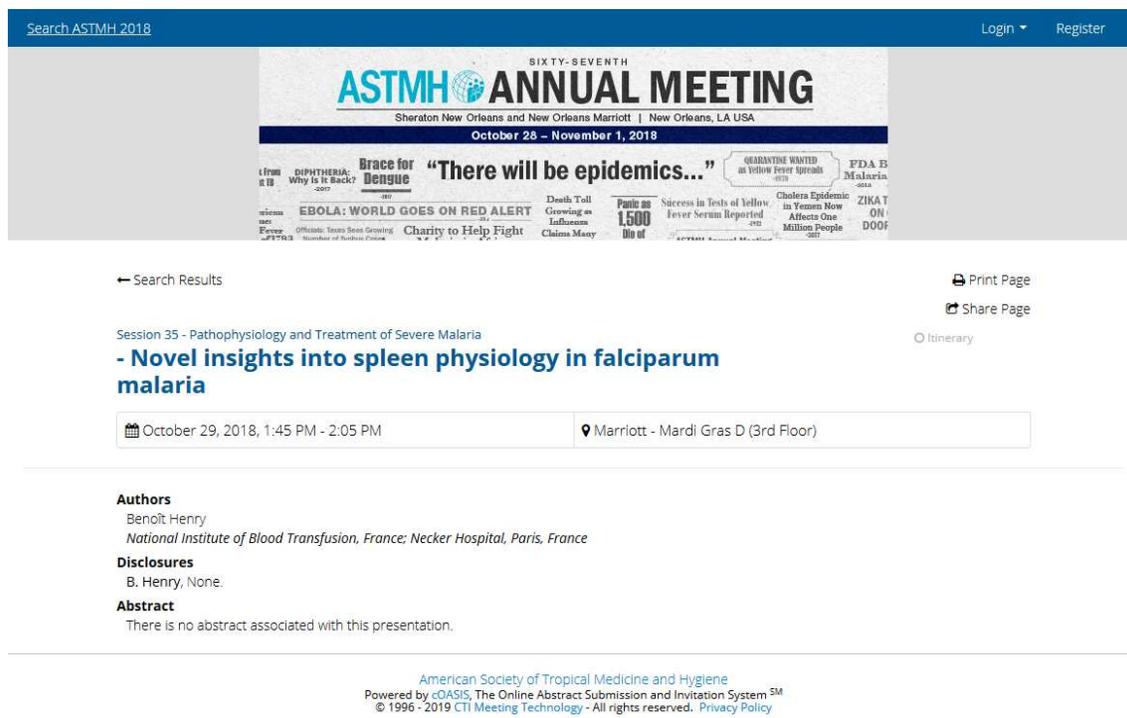
ETHNICITY-RELATED MALARIAL SPLENOMEGALY: THE HYPER-REACTIVE RED CELL FILTRATION TRAIL

Benoît Henry¹, Hilaire Akpovi², Camille Roussel³, Papa Alioune Ndour⁴, Aurélie Fricot³, Mathilde Garré⁵, Julien Solinc³, Geoffroy Volle³, Charlotte Chambrion³, Nadine Fievet⁶, Jérôme Clain⁵, David Courtin⁵, André Garcia⁶, Audrey Sabbagh⁵, Pierre A. Buffet⁴

¹Institut National de la Transfusion Sanguine, UMR1134, and Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur, Paris, France, ²Centre d'Etude et de Recherches sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance, Cotonou, Benin, ³Institut National de la Transfusion Sanguine, UMR1134, Paris, France, ⁴Institut National de la Transfusion Sanguine, UMR1134, and Université Paris Descartes, Paris, France, ⁵Institut de Recherche pour le Développement, UMR216, Mère et Enfant face aux Infections Tropicales, Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France, ⁶Institut de Recherche pour le Développement, UMR216, Mère et Enfant face aux Infections Tropicales, Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, and CERPAGE, Paris, France

Fulani subjects are partially protected against clinical malaria, have lower parasitemia but more frequent splenomegaly and anemia, as well as elevated levels of both total IgM and anti-*Plasmodium* antibodies. The triggering mechanisms of this phenotype are poorly understood. This collaborative study explored the genetic, parasitological and behavioral determinants of ethnicity-related malarial splenomegaly. In December, 2017, 482 subjects, living in Northwestern Benin, and belonging to 4 ethnic groups (Fulani, Gando, Bariba, and Otamari) were included. We captured age, gender, ethnicity, temperature, spleen size, malaria rapid diagnostic test (RDT), and rapid haemoglobin determination (Hemocue®). Red blood cells (RBC) from venous blood were analyzed using microspherulometry, a method assessing the ability of RBC to squeeze through narrow spaces between microspheres, as a proxy for their splenic filtration. RBC deformability was also assessed with ektacytometry. In a subgroup, (n=120) the deformability of RBC infected *in vitro* with *Plasmodium falciparum* was also assessed by microspherulometry, as well as parasite growth over 72 hours. As expected, Fulani were more often splenomegalic than subjects from the other groups (41% v 23%, p=0.0003) with a trend towards more frequent anemia. Microspherulometry showed that, compared to other groups, Fulani had more deformable RBC in circulation (p<0.0001). This difference was greater in subjects with a positive RDT. Ektacytometry at high shear stress (30 pascals) also showed an increased deformability of RBC in Fulani (p=0.0057). *In vitro*, the deformability of RBC after infection with *P. falciparum* and parasite growth were similar across the different ethnic groups. We establish a new link between ethnicity and the deformability of circulating RBC. Our results suggest that, in Fulani, splenic filtration of RBC becomes more stringent upon infection with *P. falciparum*, which may explain anemia, splenomegaly and the partial control of parasitemia. Upcoming work will search for determinants of this peculiar, apparently innate splenic reactivity to plasmodial infection in Fulani.

D. Communication orale présentée en symposium au 67ème congrès de l'American Society of Tropical Medicine and Hygiene en octobre 2018 à New Orleans



The screenshot shows the website for the 67th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) held in New Orleans, LA, USA, from October 28 to November 1, 2018. The page displays search results for a presentation in Session 35, 'Pathophysiology and Treatment of Severe Malaria'. The presentation title is '- Novel insights into spleen physiology in falciparum malaria', scheduled for October 29, 2018, from 1:45 PM to 2:05 PM at the Marriott - Mardi Gras D (3rd Floor). The author is Benoît Henry, from the National Institute of Blood Transfusion, France. The page also includes sections for disclosures (none) and abstracts (none associated).

Search Results

Print Page
Share Page
Itinerary

Session 35 - Pathophysiology and Treatment of Severe Malaria
- Novel insights into spleen physiology in falciparum malaria

October 29, 2018, 1:45 PM - 2:05 PM
Marriott - Mardi Gras D (3rd Floor)

Authors
Benoît Henry
National Institute of Blood Transfusion, France; Necker Hospital, Paris, France

Disclosures
B. Henry, None.

Abstract
There is no abstract associated with this presentation.

American Society of Tropical Medicine and Hygiene
Powered by cOASIS, The Online Abstract Submission and Invitation SystemSM
© 1996 - 2019 CTI Meeting Technology - All rights reserved. Privacy Policy

II. Publication en rapport avec une partie du travail de thèse :

Duez J, Carucci M *et al.* Nature Protocols 2018

Mon rôle dans ce travail fut la genèse de la figure supplémentaire 6 et des données correspondantes, à partir des expériences ayant permis de valider la microfiltration différée après conservation des GR en SAGM.

High-throughput microspherofiltration to assess red blood cell deformability and screen for malaria transmission-blocking drugs

Julien Duez^{1–3}, Mario Carucci^{1–3}, Irene Garcia-Barbazan¹, Matias Corral¹, Oscar Perez¹, Jesus Luis Presa¹, Benoit Henry², Camille Roussel², Papa Alioune Ndour², Noemi Bahamontes Rosa¹, Laura Sanz¹, Francisco-Javier Gamo^{1,4} & Pierre Buffet^{1,4}

¹Diseases of the Developing World (DDW), GlaxoSmithKline, Tres Cantos, Spain. ²Institut National de la Transfusion Sanguine, UMR_S 1134, Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, France. ³These authors contributed equally to this work. ⁴These authors jointly directed this work. Correspondence should be addressed to P.B. (pabuffet@gmail.com).

Published online 24 May 2018; doi:10.1038/nprot.2018.035

The mechanical retention of rigid erythrocytes in the spleen is central in major hematological diseases such as hereditary spherocytosis, sickle-cell disease and malaria. Here, we describe the use of microspherofiltration (microsphere filtration) to assess erythrocyte deformability in hundreds to thousands of samples in parallel, by filtering them through microsphere layers in 384-well plates adapted for the discovery of compounds that stiffen *Plasmodium falciparum* gametocytes, with the aim of interrupting malaria transmission. Compound-exposed gametocytes are loaded into microspherofiltration plates, filtered and then transferred to imaging plates for analysis. High-content imaging detects viable gametocytes upstream and downstream from filters and quantifies spleen-like retention. This screening assay takes 3–4 d. Unlike currently available methods used to assess red blood cell (RBC) deformability, microspherofiltration enables high-throughput pharmacological screening (tens of thousands of compounds tested in a matter of months) and involves a cell mechanical challenge that induces a physiologically relevant dumbbell-shape deformation. It therefore directly assesses the ability of RBCs to cross inter-endothelial splenic slits *in vivo*. This protocol has potential applications in quality control for transfusion and in determination of phenotypic markers of erythrocytes in hematological diseases.

INTRODUCTION

In humans, appropriate oxygenation of tissues requires that RBCs be deformable enough to circulate in small capillaries. The spleen contributes to this vital physiological process by removing altered RBCs from the circulation¹. Multiple disorders are associated with decreased deformability of erythrocytes, including sickle cell disease², hereditary spherocytosis³, thalassemia⁴, sepsis⁵, diabetes⁶, burns⁷ and malaria⁸, among others. Microspherofiltration is the one-word contraction for ‘microsphere filtration’, a methodology published in 2011 (refs. 9,10). Its physiological relevance in assessing erythrocyte deformability results from the geometrical similarity between the narrow spaces that separate microspheres and the narrow slits in the human spleen¹¹. Microsphere-based filters and human spleens perfused *ex vivo*¹² retain poorly deformable RBCs at similar rates¹⁰. Since its invention, microspherofiltration has also been used to explore potential links between RBC biomechanics and mechanisms of human infection with *P. falciparum* malaria^{13–19}, including the transmission of parasite sexual stages^{13–16} (gametocytes) to mosquitoes and the protection conferred by the sickle cell trait against severe malaria²⁰. Microspherofiltration has been used to determine splenic retention thresholds of parasitized erythrocytes^{10,13,14}. Sophisticated methods of assessing erythrocyte deformability, such as those involving micropipettes²¹, optical tweezers²², ektacytometry²³ and microfluidics^{24–26}, are very informative but have low sample throughput²⁷. Although this was also a limitation of microspherofiltration in its initial format^{9,10}, a prototype using 96-well microplates that enables simultaneous analysis of dozens of samples was published in 2015 (ref. 28). The use of these microspherofiltration microplates has been reported

at least twice since then^{15,29}. We propose an optimized protocol with increased sample throughput and enhanced result specificity using 384-well microspherofiltration microplates coupled to dual, morpho-metabolic imaging readouts, enabling the screening of large academic and industrial chemical collections. This technical shift opens the way to high-throughput screening (HTS) for the discovery of cell deformability modulators of therapeutic interest and to several other important applications, such as centralized quality control in transfusion centers; hospital-based diagnostic, population-based field studies; and determination of personalized phenotypic markers of erythrocytes^{1,29–31}.

Comparison with other methods

Microspherofiltration is a dynamic method enabling the analysis of homogeneous cell populations (such as RBC concentrates) or specific cell subsets in a mixture of different RBC populations (e.g., RBCs infected with *P. falciparum*). Quantification of RBC subpopulations of interest upstream and downstream of filters is performed by flow cytometry or bright-field or fluorescence microscopy. Microspherofiltration differs from membrane filtration in the geometry and relevance of the filtering gaps, which directly impact the deformation pattern displayed by filtered cells (generally, filtered cells with a cylindrical shape are observed with membrane filters and dumbbell-shaped filtered cells are observed with spleen-like microsphere filters). Micropipette aspiration²¹, optical tweezers²² or ektacytometry²³ generally measure RBC elongation or elasticity, and sometimes requires complex algorithms to analyze results. By contrast, microspherofiltration simply

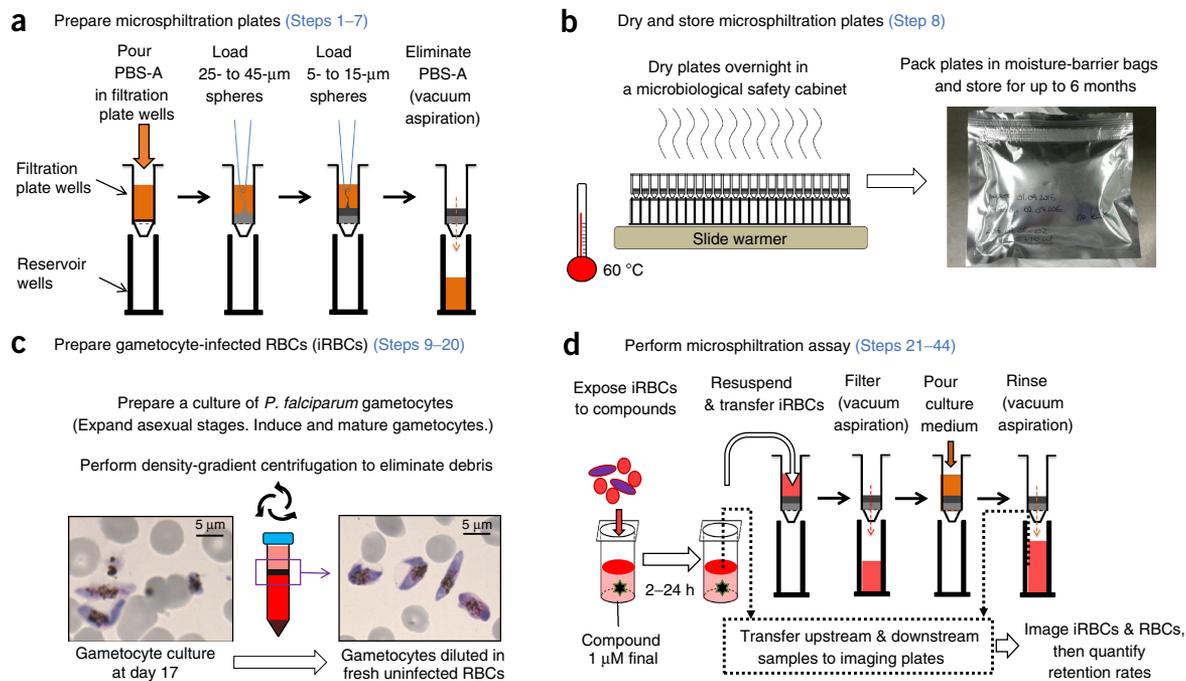


Figure 1 | Schematic overview of the microsphiltration assay. (a,b) Calibrated microspheres are automatically loaded into 384-well frits-bottom filtration plates (a), and the resulting microsphiltration plates are then processed for storage and deferred use (b). (c,d) Mature *Plasmodium falciparum* gametocytes are produced *in vitro* and concentrated in fresh red blood cells (RBCs) (c) to further run the high-throughput microsphiltration screening assay (d). iRBC, gametocyte-infected red blood cell.

quantifies a retention rate as a direct surrogate for cell ability to cross inter-endothelial splenic slits¹⁰. Recently, using microfluidic chips, studies have mimicked the splenic retention of RBCs^{24–26}. However, current methods to assess cell deformability, including microfluidic technology, do not enable the analysis of more than a few cell samples per experiment and have not been amenable to high-throughput screening. Microsphiltration is relevant to exploring the ability of cell types to stay in circulation despite exposure to splenic mechanical filtration. By shifting from hand-made filtering tips¹⁰ to 96- or 384-well microplates—into which microspheres are deposited by an automated dispenser—we have optimized the robustness and cost-effectiveness to meet the constraints of high-throughput pharmacological screening.

Limitations

Gametocyte production *in vitro* is time- and resource-consuming and requires training³². Experience in laboratory automation is required to implement microsphiltration with a very high number of samples (Experimental design).

Applications and potential extensions of the method

Microsphiltration screening can potentially be used to identify compounds inducing the retention of circulating asexual stages of *P. falciparum* (ring stage; **Supplementary Fig. 1**) and can also be easily adapted to quantify the deformability of different circulating cell types. High-throughput capability is essential to observing small phenotypic differences in large populations of healthy subjects or patients, in order to better understand the biology of specific cell subpopulations and develop adapted therapeutical research. Thus, microplate microsphiltration potentially offers

new pharmaceutical and therapeutical perspectives in regard to an interesting panel of disease states that involve abnormal cell deformability phenotypes. It has been used to study the impact of the sickle-cell trait on the course of malaria²⁰. Microsphiltration may also offer new immediate applications in the field of transfusion, especially for improving current processes used to store RBCs in blood centers, by enabling the simultaneous study of large blood collections during the first hours after blood draw. Using microplate microsphiltration for high-throughput probing of RBC units may also provide a new quality control to predict their transfusion yield, as morphological alterations related to deformability defects have recently been uncovered³¹. Adaptation of the method to discover new classes of anticancer agents is conceivable because circulating cancer cells—especially stem-cell-like cancer cells—must be deformable in order to leave the primary tumor site, circulate and form distant metastatic lesions^{33–35}. Furthermore, microplate microsphiltration may facilitate investigations focusing on leukocytes, as their deformability is reduced in patients with trauma, sepsis or inflammatory diseases, negatively affecting the rheological properties of whole blood^{36,37}.

Experimental design

Overview of the procedure. Microsphere-based filters in 384-well microplates are made of two superimposed layers of 25- to 45- and 5- to 15-µm microspheres. Microspheres are loaded in suspension in an aqueous medium (microsphere suspension medium) using an automated dispenser (Fig. 1a; Steps 1–7). Microsphere-loaded plates are dried overnight on a slide warmer in a compartment ventilated with dry airflow, then packed in bags conditioned for storage, transport and deferred use²⁸

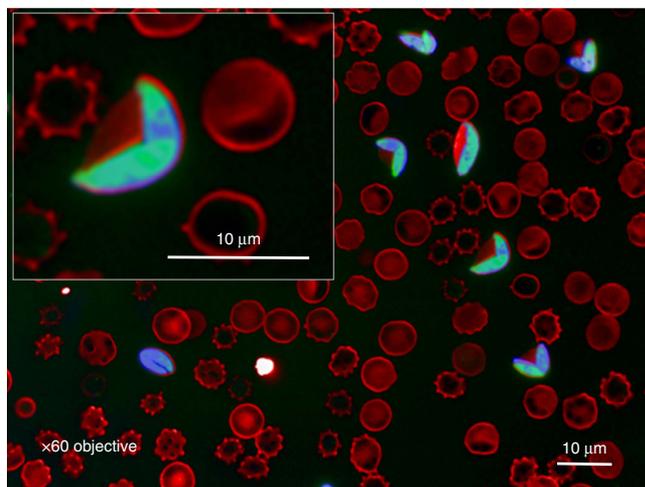


Figure 2 | High-content imaging to count gametocyte-infected RBCs before and after microfiltration, and to quantify retention rates. The image was generated using the $\times 60$ objective of an Opera high-resolution disc imager. RBC membranes were stained with CellMask Orange. Gametocytes were discriminated from RBCs based on DNA staining with Syto 40 Blue (green color) and mitochondrion staining with Mitotracker Deep Red FM (blue color). Inset—magnification of one gametocyte-infected RBC.

(Fig. 1b; Step 8). For the screening application described here, *P. falciparum* NF54 sexual transmission stages (mature gametocytes) are produced as described³⁸. Mature gametocytes are then concentrated (using density-gradient centrifugation (Nycoprep)) at a final 3–5% gametocytemia level in fresh, uninfected RBCs (Fig. 1c; Steps 9–20). Forty-five microliters of gametocyte suspension at hematocrit 0.5% is transferred to a 384-well plate, where it is exposed to pharmacological compounds for 2 or 24 h (Fig. 1d, Steps 21–24). Using an automated dispenser, compound-exposed gametocytes are resuspended and transferred as 25- μ l samples to pre-humidified microfiltration plates (Steps 26–33) to undergo filtration (Steps 36–38). The filtered samples (Ds = downstream from filters) and their respective controls (Up = upstream from filters; unfiltered gametocyte populations remaining in compound plates) are then automatically transferred (~35,000 cells per well) to separate imaging plates prefilled with 30 μ l of staining solution (Steps 25, 34, 35 and 39–40). After overnight incubation at 24 °C, the stained gametocyte-infected RBC samples form monolayers that are imaged using a high-resolution spinning disc confocal microscope (Opera; Fig. 2 and Supplementary Fig. 2, Steps 41–44). Comparison of imaged samples upstream and downstream of filters enables specific quantification of gametocyte retention rates independently of killing.

Automated sample handling. Although manual loading of microspheres and handling of samples during microfiltration can be performed by well-trained personnel, in the assay described here, Biomek NX^P liquid handlers equipped with 384-channel pipetting heads and vacuum-filtration devices are used to maximize reproducibility of both microsphere-layer loading into frits-bottom filtration plates and gametocyte microfiltration. To maximize the assay throughput and comply with the functional compartmentalization of our laboratory, two Biomek NX^P dispensers plus two Biomek vacuum-filtration devices were

TABLE 1 | Automated microfiltration plate preparation sequence using a Biomek NX^P dispenser.

Setting	Dispenser function and direction	Handling parameters
Step 4 (pre-fill with PBS-A)	Transfer: PBS-A reservoir → bottom-filter plate	<ul style="list-style-type: none"> Asp-disp speed: 90 μl/s Volume: 60 μl
Step 5 (transfer 25- to 45- μ m spheres)	Transfer: spheres reservoir → bottom-filter plate	<ul style="list-style-type: none"> Asp speed: 10 μl/s Disp. speed: 90 μl/s Volume: 15 μl
Tip wash	Mix: tip wash reservoirs (H ₂ O)	<ul style="list-style-type: none"> Asp-disp speed: 90 μl/s Repetition: 5\times
Step 6 (transfer 5- to 15- μ m spheres)	Transfer: spheres reservoir → bottom-filter plate	<ul style="list-style-type: none"> Asp speed: 10 μl/s Disp. speed: 90 μl/s Volume: 12 μl
Tip wash	Mix: tip wash reservoirs (H ₂ O)	<ul style="list-style-type: none"> Asp-disp speed: 75 μl/s Repetition: 5\times

Asp, aspirate; Disp, dispense.

used to prepare microfiltration plates and run microfiltration in an independent manner. Important parameters for automated handling steps involved in this protocol are summarized in Tables 1 and 2.

Optimization. This protocol describes an updated version of our previously published 96-well plate microfiltration assay²⁸, streamlined to increase its throughput and selectivity. A dispenser-assisted method has been developed to prepare 384-well microfiltration plates, opening the way to the screening of large chemical collections.

In the former version of the assay, the retention of mature gametocytes was quantified from imaged monolayers of elongated GFP-expressing gametocytes within a RBC population stained with CellMask Orange²⁸. However, a proportion of gametocytes killed by a pharmacological agent can still remain elongated and crescent shaped, excluding morphology as a reliable criterion for assessing gametocyte viability. From a screening perspective, this implies that the hits selected with the previous assay readout had to be subsequently tested in an orthogonal assay in order to exclude false positives characterized by gametocytocidal activity, which can substantially affect retention rates. Here, the nucleic acid stain Syto 40 Blue and the mitochondrial probe Mitotracker Deep Red FM³⁹ are used in combination to quantify the percentage of elongated, crescent-shaped gametocytes with preserved mitochondrial potential within RBCs stained with CellMask Orange. Thus, the gametocytocidal activity of compounds (referred as killing) and splenomimetic retention rates are measured in the same filtration experiment. Killing is determined by comparing the proportion of viable gametocytes (upstream of the filters) in compound versus control wells. Retention is measured by comparing the proportion of viable gametocytes upstream and downstream of the filters.

TABLE 2 | Automated microsphere filtration assay implementation sequence using a Biomek NX^P dispenser.

Setting	Dispenser function and direction	Handling parameters
Step 27 (rehumidify microsphere filtration plate)	Transfer: culture medium reservoir → microsphere filtration plate	<ul style="list-style-type: none"> • Asp speed: 90 μl/s • Disp. speed: 50 μl/s • Volume: 50 μl
Step 29 (pre-fill sterile reservoir plate with PBS-A)	Transfer: culture medium reservoir → reservoir plate	<ul style="list-style-type: none"> • Asp speed: 90 μl/s • Disp. speed: 50 μl/s • Volume: 25 μl
Step 31 (prefill microsphere filtration plate with culture medium)	Transfer: culture medium reservoir → microsphere filtration plate	<ul style="list-style-type: none"> • Asp speed: 90 μl/s • Disp. speed: 50 μl/s • Volume: 25 μl
Step 32 (resuspend compound-exposed gametocytes)	Mix: gametocyte-compound plate	<ul style="list-style-type: none"> • Asp-disp speed: 90 μl/s • Volume: 20 μl • Repetition: 1× for each well quadrant and the well center • Distance tips—RBC layer: 1 mm
Step 33 (transfer gametocytes to microsphere filtration plate)	Transfer: gametocyte-compound plate → microsphere filtration plate	<ul style="list-style-type: none"> • Asp speed: 90 μl/s • Disp. speed: 50 μl/s • Volume: 25 μl
Tip wash	Mix: tip wash reservoirs (H ₂ O)	<ul style="list-style-type: none"> • Asp-disp speed: 75 μl/s • Repetition: 5×
Step 34 (dilute upstream gametocyte sample)	Transfer and mix: culture medium reservoir → gametocyte-compound plate	<ul style="list-style-type: none"> • Asp speed: 90 μl/s • Disp. speed: 50 μl/s • Volume: 80 μl • Mix repetition: 3× (20 μl)
Step 35 (transfer upstream gametocytes to upstream imaging plate)	Transfer and mix: gametocyte-compound plate → upstream imaging plate	<ul style="list-style-type: none"> • Asp speed: 25 μl/s • Disp speed: 10 μl/s • Volume: 12.5 μl • Mix repetition: 3× (15 μl)
Tip wash	Mix: tip wash reservoirs (H ₂ O)	<ul style="list-style-type: none"> • Asp-disp speed: 75 μl/s • Repetition: 5×
Step 38 (rinse microsphere filtration plate)	Transfer: culture medium reservoir → microsphere filtration plate	<ul style="list-style-type: none"> • Asp speed: 90 μl/s • Disp. speed: 50 μl/s • Volume: 80 μl
Step 39 (transfer downstream gametocytes to downstream imaging plate)	Transfer and mix: reservoir plate → downstream imaging plate	<ul style="list-style-type: none"> • Asp speed: 25 μl/s • Disp speed: 10 μl/s • Volume: 12.5 μl • Mix repetition: 3× (15 μl)

Asp, aspirate; Disp, dispense.

In addition, a storage process was developed to enable the shipment and deferred use of microsphere filtration plates, which should facilitate the diffusion of the method.

Assay controls. A set of RBC controls (Fig. 3) have been defined to calibrate and monitor the performances of the microsphere filtration assay. For calibration, heat-stiffened²⁸ or glutaraldehyde-fixed RBCs⁴⁰ should be retained at >85% in microsphere-based filters. Normal RBCs used to dilute glutaraldehyde- or heat-stiffened RBCs provide a negative control, the retention of which should be <10%. RBCs hosting asexual stages of *P. falciparum* are also routinely used as a positive control, as their retention gradually increases with their progression through the parasite cycle^{10,28}. Moreover, their use speeds up the optimization process, as their culture is faster and easier than that of gametocytes.

To monitor the performance of filtration during screening, mature gametocytes exposed to 50 nM calyculin A²⁸ 5 μM and cipargamin (NITD609, KAE609)⁴¹ are used as positive retention controls to define the hit retention threshold and the highest retention rate of the assay, respectively. Calyculin A specifically stiffens mature gametocytes independently of killing^{16,28}. Assessing killing activities involves the use of 50 μM Gentian Violet³⁸ as positive control. Finally, mature gametocytes exposed to 0.05% (vol/vol) DMSO are used as a negative control to normalize both retention and killing values.

Parameters affecting the setup of the microsphere filtration assay.

The following experimental parameters that affect the outcome of microsphere filtration should be considered when preparing microsphere filtration plates, as described further below: (i) the properties of the microplate bottom filter mesh/frits, the thickness of the microsphere layers and the distribution of the microsphere sizes in a commercial batch, (ii) the composition of the suspension medium for RBCs and gametocytes and the synchronicity of the parasite culture, (iii) the amount of rigid RBCs to filter, as determined by saturation limits. A successful and reproducible setup for the assay requires a series of preliminary tests to finely calibrate these parameters due to differences observed from one microsphere batch to another, as well as to variations in serum and RBC sources.

(i) *Bottom filter mesh, microsphere layer thickness and microsphere size distribution.* Microsphere layers form a network of narrow channels corresponding to intersphere spaces of uneven widths and lengths. The narrowest spaces, created when two or three of the smallest (5-μm) microspheres are adjacent, are ~2 μm wide and 2 μm long. These impose a deformability challenge on RBCs flowing through that is reminiscent of the challenge induced by inter-endothelial slits in the human spleen. Because microsphere layers contain a mixture of microsphere sizes, the width of the intersphere spaces is predicted to fluctuate between 1.85 and 5.67, and 9.25 and 16.7 μm, for the 5- to 15-μm and the 25- to 45-μm microsphere layers, respectively. Thus, the 25- to 45-μm microsphere layer does not contribute to the mechanical retention of RBCs, as its smallest intersphere spaces are larger than the diameter of a RBC (RBC diameter ~6–9 μm). This 25- to 45-μm microsphere layer is necessary to prevent the smaller 5- to 15-μm microspheres from leaking across the microplate bottom frits (the pore size of which is 20 μm). Frits-bottom filtration plates used for microsphere filtration have been selected based on their frit pore size (>15 and <25 μm) and stability

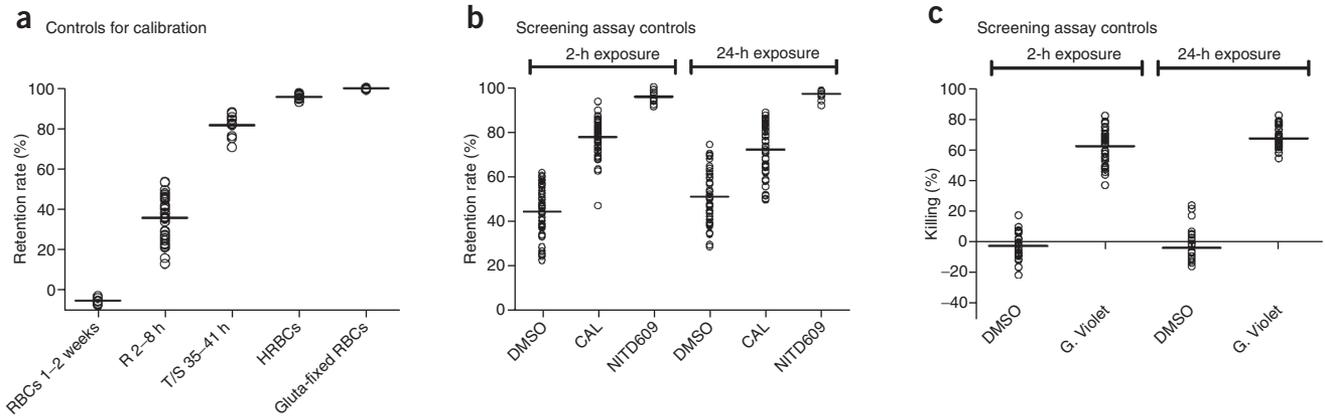


Figure 3 | Controls. (a) Retention rates of control RBC populations used to calibrate the performances of microsphere-based filters. Retention rates from two independent experiments in which CFSE-stained uninfected RBCs (HRBCs and Gluta-fixed RBCs lanes) or Sybr Green-stained *P. falciparum*-infected RBCs (R 2-8 h and T/S 35-41 h lanes) were quantified using flow cytometry against $\geq 20,000$ events (**Supplementary Figs. 7 and 8**). (b,c) Microspherulation screening assay controls. Retention rates of mature gametocytes (b) exposed during 2 or 24 h to 0.05% (vol/vol) DMSO (DMSO; negative control), 50 nM calyculin A (CAL; positive control for gametocyte stiffening) or 2.5 μ M cipargamin (NITD609; positive control for gametocyte swelling-induced stiffening). (c) Killing rates of mature gametocytes exposed to either 0.05% (vol/vol) DMSO (negative control) or 50 μ M Gentian Violet (G. Violet; positive control) for 2 or 24 h. Gluta-fixed RBCs, glutaraldehyde-fixed, stiff RBCs; HRBCs, heat-stiffened RBCs; RBCs 1-2 weeks, RBCs used to dilute the gametocytes or the uninfected RBCs to test; R 2-8 h, young *P. falciparum* at asexual ring stages; T/S 35-41 h, *P. falciparum* at mature asexual stages (trophozoites and schizonts).

upon exposure to chemicals used to solubilize the pharmacological compounds to be tested. Harvard Apparatus 96-well filter-bottom plates and Seahorse 384-well frits-bottom plates have been selected and validated for use in microspherulation. The thickness and composition of the microsphere layers have been selected by a trial-and-error approach, with retention rates of control RBC populations used as the validation output. Multiple batches of 5- to 15- μ m AmTech microspheres²⁸ or different mixtures of 5- to 15- μ m and 15- to 25- μ m IPS (Industrie des Poudres Sphériques) microspheres^{10,15} in 50:50 to 30:70 proportions have been validated for use in microspherulation. Using the same batch of microspheres across experiments is important for reproducibility of results (**Supplementary Fig. 3**).

(ii) *Composition of the suspension medium for RBCs and synchronicity of the gametocyte culture.* Notably, different retention rates have been measured when using saline buffer or culture medium to resuspend RBC for microspherulation. Using complete culture medium as the suspension medium for gametocyte microspherulation enables the retention bias related to their activation or alteration, induced even by subtle and transient environmental changes, to be minimized. A highly synchronous population of gametocytes (all parasites are at the same stage of maturation) is necessary for the microspherulation assay to perform optimally. The presence of many immature (and rigid) gametocytes may indeed affect the

reproducibility of results¹⁴. Microspherulation delivers optimal results when day 12-14 and day 16-19 mature gametocytes are produced using Avery's⁴² and Delves's³⁸ protocols, respectively.

(iii) *Saturation limits for microsphere filters.* To prevent unspecific clogging of filters, the mature gametocyte culture should be purified before microspherulation. Density-gradient (Nycoprep) centrifugation has been selected as the most efficient method to separate mature gametocytes from cell debris, parasite remnants, pyknotics and spherocytes created by the long culture process. Gametocyte purification is followed by dilution with fresh uninfected RBCs at a 2-5% gametocytemia final concentration, hematocrit = 0.5%. When using microspherulation to study uninfected RBCs, the population of interest should be labeled with PKH¹⁰ or CFSE²⁸ and diluted in unlabeled control RBCs in a proportion of 2-5% of test-labeled RBCs in 95-98% unlabeled control RBCs. Alternatively, control RBCs (still 95-98% of the whole) can be labeled with PKH or CFSE, and the population of interest left unlabeled. This second approach considerably reduces the time needed for labeling (as there is only a single large sample, rather than many small samples, to label) and limits the intervention to the RBC population of interest. Control RBCs used to dilute test RBCs should be kept in preservation medium (such as SAGM (saline, adenine, glucose, mannitol)) for a maximum of 15 d before use for microspherulation.

MATERIALS

REAGENTS

- NF54 *Plasmodium falciparum* strain (BEI Resources, cat. no. MRA-1000) **! CAUTION** To comply with institutional and governmental regulations, *P. falciparum* must be handled in containment at the applicable biosafety level (level 3 in Spain) while using personal protective equipment and approved biological waste disposal. Procedures and reagents for freezing and thawing of asexual parasites are described elsewhere³⁸

- Human serum from human male donors (AB blood group) who did not travel to malaria-endemic areas within the past 2 years and did not use aspirin in the 2 h before drawing (Interstate Blood Bank) **! CAUTION** Serum is screened for the presence of human pathogens. It must be handled in agreement with institutional and governmental regulations while using personal protective equipment and approved biological waste disposal.
- Leukocyte-reduced human RBCs (preferably type O, RhD-positive). In this protocol, we use blood provided by Biobanco of Castilla y León,

Valladolid, Spain. **! CAUTION** Human blood is screened for the presence of human pathogens. It must be handled in agreement with institutional and governmental regulations while using personal protective equipment and approved biological waste disposal. The human biological samples were sourced ethically, and their research use was in accord with the terms of the informed consents.

- RPMI 1640 medium with 25 mM HEPES (without L-Glutamine; Sigma-Aldrich, cat. no. R5886)
- Sodium bicarbonate (HNaCO₃; Merck, cat. no. S5761)
- Hypoxanthine powder (Sigma-Aldrich, cat. no. H9377)
- L-Glutamine (Merck, cat. no. 100289)
- D-(+)-Glucose (Sigma, cat. no. G8270)
- Albumax II (Life Technologies, cat. no. 11021-037)
- PBS (Sigma, cat. no. P4417)
- Ethanol (70% (vol/vol), DAB pure (tested to conform to the product specifications of the Deutsche Artseini Buch), pharma grade; PanReac Appli-Chem, cat. no. A0913-5000) **! CAUTION** Ethanol is a volatile and flammable liquid that must be handled while wearing personal protective equipment in accordance with government regulations.
- Nycoprep 1.077 (axis-shield density-gradient medium; Alere Technologies, cat. no. 1114550)
- D-Sorbitol (Merck, cat. no. S6021)
- Glutaraldehyde solution (Merck, cat. no. G4004) **! CAUTION** Glutaraldehyde is a toxic and strongly irritating liquid that must be handled in accordance with government regulations while using personal protective equipment.
- Giemsa's Azur Eosin Methylene Blue solution (Merck, cat. no. 1092040100) **! CAUTION** This solution is a combustible liquid with high toxicity that must be handled while wearing personal protective equipment in accordance with government regulations.
- Methanol (GPR Rectapur; VWR, cat. no. 20846.361) **! CAUTION** Methanol is flammable and toxic. It must be handled with care and in accordance with governmental regulations while wearing personal protective equipment.
- Syto 40 Blue fluorescent nucleic acid stain (Thermo Fisher Scientific, cat. no. S11351) **▲ CRITICAL** Other nucleic acid stains can be used, such as Sybr Green, but these would require adjustment of the imaging parameters.
- Sybr Green I nucleic acid gel stain (Thermo Fisher Scientific, cat. no. S7567)
- Mitotracker Deep Red FM (Thermo Fisher Scientific, cat. no. M22426)
- CellMask Orange plasma membrane stain (Thermo Fisher Scientific, cat. no. C10045)
- CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific, cat. no. C34554)
- PKH 67 (Merck, cat. no. PKH67GL-1KT)
- Pyrex borosilicate glass tube (Fisher Scientific, cat. no. 10422205)
- DMSO (≥99.5% (vol/vol) Sigma, cat. no. D2650)
- Calyculin A from *Discodermia calyx* (Merck, cat. no. C5552)
- Gentian Violet (MolPort, cat. no. 002-133-551)
- Cipargamin (Angene, CAS no. 1193314-23-6; product no. AG0001MA (AGN-PC-0PD6LA))

EQUIPMENT

- Plastic consumables such as centrifuge tubes, serological pipettes, storage bottles, tips and culture flasks from various suppliers can be used
- Class II microbiological safety cabinet (Telstar, model no. Bio-II-A)
- Allegra X-15R benchtop centrifuge (Beckman Coulter, part no. B09822)
- Eppendorf Safe-Lock microcentrifuge tubes (Merck, cat. no. T9661-1000EA)
- Olympus binocular microscope (Olympus Life Science, model no. CX31)
- Neubauer chamber (Brand, cat. no. 717810)
- Microscope slides (Marienfeld, cat. no. 1000912)
- Microscope slide-staining jar (Ted Pella, cat. no. 432-1)
- Sartorius eLINE multichannel electronic pipettor (Merck, cat. no. Z654663-1EA)
- Slide warmer (LabScientific, model no. XH-2001)
- QB dry block heating system (Grant, model no. QBD2)
- Water bath (Julabo, model no. PURA 10, cat. no. 9550410)
- Heracell 240i CO₂ incubators (Thermo Scientific, cat. no. 51026884)
- Biomek filtration system with vacuum valve unit (Beckman Coulter) including the vacuum filtration manifold base (cat. no. 609670), square well collar (cat. no. 609673) and tubing kit (cat. no. 609676)
- Electric vacuum pump (220 V/50 Hz; Millipore, cat. no. WP6122050)
- Filtration unit (e.g., Millex, cat. no. SLFA05000)
- Vacuum gauge kit (Millipore, cat. no. MSVMHTS07)

- Moisture barrier bags (Protective Packaging, ref. no. PP005 JUMBO - 7444 LAB JW ID20x30 cm)
- 50-g Silica gel sachets (Protective Packaging, ref. no. PPSILGE25D - defence standard 25g silica-gel 400/box)
- Lab scale balance (Mettler Toledo, model no. PJ3600)
- HP digital dispenser (HP, model no. D300e)
- HP D4 dispense-head cassettes (HP, cat. no. B3F33A)
- Biomek NX liquid-handling lab automation workstation (Beckman Coulter, cat. no. 989402) **▲ CRITICAL** This dispenser requires a laboratory air-supply system. Alternative dispenser systems can be purchased from other equipment providers. **▲ CRITICAL** The Biomek dispenser series has been selected to prepare microsphere plates in different international laboratories²⁸, but other dispensers of equivalent hydraulic power and functionalities can be used, as for instance, those of the Freedom EVO series (Tecan)¹⁵.
- Biomek AP384 P30 tips (Beckman Coulter, cat. no. 719222)
- Robotic reservoirs (Nalgene; Thermo Scientific, cat. no. 1200-1300)
- 3 M Breath-protecting mask FFP3 (Lab Unlimited, cat. no. 4AJ-6269582)
- Stericup-GP (0.22 µm, 500 ml; Merck-Millipore, cat. no. SCGPU05RE)
- Test tube rotator (Labinc, model no. LD79)
- 25–45 µl (type 3 solder powder-Sn96.5/Ag3.0/Cu0.5, Inventec Performance Chemicals, AmTech, cat. no. 9030) or (IPS, ref. SAC305-3T-25/45-D73TN)
- 5- to 15-µl, type 6 solder powder Sn96.5/Ag3.0/Cu0.5 (Inventec Performance Chemicals; AmTech, cat. no. 9060) or (IPS, ref. nos. SAC305-6A-5/15-D76AU and SAC305-5A-15/25-D75AU) **! CAUTION** Microspheres are irritating and must be handled while wearing appropriate personal protective equipment, including breath-protecting mask and disposed of in an approved waste disposal system. **▲ CRITICAL** Microspheres can be purchased from alternative providers.
- 384-Well frits-bottom filtration plates (Seahorse Biosciences, cat. no. SEA201035100)
- Eppendorf polypropylene conical-bottom 384 deep-well plates (Fisher Scientific, cat. no. 10581874)
- Electrical hair dryer (1,750 W; UFESA, model no. SC8380)
- Soldering iron (230 V, 40 W; Screwfix, cat. no. 40326) **! CAUTION** Soldering irons are harmful upon contact with skin. Handle it with care and following approval from laboratory institution.
- Gas-permeable seal Air-O-Seal (4titude, cat. no. 4ti-0517)
- 384-Well clear polystyrene microplates (Greiner Bio-One, cat. no. 781101)
- Opera Phenix high-content screening system (PerkinElmer, cat. no. HH14000000)
- Collagen-coated Cellcarrier-384 ultra microplates (PerkinElmer, cat. no. 6057708)
- Clear adhesive seal for microplates (PerkinElmer, cat. no. 6050185)
- Greiner microplate lid (Merck, cat. no. L3411-100EA)

REAGENT SETUP

▲ CRITICAL Sterility of culture reagents should be preserved by working in a class II microbiological safety cabinet or ensured by filtration with a 0.2-µm filter Stericup.

Preparation of suspension medium for microspheres Allow 10 g of Albumax II powder to dissolve over 2 h in 1 liter of sterile 1× PBS, using stir-bar agitation at a temperature <40 °C (to avoid Albumax polymerization). Filter-sterilize using a 0.2-µm filter Stericup and store as 500-ml bottles at 4 °C up to 8 weeks.

Preparation of incomplete gametocyte culture medium Five-liter batches of incomplete gametocyte culture medium are routinely prepared at a time for subsequent division into convenient 500-ml bottles, storable for up to 6 months at 4 °C. For that purpose, dissolve 250 mg of hypoxanthine in 5 liters of dH₂O in a canonical flask, using stir-bar agitation at room temperature (~18–24 °C) over 3 h. Then add 79.45 g of RPMI powder plus 10 g of NaHCO₃ and allow these to dissolve for an extra hour. Filter-sterilize this incomplete gametocyte culture medium using a 0.2-µm filter Stericup for 500-ml volumes, which are storable for up to 1 year at –20 °C³⁸.

Preparation of human serum Five-liter batches of heat-inactivated human serum are routinely prepared at a time for subsequent division into 200-ml aliquots, storable for up to 1 year at –20 °C. To this aim, heat-inactivate human serum bags at 56 °C over 30 min, and then pool these in a 5-liter conical flask for subsequent division into 250-ml aliquots and freeze at 20 °C until use.

Preparation of complete gametocyte culture medium Complete gametocyte culture medium is referred to as gametocyte culture medium in this protocol.

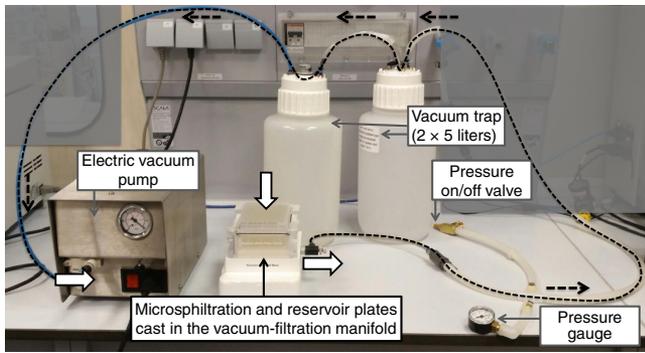


Figure 4 | Setup of the vacuum-filtration device. The black dashed line shows the vacuum line. Arrows indicate the direction of the vacuum-driven aspiration force.

To prepare 4.5 liters of complete gametocyte culture medium, remove two serum bottles from the freezer, let them thaw over 1 h in a water bath set at 37 °C and split these into 45-ml volumes in Falcon tubes. Centrifuge for 20 min at 5,000g, 37 °C. Remove surface debris using a pipette and add 55 ml of serum to 500 ml of incomplete gametocyte culture medium. Filter-sterilize using a 0.2- μ m filter Stericup and store at 4 °C for up to 10 d³⁸.

▲ CRITICAL Filter-sterilization removes micro-residual serum debris that negatively impacts the reproducibility of the microfiltration experiments along with their image analysis.

Preparation of RBCs for gametocyte culture and dilution following Nycoprep isolation Leukocyte-reduced human blood at hematocrit 60% in SAGM is routinely aliquoted into 45-ml volumes in Falcon tubes and stored at 4 °C for up to 15 d before use. Before use, centrifuge at 2,000g, 4 °C, for 5 min. Then, remove the SAGM and wash with 20 ml of gametocyte culture medium by repeating the centrifugation. Store at hematocrit 50% in gametocyte culture medium at 4 °C for up to 5 d.

Preparation of Mitotracker Deep Red FM stock Resuspend the 250 μ g of Mitotracker powder in 460 μ l of DMSO to a final concentration of 1 mM, divide into 50- μ l aliquots and store at -80 °C, protected from light, for up to 6 months.

Preparation of upstream and downstream staining solutions for imaging the layers of gametocyte-infected RBCs A 60-ml volume of both upstream and downstream gametocyte staining PBS solutions is routinely prepared at a time for each assay run of five plates. For the upstream staining solution, add 840 μ l of Syto 40 Blue, 42 μ l of Mitotracker Deep Red FM and 24 μ l of CellMask Orange to 60 ml of sterile 1 \times PBS. For downstream staining solution, add 920 μ l of Syto 40 Blue, 46 μ l of Mitotracker Deep Red FM and 24 μ l of CellMask Orange to 60 ml of sterile 1 \times PBS. Mix thoroughly and store at 4 °C, protected from light, for up to 24 h.

Preparation of heat-stiffened RBCs Resuspend 200 μ l of packed RBCs at hematocrit 2% in 10 ml of RPMI 1640 medium in an autoclaved borosilicate glass tube and warm to 50 °C over 20 min using a water bath. Wash the RBC pellet twice using gametocyte culture medium by centrifugation at 1,000g for 5 min at 20 °C. Resuspend in gametocyte culture medium at hematocrit 2% and store at 4 °C for up to 24 h.

Staining of RBCs using CellTrace CFSE stain In a 50-ml tube, add 20 μ l of 25 mM CSFE (in DMSO) to 10 ml of an RBC suspension at hematocrit 2% in RPMI 1640 medium, then incubate at room temperature for 20 min, protected from light. Wash the RBC pellet twice by adding 25 ml of gametocyte culture medium and centrifuging at 1,000g for 5 min at 20 °C. Store for up to 1 week at hematocrit 2% in gametocyte culture medium, at 4 °C and protected from light.

Preparation of glutaraldehyde-fixed RBCs To a 15-ml Falcon tube, add 500 μ l of 1.60% (vol/vol) glutaraldehyde to 500 μ l of packed CFSE-stained RBCs at hematocrit 10% in RPMI 1640 medium, then incubate for 10 min at room temperature, protected from light. Stop the fixation reaction by adding 10 ml of gametocyte culture medium and pellet the RBCs by centrifugation at 1,000g, 20 °C, 5 min. Wash the RBC pellet three times by adding 10 ml of gametocyte culture medium and centrifuging at 1,000g for 5 min at 20 °C.

TABLE 3 | Opera high spinning disc confocal imager acquisition parameters.

Setting	Exposure 1 (Syto 40 Blue)	Exposure 2 (Mi- totracker Deep Red FM)	Exposure 3 (CellMask Orange)
Focus height	0–1 μ m		
Laser	405 nm	635 nm	532 nm
Camera	No. 1— 450/50 nm	No. 3— 690/50 nm	No. 2— 585/40 nm
Camera exposure time	200 ms	400 ms	650 ms
Detection dichroic mirror	568 nm		
Primary dichroic mirror	405/532/635 nm		
Lens	\times 20		
Sublayout	Six fields (~10,000 RBCs imaged)		

Store for up to 1 week at hematocrit 2% in gametocyte culture medium, at 4 °C and protected from light.

EQUIPMENT SETUP

Preparation and use of the Biomek vacuum-filtration device

Component assembly follows general manufacturer’s operating instructions and is illustrated in **Figure 4**. Use the four-way tubing connector coupled to the vacuum gauge and vacuum control valve to create a controlled vacuum line connecting the manifold base valve to the 1- to 10-liter vacuum trap. Use tubing protected by a Millex filtration unit to connect the vacuum trap to the electric pump. To run microplate microfiltration, place a reservoir plate onto the Biomek manifold base, stabilize it by placing the square well collar and stack a microfiltration plate—previously loaded with sample or medium—on top of the collar. Reducing the gap between the microfiltration and reservoir plates prevents interwell cross-contamination upon filtration. For that purpose, the protocol described here uses a 2-mm-thick, home-machined polyethylene block (that can be easily replaced by two superimposed Greiner microplate lids) to raise the reservoir plate toward the filter plate installation base of the square collar (**Supplementary Fig. 4**). Turn on the vacuum pump—adjusted to reach a peak pressure of 5–6 inches Hg transiently (3–10 s)—to flow through the microfiltration plate into the reservoir plate; afterward, release the pressure from the device by turning the vacuum control valve off. Gently tap the microfiltration plate against the square well collar by slightly raising and dropping the front edge of the plate, in order to ensure complete transfer of the last drops of medium (or RBC sample) dripping from the director nozzles into the reservoir plate.

Preparation of Biomek NX^P dispenser for use A manual including a safety guide for users has been made available by the dispenser’ manufacturer (https://research.amnh.org/molecular/equipment_folder/Biomek%20NX%20Multichannel%20Hardware%20Manual.pdf). Before each use, it is recommended to clean the deck of the workstation, place a box of new 200- μ l tips nearby, check the input air pressure and then home all axes. To limit liquid waste volume, two reservoirs filled with dH₂O are used instead of the dispenser wash station to clean the tips when appropriate. Verifying the success of a new automated sequence with

water before first use is also recommended. Necessary labware and important parameters for automated processing of microspheres and gametocytes throughout the microsphere filtration assay are summarized in **Tables 1** and **2**, respectively.

Upstream and downstream imaging plates for use in gametocyte microsphere filtration Load 30 µl of upstream and 30 µl of downstream staining solutions into the wells of the upstream and downstream imaging plates, respectively. These plates can be prepared 1 d in advance and stored overnight at 4 °C, protected from light.

Opera high-resolution spinning disc confocal imager In accordance with the detailed procedures communicated by the manufacturer (<http://www.perkinelmer.com/lab-products-and-services/cellular-imaging/>), check liquid levels before use and, if necessary, fill the water bottle reservoir with sterile reverse-osmosis water and empty the bin bottle. Select the plate type 'Cell carrier 384 Ultra' and the ×20 water objective. Flush the Opera microfluidic system. Switch on the 405-, 532- and 635-nm lasers, along with the 450/50-, 585/40- and 690/50-nm cameras. Set up exposure parameters as described in **Table 3**. (When setting up the imaging protocol for the first time, use the 96-well Opera adjustment plate to generate reference images and a skew analysis.) Before running the automated imaging protocol according to the manufacturer's instructions, finely adjust both light source power and exposure time using an upstream imaging plate (from Step 40) loaded with the fluorescent cell samples to image. Optimal exposure parameters should yield unsaturated fluorescent images visually (**Fig. 2**; Image analysis and controls section). Optimal imaging conditions should yield gametocytemia levels that are similar to those previously quantified using control Giemsa-stained films (PROCEDURE, Step 19). Save the exposure parameters. Finally, create both plate layout and well sublayout files.

Image analysis and controls Image analysis of gametocyte-infected RBC monolayers from upstream and downstream imaging plates uses the Columbus image data storage and analysis system, which is

coupled to the Opera imager. Optimization of the image analysis script involves the use of cell and nuclei finder tools to detect and quantify in parallel the total number of CellMask-stained RBCs forming the monolayer and the Syto-stained, Mitotracker-positive gametocytes. Use morphology and intensity parameters for precise selection of RBCs and viable gametocytes. Viable gametocytes are defined as elongated, CellMask-positive objects with Syto 40 Blue and Mitotracker Deep Red FM signals with intensity values ≥350 and ≥3,000, respectively.

Use mathematical formula 1 to calculate the gametocytocidal activity of pharmacological compounds from upstream imaging plates:

$$100 - [(Gametocyte \% \text{ in compound well} \times 100) / (\text{Averaged gametocyte \% from DMSO wells})] \quad (1)$$

Killing rates >50 and >65% are routinely measured when mature gametocytes are exposed for 2 and 24 h, respectively, to 50 µM Gentian Violet.

Use the mathematical formula 2 to calculate retention rates based on the percentage of gametocytes detected in upstream and downstream imaging plates:

$$100 \times [((Gametocyte \% , Up \text{ well}) - (Gametocyte \% , Ds \text{ well})) / (Gametocyte \% , Up \text{ well})] \quad (2)$$

Averaged retention rates routinely fluctuate between 35 and 55%, 60 and 80%, and 90 and 95% after exposure to 0.05% (vol/vol) DMSO, 50 nM calyculin A and 5 µM NITD609, respectively. Exclusion criteria for the analysis of results from one compound plate are defined as a difference of <15% between the average retention rates of gametocytes from the DMSO and calyculin A control conditions; an average retention >60% for gametocytes within the DMSO control wells; an average retention <85% for gametocytes within the NITD609 control wells; an average killing rate <50 after exposure of mature gametocytes to 50 µM Gentian Violet.

PROCEDURE

Automated loading of microspheres into frits-bottom filtration plates ● TIMING 20 min per plate

1 | Place two empty dispenser reservoirs and the frits-bottom filtration plate coupled to a reservoir plate on the deck of the Biomek NX^P dispenser. Place another dispenser reservoir on the dispenser's deck and fill it with 100 ml of PBS supplemented with 1% Albumax (PBS-A = suspension medium for microspheres).

2 | Rotate on a wheel (40 rotations per min for at least 5 min) two Falcon tubes, each filled with 100 g of 25- to 45-µm microspheres in 25 ml of PBS-A. Keep the rotation going until microsphere use.

3 | Repeat Step 2 with 5- to 15-µm microspheres (two tubes each containing 100 g of microspheres in 25 ml of PBS-A). Keep the rotation going until microsphere use.

4 | Prefill the frits-bottom filtration plate from Step 1 with 60 µl of PBS-A, using the transfer function of the automated dispenser (**Table 1**).

▲ **CRITICAL STEP** Check transfer success visually. If necessary, gently tap the side of the microplate by hand to ensure homogeneous distribution of PBS-A over the entire frits surface.

? TROUBLESHOOTING

5 | Check visually for complete resuspension of microspheres in the two Falcon tubes from Step 2 (a homogeneous gray liquid suspension should be observed), then transfer the resuspended 25- to 45-µm microspheres into one of the two empty dispenser reservoirs from Step 1. Immediately transfer this suspension of microspheres from the dispenser reservoir to the frits-bottom filtration plate from Step 1, using the aspirate-dispense function of the automatic dispenser (**Table 1**). When the microspheres appear to be fully sedimented in the wells (≈10 s), tap the side of the microplate by hand very gently to ensure that the microsphere layer homogeneously covers the surface of the frits in all wells.

▲ **CRITICAL STEP** To ensure process reproducibility, automated microsphere loading into the microplate should be run immediately after microsphere transfer to the dispenser reservoir.

? TROUBLESHOOTING

PROTOCOL

6| Transfer the resuspended 5- to 15- μ m microspheres in the two Falcon tubes from Step 3 to the other empty dispenser reservoir from Step 1 and immediately proceed to their automated transfer from the dispenser reservoir to the same frits-bottom filtration plate from Step 5 (adding them on top of the existing layer of microspheres), by repeating Step 5 (Table 1). The frits-bottom filtration plate loaded with both 25- to 45- μ m and 5- to 15- μ m microspheres is now termed the microsphiltration plate.

? TROUBLESHOOTING

7| Use a hair dryer to remove surface bubbles, then the Beckman vacuum-filtration device to flow through most of the PBS-A from the microsphiltration plate from Step 6 to the reservoir plate. Put the bottom of the microsphiltration plate from Step 6 in close contact with absorbing paper for 5 min to achieve removal of excess medium by capillarity.

▲ **CRITICAL STEP** Inspect the layers of microspheres visually and identify 'deficient' wells that may display microsphere leak across the frits. Prepared microsphiltration plates routinely display <4 deficient wells ($\leq 1\%$ of the total plate wells). Seal deficient wells by melting their director nozzles with a soldering iron (Supplementary Fig. 5).

? TROUBLESHOOTING

Storage of microsphiltration plates

8| Process the microsphiltration plates differently for extemporaneous (option A) or deferred use (option B).

(A) **Short-term storage for extemporaneous use** ● **TIMING 5 min per plate**

(i) Store the plate at 4 °C in a sealed plastic bag with absorbing paper for up to 48 h.

(B) **Mid- to long-term storage** ● **TIMING overnight + 10 min per plate**

(i) Allow the microsphere-loaded plate to dry overnight on a slide warmer set at 60 °C in a class II microbiological safety cabinet (15–18 h).

▲ **CRITICAL STEP** Ventilation is critical to enabling complete drying of the microsphere layers.

? TROUBLESHOOTING

(ii) Pack the microsphiltration plate in a moisture barrier bag containing a 50-g silica bead sachet. Seal the bag using a warm sealer.

(iii) Store at room temperature.

▲ **CRITICAL STEP** Avoid unnecessarily banging or disturbing the plates during transport and experiments.

■ **PAUSE POINT** Microsphiltration plates can be stored at room temperature for up to 6 months.

Isolation of mature gametocytes by density-gradient centrifugation ● **TIMING 1 h**

▲ **CRITICAL** Sterility of the gametocyte culture should be maintained by working in a class II microbiological safety cabinet and using sterile reagents.

▲ **CRITICAL** Using a slide warmer, a block heater and reagents at 37.5 °C is necessary to prevent temperature drop, which is detrimental to mature gametocytes.

▲ **CRITICAL** In this section of the protocol, reagent volumes needed to process one gametocyte culture flask are given. Three gametocyte culture flasks are routinely prepared for an assay run of five 384-microsphiltration plates.

9| Remove ~75% of the gametocyte culture medium from the culture flask and use a 50- to 200- μ l drop to prepare a Giemsa-stained blood film for quantification of gametocytemia in Step 13. To prepare a Giemsa-stained blood film, place a drop of blood onto the edge of a clean glass slide and use another slide to rapidly smear the blood drop. Dry and fix the smear using 99% (vol/vol) methanol, then dip it for 3–5 min in a staining jar filled with Giemsa's Azur Eosin Methylene Blue solution diluted five times with dH₂O. Wash the smear with water, dry it using a hair dryer and store it in a referenced slide box at room temperature.

■ **PAUSE POINT** The smear can be stored up to two years when the humidity levels are $\leq 75\%$.

10| Gently swirl the mature gametocyte culture flask by hand over a slide warmer set at 37 °C to resuspend its contents. Transfer the gametocyte culture to a 50-ml Falcon tube prefilled with 30 ml of fresh and prewarmed gametocyte culture medium and centrifuge at 1,000g, 5 min, 37 °C.

11| Discard the supernatant and gently resuspend the 1.5- to 2-ml pellet with fresh and prewarmed gametocyte culture medium to reach a 9-ml final volume.

12| Carefully and slowly, transfer a 4.5-ml volume of the washed gametocyte culture suspension to each of two 15-ml Falcon tubes that contain 10 ml of prewarmed Nycoprep solution. Do not mix; centrifuge at 200g, 20 min, 37 °C.

▲ **CRITICAL STEP** The tubes must be handled carefully and should not be disturbed in order to preserve a clear separation between the Nycoprep solution and the gametocyte culture.

13| During the centrifugation, proceed to quantification of gametocytemia from your Giemsa-stained film (prepared during Step 9). For this purpose, use the $\times 20$ – $\times 40$ magnification of an inverted bright-field microscope to record the total number of gametocyte-infected RBCs and the total number of RBCs counted in ten or more fields of the Giemsa-stained film. Calculate the gametocytemia level (percentage of gametocyte-infected RBCs) by dividing the total number of gametocytes by the number of RBCs and multiplying the calculated product by 100.

▲ **CRITICAL STEP** Counting against $>5,000$ RBCs using quality stained films is recommended for precise quantification of gametocyte percentage.

14| Using a Pipetman at slow aspiration speed, transfer and combine the gametocyte phases from the two tubes from Step 12 (Fig. 5) in a 50-ml Falcon tube prefilled with 25 ml of prewarmed gametocyte culture medium.

▲ **CRITICAL STEP** Using a Pipetman at slow aspiration speed is recommended to prevent dispersion of the gametocyte phase upon pipetting.

▲ **CRITICAL STEP** A maximum 3- to 4-ml excess of culture medium around the gametocyte phase is recommended for complete retrieval of isolated gametocytes.

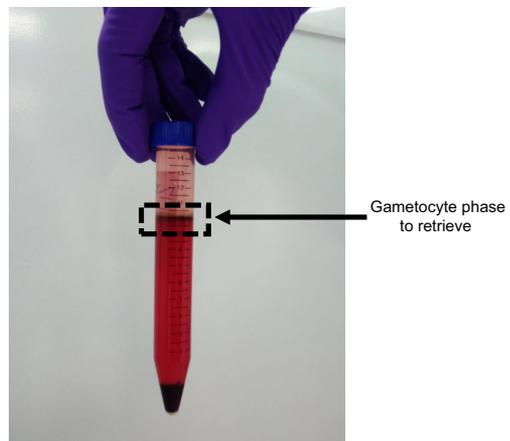


Figure 5 | Retrieval of mature gametocytes after density-gradient centrifugation (Step 14). The local concentration of gametocytes results in a dense black line termed the gametocyte phase (black box), which can be retrieved by pipetting along with an excess of 4–5 ml of surrounding sample.

Dilution of isolated gametocytes in fresh, uninfected RBCs ● **TIMING 1 h**

15| Predilute isolated gametocytes with fresh uninfected RBCs by adding 30 μ l of packed and fresh uninfected RBCs if gametocytemia is in the 1–3% range or 50 μ l of packed and fresh uninfected RBC if gametocytemia is in the 3–6% range.

16| Wash the population of isolated prediluted gametocytes twice by centrifugation at 1,000g, 5 min, 37 °C, using 2 volumes of fresh and prewarmed gametocyte culture medium.

17| Estimate the volume of the isolated prediluted gametocyte pellet using a manual micropipette.

18| Prepare a Giemsa-stained blood film and quantify gametocytemia, as described in Steps 9 and 13.

19| Add an appropriate volume of packed and fresh uninfected RBCs to reach a 3–5% final gametocytemia level, then prepare a last Giemsa-stained blood film to further control dilution accuracy (as described in Steps 9 and 13).

▲ **CRITICAL STEP** To ensure dilution accuracy, prediluting, recounting and diluting again is recommended here when $>15\%$ of gametocytes are quantified by Giemsa-stained film (from Step 18).

? **TROUBLESHOOTING**

20| Finely adjust the hematocrit to 0.5% using a hemocytometer and transfer the gametocyte suspension to a culture flask for overnight maintenance in an incubator (37 °C, 5% O₂, 5% CO₂).

Pharmacological exposure ● **TIMING 3–4 h or 25–26 h, 1–2 h hands-on**

▲ **CRITICAL** For a 2-h exposure with compounds, loading one 384-compound plate with gametocytes every 20 min for up to five plates is recommended to respect timing and microfiltration run limits. For exposures lasting >24 h, five to ten compound plates can be routinely loaded at a time.

21| Remove from the freezer the stored polypropylene plates containing test compounds and in-plate controls ≥ 45 -fold concentrated in 100% DMSO, as compared with final assay concentrations. Leave these at room temperature for 20 min on a bench.

22| Transfer the gametocyte suspension from Step 20 to a prewarmed 50-ml Falcon tube maintained at 37 °C on a block heater.

23| Transfer the gametocyte suspension (20 ml is required to fill one compound plate) from the Falcon tube to a plastic reservoir tray on a slide warmer set at 37 °C. Immediately remove the adhesive sealing film from the compound plate and

PROTOCOL

dispense 45 μl of gametocyte suspension into the wells, using an electronic multichannel pipettor with the multidispense function.

▲ **CRITICAL STEP** After transfer to reservoir tray, avoid gametocyte sedimentation by proceeding immediately to dispensing into compound plates.

24| Cover the compound–gametocyte plate using a sterile plastic lid or a Breathe-Easy sealing membrane and place the plate back into the incubator for 2 or 24 h.

Preparation of imaging plates ● TIMING 30 min

25| The morning of the microspiltration, transfer 12 μl of upstream staining solution and 16 μl of downstream staining solution (Reagent Setup) to the wells of 5 upstream and 5 downstream imaging plates, respectively. Store at room temperature protected from light until use by that afternoon.

▲ **CRITICAL STEP** Preparation of five upstream plus five downstream imaging plates is required for the microspiltration of gametocyte-infected RBC samples from five compound plates.

▲ **CRITICAL STEP** Imaging plates are loaded with staining solutions that were prepared in advance and stored for no more than 24 h (as described in Reagent Setup).

Rehumidification of microspiltration plates ● TIMING 2–3 min

26| Place a reservoir filled with prewarmed gametocyte culture medium and a microspiltration plate from Step 8 coupled to a reservoir plate on the Biomek dispenser workstation deck.

27| Using the transfer function of the automated dispenser, transfer 50 μl of prewarmed culture medium to the microspiltration plate wells (Table 2).

28| Use the Beckman vacuum-filtration device to flow through the content of the microspiltration plate into the reservoir plate.

29| Using the transfer function of the automated dispenser, replace the first reservoir plate with a new sterile one pre-filled with 25 μl of culture medium per well (Table 2).

Resuspension and transfer of gametocytes samples to microspiltration plates ● TIMING 2–3 min

30| Place the gametocyte–compound plate from Step 24 as well as upstream and downstream imaging plates from Step 25 on the deck of the Biomek NX^P dispenser (Fig. 6).

31| Using the transfer function of the automated dispenser, add 25 μl of culture medium from Step 26 to the top of the microsphere layers of the microspiltration plate (Table 2).

32| Using the aspirate–dispense function of the automated dispenser, resuspend the sedimented gametocyte culture samples from the gametocyte–compound plate (Table 2).

▲ **CRITICAL STEP** To obtain reproducible resuspensions with >80% efficiency, it is recommended to use 5 \times aspirate–dispense cycles targeting each pole and the center of the cell layer surface, with a distance of 0.5–1.5 mm between the cell layers and the dispenser tip ends (Table 2).

? TROUBLESHOOTING

33| Transfer 25 μl of the resuspended gametocyte samples from the gametocyte–compound plate into the microspiltration plate using the transfer function of the dispenser (Table 2). Thereafter, run tip wash sequence.

Dilution of upstream unfiltered control samples (upstream samples) and transfer to upstream imaging plates

● TIMING 5 min

34| Immediately transfer 80 μl of culture medium to the wells of the gametocyte–compound plate and mix the diluted suspensions, using the transfer and mix function of the automated dispenser (Table 2).

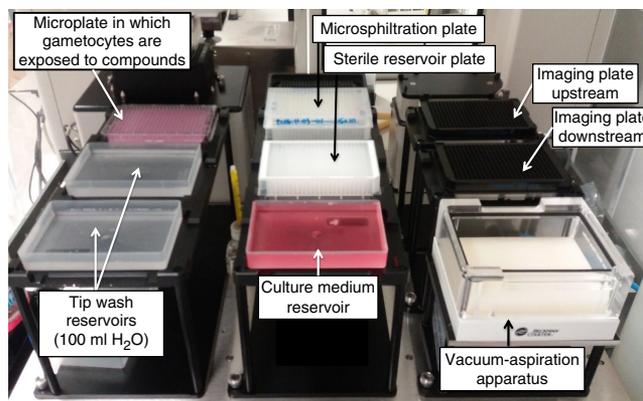


Figure 6 | Labware positions over the dispenser deck when starting the automated gametocyte microspiltration sequence (Step 30).

35| Using the transfer and mix function of the automated dispenser, transfer 12 µl of the diluted upstream samples to the upstream imaging plate (Table 2). Thereafter, run the tip wash sequence.

Filtration across microsphere layers and rinsing step ● TIMING 5 min

36| Use the Beckman vacuum-filtration device to filter resuspended gametocyte samples in the microsphiltration plate from Step 33.

37| Gently tap the reservoir plate against the Biomek deck to enable the drops of sample, which are potentially on the well sides, to slide over the reservoir plate bottom.

38| Using the automated dispenser, transfer 80 µl of culture medium from Step 26 to the wells of the microsphiltration plate (Table 2) and use the Beckman vacuum-filtration device to flow through the culture medium into the reservoir plate from Step 37 (rinsing step; Fig. 1d).

Transfer of downstream filtered samples (downstream samples) to downstream imaging plates ● TIMING 2–3 min

39| Using the transfer and mix function of the automated dispenser, remove the microsphiltration plate from the top of the reservoir plate containing the downstream samples. Transfer 16 µl of downstream samples from the reservoir plate to the downstream imaging plate (Table 2). Thereafter, run tip wash sequence.

40| Incubate both upstream and downstream imaging plates at 24–28 °C overnight, protected from light with an aluminum film.

High-throughput imaging ● TIMING 90 min per imaging plate

▲ **CRITICAL** Imaging must be performed within the 12–40 h following microsphiltration.

41| Set up the Opera high-resolution spinning disc confocal imager as described in the Equipment Setup section. Select the method and the exposure and measurement parameters described in Table 3.

42| Run imaging of control wells from upstream and downstream imaging plates using the automated imaging protocol discussed in the Equipment Setup section, which provides gametocytemia levels from the imaged fields.

43| Check calculated retention rates and killing activities from the positive and negative control wells to establish whether these match assay quality-control criteria defined in the Equipment Setup section.

? TROUBLESHOOTING

44| Once in-plate controls have demonstrated appropriate reference values, load upstream and downstream imaging plates on the automated stacker with barcode reader and start walk-away imaging of test samples.

? TROUBLESHOOTING

Troubleshooting advice can be found in Table 4.

TABLE 4 | Troubleshooting table.

Step	Problem	Possible reason	Solution
4	Heterogeneous volumes of PBS-A transferred to filter-bottom plates	Tips are not completely filled with PBS-A	Add a delay time after PBS-A aspiration to fill all tips evenly
5	Heterogeneous volumes of 25- to 45-µm spheres transferred to filter-bottom plates	Tips are loaded with homogeneous volumes of spheres but do not empty evenly	Increase move speed of the dispenser pipetting head and/or increase dispensing speed
6	Heterogeneous volumes of 5- to 15-µm spheres transferred to filter-bottom plates	Heterogeneous sphere volumes in tips	Add a delay time after aspiration and slow the aspiration speed
7	Excess of 'deficient wells' observed consistently	25- to 45-µm sphere layer is insufficiently thick	Increase the volume of 24- to 45-µm spheres transferred to the filter-bottom plate (Step 1A(iv))

(continued)

TABLE 4 | Troubleshooting table (continued).

Step	Problem	Possible reason	Solution
8B(i)	Sphere layers appear yellow-green colored after drying	Sphere layers oxidized during drying and the microsphiltration plate should be discarded	Reduce the number of microsphiltration plates that are dried over one slide warmer Increase airflow speed of the ventilated compartment
19	Presence of morphologically viable <i>P. falciparum</i> asexual stages after Nycoprep	Starting gametocyte percentage <1% Excessive retrieval of media surrounding the gametocyte phase	Discard the culture and refer to Delves' protocol ³⁸ if the problem persists Reduce medium retrieval to the gametocyte phase only
	Gametocyte level is <3% after dilution in fresh, uninfected RBCs	Overdilution induced by overestimation of gametocyte percentage after Nycoprep isolation	Prepare multiple Giemsa-stained films and increase the total number of RBCs considered for quantification
	Gametocytes appear rounded	Gametocytes were activated during Nycoprep isolation and/or dilution in RBCs	Prewarm the centrifuge, material and reagents to 37 °C before use with mature gametocytes to prevent detrimental alterations induced by temperature drop
32	Low yield of RBC layer resuspension	Suboptimal position of tips above the RBC layer	Reduce distance between the dispenser tips and the RBC layer Increase mixing speed
43	Low cell density in imaging plate	Suboptimal RBC resuspension prior to microsphiltration Insufficient number of RBCs transferred to imaging plate	Improve the automated sequence for resuspension (i.e., Step 4B(iii)) Increase the volume of compound-exposed gametocytes transferred to the imaging plate

● TIMING

Steps 1–7, plate preparation: 20 min per plate
 Step 8A, short-term storage: 5 min per plate
 Step 8B, long-term: overnight + 10 min per plate
 Steps 9–20, isolation and dilution of gametocytes: 2 h
 Steps 21–24, pharmacological exposure: 1–2 h hands-on + 2 h or 24 h of exposure
 Step 25, preparation of imaging plates: ~30 min
 Steps 26–40, microsphiltration: ~20 min per gametocyte-compound plate
 Steps 41–44, imaging and analysis: 90 min per plate

ANTICIPATED RESULTS

In the protocol described here, gametocytes are produced as according to the protocol of Delves *et al.*³⁸, in which medium culture flasks are initially seeded (day 0) with 2 ml of packed RBCs parasitized by 0.5% *P. falciparum* ring stages at 4% hematocrit, then maintained over 2 weeks, with daily culture medium change. The gametocyte induction protocol is routinely started on a Thursday or Friday to proceed to Nycoprep isolation of gametocytes 17 or 18 d later (on a Monday). With this method, ~1.5 ml of packed RBCs infected with mature stage V gametocytes are harvested from each culture flask at day 17 or 18, from

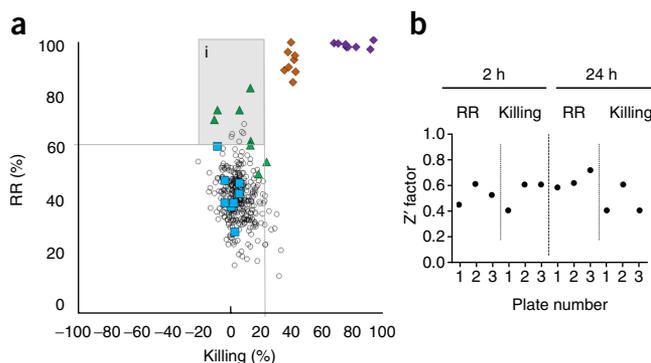


Figure 7 | Expected results from the microsphiltration assay. (a) Scatter plot illustrating normalized screen data from one microsphiltration plate. Mature gametocytes were exposed to 1 μM pharmacological compounds (simplicate) during 2-h prior filtration across a 384-well microsphiltration plate, using 0.05% (vol/vol) DMSO (blue squares), 50-nM calyculin A (green triangles), 5-μM cipargamin (NITD609, KAE609; orange diamonds) and 50 μM Gentian Violet (purple diamonds) as controls. (i) Hit selection window in which hits were defined as compounds increasing gametocyte retention rates (RRs) to >62.06% (DMSO mean + 2 s.d.) with a killing rate inferior to 20.12% (DMSO mean + 4 s.d.). (b) Z-factor values from one microsphiltration assay run assessing 2- or 24-h activities of 1,056 compounds (3× microsphiltration plates) tested at 1 μM on mature gametocytes.

which three 384-microsphiltration plates can commonly be run. Experimenters can produce up to ten microsphiltration plates per day using the automated method. Stored microsphiltration plates show optimal filtration performance over at least 6 months after their loading with microsphere layers. Microsphiltration plate shipment has recently been demonstrated to be feasible internationally for field malaria studies²⁹. Using a previously published protocol³⁸ for continuous gametocyte production *in vitro*, this assay enables screening of up to 3,600 compounds per week using ten 384-well microsphiltration plates. Because this screening methodology applies to an essentially quiescent parasite population, a low hit rate (<0.1–1%) is expected. The Z factor is predicted to fluctuate between 0.4 and 0.7 (Fig. 7). Microsphiltration offers the possibility of adapting the experiment readout to any RBC population of interest. When using a flow cytometer equipped with a robotic arm to quantify retention rates of RBC samples (Supplementary Figs. 6–8), up to 1,152 data points can be generated in 1 working day.

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS We thank the Bill & Melinda Gates Foundation (BMGF; grant OPP1123683), GlaxoSmithKline's (GSK's) Tres Cantos and the GSK Tres Cantos Open Lab Foundation (TCOLF) for funding this project. We gratefully acknowledge the Human Resources Department of INTS, including C. Pille, for the administrative support provided. We are indebted to O. Vandal from BMGF for the constant trust he placed in this HTS project. We express our sincere gratitude to S. Ruchaud for writing support. We thank HRA Pharma Paris, as well as V.M. Avery and J.P. Holleran, for their initial involvement in the microsphiltration project.

AUTHOR CONTRIBUTIONS P.B. supervised the overall project as principal investigator and supported the design and analysis of experiments. J.D., M. Carucci and I.G.-B. designed and analyzed the experiments under the supervision of P.B., F.-J.G., L.S., N.B.R. and P.A.N. J.D. wrote the paper with support provided by P.B. M. Carucci and I.G.-B. supported the preparation of figures and tables. C.R. and B.H. performed the microsphiltration of RBC samples from human donors and prepared Supplementary Figure 6. M. Corral and O.P. ensured automation maintenance, provided technical support and machined the platform used to confine the Biomek dispenser. J.L.P. provided expertise for data analysis.

COMPETING INTERESTS The authors declare no competing interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>. Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

1. Pivkin, I.V. *et al.* Biomechanics of red blood cells in human spleen and consequences for physiology and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 7804–7809 (2016).
2. Brousse, V., Buffet, P. & Rees, D. The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. *Br. J. Haematol.* **166**, 165–176 (2014).
3. Oliveira, M.C.L.A. *et al.* Clinical course of 63 children with hereditary spherocytosis: a retrospective study. *Rev. Bras Hematol. Hemoter.* **34**, 9–13 (2012).
4. Dondorp, A.M. *et al.* Red cell deformability, splenic function and anaemia in thalassaemia. *Br. J. Haematol.* **105**, 505–508 (1999).
5. Dinkla, S. *et al.* Inflammation-associated changes in lipid composition and the organization of the erythrocyte membrane. *BBA Clin.* **5**, 186–192 (2016).
6. Badr, B.M. *et al.* Increased levels of type 1 interferon in a type 1 diabetic mouse model induce the elimination of B cells from the periphery by apoptosis and increase their retention in the spleen. *Cell. Physiol. Biochem.* **35**, 137–147 (2015).
7. Zaets, S.B. *et al.* Burn-induced red blood cell deformability and shape changes are modulated by sex hormones. *Am. J. Surg.* **186**, 540–546 (2003).
8. Buffet, P.A., Safeukui, I., Milon, G., Mercereau-Puijalon, O. & David, P.H. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. *Curr. Opin. Hematol.* **16**, 157–164 (2009).
9. Lavazec, C. *et al.* Microsphiltration: a microsphere matrix to explore erythrocyte deformability. *Methods Mol. Biol.* **923**, 291–297 (2013).
10. Deplaine, G. *et al.* The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked *in vitro*. *Blood* **117**, e88–e95 (2011).

11. Ndur, P.A. *et al.* Role of the spleen in human malaria. in *Encyclopedia of Malaria* (eds. Hommel M. & Kremsner P.G.) 1–24 (Springer, 2015).
12. Buffet, P.A. *et al.* *Ex vivo* perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions. *Blood* **107**, 3745–3752 (2006).
13. Dearnley, M. *et al.* Reversible host cell remodeling underpins deformability changes in malaria parasite sexual blood stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 4800–4805 (2016).
14. Tibúrcio, M. *et al.* A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood* **119**, e172–e180 (2012).
15. Naissant, B. *et al.* *Plasmodium falciparum* STEVOR phosphorylation regulates host erythrocyte deformability enabling malaria parasite transmission. *Blood* **127**, e42–e53 (2016).
16. Ramdani, G. *et al.* cAMP-signalling regulates gametocyte-infected erythrocyte deformability required for malaria parasite transmission. *PLoS Pathog.* **11**, e1004815 (2015).
17. Sanyal, S. *et al.* *Plasmodium falciparum* STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties. *Blood* **119**, e1–e8 (2012).
18. Safeukui, I. *et al.* Surface area loss and increased sphericity account for the splenic entrapment of subpopulations of *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocytes. *PLoS One* **8**, e60150 (2013).
19. Ndur, P.A. *et al.* *Plasmodium falciparum* clearance is rapid and pitting independent in immune Malian children treated with artesunate for malaria. *J. Infect. Dis.* **211**, 290–297 (2015).
20. Diakitè, S.A.S. *et al.* Stage-dependent fate of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells in the spleen and sickle-cell trait-related protection against malaria. *Malar. J.* **15**, 482 (2016).
21. Svelc, T. & Svetina, S. Stress-free state of the red blood cell membrane and the deformation of its skeleton. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **17**, 217–227 (2012).
22. Agrawal, R. *et al.* Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique. *Sci. Rep.* **6**, 5873 (2016).
23. Rabai, M. *et al.* Deformability analysis of sickle blood using ektacytometry. *Biorheology* **51**, 159–170 (2014).
24. Picot, J. *et al.* A biomimetic microfluidic chip to study the circulation and mechanical retention of red blood cells in the spleen. *Am. J. Hematol.* **90**, 339–345 (2015).
25. Rigat-Brugarolas, L.G. *et al.* A functional microengineered model of the human splenon-on-a-chip. *Lab Chip* **14**, 1715–1724 (2014).
26. Gambhire, P. *et al.* High aspect ratio sub-micrometer channels using wet etching: application to the dynamics of red blood cell transiting through biomimetic splenic slits. *Small* <http://dx.doi.org/10.1002/sml.201700967> (2017).
27. Tomaiuolo, G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics* **8**, 051501 (2014).
28. Duez, J. *et al.* Splenic retention of *Plasmodium falciparum* gametocytes to block the transmission of malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 4206–4214 (2015).
29. Henry, B. *et al.* Red blood cell deformability, age, ethnicity and susceptibility to malaria in Africa. *Blood* **128**, 2441–2441 (2016).
30. Duez, J. *et al.* Mechanical clearance of red blood cells by the human spleen: potential therapeutic applications of a biomimetic RBC filtration method. *Transfus. Clin. Biol.* **22**, 151–157 (2015).
31. Roussel, C. *et al.* Spherocytic shift of red blood cells during storage provides a quantitative whole cell-based marker of the storage lesion. *Transfusion* **57**, 1007–1018 (2017).
32. Lucantoni, L. & Avery, V. Whole-cell *in vitro* screening for gametocytocidal compounds. *Future Med. Chem.* **4**, 2337–2360 (2012).

33. Zhang, W. *et al.* Microfluidics separation reveals the stem-cell-like deformability of tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 18707–18712 (2012).
34. Chen, J. *et al.* Efficient extravasation of tumor-repopulating cells depends on cell deformability. *Sci. Rep.* **6**, 19304 (2016).
35. Allard, W.J. *et al.* Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6897–6904 (2004).
36. Nishino, M. *et al.* Serial changes in leukocyte deformability and whole blood rheology in patients with sepsis or trauma. *J. Trauma* **59**, 1425–1431 (2005).
37. Inoue, Y. *et al.* A neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, improves leukocyte deformability in patients with acute lung injury. *J. Trauma* **60**, 936–943 discussion 943 (2006).
38. Delves, M.J. *et al.* Routine *in vitro* culture of *P. falciparum* gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions. *Nat. Protoc.* **11**, 1668–1680 (2016).
39. Duffy, S. & Avery, V.M. Identification of inhibitors of *Plasmodium falciparum* gametocyte development. *Malar. J.* **12**, 408 (2013).
40. Sosa, J.M., Nielsen, N.D., Vignes, S.M., Chen, T.G. & Shevkopyas, S.S. The relationship between red blood cell deformability metrics and perfusion of an artificial microvascular network. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **57**, 275–289 (2014).
41. Zhang, R. *et al.* A basis for rapid clearance of circulating ring-stage malaria parasites by the spiroindolone KAE609. *J. Infect. Dis.* **213**, 100–104 (2016).
42. Duffy, S., Loganathan, S., Holleran, J.P. & Avery, V.M. Large-scale production of *Plasmodium falciparum* gametocytes for malaria drug discovery. *Nat. Protoc.* **11**, 976–992 (2016).

Références Bibliographiques

1. World Health Organization & Global Malaria Programme. *World malaria report 2017*. (2017).
2. Murray, C. J. L. *et al.* Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* **379**, 413–431 (2012).
3. World Health Organization. *World Malaria Report 2018*.
4. Cotter, C. *et al.* The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet* **382**, 900–911 (2013).
5. Farfour, E., Charlotte, F., Settegrana, C., Miyara, M. & Buffet, P. The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for *Plasmodium falciparum* gametocyte maturation? *Malar. J.* **11**, 285 (2012).
6. Joice, R. *et al.* *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Sci Transl Med* **6**, 244re5 (2014).
7. Marchiafava, E. (Ettore) & Bignami, A. (Amico). *Sulle febbri malariche estivo-autunnali [electronic resource]*. (Roma : Innocenzo Artero, 1892).
8. Crompton, P. D. *et al.* Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 157–187 (2014).
9. Ménard, R. *et al.* Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 701–712 (2013).
10. Markus, M. B. Dormancy in mammalian malaria. *Trends in Parasitology* **28**, 39–45 (2012).
11. RTS,S Clinical Trials Partnership *et al.* A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2284–2295 (2012).
12. Seder, R. A. *et al.* Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science* **341**, 1359–1365 (2013).
13. Sissoko, M. S. *et al.* Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against *Plasmodium falciparum* via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* **17**, 498–509 (2017).
14. Offeddu, V., Thathy, V., Marsh, K. & Matuschewski, K. Naturally acquired immune responses against *Plasmodium falciparum* sporozoites and liver infection. *Int. J. Parasitol.* **42**, 535–548 (2012).
15. Silvie, O., Amino, R. & Hafalla, J. C. Tissue-specific cellular immune responses to malaria pre-erythrocytic stages. *Curr. Opin. Microbiol.* **40**, 160–167 (2017).
16. Long, C. A. & Zavala, F. Immune Responses in Malaria. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, (2017).
17. Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A. & Golenbock, D. T. Innate sensing of malaria parasites. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 744–757 (2014).
18. Flateau, C., Le Loup, G. & Pialoux, G. Consequences of HIV infection on malaria and therapeutic implications: a systematic review. *Lancet Infect Dis* **11**, 541–556 (2011).
19. Cohen, S., McGREGOR, I. A. & Carrington, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* **192**, 733–737 (1961).
20. Sabchareon, A. *et al.* Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**, 297–308 (1991).
21. Teo, A., Feng, G., Brown, G. V., Beeson, J. G. & Rogerson, S. J. Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. *Trends Parasitol.* **32**, 887–898 (2016).

22. Leech, J. H., Barnwell, J. W., Miller, L. H. & Howard, R. J. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J. Exp. Med.* **159**, 1567–1575 (1984).
23. Scherf, A. *et al.* Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in Plasmodium falciparum. *EMBO J.* **17**, 5418–5426 (1998).
24. Chan, J.-A. *et al.* Antibody Targets on the Surface of Plasmodium falciparum–Infected Erythrocytes That Are Associated With Immunity to Severe Malaria in Young Children. *J Infect Dis* **219**, 819–828 (2019).
25. Niang, M. *et al.* STEVOR is a Plasmodium falciparum erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. *Cell Host Microbe* **16**, 81–93 (2014).
26. Kinyanjui, S. M., Conway, D. J., Lanar, D. E. & Marsh, K. IgG antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malar. J.* **6**, 82 (2007).
27. Ndungu, F. M. *et al.* Long-lived Plasmodium falciparum specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2919–2929 (2013).
28. Migot, F. *et al.* Anti-malaria antibody-producing B cell frequencies in adults after a Plasmodium falciparum outbreak in Madagascar. *Clin. Exp. Immunol.* **102**, 529–534 (1995).
29. Ndungu, F. M. *et al.* Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 8247–8252 (2012).
30. Weiss, G. E. *et al.* The Plasmodium falciparum-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathog.* **6**, e1000912 (2010).
31. Weiss, G. E. *et al.* Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. *J. Immunol.* **183**, 2176–2182 (2009).
32. Nogaro, S. I. *et al.* The breadth, but not the magnitude, of circulating memory B cell responses to P. falciparum increases with age/exposure in an area of low transmission. *PLoS ONE* **6**, e25582 (2011).
33. Weiss, G. E. *et al.* A positive correlation between atypical memory B cells and Plasmodium falciparum transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali. *PLoS ONE* **6**, e15983 (2011).
34. Portugal, S. *et al.* Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. *Elife* **4**, (2015).
35. Moir, S. *et al.* Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J. Exp. Med.* **205**, 1797–1805 (2008).
36. Clark, E. H. *et al.* Plasmodium falciparum Malaria in the Peruvian Amazon, a Region of Low Transmission, Is Associated with Immunologic Memory. *Infection and Immunity* **80**, 1583–1592 (2012).
37. Sullivan, R. T. *et al.* B cell sub-types following acute malaria and associations with clinical immunity. *Malaria Journal* **15**, 139 (2016).
38. Asito, A. S. *et al.* Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children. *Malar J* **7**, 238 (2008).
39. Korir, J. C., Magambo, J. K., Mwatha, J. K. & Waitumbi, J. N. B-cell activity in children with malaria. *Malar. J.* **11**, 66 (2012).
40. Hansen, D. S., Obeng-Adjei, N., Ly, A., Ioannidis, L. J. & Crompton, P. D. Emerging concepts in T follicular helper cell responses to malaria. *Int. J. Parasitol.* **47**, 105–110 (2017).
41. Pleass, R. J., Moore, S. C., Stevenson, L. & Hviid, L. Immunoglobulin M: Restraint of Inflammation and Mediator of Immune Evasion by Plasmodium falciparum Malaria. *Trends Parasitol.* **32**, 108–119 (2016).

42. Atkinson, J. P. & Frank, M. M. Studies on the in vivo effects of antibody. Interaction of IgM antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes in man. *J. Clin. Invest.* **54**, 339–348 (1974).
43. Severe malaria. *Trop. Med. Int. Health* **19 Suppl 1**, 7–131 (2014).
44. Grigg, M. J. *et al.* Age-Related Clinical Spectrum of Plasmodium knowlesi Malaria and Predictors of Severity. *Clin. Infect. Dis.* **67**, 350–359 (2018).
45. Naing, C., Whittaker, M. A., Nyunt Wai, V. & Mak, J. W. Is Plasmodium vivax malaria a severe malaria?: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e3071 (2014).
46. Marsh, K. *et al.* Indicators of life-threatening malaria in African children. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1399–1404 (1995).
47. Schellenberg, D. *et al.* African children with malaria in an area of intense Plasmodium falciparum transmission: features on admission to the hospital and risk factors for death. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**, 431–438 (1999).
48. Cserti-Gazdewich, C. M. *et al.* Inter-relationships of cardinal features and outcomes of symptomatic pediatric Plasmodium falciparum MALARIA in 1,933 children in Kampala, Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **88**, 747–756 (2013).
49. Reyburn, H. *et al.* Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe Plasmodium falciparum malaria. *JAMA* **293**, 1461–1470 (2005).
50. Chu, C. S. & White, N. J. Management of relapsing Plasmodium vivax malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther* **14**, 885–900 (2016).
51. Shanks, G. D. Historical Review: Problematic Malaria Prophylaxis with Quinine. *Am J Trop Med Hyg* **95**, 269–272 (2016).
52. Gilles, H. M. & Hendrickse, R. G. Possible aetiological role of Plasmodium malariae in ‘nephrotic syndrome’ in Nigerian children. *Lancet* **1**, 806–807 (1960).
53. Ehrich, J. H. H. & Eke, F. U. Malaria-induced renal damage: facts and myths. *Pediatr. Nephrol.* **22**, 626–637 (2007).
54. Bousema, T., Okell, L., Felger, I. & Drakeley, C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 833–840 (2014).
55. Scott, J. A. G. *et al.* Relation between falciparum malaria and bacteraemia in Kenyan children: a population-based, case-control study and a longitudinal study. *Lancet* **378**, 1316–1323 (2011).
56. Cunnington, A. J., de Souza, J. B., Walther, M. & Riley, E. M. Malaria impairs resistance to Salmonella through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nat. Med.* **18**, 120–127 (2011).
57. Chen, I. *et al.* ‘Asymptomatic’ Malaria: A Chronic and Debilitating Infection That Should Be Treated. *PLoS Med.* **13**, e1001942 (2016).
58. Bryceson, A. *et al.* Malaria and splenomegaly. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, 879 (1983).
59. Bates, I. & Bedu-Addo, G. Review of diagnostic criteria of hyper-reactive malarial splenomegaly. *Lancet* **349**, 1178 (1997).
60. Dalrymple, U., Arambepola, R., Gething, P. W. & Cameron, E. How long do rapid diagnostic tests remain positive after anti-malarial treatment? *Malar. J.* **17**, 228 (2018).
61. Ndour, P. A. *et al.* Measuring the Plasmodium falciparum HRP2 protein in blood from artesunate-treated malaria patients predicts post-artesunate delayed hemolysis. *Sci Transl Med* **9**, (2017).
62. Mathison, B. A. & Pritt, B. S. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. *J Clin Microbiol* **55**, 2009–2017 (2017).
63. Dondorp, A., Nosten, F., Stepniewska, K., Day, N. & White, N. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet* **366**, 717–725 (2005).
64. Dondorp, A. M. *et al.* Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet* **376**, 1647–1657 (2010).

65. Bruneel, F. *et al.* Severe imported falciparum malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PLoS ONE* **5**, e13236 (2010).
66. Dondorp, A. M. *et al.* Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.* **361**, 455–467 (2009).
67. Ashley, E. A. *et al.* Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.* **371**, 411–423 (2014).
68. Witkowski, B. *et al.* Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis* **13**, 1043–1049 (2013).
69. Ariey, F. *et al.* A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. *Nature* **505**, 50–55 (2014).
70. Mbengue, A. *et al.* A molecular mechanism of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *Nature* **520**, 683–687 (2015).
71. Burrows, J. Microbiology: Malaria runs rings round artemisinin. *Nature* **520**, 628–630 (2015).
72. Ashley, E. A., Pyae Phyo, A. & Woodrow, C. J. Malaria. *Lancet* **391**, 1608–1621 (2018).
73. Ménard, D. *et al.* A Worldwide Map of Plasmodium falciparum K13-Propeller Polymorphisms. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2453–2464 (2016).
74. Lu, F. *et al.* Emergence of Indigenous Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum in Africa. *N. Engl. J. Med.* **376**, 991–993 (2017).
75. Bhatt, S. *et al.* The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **526**, 207–211 (2015).
76. Dicko, A. *et al.* Primaquine to reduce transmission of Plasmodium falciparum malaria in Mali: a single-blind, dose-ranging, adaptive randomised phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* **16**, 674–684 (2016).
77. Ashley, E. A., Recht, J. & White, N. J. Primaquine: the risks and the benefits. *Malar J* **13**, (2014).
78. Bastiaens, G. J. H. *et al.* Safety of single low-dose primaquine in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient falciparum-infected African males: Two open-label, randomized, safety trials. *PLoS ONE* **13**, e0190272 (2018).
79. Ouédraogo, A. L. *et al.* Efficacy and Safety of the Mosquitocidal Drug Ivermectin to Prevent Malaria Transmission After Treatment: A Double-Blind, Randomized, Clinical Trial. *Clin Infect Dis* **60**, 357–365 (2015).
80. Smit, M. R. *et al.* Safety and mosquitocidal efficacy of high-dose ivermectin when co-administered with dihydroartemisinin-piperazine in Kenyan adults with uncomplicated malaria (IVERMAL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis* **18**, 615–626 (2018).
81. Guttman, P. & Ehrlich, P. Ueber die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berliner Klinische Wochenschrift* **39**, 953–956 (1891).
82. Adjalley, S. H. *et al.* Quantitative assessment of Plasmodium falciparum sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. *PNAS* **108**, E1214–E1223 (2011).
83. Coulibaly, B. *et al.* Efficacy and safety of triple combination therapy with artesunate-amodiaquine-methylene blue for falciparum malaria in children: a randomized controlled trial in Burkina Faso. *J. Infect. Dis.* **211**, 689–697 (2015).
84. Dicko, A. *et al.* Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of Plasmodium falciparum transmission in Mali: a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* **18**, 627–639 (2018).
85. Desai, M. *et al.* Prevention of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* **18**, e119–e132 (2018).
86. Katureebe, A. *et al.* Measures of Malaria Burden after Long-Lasting Insecticidal Net Distribution and Indoor Residual Spraying at Three Sites in Uganda: A Prospective Observational Study. *PLoS Med.* **13**, e1002167 (2016).

87. Protopopoff, N. *et al.* Effectiveness of a long-lasting piperonyl butoxide-treated insecticidal net and indoor residual spray interventions, separately and together, against malaria transmitted by pyrethroid-resistant mosquitoes: a cluster, randomised controlled, two-by-two factorial design trial. *Lancet* **391**, 1577–1588 (2018).
88. Tiono, A. B. *et al.* Efficacy of Olyset Duo, a bednet containing pyriproxyfen and permethrin, versus a permethrin-only net against clinical malaria in an area with highly pyrethroid-resistant vectors in rural Burkina Faso: a cluster-randomised controlled trial. *Lancet* **392**, 569–580 (2018).
89. Casanova, J.-L. Human genetic basis of interindividual variability in the course of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E7118–E7127 (2015).
90. Buffet, P. A. *et al.* The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood* **117**, 381–392 (2011).
91. Abel, L., Cot, M., Mulder, L., Carnevale, P. & Feingold, J. Segregation analysis detects a major gene controlling blood infection levels in human malaria. *Am. J. Hum. Genet.* **50**, 1308–1317 (1992).
92. Pullan, R. L., Bukirwa, H., Snow, R. W. & Brooker, S. Heritability of Plasmodium parasite density in a rural Ugandan community. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 990–995 (2010).
93. Ranque, S. *et al.* Familial aggregation of cerebral malaria and severe malarial anemia. *J. Infect. Dis.* **191**, 799–804 (2005).
94. Traoré, Y. *et al.* [Analysis of the genetic factors controlling malarial infection in man]. *Sante* **9**, 53–59 (1999).
95. Aucan, C., Traoré, Y., Fumoux, F. & Rihet, P. Familial correlation of immunoglobulin G subclass responses to Plasmodium falciparum antigens in Burkina Faso. *Infect. Immun.* **69**, 996–1001 (2001).
96. Lawaly, Y. R. *et al.* Heritability of the human infectious reservoir of malaria parasites. *PLoS ONE* **5**, e11358 (2010).
97. Garcia, A. *et al.* Genetic control of blood infection levels in human malaria: evidence for a complex genetic model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**, 480–488 (1998).
98. Duah, N. O. *et al.* Heritability of antibody isotype and subclass responses to Plasmodium falciparum antigens. *PLoS ONE* **4**, e7381 (2009).
99. Sjöberg, K. *et al.* Genetic regulation of human anti-malarial antibodies in twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 2101–2104 (1992).
100. Jepson, A. P. *et al.* Genetic regulation of fever in Plasmodium falciparum malaria in Gambian twin children. *J. Infect. Dis.* **172**, 316–319 (1995).
101. Mackinnon, M. J., Mwangi, T. W., Snow, R. W., Marsh, K. & Williams, T. N. Heritability of malaria in Africa. *PLoS Med.* **2**, e340 (2005).
102. Casanova, J.-L. & Abel, L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 55–66 (2004).
103. Hill, A. V. S. Evolution, revolution and heresy in the genetics of infectious disease susceptibility. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **367**, 840–849 (2012).
104. Allison, A. C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J* **1**, 290–294 (1954).
105. Haldane, J. Disease and evolution. *La Ricerca Scientifica* **19**, 68–76 (1949).
106. Malaria Genomic Epidemiology Network. A global network for investigating the genomic epidemiology of malaria. *Nature* **456**, 732–737 (2008).
107. Reyburn, H. *et al.* Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *BMJ* **329**, 1212 (2004).
108. Teo, Y.-Y., Small, K. S. & Kwiatkowski, D. P. Methodological challenges of genome-wide association analysis in Africa. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 149–160 (2010).

109. Tishkoff, S. A. *et al.* The genetic structure and history of Africans and African Americans. *Science* **324**, 1035–1044 (2009).
110. Goheen, M. M., Campino, S. & Cerami, C. The role of the red blood cell in host defence against falciparum malaria: an expanding repertoire of evolutionary alterations. *Br. J. Haematol.* **179**, 543–556 (2017).
111. Taylor, S. M., Parobek, C. M. & Fairhurst, R. M. Impact of haemoglobinopathies on the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **12**, 457–468 (2012).
112. Elguero, E. *et al.* Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 7051–7054 (2015).
113. Cholera, R. *et al.* Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 991–996 (2008).
114. Ayi, K., Turrini, F., Piga, A. & Arese, P. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood* **104**, 3364–3371 (2004).
115. Gong, L., Parikh, S., Rosenthal, P. J. & Greenhouse, B. Biochemical and immunological mechanisms by which sickle cell trait protects against malaria. *Malar J* **12**, 317 (2013).
116. Piel, F. B. *et al.* The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. *Sci Rep* **3**, 1671 (2013).
117. Travassos, M. A. *et al.* Hemoglobin C Trait Provides Protection From Clinical Falciparum Malaria in Malian Children. *J. Infect. Dis.* **212**, 1778–1786 (2015).
118. Fairhurst, R. M. *et al.* Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria. *Nature* **435**, 1117–1121 (2005).
119. Fairhurst, R. M., Fujioka, H., Hayton, K., Collins, K. F. & Wellems, T. E. Aberrant development of Plasmodium falciparum in hemoglobin CC red cells: implications for the malaria protective effect of the homozygous state. *Blood* **101**, 3309–3315 (2003).
120. Olson, J. A. & Nagel, R. L. Synchronized cultures of P falciparum in abnormal red cells: the mechanism of the inhibition of growth in HbCC cells. *Blood* **67**, 997–1001 (1986).
121. Cyrklaff, M. *et al.* Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Science* **334**, 1283–1286 (2011).
122. Gouagna, L. C. *et al.* Genetic variation in human HBB is associated with Plasmodium falciparum transmission. *Nature Genetics* **42**, 328–331 (2010).
123. Flatz, G., Pik, C. & Sundharagiati, B. MALARIA AND HAEMOGLOBIN E IN THAILAND. *Lancet* **2**, 385–387 (1964).
124. Ohashi, J. *et al.* Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 1198–1208 (2004).
125. Hutagalung, R. *et al.* Influence of hemoglobin E trait on the severity of Falciparum malaria. *J. Infect. Dis.* **179**, 283–286 (1999).
126. Naka, I. *et al.* Lack of association of the HbE variant with protection from cerebral malaria in Thailand. *Biochem. Genet.* **46**, 708–711 (2008).
127. Kar, S., Seth, S. & Seth, P. K. Prevalence of malaria in Ao Nagas and its association with G6PD and HbE. *Hum. Biol.* **64**, 187–197 (1992).
128. Nagel, R. L. *et al.* Impairment of the growth of Plasmodium falciparum in HbEE erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **68**, 303–305 (1981).
129. Vernes, A. J., Haynes, J. D., Tang, D. B., Dutoit, E. & Diggs, C. L. Decreased growth of Plasmodium falciparum in red cells containing haemoglobin E, a role for oxidative stress, and a sero-epidemiological correlation. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**, 642–648 (1986).

130. Santiyanont, R. & Wilairat, P. Red cells containing hemoglobin E do not inhibit malaria parasite development in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**, 541–543 (1981).
131. Chotivanich, K. *et al.* Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P falciparum* malaria. *Blood* **100**, 1172–1176 (2002).
132. Lithanatudom, P. *et al.* Hemoglobin E Prevalence among Ethnic Groups Residing in Malaria-Endemic Areas of Northern Thailand and Its Lack of Association with *Plasmodium falciparum* Invasion In Vitro. *PLoS ONE* **11**, e0148079 (2016).
133. Bunyaratvej, A. *et al.* Increased phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes with haemoglobin E by peripheral blood monocytes. *Acta Haematol.* **76**, 155–158 (1986).
134. Hutagalung, R., Wilairatana, P., Looareesuwan, S., Brittenham, G. M. & Gordeuk, V. R. Influence of hemoglobin E trait on the antimalarial effect of artemisinin derivatives. *J. Infect. Dis.* **181**, 1513–1516 (2000).
135. Taher, A. T., Weatherall, D. J. & Cappellini, M. D. Thalassaemia. *Lancet* **391**, 155–167 (2018).
136. Williams, T. N. *et al.* Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+ thalassaemia and the sickle cell trait. *Nat. Genet.* **37**, 1253–1257 (2005).
137. Uyoga, S. *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and the risk of malaria and other diseases in children in Kenya: a case-control and a cohort study. *Lancet Haematol* **2**, e437-444 (2015).
138. Clark, T. G. *et al.* Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 1080–1085 (2009).
139. Shah, S. S. *et al.* Heterogeneous alleles comprising G6PD deficiency trait in West Africa exert contrasting effects on two major clinical presentations of severe malaria. *Malar. J.* **15**, 13 (2016).
140. Guindo, A., Fairhurst, R. M., Doumbo, O. K., Wellems, T. E. & Diallo, D. A. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med.* **4**, e66 (2007).
141. Toure, O. *et al.* Candidate polymorphisms and severe malaria in a Malian population. *PLoS ONE* **7**, e43987 (2012).
142. Malaria Genomic Epidemiology Network & Malaria Genomic Epidemiology Network. Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study. *Nat. Genet.* **46**, 1197–1204 (2014).
143. Clarke, G. M. *et al.* Characterisation of the opposing effects of G6PD deficiency on cerebral malaria and severe malarial anaemia. *eLife* (2017). doi:10.7554/eLife.15085
144. Watson, J. A. *et al.* Collider bias and the apparent protective effect of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on cerebral malaria. *Elife* **8**, (2019).
145. Grace, R. F., Mark Layton, D. & Barcellini, W. How we manage patients with pyruvate kinase deficiency. *Br. J. Haematol.* **184**, 721–734 (2019).
146. Machado, P. *et al.* Pyruvate kinase deficiency in sub-Saharan Africa: identification of a highly frequent missense mutation (G829A;Glu277Lys) and association with malaria. *PLoS ONE* **7**, e47071 (2012).
147. Ayi, K. *et al.* Pyruvate kinase deficiency and malaria. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1805–1810 (2008).
148. Durand, P. M. & Coetzer, T. L. Pyruvate kinase deficiency protects against malaria in humans. *Haematologica* **93**, 939–940 (2008).
149. Min-Oo, G. *et al.* Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nat. Genet.* **35**, 357–362 (2003).
150. van Bruggen, R. *et al.* Modulation of Malaria Phenotypes by Pyruvate Kinase (PKLR) Variants in a Thai Population. *PLoS ONE* **10**, e0144555 (2015).
151. Picard, V. *et al.* Homozygous Southeast Asian ovalocytosis is a severe dyserythropoietic anemia associated with distal renal tubular acidosis. *Blood* **123**, 1963–1965 (2014).

152. Jarolim, P. *et al.* Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 11022–11026 (1991).
153. Liu, S. C. *et al.* Molecular defect of the band 3 protein in southeast Asian ovalocytosis. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1530–1538 (1990).
154. Genton, B. *et al.* Ovalocytosis and cerebral malaria. *Nature* **378**, 564–565 (1995).
155. Lin, E. *et al.* Minimal association of common red blood cell polymorphisms with *Plasmodium falciparum* infection and uncomplicated malaria in Papua New Guinean school children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 828–833 (2010).
156. Kidson, C., Lamont, G., Saul, A. & Nurse, G. T. Ovalocytic erythrocytes from Melanesians are resistant to invasion by malaria parasites in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 5829–5832 (1981).
157. Mohandas, N., Lie-Injo, L. E., Friedman, M. & Mak, J. W. Rigid membranes of Malayan ovalocytes: a likely genetic barrier against malaria. *Blood* **63**, 1385–1392 (1984).
158. Cortés, A., Benet, A., Cooke, B. M., Barnwell, J. W. & Reeder, J. C. Ability of *Plasmodium falciparum* to invade Southeast Asian ovalocytes varies between parasite lines. *Blood* **104**, 2961–2966 (2004).
159. Cortés, A. *et al.* Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells to CD36 under flow is enhanced by the cerebral malaria-protective trait South-East Asian ovalocytosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **142**, 252–257 (2005).
160. Greth, A. *et al.* A novel ENU-mutation in ankyrin-1 disrupts malaria parasite maturation in red blood cells of mice. *PLoS ONE* **7**, e38999 (2012).
161. Narla, J. & Mohandas, N. Red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol* **39 Suppl 1**, 47–52 (2017).
162. Schulman, S. *et al.* Growth of *Plasmodium falciparum* in human erythrocytes containing abnormal membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 7339–7343 (1990).
163. Chishti, A. H., Palek, J., Fisher, D., Maalouf, G. J. & Liu, S. C. Reduced invasion and growth of *Plasmodium falciparum* into elliptocytic red blood cells with a combined deficiency of protein 4.1, glycophorin C, and p55. *Blood* **87**, 3462–3469 (1996).
164. Cserti, C. M. & Dzik, W. H. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood* **110**, 2250–2258 (2007).
165. Fry, A. E. *et al.* Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 567–576 (2008).
166. Rout, R. *et al.* Blood group phenotypes A and B are risk factors for cerebral malaria in Odisha, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **106**, 538–543 (2012).
167. Lopera-Mesa, T. M. *et al.* Impact of red blood cell variants on childhood malaria in Mali: a prospective cohort study. *Lancet Haematol* **2**, e140–e149 (2015).
168. Vafa, M., Troye-Blomberg, M., Anchang, J., Garcia, A. & Migot-Nabias, F. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants. *Malar. J.* **7**, 17 (2008).
169. Bedu-Addo, G. *et al.* Reduced prevalence of placental malaria in primiparae with blood group O. *Malar. J.* **13**, 289 (2014).
170. Boel, M. E. *et al.* No association of phenotypic ABO blood group and malaria during pregnancy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **87**, 447–449 (2012).
171. Barragan, A., Kremsner, P. G., Wahlgren, M. & Carlson, J. Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infect. Immun.* **68**, 2971–2975 (2000).
172. Chotivanich, K. T. *et al.* Rosetting characteristics of uninfected erythrocytes from healthy individuals and malaria patients. *Ann Trop Med Parasitol* **92**, 45–56 (1998).
173. Rowe, J. A. *et al.* Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 17471–17476 (2007).

174. Vigan-Womas, I. *et al.* Structural basis for the ABO blood-group dependence of Plasmodium falciparum rosetting. *PLoS Pathog.* **8**, e1002781 (2012).
175. Goel, S. *et al.* RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria. *Nat. Med.* **21**, 314–317 (2015).
176. Wolofsky, K. T. *et al.* ABO blood groups influence macrophage-mediated phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *PLoS Pathog.* **8**, e1002942 (2012).
177. Chaudhuri, A. & De, S. Cholera and blood-groups. *Lancet* **2**, 404 (1977).
178. Maier, A. G. *et al.* Plasmodium falciparum erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nat. Med.* **9**, 87–92 (2003).
179. Patel, S. S. *et al.* The association of the glycophorin C exon 3 deletion with ovalocytosis and malaria susceptibility in the Wosera, Papua New Guinea. *Blood* **98**, 3489–3491 (2001).
180. Tavul, L. *et al.* Glycophorin C delta(exon3) is not associated with protection against severe anaemia in Papua New Guinea. *P N G Med J* **51**, 149–154 (2008).
181. Malaria Genomic Epidemiology Network, Band, G., Rockett, K. A., Spencer, C. C. A. & Kwiatkowski, D. P. A novel locus of resistance to severe malaria in a region of ancient balancing selection. *Nature* **526**, 253–257 (2015).
182. Leffler, E. M. *et al.* Resistance to malaria through structural variation of red blood cell invasion receptors. *Science* **356**, (2017).
183. Timmann, C. *et al.* Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. *Nature* **489**, 443–446 (2012).
184. Bedu-Addo, G., Meese, S. & Mockenhaupt, F. P. An ATP2B4 polymorphism protects against malaria in pregnancy. *J. Infect. Dis.* **207**, 1600–1603 (2013).
185. Ndila, C. M. *et al.* Human candidate gene polymorphisms and risk of severe malaria in children in Kilifi, Kenya: a case-control association study. *Lancet Haematol* **5**, e333–e345 (2018).
186. Gelabert, P., Olalde, I., de-Dios, T., Civit, S. & Lalueza-Fox, C. Malaria was a weak selective force in ancient Europeans. *Scientific Reports* **7**, (2017).
187. Lessard, S. *et al.* An erythroid-specific ATP2B4 enhancer mediates red blood cell hydration and malaria susceptibility. *J. Clin. Invest.* **127**, 3065–3074 (2017).
188. Albuissou, J. *et al.* Dehydrated hereditary stomatocytosis linked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels. *Nat Commun* **4**, 1884 (2013).
189. Huisjes, R. *et al.* Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front Physiol* **9**, 656 (2018).
190. Picard, V. *et al.* Clinical and biological features in PIEZO1-hereditary xerocytosis and Gardos-channelopathy: A retrospective series of 126 patients. *Haematologica* (2019). doi:10.3324/haematol.2018.205328
191. Tiffert, T. *et al.* The hydration state of human red blood cells and their susceptibility to invasion by Plasmodium falciparum. *Blood* **105**, 4853–4860 (2005).
192. Ma, S. *et al.* Common PIEZO1 Allele in African Populations Causes RBC Dehydration and Attenuates Plasmodium Infection. *Cell* **173**, 443–455.e12 (2018).
193. Rooks, H. *et al.* A gain of function variant in PIEZO1 (E756del) and sickle cell disease. *Haematologica* **104**, e91–e93 (2019).
194. Ilboudo, Y. *et al.* A common functional PIEZO1 deletion allele associates with red blood cell density in sickle cell disease patients. *Am. J. Hematol.* **93**, E362–E365 (2018).
195. Opi, D. H. *et al.* Mechanistic Studies of the Negative Epistatic Malaria-protective Interaction Between Sickle Cell Trait and α -thalassemia. *EBioMedicine* **1**, 29–36 (2014).
196. Contu, L. *et al.* HLA-B35 frequency variations correlate with malaria infection in Sardinia. *Tissue Antigens* **52**, 452–461 (1998).

197. Hill, A. V. *et al.* Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* **360**, 434–439 (1992).
198. Bennett, S. *et al.* Human leucocyte antigen (HLA) and malaria morbidity in a Gambian community. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**, 286–287 (1993).
199. Lyke, K. E. *et al.* Association of HLA alleles with Plasmodium falciparum severity in Malian children. *Tissue Antigens* **77**, 562–571 (2011).
200. Garcia, A. *et al.* Association of HLA-G 3'UTR polymorphisms with response to malaria infection: a first insight. *Infect. Genet. Evol.* **16**, 263–269 (2013).
201. Sabbagh, A. *et al.* Association of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms with antibody response against Plasmodium falciparum antigens: preliminary results. *Tissue Antigens* **82**, 53–58 (2013).
202. Kwiatkowski, D. P. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 171–192 (2005).
203. Fry, A. E. *et al.* Positive selection of a CD36 nonsense variant in sub-Saharan Africa, but no association with severe malaria phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2683–2692 (2009).
204. Kosoy, R. *et al.* Evidence for malaria selection of a CR1 haplotype in Sardinia. *Genes Immun.* **12**, 582–588 (2011).
205. Cockburn, I. A. *et al.* A human complement receptor 1 polymorphism that reduces Plasmodium falciparum rosetting confers protection against severe malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 272–277 (2004).
206. Zimmerman, P. A. *et al.* CR1 Knops blood group alleles are not associated with severe malaria in the Gambia. *Genes Immun.* **4**, 368–373 (2003).
207. Larousse, É. Définitions : ethnologie - Dictionnaire de français Larousse. Available at: <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/ethnologie/31396>. (Accessed: 6th May 2018)
208. Terrier, J. Culture et types de l'action sociale. *Revue européenne des sciences sociales* 141–153 (2002). doi:10.4000/ress.635
209. Heyer, E. *et al.* Genetic diversity and the emergence of ethnic groups in Central Asia. *BMC Genet.* **10**, 49 (2009).
210. Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique (INSAE) & ICF International. Principaux indicateurs socio démographiques et économiques (RGPH-4, 2013). (2016).
211. Oomen, J. M., Meuwissen, J. H. & Gemert, W. Differences in blood status of three ethnic groups inhabiting the same locality in Northern Nigeria. Anaemia, splenomegaly and associated causes. *Trop Geogr Med* **31**, 587–606 (1979).
212. Greenwood, B. M. *et al.* Ethnic differences in the prevalence of splenomegaly and malaria in The Gambia. *Ann Trop Med Parasitol* **81**, 345–354 (1987).
213. Modiano, G. *et al.* Protection against malaria morbidity: near-fixation of the alpha-thalassemia gene in a Nepalese population. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 390–397 (1991).
214. Voller, A. Immunopathology of malaria. *Bull. World Health Organ.* **50**, 177–186 (1974).
215. Dolo, A. *et al.* [Relationship between malaria and anemia in two ethnic groups living in sympatry in Mali]. *Bull Soc Pathol Exot* **105**, 370–376 (2012).
216. Dolo, A. *et al.* Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72**, 243–248 (2005).
217. Farouk, S. E. *et al.* Different antibody- and cytokine-mediated responses to Plasmodium falciparum parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. *Microbes Infect.* **7**, 110–117 (2005).
218. Israelsson, E. *et al.* Differences in Fcγ receptor IIa genotypes and IgG subclass pattern of anti-malarial antibodies between sympatric ethnic groups in Mali. *Malar. J.* **7**, 175 (2008).
219. Maiga, B. *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and susceptibility to mild malaria in Dogon and Fulani, Mali. *Malar. J.* **13**, 270 (2014).

220. Maiga, B. *et al.* Human candidate polymorphisms in sympatric ethnic groups differing in malaria susceptibility in Mali. *PLoS ONE* **8**, e75675 (2013).
221. Maiga, B. *et al.* Fc gamma receptor IIa-H131R polymorphism and malaria susceptibility in sympatric ethnic groups, Fulani and Dogon of Mali. *Scand. J. Immunol.* **79**, 43–50 (2014).
222. McCall, M. B. B. *et al.* Early interferon-gamma response against Plasmodium falciparum correlates with interethnic differences in susceptibility to parasitemia between sympatric Fulani and Dogon in Mali. *J. Infect. Dis.* **201**, 142–152 (2010).
223. Vafa, M. *et al.* Relationship between immunoglobulin isotype response to Plasmodium falciparum blood stage antigens and parasitological indexes as well as splenomegaly in sympatric ethnic groups living in Mali. *Acta Trop.* **109**, 12–16 (2009).
224. Vafa, M. *et al.* Associations between the IL-4 -590 T allele and Plasmodium falciparum infection prevalence in asymptomatic Fulani of Mali. *Microbes Infect.* **9**, 1043–1048 (2007).
225. Nasr, A. *et al.* Antibody responses to P. falciparum Apical Membrane Antigen 1(AMA-1) in relation to haemoglobin S (HbS), HbC, G6PD and ABO blood groups among Fulani and Masaleit living in Western Sudan. *Acta Trop.* **182**, 115–123 (2018).
226. Cherif, M. *et al.* Distribution of FcγR gene polymorphisms among two sympatric populations in Mali: differing allele frequencies, associations with malarionometric indices and implications for genetic susceptibility to malaria. *Malar. J.* **15**, 29 (2016).
227. Pandey, J. P., Nasr, A., Rocca, K. M., Troy-Blomberg, M. & Elghazali, G. Significant differences in GM allotype frequencies between two sympatric tribes with markedly differential susceptibility to malaria. *Parasite Immunol.* **29**, 267–269 (2007).
228. Chaves, L. F., Taleo, G., Kalkoa, M. & Kaneko, A. Spleen rates in children: an old and new surveillance tool for malaria elimination initiatives in island settings. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **105**, 226–231 (2011).
229. Hackett, L. Spleen measurement in malaria. *J Natl Mal Soc* **3**, 121–133 (1944).
230. Dolo, A. *et al.* [Humoral immune anti-Plasmodium falciparum AMA1 and MSP1 response in two ethnic groups living in sympatry in Mali]. *Bull Soc Pathol Exot* **105**, 364–369 (2012).
231. Dolo, A. *et al.* [Place of malaria among febrile illnesses in two ethnic tribes living in sympatry in Mali from 1998 to 2008]. *Bull Soc Pathol Exot* **105**, 377–383 (2012).
232. Mangano, V. D. *et al.* Interferon regulatory factor-1 polymorphisms are associated with the control of Plasmodium falciparum infection. *Genes Immun.* **9**, 122–129 (2008).
233. Modiano, D. *et al.* Different response to Plasmodium falciparum malaria in west African sympatric ethnic groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13206–13211 (1996).
234. Paganotti, G. M. *et al.* Genetic complexity of Plasmodium falciparum in two ethnic groups of Burkina Faso with marked differences in susceptibility to malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**, 173–178 (2004).
235. Sanou, G. S. *et al.* Haematological parameters, natural regulatory CD4 + CD25 + FOXP3+ T cells and γδ T cells among two sympatric ethnic groups having different susceptibility to malaria in Burkina Faso. *BMC Res Notes* **5**, 76 (2012).
236. Modiano, D. *et al.* Humoral response to Plasmodium falciparum Pf155/ring-infected erythrocyte surface antigen and Pf332 in three sympatric ethnic groups of Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**, 220–224 (1998).
237. Cherif, M. K. *et al.* FcγRIIa polymorphism and anti-malaria-specific IgG and IgG subclass responses in populations differing in susceptibility to malaria in Burkina Faso. *Scand. J. Immunol.* **75**, 606–613 (2012).
238. Vafa, M. *et al.* Impact of the IL-4 -590 C/T transition on the levels of Plasmodium falciparum specific IgE, IgG, IgG subclasses and total IgE in two sympatric ethnic groups living in Mali. *Microbes Infect.* **11**, 779–784 (2009).

239. Quin, J. E. *et al.* Major transcriptional changes observed in the Fulani, an ethnic group less susceptible to malaria. *Elife* **6**, (2017).
240. Paganotti, G. M. *et al.* Genetic complexity and gametocyte production of *Plasmodium falciparum* in Fulani and Mossi communities in Burkina Faso. *Parasitology* **132**, 607–614 (2006).
241. Traore, K. *et al.* Interaction between environment, nutrient-derived metabolites and immunity: A possible role in malaria susceptibility/resistance in Fulani and Dogon of Mali. *PLoS ONE* **12**, e0189724 (2017).
242. Arama, C. *et al.* Genetic Resistance to Malaria Is Associated With Greater Enhancement of Immunoglobulin (Ig)M Than IgG Responses to a Broad Array of *Plasmodium falciparum* Antigens. *Open Forum Infect Dis* **2**, ofv118 (2015).
243. Portugal, S. *et al.* B cell analysis of ethnic groups in Mali with differential susceptibility to malaria. *Malar. J.* **11**, 162 (2012).
244. Arama, C. *et al.* Interethnic differences in antigen-presenting cell activation and TLR responses in Malian children during *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS ONE* **6**, e18319 (2011).
245. Boström, S. *et al.* Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali. *Malar. J.* **11**, 109 (2012).
246. Bereczky, S. *et al.* Spleen enlargement and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infection in two ethnic groups with different malaria susceptibility in Mali, West Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**, 248–257 (2006).
247. Djimdé, A. A. *et al.* Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **69**, 558–563 (2003).
248. Dolo, A. *et al.* [Relationship between malaria and anemia in two ethnic groups living in sympatry in Mali]. *Bull Soc Pathol Exot* **105**, 370–376 (2012).
249. Perdijk, O. *et al.* Haptoglobin phenotype prevalence and cytokine profiles during *Plasmodium falciparum* infection in Dogon and Fulani ethnic groups living in Mali. *Malar. J.* **12**, 432 (2013).
250. Torcia, M. G. *et al.* Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 646–651 (2008).
251. Bouharoun-Tayoun, H., Attanath, P., Sabchareon, A., Chongsuphajaisiddhi, T. & Druilhe, P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *Journal of Experimental Medicine* **172**, 1633–1641 (1990).
252. Bolad, A. *et al.* Distinct interethnic differences in immunoglobulin G class/subclass and immunoglobulin M antibody responses to malaria antigens but not in immunoglobulin G responses to nonmalarial antigens in sympatric tribes living in West Africa. *Scand. J. Immunol.* **61**, 380–386 (2005).
253. Modiano, D. *et al.* Interethnic differences in the humoral response to non-repetitive regions of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**, 663–667 (1999).
254. Rizzo, C. *et al.* IgG1 and IgG4 antibody responses to the *Anopheles gambiae* salivary protein gSG6 in the sympatric ethnic groups Mossi and Fulani in a malaria hyperendemic area of Burkina Faso. *PLoS ONE* **9**, e96130 (2014).
255. Rizzo, C. *et al.* Humoral response to the *Anopheles gambiae* salivary protein gSG6: a serological indicator of exposure to Afrotropical malaria vectors. *PLoS ONE* **6**, e17980 (2011).
256. Dolo, A. *et al.* [Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (A-376/202) in three Malian ethnic groups]. *Bull Soc Pathol Exot* **107**, 165–170 (2014).
257. Modiano, D. *et al.* The lower susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria of Fulani of Burkina Faso (west Africa) is associated with low frequencies of classic malaria-resistance genes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**, 149–152 (2001).

258. Nasr, A., Elghazali, G., Giha, H., Troye-Blomberg, M. & Berzins, K. Interethnic differences in carriage of haemoglobin AS and Fcγ₂ receptor IIa (CD32) genotypes in children living in eastern Sudan. *Acta Trop.* **105**, 191–195 (2008).
259. Luoni, G. *et al.* Antimalarial antibody levels and IL4 polymorphism in the Fulani of West Africa. *Genes Immun.* **2**, 411–414 (2001).
260. Nasr, A. *et al.* Fcγ₂ receptor IIa (CD32) polymorphism and anti-malarial IgG subclass pattern among Fulani and sympatric ethnic groups living in eastern Sudan. *Malar. J.* **8**, 43 (2009).
261. Delaitre, B. & Varet, B. *La rate.* (Springer-Verlag, 1989).
262. Dittrich, M., Milde, S., Dinkel, E., Baumann, W. & Weitzel, D. Sonographic biometry of liver and spleen size in childhood. *Pediatr Radiol* **13**, 206–211 (1983).
263. Varga, I., Babala, J. & Kachlik, D. Anatomic variations of the spleen: current state of terminology, classification, and embryological background. *Surg Radiol Anat* **40**, 21–29 (2018).
264. Krieken, J. H. J. M. van. *Encyclopedia of pathology.* (2018).
265. Barcroft, J. & Poole, L. T. The blood in the spleen pulp. *The Journal of Physiology* **64**, 23–29 (1927).
266. Qvist, J. *et al.* Hemoglobin concentrations and blood gas tensions of free-diving Weddell seals. *J. Appl. Physiol.* **61**, 1560–1569 (1986).
267. Hurford, W. E. *et al.* Splenic contraction during breath-hold diving in the Korean ama. *J. Appl. Physiol.* **69**, 932–936 (1990).
268. Ilardo, M. A. *et al.* Physiological and Genetic Adaptations to Diving in Sea Nomads. *Cell* **173**, 569–580.e15 (2018).
269. Schagatay, E., Richardson, M. X. & Lodin-Sundström, A. Size matters: spleen and lung volumes predict performance in human apneic divers. *Front Physiol* **3**, 173 (2012).
270. Mebius, R. E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 606–616 (2005).
271. Batteux, F., Garraud, O., Prin, L., Renaudineau, Y. & Vallat, L. Lymphocytes B: diversité, ontogénèse, différenciation et activation. (2011).
272. Kang, Y.-S. *et al.* The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 215–220 (2004).
273. Steiniger, B. S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology* **145**, 334–346 (2015).
274. Bowdler, A. J. *The Complete Spleen: Structure, Function, and Clinical Disorders.* (Humana Press, 2010).
275. Laub, M. *et al.* Spleen emptying and venous hematocrit in humans during exercise. *J. Appl. Physiol.* **74**, 1024–1026 (1993).
276. Borges da Silva, H. *et al.* Splenic Macrophage Subsets and Their Function during Blood-Borne Infections. *Front Immunol* **6**, 480 (2015).
277. Kurotaki, D., Uede, T. & Tamura, T. Functions and development of red pulp macrophages. *Microbiology and Immunology* **59**, 55–62 (2015).
278. Nagelkerke, S. Q. *et al.* Red pulp macrophages in the human spleen are a distinct cell population with a unique expression of Fcγ receptors. *Blood Advances* **2**, 941–953 (2018).
279. Ganz, T. Macrophages and Iron Metabolism. *Microbiology Spectrum* **4**, (2016).
280. Kim, C. C. *et al.* Splenic Red Pulp Macrophages Produce Type I Interferons as Early Sentinels of Malaria Infection but Are Dispensable for Control. *PLoS One* **7**, (2012).
281. Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A. & Merad, M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* **15**, 731–744 (2015).
282. A-Gonzalez, N. *et al.* The nuclear receptor LXRα controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nat. Immunol.* **14**, 831–839 (2013).

283. Backer, R. *et al.* Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 216–221 (2010).
284. Beattie, L., Engwerda, C. R., Wykes, M. & Good, M. F. CD8+ T lymphocyte-mediated loss of marginal metallophilic macrophages following infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *J. Immunol.* **177**, 2518–2526 (2006).
285. Vinuesa, C. G., Sanz, I. & Cook, M. C. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 845–857 (2009).
286. Weller, S. *et al.* Human blood IgM ‘memory’ B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **104**, 3647–3654 (2004).
287. Weill, J.-C., Weller, S. & Reynaud, C.-A. Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 267–285 (2009).
288. Weller, S. *et al.* IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-, MyD88-, and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients. *Blood* **120**, 4992–5001 (2012).
289. Ubillos, I. *et al.* Chronic Exposure to Malaria Is Associated with Inhibitory and Activation Markers on Atypical Memory B Cells and Marginal Zone-Like B Cells. *Front Immunol* **8**, (2017).
290. Crosby, W. H. Normal functions of the spleen relative to red blood cells: a review. *Blood* **14**, 399–408 (1959).
291. Crosby, W. H. Siderocytes and the spleen. *Blood* **12**, 165–170 (1957).
292. Angus, B. J., Chotivanich, K., Udomsangpetch, R. & White, N. J. In vivo removal of malaria parasites from red blood cells without their destruction in acute falciparum malaria. *Blood* **90**, 2037–2040 (1997).
293. Schnitzer, B., Sodeman, T., Mead, M. L. & Contacos, P. G. Pitting function of the spleen in malaria: ultrastructural observations. *Science* **177**, 175–177 (1972).
294. Chotivanich, K. *et al.* The mechanisms of parasite clearance after antimalarial treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* **182**, 629–633 (2000).
295. Jauréguiberry, S. *et al.* Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins. *Blood* **124**, 167–175 (2014).
296. Ndour, P. A. *et al.* *Plasmodium falciparum* clearance is rapid and pitting independent in immune Malian children treated with artesunate for malaria. *J. Infect. Dis.* **211**, 290–297 (2015).
297. Newton, P. N. *et al.* A comparison of the in vivo kinetics of *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen-positive and -negative erythrocytes. *Blood* **98**, 450–457 (2001).
298. Buffet, P. A. *et al.* Ex vivo perfusion of human spleens maintains clearing and processing functions. *Blood* **107**, 3745–3752 (2006).
299. Ganz, T. Macrophages and Systemic Iron Homeostasis. *Journal of Innate Immunity* **4**, 446–453 (2012).
300. Kristinsson, S. Y., Gridley, G., Hoover, R. N., Check, D. & Landgren, O. Long-term risks after splenectomy among 8,149 cancer-free American veterans: a cohort study with up to 27 years follow-up. *Haematologica* **99**, 392–398 (2014).
301. Linet, M. *et al.* Risk of cancer following splenectomy. *Int J Cancer* **66**, 611–616 (1996).
302. Robinette, C. D. & Fraumeni, J. F. Splenectomy and subsequent mortality in veterans of the 1939–45 war. *Lancet* **2**, 127–129 (1977).
303. Bach, O. *et al.* Falciparum malaria after splenectomy: a prospective controlled study of 33 previously splenectomized Malawian adults. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**, 861–867 (2005).
304. Kho, S. *et al.* High risk of *Plasmodium vivax* malaria following splenectomy in Papua, Indonesia. *Clin. Infect. Dis.* (2018). doi:10.1093/cid/ciy403

305. Luethy, P. M. *et al.* Diagnostic challenges of prolonged post-treatment clearance of Plasmodium nucleic acids in a pre-transplant autosplenectomized patient with sickle cell disease. *Malar. J.* **17**, 23 (2018).
306. Tagariello, G. *et al.* Dramatic post-splenectomy onset of malaria caused by latent Plasmodium vivax in a female immigrant with severe immunological anaemia. *Blood Transfus* **12**, 428–430 (2014).
307. Boo, Y. L., Lim, H. T., Chin, P. W., Lim, S. Y. & Hoo, F. K. A case of severe Plasmodium knowlesi in a splenectomized patient. *Parasitol. Int.* **65**, 55–57 (2016).
308. Barber, B. E. *et al.* A Prospective Comparative Study of Knowlesi, Falciparum, and Vivax Malaria in Sabah, Malaysia: High Proportion With Severe Disease From Plasmodium Knowlesi and Plasmodium Vivax But No Mortality With Early Referral and Artesunate Therapy. *Clin Infect Dis* **56**, 383–397 (2013).
309. Ram, S., Lewis, L. A. & Rice, P. A. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 740–780 (2010).
310. Hommel, B., Galloula, A., Simon, A. & Buffet, P. Hyposplenism revealed by Plasmodium malariae infection. *Malar. J.* **12**, 271 (2013).
311. Gómez-Pérez, G. P., van Bruggen, R., Grobusch, M. P. & Dobaño, C. Plasmodium falciparum malaria and invasive bacterial co-infection in young African children: the dysfunctional spleen hypothesis. *Malar. J.* **13**, 335 (2014).
312. Di Sabatino, A., Carsetti, R. & Corazza, G. R. Post-splenectomy and hyposplenic states. *The Lancet* **378**, 86–97 (2011).
313. Baker, W., Dempster, T. & Yule, H. Organic disease of the spleen as a test for detecting malarious localities in hot climates. (1868).
314. Dempster, T. Notes on the application of the test of organic disease of the spleen, as an easy and certain method of detecting malarious localities in hot climates, Agra. *Rec Malar Surv India* **1**, (1930).
315. Malaria Conference in Equatorial Africa (1950: Kampala, U., Organization, W. H. & Sahara, C. for T. C. in A. S. of the. Report on the Malaria Conference in Equatorial Africa, held under the joint auspices of the World Health Organization and the Commission for Technical Co-operation in Africa South of the Sahara, Kampala, Uganda, 27 November-9 December 1950. *Wld Hlth Organ. Tech. Rep. Ser.* **38**, 1–72 (1951).
316. Cox, J., Craig, M., Le Sueur, D. & Sharp, B. Mapping malaria risks in the highlands of Africa. (1999).
317. Baird, K., Bangs, M., Maguire, J. D. & Barcus, M. J. Epidemiological Measures of Risk of Malaria. in *Malaria methods and protocols* **72**, 13–22 (Denise L Doolan, 2002).
318. Marcano, T. J., Morgado, A., Tosta, C. E. & Coura, J. R. Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **99**, 369–376 (2004).
319. Snow, R. W. *et al.* Sporozoite antibodies and malaria in children in a rural area of The Gambia. *Ann Trop Med Parasitol* **83**, 559–568 (1989).
320. May, J. *et al.* High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**, 339–343 (1999).
321. Chene, A. *et al.* Endemic Burkitt's lymphoma as a polymicrobial disease: new insights on the interaction between Plasmodium falciparum and Epstein-Barr virus. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 411–420 (2009).
322. Färnert, A. *et al.* Epidemiology of malaria in a village in the Rufiji River Delta, Tanzania: declining transmission over 25 years revealed by different parasitological metrics. *Malar. J.* **13**, 459 (2014).

323. Miller, L. H., Usami, S. & Chien, S. Alteration in the rheologic properties of Plasmodium knowlesi-infected red cells. A possible mechanism for capillary obstruction. *J. Clin. Invest.* **50**, 1451–1455 (1971).
324. Cranston, H. A. *et al.* Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability. *Science* **223**, 400–403 (1984).
325. Nash, G. B., O'Brien, E., Gordon-Smith, E. C. & Dormandy, J. A. Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by Plasmodium falciparum. *Blood* **74**, 855–861 (1989).
326. Naumann, K. M., Jones, G. L., Saul, A. & Smith, R. Parasite-induced changes to localized erythrocyte membrane deformability in Plasmodium falciparum cultures. *Immunol. Cell Biol.* **70 (Pt 4)**, 267–275 (1992).
327. Dondorp, A. M., Omodeo-Salè, F., Chotivanich, K., Taramelli, D. & White, N. J. Oxidative stress and rheology in severe malaria. *Redox Rep.* **8**, 292–294 (2003).
328. Omodeo-Salè, F., Motti, A., Dondorp, A., White, N. J. & Taramelli, D. Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by Plasmodium falciparum haem products. *Eur. J. Haematol.* **74**, 324–332 (2005).
329. Lavazec, C. Molecular mechanisms of deformability of Plasmodium-infected erythrocytes. *Curr. Opin. Microbiol.* **40**, 138–144 (2017).
330. Shi, H. *et al.* Life cycle-dependent cytoskeletal modifications in Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *PLoS ONE* **8**, e61170 (2013).
331. Zhang, Y. *et al.* Multiple stiffening effects of nanoscale knobs on human red blood cells infected with Plasmodium falciparum malaria parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 6068–6073 (2015).
332. Safeukui, I. *et al.* Surface area loss and increased sphericity account for the splenic entrapment of subpopulations of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes. *PLoS ONE* **8**, e60150 (2013).
333. Herricks, T., Antia, M. & Rathod, P. K. Deformability limits of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Cell. Microbiol.* **11**, 1340–1353 (2009).
334. Mills, J. P. *et al.* Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cells harboring Plasmodium falciparum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 9213–9217 (2007).
335. Diez-Silva, M. *et al.* Pf155/RESA protein influences the dynamic microcirculatory behavior of ring-stage Plasmodium falciparum infected red blood cells. *Sci Rep* **2**, 614 (2012).
336. Sisquella, X. *et al.* Plasmodium falciparum ligand binding to erythrocytes induce alterations in deformability essential for invasion. *Elife* **6**, (2017).
337. Pasvol, G. *et al.* Inhibition of malarial parasite invasion by monoclonal antibodies against glycophorin A correlates with reduction in red cell membrane deformability. *Blood* **74**, 1836–1843 (1989).
338. Naumann, K. M., Jones, G. L., Saul, A. & Smith, R. A Plasmodium falciparum exo-antigen alters erythrocyte membrane deformability. *FEBS Lett.* **292**, 95–97 (1991).
339. Dondorp, A. M. *et al.* Prognostic significance of reduced red blood cell deformability in severe falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **57**, 507–511 (1997).
340. Dondorp, A. M., Kager, P. A., Vreeken, J. & White, N. J. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* **16**, 228–232 (2000).
341. Dondorp, A. M. *et al.* The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe falciparum malaria and its restoration by blood transfusion. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **96**, 282–286 (2002).
342. Paul, A., Pallavi, R., Tatu, U. S. & Natarajan, V. The bystander effect in optically trapped red blood cells due to Plasmodium falciparum infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **107**, 220–223 (2013).
343. Safeukui, I. *et al.* Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen. *Blood* **112**, 2520–2528 (2008).

344. Herricks, T., Seydel, K. B., Molyneux, M., Taylor, T. & Rathod, P. K. Estimating physical splenic filtration of Plasmodium falciparum-infected red blood cells in malaria patients. *Cell. Microbiol.* **14**, 1880–1891 (2012).
345. Looareesuwan, S. *et al.* Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.* **317**, 675–679 (1987).
346. Looareesuwan, S. *et al.* Reduced erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients. *Br. J. Haematol.* **67**, 473–478 (1987).
347. White, N. J. Anaemia and malaria. *Malaria Journal* **17**, 371 (2018).
348. Kotlyar, S. *et al.* Spleen volume and clinical disease manifestations of severe Plasmodium falciparum malaria in African children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **108**, 283–289 (2014).
349. Giha, H. A., Elghazali, G., A-Elgadir, T. M. E., A-Elbasit, I. E. & Elbashir, M. I. Severe malaria in an unstable setting: clinical and laboratory correlates of cerebral malaria and severe malarial anemia and a paradigm for a simplified severity scoring. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 661–665 (2009).
350. Prommano, O. *et al.* A quantitative ultrastructural study of the liver and the spleen in fatal falciparum malaria. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **36**, 1359–1370 (2005).
351. Douglas, N. M. *et al.* The anaemia of Plasmodium vivax malaria. *Malar. J.* **11**, 135 (2012).
352. Jakeman, G. N., Saul, A., Hogarth, W. L. & Collins, W. E. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology* **119** (Pt 2), 127–133 (1999).
353. Price, R. N. *et al.* Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**, 614–622 (2001).
354. Harnagel, E. E. & Rhudy, F. V. Falciparum malaria; report of a fatal case and autopsy findings. *Calif Med* **81**, 89–91 (1954).
355. Muehlethaler, K., Scheurer, E., Zollinger, U., Markwalder, R. & Nguyen, X. M. Fulminant cerebral malaria in a Swiss patient. *Infection* **33**, 33–35 (2005).
356. Dondorp, A. M. *et al.* Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**, 733–737 (1999).
357. Helegbe, G. K. *et al.* Complement activation in Ghanaian children with severe Plasmodium falciparum malaria. *Malar. J.* **6**, 165 (2007).
358. Fendel, R. *et al.* Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia. *PLoS ONE* **5**, e10038 (2010).
359. Waitumbi, J. N., Opollo, M. O., Muga, R. O., Misore, A. O. & Stoute, J. A. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe plasmodium falciparum anemia. *Blood* **95**, 1481–1486 (2000).
360. Goka, B. Q. *et al.* Complement binding to erythrocytes is associated with macrophage activation and reduced haemoglobin in Plasmodium falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**, 545–549 (2001).
361. Safeukui, I. *et al.* Malaria induces anemia through CD8+ T cell-dependent parasite clearance and erythrocyte removal in the spleen. *MBio* **6**, (2015).
362. Surgical Memoranda. *Br Med J* **2**, 403–404 (1874).
363. Imbert, P., Rapp, C. & Buffet, P. A. Pathological rupture of the spleen in malaria: analysis of 55 cases (1958–2008). *Travel Med Infect Dis* **7**, 147–159 (2009).
364. Kwak, Y. G., Lee, H. K., Kim, M., Um, T. H. & Cho, C. R. Clinical characteristics of vivax malaria and analysis of recurred patients. *Infect Chemother* **45**, 69–75 (2013).
365. Lacerda, M. V. G. *et al.* Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of Plasmodium vivax malaria: to what extent does this parasite kill? *Clin. Infect. Dis.* **55**, e67–74 (2012).

366. Kim, E. M. *et al.* Abdominal computed tomography findings of malaria infection with *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 1202–1205 (2010).
367. Zingman, B. S. & Viner, B. L. Splenic complications in malaria: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **16**, 223–232 (1993).
368. Kim, N. H., Lee, K. H., Jeon, Y. S., Cho, S. G. & Kim, J. H. Spontaneous splenic rupture in a vivax malaria case treated with transcatheter coil embolization of the splenic artery. *Korean J. Parasitol.* **53**, 215–218 (2015).
369. Ribordy, V., Schaller, M.-D., Martinet, O., Doenz, F. & Liaudet, L. Spontaneous rupture of the spleen during malaria treated with transcatheter coil embolization of the splenic artery. *Intensive Care Med* **28**, 996 (2002).
370. Croft, D. N. & Dawson, J. L. Spontaneous subcapsular splenic haematoma in acute malaria. *Postgrad Med J* **38**, 123–124 (1962).
371. de Lacerda, M. V. G., de Oliveira, S. L. & Alecrim, M. das G. C. Splenic hematoma in a patient with *Plasmodium vivax* malaria. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **40**, 96–97 (2007).
372. Christoforov, B. *et al.* [Splenic infarction in primary *Plasmodium falciparum* infection]. *Ann Med Interne (Paris)* **127**, 47–49 (1976).
373. Wojnarski, M. *et al.* *Plasmodium falciparum* Clearance Is Pitting-Dependent With Artemisinin-Based Drugs but Pitting-Independent With Atovaquone-Proguanil or Mefloquine. *J Infect Dis* doi:10.1093/infdis/jiz115
374. Ndour, P. A. *et al.* Role of Spleen in Human Malaria. in *Encyclopedia of Malaria* (2015).
375. Huang, S. *et al.* Dynamic deformability of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes exposed to artesunate in vitro. *Integr Biol (Camb)* **5**, 414–422 (2013).
376. Zoller, T. *et al.* Intravenous artesunate for severe malaria in travelers, Europe. *Emerging Infect. Dis.* **17**, 771–777 (2011).
377. Caramello, P. *et al.* Severe malaria, artesunate and haemolysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2053–2054 (2012).
378. Rolling, T. *et al.* Post-treatment haemolysis in severe imported malaria after intravenous artesunate: case report of three patients with hyperparasitaemia. *Malar. J.* **11**, 169 (2012).
379. Jauréguiberry, S. *et al.* Delayed-Onset Hemolytic Anemia in Patients with Travel-Associated Severe Malaria Treated with Artesunate, France, 2011–2013. *Emerg Infect Dis* **21**, 804–812 (2015).
380. Rolling, T. *et al.* Delayed hemolysis after treatment with parenteral artesunate in African children with severe malaria--a double-center prospective study. *J. Infect. Dis.* **209**, 1921–1928 (2014).
381. Sowunmi, A. *et al.* Clinical illness and outcomes in Nigerian children with late-appearing anaemia after artemisinin-based combination treatments of uncomplicated falciparum malaria. *BMC Infect. Dis.* **16**, 240 (2016).
382. Meibalan, E. & Marti, M. Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, (2017).
383. Bachmann, A. *et al.* Absence of erythrocyte sequestration and lack of multicopy gene family expression in *Plasmodium falciparum* from a splenectomized malaria patient. *PLoS ONE* **4**, e7459 (2009).
384. Aingaran, M. *et al.* Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell. Microbiol.* **14**, 983–993 (2012).
385. Tibúrcio, M. *et al.* A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood* **119**, e172–e180 (2012).
386. Buffet, P. A. *et al.* Method for screening compounds for their ability to increase rigidity of red blood cells infected by a protozoan parasite of the genus plasmodium and application thereof. European Patent Application EP 2 128 613 A1. (2009).

387. Naissant, B. *et al.* Plasmodium falciparum STEVOR phosphorylation regulates host erythrocyte deformability enabling malaria parasite transmission. *Blood* **127**, e42-53 (2016).
388. Tsertsvadze, A. *et al.* Oral phosphodiesterase-5 inhibitors and hormonal treatments for erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **151**, 650–661 (2009).
389. Archer, S. L. & Michelakis, E. D. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1864–1871 (2009).
390. Hawkes, N. Trial of Viagra for fetal growth restriction is halted after baby deaths. *BMJ* **362**, k3247 (2018).
391. Duez, J. *et al.* Splenic retention of Plasmodium falciparum gametocytes to block the transmission of malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 4206–4214 (2015).
392. Duez, J. *et al.* High-throughput microspherultration to assess red blood cell deformability and screen for malaria transmission-blocking drugs. *Nat Protoc* **13**, 1362–1376 (2018).
393. Duffy, S. & Avery, V. M. Development and optimization of a novel 384-well anti-malarial imaging assay validated for high-throughput screening. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, 84–92 (2012).
394. Bidegain, F. *et al.* Acute Plasmodium falciparum malaria following splenectomy for suspected lymphoma in 2 patients. *Clin. Infect. Dis.* **40**, e97-100 (2005).
395. Buffet, P. A., Safeukui, I., Milon, G., Mercereau-Puijalon, O. & David, P. H. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. *Curr. Opin. Hematol.* **16**, 157–164 (2009).
396. Crookston, B. T. *et al.* Exploring the relationship between chronic undernutrition and asymptomatic malaria in Ghanaian children. *Malar. J.* **9**, 39 (2010).
397. Akhwale, W. S. *et al.* Anemia and malaria at different altitudes in the western highlands of Kenya. *Acta Trop.* **91**, 167–175 (2004).
398. Brabin, B. J., Ginny, M., Sapau, J., Galme, K. & Paino, J. Consequences of maternal anaemia on outcome of pregnancy in a malaria endemic area in Papua New Guinea. *Ann Trop Med Parasitol* **84**, 11–24 (1990).
399. May, J. *et al.* Impact of subpatent multi-species and multi-clonal plasmodial infections on anaemia in children from Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**, 399–403 (2000).
400. Sumbele, I. U. N., Samje, M. & Nkuo-Akenji, T. A longitudinal study on anaemia in children with Plasmodium falciparum infection in the Mount Cameroon region: prevalence, risk factors and perceptions by caregivers. *BMC Infect. Dis.* **13**, 123 (2013).
401. Leishman, W. B. Note on the Nature of the Parasitic Bodies found in Tropical Splenomegaly. *Br Med J* **1**, 303 (1904).
402. Manson, P. & Low, G. C. The Leishman-Donovan Body and Tropical Splenomegaly. *Br Med J* **1**, 183–186 (1904).
403. Chaudhuri, R. N., Saha, T. K., Basu, S. P., Mukherjee, A. M. & Chaudhuri, M. N. R. Chronic splenomegaly. *Indian J. Med. Res.* **44**, 305–323 (1956).
404. Fawdry, A. L. Syndrome of splenomegaly, anaemia, and hepatomegaly often left-lobed, in South Arabia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **49**, 387–398 (1955).
405. Gebbie, D. A. *et al.* MALARIAL ANTIBODIES IN IDIOPATHIC SPLENOMEGALY IN UGANDA. *Lancet* **2**, 392–393 (1964).
406. Watson-Williams, E. J. & Allan, N. C. Idiopathic tropical splenomegaly syndrome in Ibadan. *Br Med J* **4**, 793–796 (1968).
407. Wells, J. V. Positive results to serological tests for rheumatoid factor in New Guinea. *Med. J. Aust.* **2**, 777–779 (1967).
408. Wells, J. V. Serum immunoglobulin levels in tropical splenomegaly syndrome in New Guinea. *Clinical and Experimental Immunology* **3**, 943 (1968).

409. Wells, J. V. Immunological studies in tropical splenomegaly syndrome. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **64**, 531–546 (1970).
410. Ziegler, J. L., Cohen, M. H. & Hutt, M. S. Immunological studies in tropical splenomegaly syndrome in Uganda. *Br Med J* **4**, 15–17 (1969).
411. Bryceson, A. D., Fleming, A. F. & Edington, G. M. Splenomegaly in Northern Nigeria. *Acta Trop.* **33**, 185–214 (1976).
412. DeCock, K. M. *et al.* Obscure splenomegaly in the tropics that is not the tropical splenomegaly syndrome. *Br Med J (Clin Res Ed)* **287**, 1347–1348 (1983).
413. Bates, I. & Bedu-Addo, G. Review of diagnostic criteria of hyper-reactive malarial splenomegaly. *Lancet* **349**, 1178 (1997).
414. De Cock, K. M. *et al.* Chronic splenomegaly in Nairobi, Kenya. I. Epidemiology, malarial antibody and immunoglobulin levels. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**, 100–106 (1987).
415. Bedu-Addo, G. & Bates, I. Causes of massive tropical splenomegaly in Ghana. *Lancet* **360**, 449–454 (2002).
416. Martin-Peprah, R., Bates, I., Bedu-Addo, G. & Kwiatkowski, D. P. Investigation of familial segregation of hyperreactive malarial splenomegaly in Kumasi, Ghana. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**, 68–73 (2006).
417. Ziegler, J. L. & Stuiiver, P. C. Tropical splenomegaly syndrome in a Rwandan kindred in Uganda. *Br Med J* **3**, 79–82 (1972).
418. Ackerman, L. Hyperreactive malarial syndrome. *J Am Board Fam Pract* **9**, 356–359 (1996).
419. Chim, C. S., Wong, S. S. Y., Lam, C. C. K. & Chan, K. W. Concurrent hyperreactive malarial splenomegaly and quartan malarial nephropathy - Plasmodium malariae revisited. *Haematologica* **89**, ECR21 (2004).
420. Palit, A. N. Splenectomy for Tropical Splenomegaly. *Ind Med Gaz* **70**, 243–247 (1935).
421. Pryor, D. S. The mechanism of anaemia in tropical splenomegaly. *Q. J. Med.* **36**, 337–356 (1967).
422. Maslin, J. *et al.* [A case of hyperreactive malarial splenomegaly]. *Med Trop (Mars)* **57**, 307–308 (1997).
423. Mitjà, O. *et al.* HMS-related hemolysis after acute attacks of Plasmodium vivax malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**, 616–618 (2011).
424. Puente, S. *et al.* The use of PCR in the diagnosis of hyper-reactive malarial splenomegaly (HMS). *Ann Trop Med Parasitol* **94**, 559–563 (2000).
425. Hommel, B. *et al.* Chronic malaria revealed by a new fluorescence pattern on the antinuclear autoantibodies test. *PLoS ONE* **9**, e88548 (2014).
426. Torres, J. R. *et al.* Low-grade parasitaemias and cold agglutinins in patients with hyper-reactive malarious splenomegaly and acute haemolysis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **97**, 125–130 (2003).
427. Van den Ende, J. *et al.* Hyperreactive malaria in expatriates returning from sub-Saharan Africa. *Trop. Med. Int. Health* **5**, 607–611 (2000).
428. Bisoffi, Z. *et al.* Early hyperreactive malarial splenomegaly and risk factors for evolution into the full-blown syndrome: a single-centre, retrospective, longitudinal study. *Malar J* **14**, (2015).
429. Puente, S., Subirats, M., Benito, A., Rubio, J. M. & González-Lahoz, J. M. Hyperreactive malarial splenomegaly in Europeans: report of five cases. *J Travel Med* **8**, 322–324 (2001).
430. Bisoffi, Z. *et al.* Chronic malaria and hyper-reactive malarial splenomegaly: a retrospective study on the largest series observed in a non-endemic country. *Malar J* **15**, (2016).
431. No authors listed. Tropical splenomegaly syndrome. *Br Med J* **4**, 614 (1967).
432. Molyneux, E. M. *et al.* Burkitt's lymphoma. *Lancet* **379**, 1234–1244 (2012).
433. Robbiani, D. F. *et al.* Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. *Cell* **162**, 727–737 (2015).

434. Torgbor, C. *et al.* A multifactorial role for *P. falciparum* malaria in endemic Burkitt's lymphoma pathogenesis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004170 (2014).
435. Donati, D. *et al.* Identification of a Polyclonal B-Cell Activator in *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity* **72**, 5412–5418 (2004).
436. Chêne, A. *et al.* A Molecular Link between Malaria and Epstein–Barr Virus Reactivation. *PLOS Pathogens* **3**, e80 (2007).
437. Ziegler, J. L., Bluming, A. Z. & Templeton, A. C. Burkitt's lymphoma and tropical splenomegaly syndrome. *Lancet* **2**, 317 (1971).
438. Thorley-Lawson, D., Deitsch, K. W., Duca, K. A. & Torgbor, C. The Link between *Plasmodium falciparum* Malaria and Endemic Burkitt's Lymphoma—New Insight into a 50-Year-Old Enigma. *PLOS Pathogens* **12**, e1005331 (2016).
439. Bates, I., Bedu-Addo, G., Rutherford, T. & Bevan, D. H. Splenic lymphoma with villous lymphocytes in tropical West Africa. *Lancet* **340**, 575–577 (1992).
440. Bates, I., Bedu-Addo, G., Rutherford, T. R. & Bevan, D. H. Circulating villous lymphocytes—a link between hyperreactive malarial splenomegaly and splenic lymphoma. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**, 171–174 (1997).
441. Jimmy, E. O., Bedu-Addo, G., Bates, I., Bevan, D. & Rutherford, T. R. Immunoglobulin gene polymerase chain reaction to distinguish hyperreactive malarial splenomegaly from 'African' chronic lymphocytic leukaemia and splenic lymphoma. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**, 37–39 (1996).
442. Vineis, P. *et al.* Haematopoietic cancer and medical history: a multicentre case control study. *J Epidemiol Community Health* **54**, 431–436 (2000).
443. Dascalescu, C. M. & Najman, A. Splénomégales tropicales : splénomégalie palustre hyperréactive et lymphome splénique tropical à lymphocytes villeux. *Hématologie* **11**, 259–263 (2005).
444. Belhadj, K. *et al.* Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood* **102**, 4261–4269 (2003).
445. Chauvet, E., Misslin, C., Randrianjohany, A., Gaulard, P. & Daigre, J.-L. [Gamma-delta T-cell lymphoma: outcome of a hyperactive malarial splenomegaly?]. *Rev Med Interne* **30**, 85–87 (2009).
446. Hassan, R. *et al.* Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma following seven malaria infections. *Pathol. Int.* **56**, 668–673 (2006).
447. Traverse-Glehen, A. *et al.* Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood* **111**, 2253–2260 (2008).
448. Hermine, O. *et al.* Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 89–94 (2002).
449. Suarez, F., Lortholary, O., Hermine, O. & Lecuit, M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* **107**, 3034–3044 (2006).
450. Bates, I., Bedu-Addo, G., Bevan, D. H. & Rutherford, T. R. Use of immunoglobulin gene rearrangements to show clonal lymphoproliferation in hyper-reactive malarial splenomegaly. *Lancet* **337**, 505–507 (1991).
451. Sagoe, A. S. Tropical splenomegaly syndrome: long-term proguanil therapy correlated with spleen size, serum IgM, and lymphocyte transformation. *Br Med J* **3**, 378–382 (1970).
452. Hahonou, E. K. Pourquoi pas nous ? Statut social et « adultéité politique » des femmes gando au Bénin. *Autrepart* **61**, 157 (2012).
453. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1) (<http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, accessed 2018). (2011).

454. Fleiss, J. L. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychological Bulletin* **76**, 378–382 (1971).
455. Chow, K. U., Luxembourg, B., Seifried, E. & Bonig, H. Spleen Size Is Significantly Influenced by Body Height and Sex: Establishment of Normal Values for Spleen Size at US with a Cohort of 1200 Healthy Individuals. *Radiology* **279**, 306–313 (2016).
456. Dănilă, M. The ultrasound examination of the spleen. *Med Ultrason* **12**, 253–254 (2010).
457. Ehimwenma, O. & Tagbo, M. T. Determination of normal dimension of the spleen by ultrasound in an endemic tropical environment. *Nigerian Medical Journal* **52**, 198 (2011).
458. Mustapha, Z., Tahir, A., Tukur, M., Bukar, M. & Lee, W.-K. Sonographic determination of normal spleen size in an adult African population. *European Journal of Radiology* **75**, e133–e135 (2010).
459. *Pediatric clinical chemistry: reference (normal) values*. (AACC Press, 1989).
460. OMS. Concentrations sériques de ferritine permettant d'évaluer le statut et les carences en fer dans les populations. (2011).
461. Landis, J. R. & Koch, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**, 159–174 (1977).
462. Buffet, P. A., Safeukui, I., Milon, G., Mercereau-Puijalon, O. & David, P. H. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. *Curr. Opin. Hematol.* **16**, 157–164 (2009).
463. Maazoun, F. *et al.* [Hyper-reactive malarial splenomegaly]. *Rev Med Interne* **36**, 753–759 (2015).
464. Bedu-Addo, G. & Bates, I. Causes of massive tropical splenomegaly in Ghana. *Lancet* **360**, 449–454 (2002).
465. *Report on the Malaria Conference in Equatorial Africa, held under the joint auspices of the World Health Organization and the Commission for Technical Co-operation in Africa South of the Sahara, Kampala, Uganda, 27 November-9 December 1950*. (World Health Organization, 1951).
466. Slater, H. C. *et al.* The temporal dynamics and infectiousness of subpatent Plasmodium falciparum infections in relation to parasite density. *Nature Communications* **10**, 1433 (2019).
467. Crawley, J. REDUCING THE BURDEN OF ANEMIA IN INFANTS AND YOUNG CHILDREN IN MALARIA-ENDEMIC COUNTRIES OF AFRICA: FROM EVIDENCE TO ACTION. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **71**, 25–34 (2004).
468. World Health Organization. The global prevalence of anemia in 2011. (2015).
469. Calis, J. C. J. *et al.* Severe Anemia in Malawian Children. *The New England Journal of Medicine* **358**, 888–99 (2008).
470. Ardiet, D.-L. *et al.* Patterns of malaria indices across three consecutive seasons in children in a highly endemic area of West Africa: a three times-repeated cross-sectional study. *Malaria Journal* **13**, 199 (2014).
471. Sanou, G. S. *et al.* Haematological parameters, natural regulatory CD4 + CD25 + FOXP3+ T cells and $\gamma\delta$ T cells among two sympatric ethnic groups having different susceptibility to malaria in Burkina Faso. *BMC Res Notes* **5**, 76 (2012).
472. Laman, M. *et al.* Ultrasonographic assessment of splenic volume at presentation and after anti-malarial therapy in children with malarial anaemia. *Malaria Journal* **14**, 219 (2015).
473. Murphy, S. *et al.* Ultrasound findings in Plasmodium falciparum malaria: A pilot study*. *Pediatric Critical Care Medicine* **12**, (2011).
474. Henry, B. *et al.* Red Blood Cell Deformability, Age, Ethnicity and Susceptibility to Malaria in Africa. in *Blood* **22**, 2441 (American Society of Hematology, 2016).
475. Bell, D. R., Wilson, D. W. & Martin, L. B. False-positive results of a Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2-detecting malaria rapid diagnostic test due to high sensitivity in a community with fluctuating low parasite density. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**, 199–203 (2005).

476. Clark, M. A. *et al.* Host iron status and iron supplementation mediate susceptibility to erythrocytic stage *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications* **5**, 4446 (2014).
477. Cameron, P. U. *et al.* Splenectomy Associated Changes in IgM Memory B Cells in an Adult Spleen Registry Cohort. *PLOS ONE* **6**, e23164 (2011).
478. Mohandas, N., Clark, M. R., Jacobs, M. S. & Shohet, S. B. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *J. Clin. Invest.* **66**, 563–573 (1980).
479. Safeukui, I. *et al.* Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen. *Blood* **120**, 424–430 (2012).
480. Safeukui, I. *et al.* Sensing of red blood cells with decreased membrane deformability by the human spleen. *Blood Adv* **2**, 2581–2587 (2018).
481. Renoux, C. *et al.* Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition. *Sci Rep* **9**, 6771 (2019).
482. Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C. & Sankaran, V. G. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br. J. Haematol.* **173**, 206–218 (2016).
483. Sok, D., Moldt, B. & Burton, D. R. SnapShot: broadly neutralizing antibodies. *Cell* **155**, 728–728.e1 (2013).
484. Maiga, B. *et al.* Human candidate polymorphisms in sympatric ethnic groups differing in malaria susceptibility in Mali. *PLoS ONE* **8**, e75675 (2013).
485. Spivak, J. L. Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine* **376**, 2168–2181 (2017).
486. James, C. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144–1148 (2005).
487. Klampfl, T. *et al.* Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine* **369**, 2379–2390 (2013).
488. Nangalia, J. *et al.* Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *The New England journal of medicine* **369**, 2391 (2013).
489. Pikman, Y. *et al.* MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS Medicine* **3**, (2006).
490. Roussel, C., Buffet, P. A. & Amireault, P. Measuring Post-transfusion Recovery and Survival of Red Blood Cells: Strengths and Weaknesses of Chromium-51 Labeling and Alternative Methods. *Frontiers in Medicine* **5**, (2018).
491. Giarratana, M.-C. *et al.* Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood* **118**, 5071–5079 (2011).
492. Singh, V. K., Saini, A., Tsuji, K., Sharma, P. B. & Chandra, R. Manufacturing blood ex vivo: a futuristic approach to deal with the supply and safety concerns. *Front Cell Dev Biol* **2**, 26 (2014).
493. Urban, B. C. *et al.* Fatal Plasmodium falciparum Malaria Causes Specific Patterns of Splenic Architectural Disorganization. *Infection and Immunity* **73**, 1986 (2005).