Thèse de doctorat de l'Université de Paris

Ecole doctorale 562 BioSPC

Institut Cochin INSERM U1016

Equipe Biologie de la Transmission de *Plasmodium*

Etude des interactions des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* avec les îlots érythroblastiques

Par Gaëlle NEVEU

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par le Dr Catherine Lavazec

Présentée et soutenue publiquement à l'Institut Cochin le 28 novembre 2019

Devant un jury composé de :

Pr Caroline Le Van Kim	Présidente du jury
Dr Olivier Silvie	Rapporteur
Dr Yaël Zermati	Rapporteure
Dr Geneviève Milon	Examinatrice
Dr Wassim El Nemer	Examinateur
Dr Catherine Lavazec	Directrice de thèse

Except where otherwise noted, this is work licensed under
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Résumé

Les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* sont les stades sexués du parasite et sont responsables de sa transmission de l'Homme au moustique. Chez l'Humain, ils sont localisés dans le parenchyme de la moelle osseuse, plus précisément au niveau des îlots érythroblastiques. Ces niches hématopoïétiques sont constituées d'un macrophage central entouré d'érythroblastes en cours de développement. Les mécanismes par lesquels les gamétocytes immatures sont séquestrés dans la moelle osseuse sont encore inconnus. Ce projet de thèse consiste à étudier deux hypothèses qui pourraient expliquer la nature des interactions entre les gamétocytes et les îlots érythroblastiques. La première hypothèse soutient que les érythrocytes infectés par des gamétocytes (EIG) peuvent adhérer aux érythroblastes via des interactions entre ligands et récepteurs. La seconde hypothèse propose que les parasites infectent les érythroblastes et que les gamétocytes s'y développent jusqu'à maturité. Chacun de ces deux mécanismes pourrait permettre aux gamétocytes d'être séquestré dans le parenchyme de la moelle osseuse.

Afin d'étudier la première hypothèse, nous avons mis au point un protocole d'adhérence de cellules en suspension et nous avons pu montrer que les EIG immatures n'adhèrent ni aux lignées érythroïdes ni aux érythroblastes primaires. Cependant, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que nos conditions expérimentales ne permettent pas de détecter une adhérence qui pourrait être due à des protéines appartenant à des familles multigéniques, comme c'est généralement le cas pour les phénomènes de cytoadhérence chez *P. falciparum*. En particulier, les protéines codées par la famille multigénique *stevor* ont été identifiées comme ayant des propriétés adhésives chez les stades asexués des parasites: ces protéines se lient à la glycophorine C (GPC) à la surface des érythrocytes. Les protéines STEVOR sont exprimées à la membrane des EIG et la GPC est présente chez les érythroblastes: ainsi les protéines STEVOR pourraient être impliquées dans l'adhérence des EIG aux érythroblastes. Pour tester cette hypothèse nous avons évalué l'adhérence des EIG de plusieurs clones de parasites exprimant différentes protéines STEVOR connues pour leurs propriétés adhésives au stade asexué. Nous avons également généré une lignée transgénique qui surexprime une protéine STEVOR capable de se lier à la GPC. Cependant, aucune adhérence significative de ces EIG aux

érythroblastes n'a pu être observée. Nous en avons conclu que la séquestration des gamétocytes immatures dans la moelle osseuse n'est probablement pas due à l'adhérence aux érythroblastes.

Pour étudier la seconde hypothèse nous avons développé un protocole d'infection des érythroblastes primaires humains par *P. falciparum*. Nous avons caractérisé le développement des gamétocytes au sein d'érythroblastes par microscopie à fluorescence et électronique : les gamétocytes se développant dans des érythroblastes présentent des structures caractéristiques du stade sexué et exportent leurs protéines dans la cellule. De plus, nous avons montré que seuls les stades tardifs d'érythroblastes permettent le développement des gamétocytes. Les gamétocytes immatures se développent entièrement dans les cellules nucléées, aboutissant à la présence de gamétocytes matures dans les réticulocytes. Alors que le développement des érythroblastes tardifs est habituellement beaucoup plus court que la maturation des gamétocytes, nous avons montré que le parasite retarde la différenciation érythropoïétique afin de finir sa maturation au sein d'une cellule nucléée. De plus, nous avons montré que les vésicules extracellulaires (VE) sécrétées par le parasite contribuent à ce retard érythropoïétique.

Cette étude suggère que les gamétocytes immatures pourraient être séquestrés dans la moelle osseuse en infectant les stades tardifs d'érythroblastes et en retardant leur différenciation par sécrétion de VE. Une fois matures, les gamétocytes au sein des réticulocytes pourraient sortir dans la circulation sanguine et être disponibles pour la transmission au moustique.

Abstract

Plasmodium falciparum gametocytes, the sexual stages responsible for parasite transmission, have been shown to sequester and develop in the human bone marrow parenchyma, where they are enriched at erythroblastic islands. These specialized niches, where occurs the terminal erythroid differentiation, consist of a macrophage surrounded by differentiating erythroblasts. Sequestration mechanisms of immature gametocytes in the parenchyma remain unknown. This PhD project addresses two hypotheses for gametocytes interactions with erythroblastic islands. The first hypothesis proposes that immature gametocytes may adhere to the erythroblasts constituting the island. The second hypothesis proposes that the parasite may infect erythroblasts and develop within these nucleated cells. Both mechanisms may allow gametocytes to sequester in the bone marrow parenchyma.

To address the first hypothesis, we set up a cell-cell adhesion protocol and we found that erythrocytes infected with immature gametocytes do not specifically adhere to primary erythroblasts or erythroid cell lines. However, we cannot rule out the possibility that our experimental conditions do not detect adhesion which may be due to proteins belonging to multigenic families, as it is generally the case for cytoadhesion in *P. falciparum*. In particular, proteins encoded by the *stevor* multigenic family exhibit adhesive properties in asexual stages: these proteins bind to the glycophorin C (GPC) on the surface of erythrocytes. STEVOR proteins have been detected at the membrane of gametocyte infected erythrocytes and GPC is expressed in erythroid precursors: thus, STEVOR proteins may promote the adhesion of immature gametocytes to erythroblasts. To test this hypothesis, we evaluated the adhesion of gametocytes from several clones expressing different STEVOR proteins presenting adhesive properties in asexual stages. We also generated and characterized a transgenic line that overexpresses a STEVOR protein known to bind to the GPC in asexual stages. However, no significant adhesion was observed between erythroblasts and erythrocytes infected by these gametocytes. Therefore, we concluded that sequestration of immature gametocytes in bone marrow is likely not mediated by adhesion to erythroblasts.

Then we focused on the second part of the project and we developed a protocol for infecting human primary erythroblasts with *P. falciparum*. We characterized gametocyte development in erythroid precursors by fluorescent microscopy and by electron microscopy: gametocytes in erythroblasts presented typical structures of sexual stages and exported proteins in the host cell. Furthermore, we have shown that only late stages erythroblasts supported the development of gametocytes. Surprisingly, gametocytes were able to complete their development within nucleated cells, resulting in the presence of mature gametocytes within reticulocytes, whereas the differentiation of late erythroblasts is usually much shorter than that of gametocytes. We therefore addressed the hypothesis that the parasite could delay the differentiation of its erythroblast host to complete its development within a nucleated cell. We confirmed this hypothesis by using a flow cytometry approach to show that extracellular vesicles secreted by the parasite are one of the parasitic factor responsible for this delay in erythropoiesis differentiation.

This study supports the hypothesis that immature gametocytes could sequester in the bone marrow parenchyma by infecting late stage erythroblasts. Gametocytes may complete their development within nucleated cells by delaying their conversion into reticulocytes through extracellular vesicles secretion. Once mature within reticulocytes, gametocytes could reach the blood circulation to be available for the transmission to mosquito.

Table des abréviations

4-HNE	4-HydroxyNonEnal
ACT	Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AFM	Microscopie de Force Atomique
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP2G	ApiAP2-Gamétocyte
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messager
BFU-E	Burst Forming Unit – Erythroid
CD	Cluster de différenciation
CFU-E	Colony Forming Unit – Erythroid
CLP	Progéniteurs Lymphoïdes Communs
CM	Milieu Conditionné
CMP	Progéniteurs Myéloïdes Communs
COS	CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material
C-ter	C-terminale
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
EIG	Erythrocytes infectés par des Gamétocytes
EPO	Erythropoietine
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
GDF15	Growth Differenciation Factor 15
GDV1	Gametocyte Development 1
GMP	Progéniteurs Granulo-Monocytaires
GPA	GlycoPhorine A
GPC	GlycoPhorine C
GR	Globule Rouge
hBMEC	human Brain Microvascular Endothelial Cells
hBM-MSC	human Bone Marrow-MeSenchymal Cells
HDA2	Histone Deacetylase 2
HES	Hematoxylin Eosin Saffron
HP1	Heterochromatin Protein 1
HSC	Cellules Souches Hématopoïétiques
IFN	Interféron
IgA	ImmunoGlobulines A
IgM	ImmunoGlobulines M
IL	InterLeukine

IMC	Inner Membrane Complex
KAHRP	Knob Associated Histidine-Rich Protein
LB	Lymphocytes B
LILRB1	Leucocyte Immunoblogulin-Like Receptor B1
LT	Lymphocytes T
LysoPC	lysoPhosphatidylCholine
MC	Maurer's Cleft
MEP	Progéniteurs Erythro-Mégacaryocytaires
miARN	Micro-ARN
MIF	Macrophage migration Inhibitory Factor
MPP	Progéniteurs MultiPotents
MSP1	Major Merozoïte Surface Protein 1
NCC	Next Cycle Conversion
NK	Natural Killer
NPP	New Permeability Pathway
N-ter	N-terminale
OB	Osmophilic Bodies
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDE	PhosphoDiEsterase
PEXEL/HT	*Plasmodium* EXport ELement / Host-Targeting
PfEMP1	*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1
PfGEXPs	*Plamodium falciparum* Gametocyte Exported Proteins
PKA	PhosphoKinase A
PNB	PolyNucléaires Basophiles
PNE	PolyNucléaires Eosinophiles
PNEPs	PEXEL-negative exported proteins
PNN	PolyNucléaires Neutrophiles
RH	Région Hypervariable
RESA	Ring-Erythrocyte Surface Antigen
rif	interspersed repetitive elements
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RT-qPCR	Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction
SAM	S-AdénosylMéthionine
SBP1	Skeleton Binding Protein 1
SCC	Same Cycle Conversion
SCF	Stem Cell Factor
STEVOR	Subtelomeric open reading frames
TGF	Transforming Growth Factor
TM	TransMembranaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
VE	Vésicules Extracellulaires
WGA	Wheat Germ Agglutinin

Table des matières

RESUME 1

ABSTRACT 3

TABLE DES ABREVIATIONS 5

TABLE DES MATIERES 7

INTRODUCTION 12

I. **LE PALUDISME ET *PLASMODIUM* 13**

1. **LE PALUDISME : PLUS GRANDE PARASITOSE MONDIALE 13**

a. Epidémiologie 13

b. Pathologie 13

c. Mesures de prévention et traitements 14

2. **LE PARASITE *PLASMODIUM* 15**

a. Le genre *Plasmodium* 15

b. Cycle biologique de *Plasmodium falciparum* 16

i. Stades hépatiques 16

ii. Stades érythrocytaires 16

iii. Développement chez le moustique 16

c. Séquestration et circulation des stades érythrocytaires 17

II. **LA GAMETOCYTOGENESE 18**

1. **ENGAGEMENT VERS LA VOIE SEXUEE 19**

a. Régulation génétique de l'engagement vers la gamétocytogenèse 19

b. Facteurs environnementaux régulant l'engagement vers la voie sexuée 20

2. **DEVELOPPEMENT DU GAMETOCYTE 22**

a. Morphologie des gamétocytes au cours de leur développement 22

b. Ultrastructure du gamétocyte 23

3. **GAMETOCYTES MALES ET FEMELLES 24**

III. **MODIFICATION DE LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE PAR LE GAMETOCYTE 25**

1. EXPORT DES PROTEINES A LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE 26

2. REORGANISATION DE LA STRUCTURE DU CYTOSQUELETTE ET DE LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE.. 29

3. CHANGEMENT DE LA DEFORMABILITE DE LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE 30

4. MODIFICATION DE LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE 31

5. MODIFICATION DES PROPRIETES ADHESIVES DES ERYTHROCYTES INFECTES 32

IV. STEVOR : UNE FAMILLE MULTIGENIQUE DE PROTEINES PARASITAIRES 35

1. LES FAMILLES MULTIGENIQUES CHEZ *PLASMODIUM* 35

2. EXPRESSION DES STEVORS AU COURS DU CYCLE PARASITAIRE 38

3. REGULATION DE L'EXPRESSION DES *STEVOR* 39

4. LOCALISATION ET STRUCTURE DES STEVORS 40

a. Localisation des STEVORs 40

b. Structure des STEVORs 41

5. FONCTIONS DES PROTEINES STEVOR 42

a. Invasion de l'érythrocyte 43

b. Déformabilité de l'érythrocyte parasité 43

c. Echappement au système immunitaire 44

d. Rosetting 44

V. LES INTERACTIONS ENTRE LE PARASITE ET LA MOELLE OSSEUSE 45

1. MOELLE OSSEUSE ET ERYTHROPOÏESE 45

a. Structure du parenchyme 46

b. Erythropoïèse 47

i. Erythropoïèse précoce 47

ii. Différenciation terminale 47

c. Ilots érythroblastiques 49

2. SEQUESTRATION DES GAMETOCYTES IMMATURES DANS LE PARENCHYME DE LA MOELLE OSSEUSE 50

a. Détection des gamétocytes dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse 50

b. Présence des gamétocytes immatures au contact des îlots érythroblastiques... 51

c. Infection des érythroblastes par le parasite 52

d. Mécanismes d'entrée des parasites dans le parenchyme de la moelle osseuse. 54

3. L'ERYTHROPOÏESE AFFECTEE PAR *PLASMODIUM* 54
a. Anémie 54
b. Perturbation de l'érythropoïèse 56
VI. HYPOTHESES DE SEQUESTRATION DES GAMETOCYTES DANS LE PARENCHYME DE LA MOELLE OSSEUSE ET OBJECTIFS DE LA THESE 59
1. RETENTION MECANIQUE 59
2. ADHERENCE 59
3. INFECTION DES ERYTHROBLASTES 60
RESULTATS 62
I. ETUDE DE L'ADHERENCE DES EIG IMMATURES AUX ERYTHROBLASTES PRIMAIRES HUMAINS 63
1. PREAMBULE 63
a. Contexte 63
b. Résultats 64
c. Conclusion 65
2. ARTICLE: *PLASMODIUM FALCIPARUM* GAMETOCYTE-INFECTED ERYTHROCYTES DO NOT ADHERE TO HUMAN PRIMARY ERYTHROBLASTS 65
II. CARACTERISATION DU DEVELOPPEMENT DES GAMETOCYTES DE *P. FALCIPARUM* CHEZ LES ERYTHROBLASTES PRIMAIRES HUMAINS 81
1. PREAMBULE 81
a. Contexte 81
b. Résultats 82
c. Conclusion 83
2. MANUSCRIT: *PLASMODIUM FALCIPARUM* SEXUAL PARASITES DEVELOP IN HUMAN ERYTHROBLASTS .. 84
DISCUSSION 133
I. COMMENT LE PARASITE S'ADAPTE A SON ENVIRONNEMENT 134
a. Des propriétés adhésives adaptées aux environnements du parasite 134
b. STEVOR, une protéine parasitaire différente selon l'environnement ? 136
II. COMMENT LE PARASITE DETOURNE SA CELLULE HOTE 137
1. MODIFICATION DE LA MEMBRANE DE L'ERYTHROBLASTE PAR LE GAMETOCYTE. 137

a. Les protéines parasitaires exportées chez les érythroblastes 138
b. Quelles sont les propriétés mécaniques de l'érythroblaste parasité ?..... 140
c. Le parasite modifie-t-il la perméabilité de l'érythroblaste ? 141
d. Les érythroblastes parasités ont-ils des propriétés adhésives ?..... 141
2. MODIFICATION DE LA CELLULE HOTE VIA LA SECRETION DE VESICULES EXTRACELLULAIRES PAR LE PARASITE 142
a. Les VE, particules omniprésentes chez les parasites eucaryotes..... 143
b. Les VE chez *Plasmodium* 143
c. Les VE de *P. falciparum* retardent l'érythropoïèse terminale..... 145
CONCLUSIONS GENERALES 149
ANNEXES 152
I. MANUSCRIT DE REVUE: ERYTHROCYTE MEMBRANE MAKEOVER BY *PLASMODIUM FALCIPARUM* GAMETOCYTES 153
II. MANUSCRIT: ACTIVATION OF ERYTHROCYTE PERMEABILITY ENHANCES DRUG UPTAKE BY MALARIA SEXUAL PARASITES 172
III. MANUSCRIT: A CHEMICALLY STABLE FLUORESCENT MIMIC OF DIHYDROARTEMISININ, ARTEMETHER AND ARTEETHER WITH CONSERVED BIOLOGICAL ACTIVITY AND SPECIFICITY SHOWS HIGH PHARMACOLOGICAL RELEVANCE TO THE CLINICAL ANTIMALARIAL DRUGS 198
IV. POSTER: DECIPHERING *PLASMODIUM FALCIPARUM* GAMETOCYTES INTERACTION WITH HUMAN BONE MARROW, EUROPEAN SCHOOL OF HEMATOLOGY, PARIS, FRANCE, 2018 225
V. POSTER: DECIPHERING STEVOR ADHESIVE PROPERTIES OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* GAMETOCYTE-INFECTED ERYTHROCYTES TO ERYTHROBLASTIC ISLAND CELLS, MALARIA PARASITOLOGY MEETING, WOODS HOLE, USA, 2018 226
VI. COMMUNICATION ORALE: *PLASMODIUM FALCIPARUM* IMMATURE GAMETOCYTES DEVELOPMENT IN HUMAN PRIMARY ERYTHROBLASTS, BIOMALPAR, HEIDELBER, ALLEMAGNE, 2019 227
VII. COMMUNICATION ORALE: *PLASMODIUM FALCIPARUM* IMMATURE GAMETOCYTES DEVELOPMENT IN HUMAN PRIMARY ERYTHROBLASTS, GORDON RESEARCH SEMINAR, LES DIABLERETS, SUISSE 2019 228

VIII. POSTER: DEVELOPMENT OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* SEXUAL PARASITES IN HUMAN PRIMARY ERYTHROBLASTS AFFECTS ERYTHROPOIESIS, GORDON RESEARCH SEMINAR, LES DIABLERETS, SUISSE 2019 229

IX. COMMUNICATION ORALE: DEVELOPMENT OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* SEXUAL PARASITES IN HUMAN PRIMARY ERYTHROBLASTS AFFECTS ERYTHROPOIESIS, MALARIA PARASITOLOGY MEETING, WOODS HOLE, USA, 2019 230

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 231

Cette thèse destinée à la diffusion ne contient pas d'illustrations pour des raisons de droits d'auteurs.

INTRODUCTION

I. Le paludisme et *Plasmodium*

Tout d'abord associé à la présence d'eaux stagnantes, l'origine du mot paludisme vient du latin « palus » qui signifie marais. Quant au mot malaria, utilisé dans la majorité des pays, il tire son origine de l'italien « mala aria » qui veut dire mauvais air. Il semble que le paludisme affecte l'Homme depuis l'origine de l'histoire de l'humanité. Cependant, le lien entre la pathologie et le parasite qui en est responsable a été fait en 1880 par Charles Louis Alphonse Laveran qui a pu étudier en Algérie le sang de personnes impaludées et y a observé des micro-organismes parasitaires mobiles. Il recevra en 1907 le prix Nobel pour la découverte du parasite du paludisme. Ce micro-organisme infectieux sera appelé *Plasmodium* par Ettore Marchiafava et Angelo Celli en 1885. En 1898, Ronald Ross prouve que le parasite du paludisme est transmis à l'Homme par le moustique Anophèle et sera récompensé par le prix Nobel en 1902. Depuis, les découvertes sur la biologie de *Plasmodium* et sur les moyens de lutter contre ce parasite augmentent d'année en année. Malgré toutes ces avancées, le paludisme reste la première parasitose mondiale et un problème de santé publique majeur dans un grand nombre de pays.

1. Le paludisme : plus grande parasitose mondiale

a. Epidémiologie

Près de la moitié de la population mondiale est exposée au risque de contracter le paludisme. La maladie est endémique dans une grande partie de l'hémisphère sud et touche spécialement la population du continent Africain qui concentre 90% des cas. En 2017, il y a eu 219 millions de cas de paludisme dans le monde. Bien que l'incidence du paludisme ait fortement diminué ces 20 dernières années, ce chiffre est en augmentation par rapport à l'année 2016 selon l'OMS. Le paludisme est à l'origine de 435 000 décès par an, dont la très grande majorité est composée d'enfants de moins de 5 ans en Afrique Subsaharienne (Word Malaria Report, 2018).

b. Pathologie

L'infection par *Plasmodium* est responsable de beaucoup de manifestations cliniques différentes qui sont variables selon le tropisme du parasite. Les premiers

symptômes apparaissent entre 10 à 15 jours après la piqûre du moustique et sont généralement de la fièvre, des frissons et des maux de tête. Ces symptômes assez généraux peuvent être attribués à beaucoup d'autres maladies que le paludisme d'où la difficulté d'un diagnostic basé uniquement sur les symptômes. Mais sans traitement, la personne infectée peut développer un paludisme grave qui se caractérise par une anémie importante, une détresse respiratoire et une atteinte de plusieurs organes vitaux qui peut mener au coma et à la mort de la personne impaludée.

c. Mesures de prévention et traitements

A ce jour, un des meilleurs moyens de lutter contre le paludisme reste la prévention des piqûres de moustiques. La lutte anti-vectorielle passe principalement par la pulvérisation d'insecticides, par l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides et par l'assèchement des points d'eaux stagnantes, niches de reproduction des moustiques. Il existe également des moyens de chimioprophylaxie et de chimiothérapie du paludisme. La mise sur le marché de la chloroquine dans les années 1950 a été un évènement majeur dans la lutte contre ce parasite. Très rapidement, la chloroquine a permis de diminuer fortement le nombre de personnes atteintes, laissant envisager l'éradication de la maladie à l'échelle mondiale. Mais dès 1960 apparaissent les premiers cas de résistance à la chloroquine en Asie du Sud Est et en Amérique latine. Les résistances se sont répandues partout dans le monde jusqu'à générer 25% d'échec thérapeutique en Afrique. Face à l'inefficacité grandissante de la chloroquine, l'OMS a déclaré en 2001 les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (Artemisinin-based Combinaison Therapy, ACT) comme le traitement de première intention contre le paludisme. L'artémisinine a été isolée en 1972 à partir de l'armoise annuelle *Artemisia annua* par la scientifique chinoise Youyou Tu qui recevra le prix Nobel en 2015 pour cette découverte (Tu, 2011). L'artémisinine est utilisée en combinaison avec d'autres composés antipaludiques afin d'éviter l'apparition de nouveaux parasites chimiorésistants. Cependant le schéma se répète puisque des cas de résistance à l'artémisinine ont été reportés en Asie du Sud-Est, laissant présager une nouvelle vague de résistance contre les antipaludéens actuellement utilisés (Dondorp et al., 2009). D'autre part, les ACT ne sont pas efficaces contre les formes transmissibles du parasite de l'Homme au moustique. La seule drogue efficace contre ces formes et

recommandée par l'OMS est la primaquine mais elle est mal tolérée par les personnes présentant un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase, nombreuses en Afrique (Dern et al., 1954).

Bien qu'il n'existe pas encore de vaccins protégeant du paludisme, plusieurs composés sont à l'état de test et de développement. Le plus avancé est le vaccin RTS,S/AS01 qui montre des résultats encourageants avec une protection dans 30% des cas. Ce vaccin a été introduit dans 3 pays de zones endémiques pilotes afin de tester son efficacité et son innocuité (von Seidlein, 2019).

La nécessité de développer de nouveaux traitements ou des vaccins antipaludiques est donc urgente pour pouvoir continuer à prétendre à l'éradication du paludisme dans le monde dans les prochaines années.

2. Le parasite *Plasmodium*

a. Le genre *Plasmodium*

Le genre *Plasmodium* fait partie de l'embranchement des *Apicomplexa* qui regroupe plusieurs genres de parasites comme *Cryptosporidium*, *Babesia*, *Theileria* et *Toxoplasma* (Cowman and Crabb, 2006). Ces espèces sont caractérisées par la présence d'un apicoplaste c'est-à-dire d'un plaste non-photosynthétique ainsi que d'un complexe apical situé à l'avant de la cellule et essentiel au processus d'invasion de la cellule de l'hôte. Le parasite *Plasmodium* est donc un eucaryote protozoaire, son hôte définitif est le moustique hématophage femelle du genre *Anopheles* et son hôte intermédiaire un vertébré. En tout, plusieurs centaines d'espèces de *Plasmodium* existent et infectent de nombreux animaux comme les mammifères, les reptiles et les oiseaux (Escalante and Ayala, 1994). Seules cinq espèces de *Plasmodium* peuvent infecter l'Homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. *P. falciparum* et *P. vivax* sont les espèces les plus répandues dans le monde et *P. falciparum* est à l'origine du plus grand nombre de décès attribués au paludisme, cette espèce est retrouvée principalement sur le continent africain et en Asie du Sud-Est. *P. vivax* est quant à lui présent majoritairement en Amérique du Sud et en Asie.

b. Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*

i. Stades hépatiques

Lors d'une piqûre, le moustique *Anophèle* injecte à son hôte des sporozoïtes, formes mobiles et infectantes du parasite localisées dans les glandes salivaires du moustique. Les sporozoïtes sont ensuite véhiculés par la circulation sanguine et gagnent le foie. Après avoir traversé plusieurs cellules de Kupffer, le sporozoïte envahit un hépatocyte et s'y multiplie (Yuda and Ishino, 2004). Après plusieurs jours, l'hépatocyte contient alors de très nombreux parasites appelés mérozoïtes qui sont relâchés dans la circulation sanguine après le détachement de leur cellule hôte (Sturm et al., 2006). Cette phase pré-érythrocytaire dure en moyenne entre 8 à 10 jours pour *P. falciparum* et n'engendre aucun symptôme chez le patient infecté.

ii. Stades érythrocytaires

Les mérozoïtes libérés dans la circulation sanguine sont des formes invasives du parasite de petite taille (en moyenne 1µm de diamètre). Après avoir envahi un érythrocyte, le parasite s'y développe pendant 42 à 48h en moyenne pour *P. falciparum*. Lors de ce développement, le parasite grossit et digère l'hémoglobine présente dans le globule rouge : le parasite passe du stade anneau (ou ring) au stade trophozoïte. Après réplication du matériel génétique, le parasite prend une forme multi-nucléée appelée schizonte. Une fois totalement mature, le parasite déclenche la rupture de l'érythrocyte afin de libérer de nouveaux mérozoïtes qui pourront envahir les globules rouges dans la circulation.
La multiplication asexuée des parasites lors de ce stade érythrocytaire entraine des accès palustres chez les personnes infectées. A chaque nouveau cycle d'invasion des globules rouges, une petite partie des parasites se différencie en parasites sexués mâles et femelles que l'on appelle gamétocytes. Les gamétocytes de *P. falciparum* se développent en moyenne pendant une dizaine de jours en passant de stades immatures au stade mature, ils sont la seule forme parasitaire qui puisse être transmise au moustique.

iii. Développement chez le moustique

Lors du repas sanguin d'un moustique *Anophèle* sur une personne parasitée et porteuse de gamétocytes, le moustique absorbe du sang contenant les parasites. Une fois dans l'estomac de l'arthropode, les gamétocytes mâles et femelles sont activés et

sortent de leur érythrocyte hôte par un processus appelé gamétogenèse. Les gamétocytes mâles se divisent et libèrent leurs gamètes lors du processus d'exflagellation. Ces gamètes sont mobiles et se déplacent dans l'estomac du moustique pour féconder les gamètes femelles. La fécondation des gamètes donne naissance à un zygote diploïde qui devient une cellule mobile appelée ookinète. L'ookinète migre et traverse l'épithélium de l'estomac du moustique, puis se fixe au niveau de la lame basale de l'épithélium où il se transforme en oocyste. Après 8 à 10 jours, une série de divisions cellulaires ont lieu au sein de l'oocyste pour donner naissance à des milliers de nouveaux sporozoïtes qui seront relâchés pour migrer vers les glandes salivaires du moustique, prêts à être injectés à un nouvel hôte humain lors du prochain repas sanguin du moustique.

c. Séquestration et circulation des stades érythrocytaires

Lors d'un frottis sanguin effectué chez une personne atteinte de paludisme, on peut généralement identifier deux formes parasitaires : des parasites asexués au stade anneau et des gamétocytes matures. Cette observation s'explique par le fait que les autres formes parasitaires intra-érythrocytaires sont séquestrées dans les tissus, hors de la circulation sanguine.

A partir du stade trophozoïtes, les parasites asexués au sein des érythrocytes ne sont plus retrouvés dans la circulation sanguine des patients impaludés. Les érythrocytes infectés par des trophozoïtes et des schizontes sont séquestrés dans les microcapillaires des tissus profonds via un mécanisme de cytoadhérence. En effet, les érythrocytes infectés par des parasites asexués adhèrent aux cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins. Cette adhérence se fait grâce à la protéines parasitaire *Plasmodium falciparum* Protein 1 (PfEMP1) qui est exprimée à la surface des érythrocytes infectés par des parasites asexués (Baruch et al., 1995; Su et al., 1995). PfEMP1 peut se lier à différents récepteurs des cellules endothéliales (CD36, ICAM-1, TSP, VCAM-I, E-selectine, CSA, etc.) en fonction de la localisation tissulaire des parasites (Barnwell et al., 1989; Berendt et al., 1989; Fried and Duffy, 1996; Ockenhouse et al., 1992; Roberts et al., 1985).

Bien qu'ils ne soient pas retrouvés dans la circulation sanguine, le lieu de séquestration des gamétocytes immatures est longtemps resté inconnu. La présence de gamétocytes dans la moelle osseuse a été détecté depuis plusieurs décennies (Smalley et al., 1981; Wickramasinghe et al., 1987) mais l'identification du lieu de séquestration des parasites sexués immatures a pris encore plusieurs années. A ce jour, le ou les mécanismes de séquestration des gamétocytes immatures hors de la circulation sanguine sont toujours inconnus. Mieux comprendre ces mécanismes est l'objectif de ces travaux de thèse.

La rétention des érythrocytes infectés par des formes développées du parasite est supposée être à l'origine d'un phénomène d'échappement à la filtration des globules rouges par la rate. En effet, la rate élimine les érythrocytes parasités par des trophozoïtes et des schizontes (Miller et al., 1994). La séquestration des parasites dans les tissus profonds leur permet donc de persister dans l'organisme pour se développer et s'y multiplier.

II. La gamétocytogenèse

Le processus de maturation des gamétocytes de *Plasmodium* est appelé gamétocytogenèse, il dure en moyenne 10 jours chez *P. falciparum* pendant lesquels les gamétocytes évoluent du stade I au stade V (Hawking et al., 1971). Les gamétocytes de stades I à IV sont immatures et sont absents de la circulation périphérique alors que les gamétocytes de stade V sont matures et sont retrouvés dans la circulation sanguine. D'anciens travaux ont d'abord suggéré que les gamétocytes étaient localisés dans la moelle osseuse ainsi que dans la rate (Smalley et al., 1981; Thomson and Robertson, 1935; Wickramasinghe et al., 1987). Puis de récentes études ont confirmé la présence des gamétocytes dans la moelle osseuse des personnes infectées (Aguilar et al., 2014a; Farfour et al., 2012; Joice et al., 2014). La présence des gamétocytes immatures dans la rate reste très peu étudiée. Ces dernières années, beaucoup de nouvelles connaissances ont été apportées quant à la biologie des gamétocytes, en particulier quant aux processus moléculaires impliqués dans l'engagement des parasites vers la voie sexuée. Cependant, les mécanismes de séquestration des gamétocytes immatures dans le parenchyme de la moelle osseuse ne sont pas encore élucidés.

1. Engagement vers la voie sexuée

a. Régulation génétique de l'engagement vers la gamétocytogenèse

Le principal régulateur génétique de l'engagement des parasites vers la voie sexuée est le facteur de transcription AP2G (pour ApiAP2-Gamétocytes). Ce facteur de transcription, crucial pour la gamétocytogenèse, a été identifié en séquençant le génome de souches parasitaires de *P. falciparum* et *P. berghei* ayant perdu leur faculté à produire des gamétocytes. Dans ces souches, le gène codant pour la protéine AP2G était muté. D'autre part, la sous-expression d'AP2G empêche la formation de gamétocytes et la surexpression de cette protéine augmente la production de gamétocytes par le parasite (Kafsack et al., 2014; Sinha et al., 2014).

D'autres facteurs ont été décrits comme impliqués dans la régulation de la production de gamétocytes. Les protéines HP1 (Heterochromatin Protein 1) et HDA2 (Histone Deacetylase 2) sont des régulateurs épigénétiques qui inhibent l'expression d'*ap2g* et donc l'engagement vers la voie sexuée (Brancucci et al., 2014; Coleman et al., 2014). Parallèlement, la protéine GDV1 (Gametocyte Development 1) est indispensable à la production de gamétocytes. Les souches surexprimant *gdv1* voient leur production de gamétocytes augmenter tandis que les souches déficitaires en GDV1 ne produisent que des parasites asexués (Eksi et al., 2012).
Le lien entre la protéine GDV1 et la régulation épigénétique d'*ap2g* a été fait récemment grâce aux travaux de Filarsky et de ses collaborateurs. Lors du développement asexué, l'expression d'*ap2g* est inhibée par le recrutement de la protéine HP1 qui va engendrer la méthylation de l'histone H3K9. L'ADN est ainsi sous forme d'hétérochromatine et ne sera pas transcrit. Lors du passage à la voie sexuée, la protéine GDV1 est exprimée et se lie à HP1 pour l'empêcher d'être recrutée au niveau de la chromatine. Sans la présence de HP1, l'histone H3K9 n'est plus méthylé et l'ADN est alors sous forme d'euchromatine, permettant la transcription du gène *ap2g*. La transcription du gène codant pour la protéine GDV1 est elle-même régulée par un ARN antisens non codant appelé *asgdv1* qui régule négativement la transcription de *gdv1* (Filarsky et al., 2018). Bien que la régulation épigénétique de l'engagement vers la voie sexuée soit de mieux en mieux connue, de nouveaux régulateurs épigénétiques ont été identifiés comme impliqués dans la

gamétocytogenèse par séquençage d'ARN sur cellule unique (Poran et al., 2017), signifiant que toute la voie moléculaire menant à la formation des gamétocytes n'est pas encore décryptée.

Une fois l'inhibition transcriptionnelle levée, l'expression de la protéine AP2G peut se faire à deux stades différents du cycle intra-érythrocytaire de *Plasmodium*, donnant lieu à deux voies de conversion en gamétocytes. Dans le cas de la première voie de conversion appelée voie NCC pour « Next Cycle Conversion », la protéine AP2G est exprimée au stade schizonte qui est alors engagé vers la voie sexuée. Ce schizonte donne naissance à plusieurs mérozoïtes qui, en envahissant un nouvel érythrocyte, vont se développer en gamétocytes. Dans la voie NCC, l'induction de la gamétocytogenèse a donc lieu au cycle précédant le développement du gamétocyte (Bruce et al., 1990). La voie NCC était considérée comme la seule voie de production des gamétocytes jusqu'à très récemment. Cependant, Bancells et ses collaborateurs ont mis en évidence en 2019 qu'il existe une deuxième voie de conversion appelée voie SCC pour « Same Cycle Conversion », la protéine AP2G est alors exprimée dès le stade anneau : le parasite s'engage vers la voie sexuée et se développe en gamétocyte. Dans la voie SCC il n'y pas donc pas de ré-invasion entre l'engagement vers la gamétocytogenèse et le développement du gamétocyte (Bancells et al., 2019). L'existence de la voie SCC a également été montrée chez le parasite de rongeur *P. berghei* (Kent et al., 2018).

b. Facteurs environnementaux régulant l'engagement vers la voie sexuée

Bien que l'on sache que l'engagement vers la voie sexuée est régulé par une cascade de facteurs épigénétiques, le lien entre ces facteurs et une régulation environnementale reste en grande partie incompris. Par exemple, les conditions d'expression de l'ARN anti-sens *asgdv1* sont inconnues. De nombreux facteurs environnementaux ont été identifiés pour leur capacité à réguler l'engagement des parasites vers la voie sexuée. Parmi ceux-ci on retrouve le milieu conditionné par une culture parasitaire (Brancucci et al., 2015; Williams, 1999), les vésicules extracellulaires sécrétées par le parasite (Mantel et al., 2013), la présence de réticulocytes (Trager and Gill, 1992) et la présence de drogues anti-malariques (Buckling et al., 1999). Cependant, les mécanismes d'actions par lesquels ces différents facteurs pourraient réguler la production de gamétocytes n'ont pas été identifiés. Récemment, il a été montré que la

lysophosphatidylcholine (LysoPC) inhibait la production de gamétocytes (Brancucci et al., 2017). La LysoPC est un composant nécessaire à la synthèse de la phosphatidylcholine dans la cellule et plus généralement à la biosynthèse des phospholipides par le parasite asexué. Cette biosynthèse passe par la voie métabolique de Kennedy : c'est l'activation de cette voie qui inhibe la différenciation du parasite en gamétocyte. En présence de LysoPC et donc lorsque la voie de Kennedy est active, l'expression de *ap2g* est réprimée. Lorsque la LysoPC est absente du milieu de culture, *ap2g* est exprimé et les parasites s'engagent vers la gamétocytogenèse (Brancucci et al., 2017). Le lien entre l'absence de LysoPC et l'expression d'*ap2g* n'est pas encore identifié mais pourrait être lié au métabolisme de la phosphatidylcholine dans la cellule. En effet, lorsque la concentration en LysoPC diminue, la cellule augmente l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de la S-adénosylméthionine (SAM). Ces enzymes permettent la production de phosphatidylcholine par une autre voie que la LysoPC, c'est-à-dire en transformant la sérine ou l'éthanolamine en choline via l'utilisation de SAM. Or, SAM est également nécessaire à des enzymes histones méthyltransferases du noyau. La diminution de la quantité de SAM dans la cellule au profit du métabolisme de la phosphatidylcholine en l'absence de LysoPC pourrait donc entraîner une diminution du taux de méthylation des histones. Ainsi, la méthylation qui entraînait la répression du gène *ap2g* pourrait être inhibée ce qui permettrait son activation et donc l'engagement du parasite vers la voie sexuée (Josling et al., 2018).

La disponibilité de la lysoPC agit donc comme un senseur environnemental pour l'engagement vers la voie sexuée. La LysoPC est un des composants du sérum, présent abondamment dans la circulation sanguine, elle pourrait donc inhiber la production de gamétocytes par les parasites asexués en circulation. Dans certains tissus comme le parenchyme de la moelle osseuse, la LysoPC est moins abondante (Brancucci et al., 2017). Cette diminution du taux de LysoPC dans l'espace extravasculaire de la moelle pourrait déclencher le passage des parasites vers la voie sexuée et ainsi encourager la formation de gamétocytes dans leur lieu de séquestration.

L'ajout ou la suppression de LysoPC dans le milieu de culture permet donc d'induire ou non la gamétocytogenèse. C'est un outil puissant pour étudier les mécanismes de

l'engagement vers la voie sexuée qui été utilisé pour étudier la signature transcriptomique de la différenciation en gamétocyte sur cellule unique (Brancucci et al., 2018).

2. Développement du gamétocyte

Au cours de la gamétocytogenèse, la structure du gamétocyte est peu à peu modifiée jusqu'à arriver à la morphologie falciforme, typique des gamétocytes matures. Ces changements se font grâce à la mise en place d'un réseau de microtubules et d'une structure membranaire supplémentaire autour du parasite, appelée « Inner Membrane Complex » ou IMC. Cette évolution du gamétocyte se fait parallèlement à de profondes modifications dans la structure de la membrane et du cytosquelette du globule rouge. Malgré ces transformations, certaines caractéristiques biophysiques de l'érythrocyte ne sont pas modifiées lors du développement sexué, comme la surface et le volume de la cellule qui ont été déterminés par modélisation en trois dimensions et par tomographie à rayon X (Aingaran et al., 2012; Hanssen et al., 2012). En revanche, la taille de la cellule hôte est modifiée avec une augmentation de la longueur de la cellule et une diminution de sa largeur au cours de la gamétocytogenèse (Aingaran et al., 2012; Hanssen et al., 2012).

a. Morphologie des gamétocytes au cours de leur développement

Les érythrocytes infectés par des gamétocytes (EIG) de stade I sont difficilement différenciables morphologiquement des érythrocytes infectés par des trophozoites. Pour distinguer un gamétocyte de stade I d'un trophozoïte, la stratégie privilégiée à l'heure actuelle consiste à utiliser des souches transgéniques exprimant un marqueur fluorescent sous le contrôle du promoteur d'un gène exprimé spécifiquement au stade gamétocyte, comme les gènes *Pfs16* (Bruce et al., 1994) ou *Pfg27* (Alano et al., 1991). Au stade II, le gamétocyte commence son évolution morphologique: il s'allonge et prend la forme de demi-lune sans changer la forme de l'érythrocyte. Au stade III, le gamétocyte continue de s'étirer, la longueur du gamétocyte est alors supérieure au diamètre d'un érythrocyte non-parasité, ce qui lui donne une forme allongée et ovale. Au stade IV, la longueur du gamétocyte augmente encore et les extrémités du parasite deviennent pointues, déformant encore plus son érythrocyte hôte. Le parasite occupe alors quasiment tout le

cytoplasme du globule rouge, exceptée une petite partie appelée le bavoir de Laveran ou « Laveran's bib ». Enfin, au stade V qui est le stade mature, les extrémités du gamétocyte redeviennent arrondies et le parasite adopte une forme de banane, aussi appelée falciforme (Sinden, 1982). La morphologie falciforme est typique de *P. falciparum* et n'est pas conservée chez les autres espèces de *Plasmodium* où les gamétocytes sont majoritairement ronds tout au long de leur maturation (Sinden et al., 1978). De même, les gamétocytes des autres espèces ont généralement un temps de maturation beaucoup plus court (Gautret and Motard, 1999).

b. Ultrastructure du gamétocyte

L'IMC est une structure en alvéole retrouvée dans toute le groupe des Alveolata (Gould et al., 2008). Cette structure est composée de sacs membranaires de forme aplatie qui se situent sous la membrane plasmique du parasite. En plus des gamétocytes, l'IMC est présent chez les sporozoïtes, les ookinètes et les mérozoïtes, c'est-à-dire toutes les formes invasives du parasite.

Chez les gamétocytes, la mise en place de l'IMC se fait dès le stade I/II où l'on peut observer les sacs membranaires sous la membrane plasmique ainsi que la mise en place d'un réseau de microtubules (Dearnley et al., 2016, 2012; Sinden, 1982). Au fur et à mesure de la maturation, l'IMC se développe tout autour du parasite et les microtubules s'agrandissent, ce qui donne une forme allongée au parasite (Dearnley et al., 2012). Mais au stade V, le réseau de microtubules est désassemblé pour devenir quasiment inexistant (Parkyn Schneider et al., 2017; Sinden, 1982). Ainsi la structure à l'origine de la forme pointue du gamétocyte se relâche et le gamétocyte mature prend sa forme typique de banane, avec des bouts arrondis.
Le rôle de l'IMC et des microtubules chez les parasites sexués est encore inconnu, il semble être seulement structural alors que l'IMC est impliqué dans la mobilité des stades parasitaires invasifs (Beck et al., 2010; Frénal et al., 2010; Gaskins et al., 2004). Le rôle des microtubules a d'abord été évoqué comme étant impliquées dans la régulation de la déformabilité des EIG. Cependant, le traitement des cellules au trifluralin, un déstabilisateur de microtubules, n'induit pas de changement dans la déformabilité des

EIG. Ce résultat suggère que les microtubules ne jouent pas un rôle primordial dans la régulation de la déformabilité de la membrane des EIG (Dearnley et al., 2016).
Dernièrement, il a été suggéré que les gamétocytes matures de *P. berghei* étaient mobiles, facilitant ainsi leur passage du parenchyme de la moelle osseuse vers la circulation sanguine (De Niz et al., 2018). Cette découverte relance le débat autour du rôle de l'IMC qui pourrait donc être impliqué dans la mobilité des gamétocytes.

Les corps osmiophiliques (osmiophilic bodies, OB) sont des structures spécifiques des gamétocytes. Les OB sont des organelles de sécrétion de 200 nm de diamètre retrouvées chez les gamétocytes femelles dès le stade III de maturation chez *P. falciparum* (Sinden, 1982). Pfg377 a été l'une des premières protéines identifiée comme contenue dans les OB (Alano et al., 1995). Les parasites déficients pour la protéine Pfg377 n'ont pas d'OB et leur capacité à sortir de l'érythrocyte lors de la gamétogenèse ainsi qu'à infecter des moustiques anophèles est inhibée (de Koning-Ward et al., 2008; Suaréz-Cortés et al., 2014). Les OB semblent donc avoir un rôle majeur dans la transmission du parasite au moustique. La comparaison par protéomique entre des parasites déficients pour la protéine Pfg377 et des parasites non modifiés a permis de révéler la composition protéique de ces organelles. Seize protéines ont été identifiées comme faisant partie des OB dont 4 ont fait l'objet d'études fonctionnelles. Cette étude a également permis de montrer que les OB n'avaient pas un rôle lors de la sortie de l'érythrocyte par le gamète mature mais lors de l'infection des moustiques (Suárez-Cortés et al., 2016).

3. Gamétocytes mâles et femelles

Les gamétocytes mâles et femelles diffèrent dès le stade I de la gamétocytogenèse et probablement dès l'engagement vers la voie sexuée. Néanmoins, on ne peut distinguer morphologiquement les mâles et les femelles qu'à partir du stade III de développement en gamétocyte (Sinden, 1983a). Après coloration au Giemsa, les gamétocytes mâles sont roses et les gamétocytes femelles sont bleus. De plus, les gamétocytes mâles sont plus charnus et présentent des pigments d'hémozoïne dispersés dans le cytoplasme du parasite alors qu'ils sont plus concentrés chez les femelles. Les transcriptomes et les protéomes des gamétocytes mâles sont différents de ceux des gamétocytes femelles ce qui suggère que de nombreux gènes sont impliqués dans la différenciation des deux

sexes (Lasonder et al., 2016). Les protéines exprimées spécifiquement chez les gamétocytes mâles sont souvent associées à la réplication de l'ADN et à la formation des gamètes tandis que les protéines exprimées spécifiquement chez les gamétocytes femelles ont trait au métabolisme du parasite et au fonctionnement de ses organelles (Lasonder et al., 2016; Miao et al., 2017). Parmi les protéines de gamétocytes exprimées chez les femelles on retrouve Pfg377 (Alano et al., 1995), Pfs47 (van Schaijk et al., 2006) et Pfs25 (Vermeulen et al., 1986) alors que la protéine Pfs230 (Eksi et al., 2002) est exprimée spécifiquement chez les gamétocytes mâles. D'autres protéines sont exprimées chez les deux sexes mais ont un rôle spécifique chez les mâles : la protéine Pfs48/45 est essentielle à la fécondation du gamète femelle (Lobo et al., 1999; van Schaijk et al., 2006) et PfPuf2 est impliquée dans le développement des gamétocytes mâles (Miao et al., 2010).

Une fois absorbés par le moustique, les gamétocytes des deux sexes s'arrondissent puis sortent de leur érythrocyte hôte pour devenir des gamètes. Le gamète femelle reste rond tandis que le mâle forme plusieurs gamètes mobiles qui vont se déplacer pour féconder le gamète femelle.

III. Modification de la membrane du globule rouge par le gamétocyte

Lors du stade érythrocytaire, le parasite modifie profondément le globule rouge qu'il infecte. *Plasmodium* exporte dans sa cellule hôte ces propres protéines notamment grâce à un système d'export qui lui est propre et qui est principalement composé de structures membranaires appelées Maurer's Cleft (MC) (Maurer, 1902). Les MC dirigent les protéines parasitaires de la vacuole parasitaire vers la membrane de l'érythrocyte parasité. L'insertion de protéines parasitaires à la membrane du globule rouge hôte modifie profondément ses propriétés, tant sur le plan de la structure membranaire et du cytosquelette, que sur celui de sa déformabilité, de sa perméabilité et de ses propriétés adhésives à d'autres types cellulaires. Sur tous ces points, les altérations induites par le parasite varient entre les stades érythrocytaires asexués et sexués. Ces modifications jouent un rôle primordial dans les interactions de l'érythrocyte infecté avec les cellules de

l'hôte et sont impliquées dans les mécanismes de séquestration et de circulation du parasite.

1. Export des protéines à la membrane du globule rouge

Les protéines présentes à la membrane du globule rouge parasité ont soit été sécrétées par les organelles du parasite lors de l'invasion soit exportées par le parasite lors de son développement. Par exemple, la protéine RESA (Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen) (Pei et al., 2007) et les protéines de la famille RhopH, qui sont impliquées dans la perméabilité de l'érythrocyte parasité (Counihan et al., 2017; Ito et al., 2017; Sherling et al., 2017), sont sécrétées lors du processus d'invasion. Quant aux protéines exportées hors de la vacuole parasitaire, elles sont identifiables par la présence d'un motif PEXEL/HT (*Plasmodium* EXport ELement / Host-Targeting) (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004). La machinerie d'export des protéines parasitaires à la membrane de l'érythrocyte infecté est conservée entre les stades asexués et sexués mais il existe des aspects spécifiques aux gamétocytes. Les protéines exportées spécifiquement par les gamétocytes ont été identifiées par protéomique (Silvestrini et al., 2010), ce qui indique que la parasite remodèle sa cellule hôte de manière spécifique au stade sexué, en lien avec les besoins particuliers du parasite lors cette partie du cycle parasitaire. La majorité des protéines contenant un PEXEL/HT exprimées au stade gamétocyte le sont lors du début de la gamétocytogenèse, aux stades I et II (Matthews et al., 2013).

La protéine Pf11.1 est exprimée spécifiquement par les gamétocytes et est exportée à la membrane des EIG (Scherf et al., 1992a). Parmi les protéines parasitaires exportées par les gamétocytes on retrouve aussi la famille des protéines PfGEXPs pour *P. falciparum* Gametocyte Exported Proteins, ces protéines sont également exportées par les parasites asexués. Récemment, les protéines PfGEXP07 et PfGEXP10 ont été observées à la surface des EIG, bien qu'elles semblent résistantes aux traitements à la trypsine (Dantzler et al., 2019). Certaines protéines PfGEXP appartiennent à la famille des protéines PHIST (Silvestrini et al., 2010) dont certains membres sont exportés au niveau du cytosquelette de l'érythrocyte parasité au stade asexué et contribue à la modification de l'érythrocyte par le parasite (Oberli et al., 2016; Parish et al., 2013).

Les protéines PfEMP1, qui sont les principales protéines d'adhérence du parasite au stade asexué, ne sont pas présentes à la surface des EIG, exception faite d'une très faible quantité au stade I de la gamétocytogenèse (Tibúrcio et al., 2013). Cette absence est due à une sous régulation de l'expression de toute la famille multigénique *var* codant pour ces protéines (Tibúrcio et al., 2013). De manière surprenante, il a été reporté que les gènes *var* du type C seraient préférentiellement transcrits chez les jeunes gamétocytes comparé aux parasites asexués, et ce à très faible niveau (Sharp et al., 2006). Cependant il est à noter que cette étude n'utilise aucun rapporteur fluorescent permettant de distinguer les gamétocytes de stade I des trophozoïtes asexués qui ont des morphologies identiques, on peut donc postuler que le faible taux d'expression des gènes *var* chez les jeunes gamétocytes peut être dû à des trophozoïtes présents dans la culture. En ce qui concerne les autres familles multigéniques chez *P. falciparum*, les protéines STEVOR (Subtelomeric Open Reading Frames) sont exportées à la membrane des EIG immatures (McRobert et al., 2004) mais ne sont plus détectées à la membrane chez les stades matures (Tibúrcio et al., 2012). Les protéines STEVOR ont été détectées à la surface du globule rouge infecté au stade asexué (Niang et al., 2009) et au stade sexué (Tibúrcio et al., 2012).

Les gènes de la famille multigénique *rif* (interspersed repetitive elements), codant pour les RIFINs, sont exprimés tout au long de la gamétocytogenèse (Mwakalinga et al., 2012; Petter et al., 2008; Wang et al., 2010). Les RIFINs de type A sont présentes à la membrane du globule rouge au stade gamétocyte tandis que les RIFINs de type B sont localisées au niveau du parasite (Mwakalinga et al., 2012; Petter et al., 2008). Cependant, l'exposition des RIFINs à la surface des EIG reste à déterminer.

Les protéines parasitaires exposées à la surface de l'érythrocyte parasité modifient l'antigénicité de la cellule hôte ainsi que les propriétés mécaniques de sa membrane.

L'export d'antigènes de surface par le parasite donne théoriquement lieu à une réponse immunitaire acquise, mais la production d'anticorps due au développement et à la circulation des gamétocytes est encore mal connue. Au stade asexué, il existe des anticorps générés contre les protéines parasitaires de surface, en particulier contre les

protéines PfEMP1. Ces anticorps sont impliqués dans la phagocytose et la réponse cytotoxique (Arora et al., 2018; Bengtsson et al., 2013; Chan et al., 2014).

Chez les gamétocytes, plusieurs études utilisant des sérums de patients porteurs de gamétocytes ont rapporté des résultats contradictoires. Quelques études ont tout d'abord montré que seuls les EIG matures, et non les stades I à IV, étaient reconnus par une partie des sérums. De plus, les sérums des patients ayant développé une immunité contre les EIG matures étaient associés à une faible gamétocytémie dans le sang circulant (Dinko et al., 2016; Saeed et al., 2008). Il est à noter que la sortie du gamète de l'érythrocyte n'est pas contrôlée dans ces études et que l'immunogénicité observée pourrait être due à des protéines parasitaires localisées à la surface des gamètes. Une autre étude a montré qu'il existait des anticorps dirigés contre les protéines parasitaires de surface des gamétocytes de stade II à V. Ces anticorps changent la morphologie des gamétocytes et retardent leur maturation (Tonwong et al., 2012). De la même manière, une étude récente indique qu'il existe une réponse immunitaire acquise contre les EIG immatures au contraire des EIG matures (Dantzler et al., 2019). Cette étude montre que les gamétocytes immatures expriment des antigènes à la surface du globule rouge infecté, qui sont le plus souvent aussi retrouvés au stade asexué (Dantzler et al., 2019).

Les parasites sexués sont donc capables de provoquer une réponse immunitaire chez les patients porteurs de gamétocytes. Il reste à déterminer si cette immunogénicité est spécifique des stades immatures, des stades matures, ou si elle est présente tout au long de la gamétocytogenèse. Il serait ensuite intéressant de déterminer le rôle des anticorps générés contre les gamétocytes. Ces anticorps pourraient être impliqués dans l'inhibition de la séquestration des gamétocytes immatures dans le parenchyme ou dans l'élimination des gamétocytes matures de la circulation sanguine. Cette dernière hypothèse est appuyée par le fait que les sérums de personnes infectées porteuses de gamétocytes entraînent l'augmentation de la phagocytose des EIG par les macrophages (Dantzler et al., 2019). Bien qu'il n'existe à ce jour aucun vaccin antipaludique disponible, la découverte de nouveaux antigènes présents à la surface des EIG pourrait permettre l'élaboration d'un vaccin bloquant la transmission.

2. Réorganisation de la structure du cytosquelette et de la membrane du globule rouge

L'un des changements majeurs au niveau de la membrane du globule rouge infecté au stade asexué est l'apparition de « knobs » à la surface de l'érythrocyte (Langreth et al., 1978; Luse and Miller, 1971). Les « knobs » correspondent à des protrusions de la membrane plasmique et regroupent différentes protéines parasitaires reliées au cytosquelette du globule rouge. En particulier, les « knobs » permettent l'insertion de la protéine parasitaire PfEMP1 à la membrane du globule rouge parasité (Luse and Miller, 1971). Cependant ces « knobs » sont absents à tous les stades de la gamétocytogenèse (Sinden, 1982; Tibúrcio et al., 2012, 2013).

Comme chez les parasites asexués, les Maurer's Clefts ont aussi été observées chez les gamétocytes (Dearnley et al., 2016; Eksi et al., 2002). Néanmoins, leur apparence est différente: les MC semblent mobiles chez les gamétocytes (Dearnley et al., 2016) alors qu'elles sont reliées à la membrane par le cytosquelette d'actine chez les parasites asexués (Cyrklaff et al., 2011). Cette différence pourrait être liée à l'absence des « knobs » et à la diminution du nombre de protéines parasitaires interagissant avec le cytosquelette.

Beaucoup de modifications à la membrane de l'érythrocyte parasité se font au niveau du cytosquelette de la cellule. Tout comme chez les parasites asexués (Shi et al., 2013), les érythrocytes infectés par des gamétocytes présentent une expansion du réseau de spectrine (Dearnley et al., 2016). Les érythrocytes infectés par des parasites asexués et par des gamétocytes immatures voient la mobilité de la protéine Bande 3 altérée, ce qui témoigne d'une augmentation de l'association du réseau de spectrine avec la membrane plasmique de l'érythrocyte (Dearnley et al., 2016; Parker et al., 2004). Chez les EIG immatures, l'actine est relocalisée au niveau des MC. Tous ces changements sont réversibles lors du passage au stade mature (Dearnley et al., 2016) et sont probablement liés aux changements de déformabilité que connait l'érythrocyte infecté lors du passage du stade immature au stade mature.

3. Changement de la déformabilité de la membrane du globule rouge

Lors de la gamétocytogenèse, les propriétés mécaniques de la membrane de l'érythrocyte sont profondément modifiées. Les EIG de stades immatures sont rigides alors que les EIG matures redeviennent déformables (Aingaran et al., 2012; Dearnley et al., 2012; Tibúrcio et al., 2012). Les gamétocytes matures étant retrouvés dans la circulation au contraire des stades immatures qui séquestrent dans le parenchyme de la moelle osseuse (Aguilar et al., 2014a; Farfour et al., 2012; Joice et al., 2014), l'extrême déformabilité des érythrocytes infectés par des gamétocytes matures pourrait donc leur permettre d'éviter d'être éliminés de la circulation par le mécanisme de filtration par la rate. D'autre part, la rigidité des EIG immatures pourrait être impliquée dans le ou les mécanismes de séquestration des gamétocytes dans le parenchyme de la moelle osseuse.

Cette différence de rigidité pourrait s'expliquer par la présence d'un réseau de microtubules chez les stades immatures et par son démantèlement chez les gamétocytes matures (Sinden, 1983a, 1983b). Cependant, Dearnley et ses collaborateurs ont montré que les microtubules du parasite n'étaient pas la cause majeure de la déformabilité de l'érythrocyte infecté. C'est plutôt la modification du cytosquelette de la membrane du globule rouge qui serait à l'origine du changement de déformabilité lorsque les gamétocytes deviennent matures (Dearnley et al., 2016). Lorsque les gamétocytes immatures sont traités avec de la cytochalasine D, la déformabilité des EIG immatures augmente considérablement ce qui suggère un rôle important du cytosquelette d'actine dans la rigidité de la membrane des EIG (Dearnley et al., 2016). D'autre part, la perte de déformabilité de la membrane des EIG immatures est liée à la présence de protéines parasitaires exportées à la membrane du globule rouge, comme cela a déjà été rapporté chez les parasites asexués. L'infection du globule rouge par un parasite asexué transforme la membrane de la cellule hôte d'un état hautement déformable à un état rigide (Nash et al., 1989). Plusieurs protéines parasitaires sont impliquées dans cette perte d'élasticité comme les protéines KAHRP, PfEMP3 (Glenister et al., 2002), RESA (Mills et al., 2007) et STEVOR (Sanyal et al., 2012). Au cours de la gamétocytogenèse, KAHRP, PfEMP3 et RESA ne sont pas exprimées et la perte de déformabilité est liée à l'expression

des protéines STEVOR (Tibúrcio et al., 2012). Ces protéines sont détectées à la membrane des érythrocytes infectés par des gamétocytes de stade I à IV (Tibúrcio et al., 2012). La phosphorylation de ces protéines engendre leur interaction avec le réseau de spectrine du cytosquelette de l'érythrocyte hôte, entrainant ainsi une augmentation de la rigidité du globule rouge (Naissant et al., 2016). Cette phosphorylation, dépendante de la protéine kinase A (PKA), a lieu uniquement chez les stades immatures et est due à l'augmentation du taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui est la résultante d'une faible expression de la phosphodiesterase δ (PDEδ) à ce stade (Ramdani et al., 2015). Chez les gamétocytes de stade V, la PDE δ est fortement exprimée et dégrade l'AMPc dans la cellule, par conséquent les protéines STEVOR ne sont plus phosphorylées et ne lient plus le cytosquelette de l'érythrocyte : la membrane du globule rouge redevient déformable (Naissant et al., 2016; Ramdani et al., 2015). Ce phénomène d'augmentation de déformabilité étant fortement lié à l'expression de la PDEδ, des inhibiteurs de phosphodiesterases, dont certains sont déjà commercialisés tels que le sildénafil, peuvent être utilisés pour augmenter la rigidité du globule rouge parasité (Naissant et al., 2016; Ramdani et al., 2015). Récemment, une étude chez le parasite de rongeur *P. berghei* a suggéré que, comme chez *P. falciparum,* les stades immatures étaient plus rigides que les stades matures (De Niz et al., 2018) même si le développement des gamétocytes chez cette espèce est beaucoup plus courte que chez *P. falciparum* (Mons et al., 1985).

4. Modification de la perméabilité de la membrane du globule rouge

Alors que les érythrocytes non-parasités sont très peu perméables, *Plasmodium falciparum* modifie les propriétés de perméabilité de la membrane de son globule rouge hôte. A partir du stade trophozoïte, le globule rouge parasité devient beaucoup plus perméable à différents solutés. Cette augmentation de la perméabilité de l'érythrocyte induite par le parasite est appelée New Permeability Pathways (NPP) (Ginsburg et al., 1983). Bien que la nature exacte du ou des canaux responsables de cette perméabilité accrue ne soit pas élucidée, on sait que le courant établi à la membrane de l'érythrocyte infecté est dû à un canal anionique peu sélectif (Desai et al., 2000).

En ce qui concerne les parasites sexués, la présence de NPP à la membrane des érythrocytes infectés par des gamétocytes n'a jamais été détectée, cependant très peu d'études se sont intéressées à ce sujet. Seul le travail de Saul et de ses collaborateurs a montré que les gamétocytes étaient résistants à la lyse au sorbitol, suggérant que les NPP étaient absents à ce stade de développement du parasite (Saul et al., 1990). Dans ce sens, plusieurs protéines parasitaires qui ont été montrées comme étant impliquées dans l'activité des NPP au stade asexué, comme Clag3 (Nguitragool et al., 2011), Rhop2 (Counihan et al., 2017) et Rhop3 (Sherling et al., 2017), ne sont pas exprimées au stade gamétocytaire. Cependant, un transcriptome récent a montré que les gènes *RhopH* et *Clag* étaient transcrits chez les parasites engagés vers la voie sexuée (Brancucci et al., 2018). Ces résultats remettent en question la présence d'une activité NPP chez les érythrocytes infectés par des gamétocytes.

Notre laboratoire a pu montrer lors de ma thèse que les EIG présentent également une activité NPP qui diminue au long de la gamétocytogenèse pour devenir inexistante au stade V. L'activité NPP est régulée par la présence d'AMPc, elle-même régulée par l'activité de la phosphodiestérase. De manière très intéressante, il a été montré que l'absorption de l'artémisinine est dépendante de l'activité NPP chez les gamétocytes, ce qui peut expliquer le manque d'efficacité des ACT sur les stades matures. L'ajout d'inhibiteurs de phosphodiesterases au stade V réactive les NPPs et permet à l'artémisinine de pénétrer dans les EIG matures, ce qui diminue leur viabilité (Bouyer et al, manuscrit soumis présenté en annexe). L'utilisation d'inhibiteurs de phosphodiesterases déjà présents sur le marché comme le sildénafil et le tadalafil est donc très prometteuse pour lutter contre la transmission du parasite de l'Homme au moustique.

5. Modification des propriétés adhésives des érythrocytes infectés

Chez les parasites asexués, les propriétés adhésives de la membrane des globules rouges qui les hébergent sont profondément modifiées. En effet, les érythrocytes parasités par des parasites asexués présentent une forte adhérence aux cellules de l'endothélium des vaisseaux sanguins grâce à l'expression de la protéine parasitaire PfEMP1 (Baruch et al., 1995; Su et al., 1995). Les parasites asexués dans des érythrocytes peuvent également adhérer aux érythrocytes non-parasités environnants par

un mécanisme que l'on appelle « rosetting ». Cette adhérence est due à la liaison de différents variants antigéniques du parasite exportés à la surface de l'érythrocyte (PfEMP1, STEVOR, RIFIN) avec des récepteurs à la surface des érythrocytes (CR1, héparane sulfate, antigène A du groupe ABO, Glycophorine A et Glycophorine C) (Chen et al., 1998, 2000; Goel et al., 2015; Niang et al., 2014; Rowe et al., 1997; Vigan-Womas et al., 2012).

Au contraire du stade asexué, les propriétés adhésives de la membrane du globule rouge des EIG ont été longtemps débattues et ne sont pas encore complètement élucidées. Premièrement, il a été envisagé, comme chez les parasites asexués, que les EIG pouvaient adhérer aux cellules endothéliales via PfEMP1. Dans ce sens, plusieurs études de Rogers et de ses collaborateurs montrent que les EIG de stades I à IV, et non les stades V, adhèrent aux cellules de mélanomes C32 (Rogers et al., 1996) et aux cellules endothéliales de moelle osseuse hBMEC (Rogers et al., 2000) via les récepteurs CD36 et ICAM-1. Ces résultats sont cependant temporisés par une autre étude montrant que seuls les EIG de stade I présentent des « knobs » à leur surface et adhèrent aux cellules de mélanomes C32 tandis que les EIG de stade II à V n'ont ni « knobs » à leur surface, ni propriétés adhésives (Day et al., 1998). Il est à noter que les auteurs de ces premières études ne disposaient pas d'autres outils que la microscopie sur frottis sanguins colorés au Giemsa pour distinguer les gamétocytes de stade I des trophozoïtes asexués, qui peuvent être facilement confondus morphologiquement. Par la suite, Silvestrini et ses collaborateurs ont montré que les EIG de stades III-IV n'adhèrent pas aux cellules endothéliales et ce indépendamment de la lignée utilisée (Silvestrini et al., 2012). Enfin, les mêmes auteurs ont montré que les EIG immatures dès le stade I, au contraire des parasites asexués, n'adhèrent pas aux cellules endothéliales (Tibúrcio et al., 2013). Ces résultats s'expliquent d'une part par la très faible présence de la protéine PfEMP1 chez les gamétocytes de stade I et son absence chez les gamétocytes de stades I à V (Silvestrini et al., 2010), et d'autre part par l'absence de « knobs » à la surface des EIG dès le stade I, qui sont discriminés des parasites asexués grâce à une lignée transgénique fluorescente uniquement au stade sexué (Silvestrini et al., 2010).

Jusqu'à récemment, il n'avait donc pas été démontré que les EIG immatures avaient des propriétés adhésives. Cependant, grâce à un système de co-culture en trois dimensions,

une étude récente a montré que les érythrocytes infectés par des parasites asexués et par des gamétocytes immatures présentaient des propriétés d'adhérence aux cellules primaires du mésenchyme de la moelle osseuse (hBM-MSCs) (Messina et al., 2018). De plus, cette interaction stimule la production de cytokines et de facteurs de croissance par les cellules hBM-MSCs, ce qui a pour conséquence d'augmenter la capacité des cellules endothéliales à créer des tubes vasculaires (Messina et al., 2018). Cette augmentation de l'angiogenèse pourrait être en lien avec l'entrée des parasites dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse. Il a déjà été montré que le parasite, et plus précisément les vésicules qu'il sécrète peuvent altérer la perméabilité de la barrière endothéliale (Mantel et al., 2016), ce qui pourrait faciliter le passage des parasites dans le parenchyme. Un autre moyen de franchir cette barrière endothéliale serait l'augmentation des capacités angiogéniques des cellules endothéliales par le parasite afin de passer l'endothélium via ses structures vasculaires. Cependant, l'entrée de *Plasmodium* dans la moelle osseuse restant inconnue, plusieurs études seront nécessaires pour en déterminer le mécanisme.

Les érythrocytes infectés par des parasites asexués et sexués semblent donc adhérer à différents types cellulaires, présents dans différents tissus de l'hôte. Ces différences de propriétés adhésives reflètent très certainement la différence des lieux de séquestrations entre les parasites asexués qui séquestrent dans les vaisseaux sanguins, et les gamétocytes immatures qui séquestrent dans le parenchyme de la moelle osseuse.

IV. STEVOR : une famille multigénique de protéines parasitaires

Parmi les protéines parasitaires exportées à la membrane du globule rouge, les protéines codées par les gènes *stevor* jouent un rôle important dans la biologie du gamétocyte. Les protéines STEVOR sont essentielles aux changements de déformabilité lors de la gamétocytogenèse et elles pourraient également être impliquées dans des phénomènes d'adhérence et de perméabilité de l'érythrocyte parasité par un parasite sexué.

1. Les familles multigéniques chez *Plasmodium*

Certaines protéines parasitaires insérées à la membrane du globule rouge parasité sont exposées à la surface de la cellule et donc au système immunitaire de l'hôte. Ces protéines parasitaires de surface appartiennent le plus souvent à des familles multigéniques. Ainsi, les variants antigéniques exposés à la surface de l'érythrocyte changent constamment, ce qui représente une stratégie d'échappement du système immunitaire par le parasite. Chez *P. falciparum*, on retrouve trois grandes familles multigéniques.

PfEMP1 est la protéine exportée à la surface du globule rouge infecté la plus étudiée (Howard et al., 1988). Les protéines PfEMP1 sont codées par plus de 60 gènes *var*, formant une famille multigénique de variants antigéniques (Gardner et al., 2002). La structure de PfEMP1 est composée de deux exons : le premier exon code pour la partie extracellulaire de la protéine et présente une séquence hypervariable, le second exon code pour la partie intra-cytoplasmique et sa séquence est conservée pour tous les membres de la famille multigénique.
Le pic de transcription des gènes *var* se situe 12h après l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte (Chen et al., 1998; Dahlbäck et al., 2007; Kyes et al., 2000; Schieck et al., 2007) et PfEMP1 est exportée à la surface du globule rouge dès le stade jeune trophozoïte (Kriek et al., 2003). A la membrane de l'érythrocyte, les protéines PfEMP1 sont regroupées au sein des « knobs ».
La régulation de la transcription des gènes *var*, due à des mécanismes épigénétiques, est très décrite dans la littérature. Essentiellement, les gènes *var* sont réprimés par défaut,

ceci grâce à la marque H3K9me3 des histones de l'hétérochromatine permettant le recrutement de HP1 sur le promoteur des gènes *var* pour en empêcher la transcription (Duraisingh et al., 2005; Freitas-Junior et al., 2005; Tonkin et al., 2009). De par le phénomène d'exclusion allélique, un seul gène *var* est exprimé par parasite durant tout le cycle. L'activation de la transcription à lieu par la perte de HP1 (Lopez-Rubio et al., 2007; Pérez-Toledo et al., 2009). L'expression des gènes *var* est régulée par un phénomène de switching qui permet de changer l'unique gène exprimé par le parasite (Peters et al., 2002; Roberts et al., 1992).

PfEMP1 est impliqué dans deux phénomènes de cytoadhérence : l'adhérence aux cellules endothéliales et le rosetting qui correspond à l'adhérence d'un érythrocyte parasité à plusieurs érythrocytes sains. Cette adhérence des érythrocytes infectés aux cellules de l'hôte engendre l'obstruction des microcapillaires irriguant les organes vitaux et est associée aux cas de paludismes sévères (Heddini et al., 2001; Kun et al., 1998).

Cependant, le rosetting peut exister indépendamment de la protéine PfEMP1 (Helmby et al., 1993). Ceci suggère que d'autres protéines parasitaires exportées à la surface du globule rouge parasité pourraient être à l'origine de ce phénotype. Dans ce contexte, plusieurs expériences d'hybridation de l'ADN ont été menées pour découvrir d'autres gènes codant pour des protéines qui pourraient être impliquées dans le rosetting. Deux grandes familles de gènes ont alors été identifiées : les gènes *rif* (Weber, 1988) et les gènes *stevor* (Cheng et al., 1998).

Les gènes *rif* sont présents à plus de 150 copies dans les régions subtélomériques des chromosomes composant le génome de *P. falciparum* (Gardner et al., 2002). Ils codent pour la plus grande famille multigénique de variants antigéniques: les protéines RIFINs. Les RIFINs sont exportées dans le globule rouge parasité via les Maurer's Cleft (Haeggström et al., 2004) et exposées à la surface de l'érythrocyte (Bachmann et al., 2015; Kyes et al., 1999). Plus précisément, les RIFINs sont divisées en deux sous-groupes : les RIFINs A et les RIFINs B (Joannin et al., 2008). Ces deux groupes sont différenciés par leur localisation sub-cellulaire: les RIFINs du groupe A sont localisées à la surface de l'érythrocyte infecté alors que les RIFINs du groupe B ne sont pas exposées à la surface mais se trouvent à l'intérieur de la vacuole parasitaire (Petter et al., 2007).

Les gènes *rif* sont transcrits à partir de 12h après l'invasion de l'érythrocyte et les protéines RIFIN sont retrouvées à la surface du globule rouge infecté entre 16 et 20 heures après l'invasion (Kyes et al., 1999). En plus d'être exprimés au stade asexué, les gènes *rif* sont également transcrits tout au long de la gamétocytogenèse (Mwakalinga et al., 2012; Wang et al., 2010), ainsi que dans les mérozoïtes (Petter et al., 2007). Des études de protéomique montrent par spectrométrie de masse que les RIFINs sont aussi retrouvées chez les sporozoïtes (Florens et al., 2002).

Lors du cycle intra-érythrocytaire du parasite, les RIFINs jouent un rôle important dans la pathologie du paludisme. Ces protéines parasitaires sont à l'origine du phénomène de rosetting (Fernandez et al., 1999; Kyes et al., 1999) qui mène à l'occlusion des microcapillaires (Goel et al., 2015). Indépendamment de PfEMP1, les RIFINs A se lient soit aux sucres du groupe A de l'érythrocyte, causant la formation de rosettes géantes, soit à la glycophorine A des érythrocytes de groupe O, causant la formation de rosettes plus petites (Goel 2015). Les gènes *rif* codent pour des variants antigéniques : le changement de protéine RIFIN exposée à la surface de l'érythrocyte parasité, parmi les 150 variants existants, participe à l'échappement du parasite au système immunitaire (Abdel-Latif et al., 2002, 2003). Les RIFINs interagissent avec le récepteur LILRB1 (leucocyte immunoblogulin-like receptor B1) présent à la surface des cellules immunitaires. La liaison de RIFIN au LILRB inhibe l'action des cellules T, B, NK et des monocytes en empêchant la production d'anticorps et l'activation des cellules cytotoxiques (Saito et al., 2017). Les RIFINs ont donc un rôle direct et essentiel dans la répression du système immunitaire de l'hôte par le parasite.

L'identification des gènes *stevor* a lieu en 1998, avant le séquençage complet du génome de *P. falciparum* (Cheng et al., 1998). Le séquençage de plusieurs gènes *stevor* a pu montrer que ces gènes contenaient tous deux exons entrecoupés d'un intron très riche en AT. Dans l'exon 1, les extrémités 5' et 3' présentent des séquences très peu polymorphiques. A l'inverse, la séquence se trouvant au centre de l'exon 2 est hautement variable. Tous les gènes *stevor* se situent dans la région subtélomérique des 14 chromosomes de *P. falciparum*, en association avec les gènes *rifs* (Cheng et al., 1998).

Les études prédictives de la structure de la protéine STEVOR prévoient la présence d'un peptide signal d'export, tout comme chez les RIFINs, ce qui laisse penser que ces protéines sont exportées hors de la vacuole parasitaire (Cheng et al., 1998).
Ces premières données indiquent que les gènes *stevor* apparaissent comme la troisième grande famille multigénique chez *P. falciparum*, aux côtés des gènes *var* et des gènes *rif*, codant pour des variants antigéniques exportés à la surface de l'érythrocyte parasité.

2. Expression des STEVORs au cours du cycle parasitaire

Initialement découverte chez les stades asexués du parasite (trophozoïtes et schizontes), l'expression des protéines STEVOR a été caractérisée tout au long du cycle érythrocytaire. Les STEVORs sont exprimées dès le stade mérozoïte, au niveau des rhoptries (Khattab et al., 2008), organelles sécrétrices essentielles lors de l'invasion d'un nouveau globule rouge par le parasite.

Lors du développement intra-érythrocytaire du globule rouge, le pic d'expression des ARN *stevor* se situe 28h post-invasion, au stade trophozoïte (Kaviratne et al., 2002). D'un point de vue protéique, l'expression des STEVORs a pu être mise en évidence par imagerie d'immunofluorescence sur des trophozoïtes et des schizontes avec des anticorps anti-STEVOR (Blythe et al., 2008; Kaviratne et al., 2002) et des parasites transgéniques possédant une séquence protéique STEVOR marquée d'une étiquette (Lavazec et al., 2006). En 2012, une étude sur des isolats cliniques confirme que les STEVORs sont exprimées chez les érythrocytes parasités par des trophozoïtes et des schizonts issus de pays endémiques (Bachmann et al., 2012). De manière surprenante, cette étude met en évidence l'existence d'un premier pic d'expression des ARN *stevor* au stade jeune ring chez les isolats de terrain, en plus du second pic à 28h détecté chez les souches de laboratoire. De récentes expériences ont confirmé qu'il y avait bien deux pics d'expression des ARN *stevor* lors du cycle asexué : le premier au stade trophozoïte et le second à la fin de la schizogonie. Le pic d'expression, au stade anneau n'a quant à lui pas été retrouvé par ces expériences de séquençage de l'ARN (Wichers et al., 2019).
Les ARN *stevor* sont exprimés au cours de la gamétocytogenèse (McRobert et al., 2004) et les transcrits des gènes *stevor* chez les gamétocytes semblent être les mêmes que

chez leurs progéniteurs asexués (Sharp et al., 2006). Les protéines STEVOR sont détectées par western-blot des stades I à V (Tiburcio 2012).

Peu d'études ont pu mettre en évidence l'expression de protéines STEVOR chez les sporozoïtes. Il faut cependant noter qu'une étude de protéomique détecte la présence d'une seule protéine STEVOR au stade sporozoïte, bien que celle-ci ne soit pas retrouvée comme exprimée aux stades mérozoïtes, trophozoïtes et gamétocytes et que l'étude n'étudie l'expression que d'un variant STEVOR parmi toute la famille multigénique (Florens et al., 2002). D'autre part, une unique expérience d'imagerie d'immunofluorescence montre la présence de STEVOR au stade sporozoïte (McRobert et al., 2004). Il est à noter qu'une récente étude a mis en évidence qu'un variant de la famille multigénique *var* était exprimé chez les sporozoïtes. Cette protéine PfEMP1, présente à la surface des sporozoïtes est essentielle pour l'infection des hépatocytes (Zanghì et al., 2018). Ainsi la question de l'expression des STEVORs au stade sporozoïte reste encore ouverte et de nouvelles études viendront peut être, comme pour PfEMP1, montrer que cette famille multigénique peut également avoir un rôle dans la phase hépatique de l'infection parasitaire.

3. Régulation de l'expression des *stevor*

Les différents membres de la famille des gènes *stevor* ont des séquences variables (Cheng et al., 1998; Gardner et al., 2002; Kaviratne et al., 2002) et sont plus ou moins exprimés chez les parasites. Chez la lignée parentale NF54 on observe une faible expression de tous les gènes *stevor* (Lavazec et al., 2007). Ce phénomène peut être expliqué de deux manières : soit seule une sous-population de parasites exprime les gènes *stevor*, soit tous les parasites de cette souche polyclonale expriment les différents gènes *stevor* de façon hautement hétérogène. Après clonage de la lignée parentale, l'analyse de l'expression par RT-qPCR montre que seul un gène *stevor* est exprimé par clone. Ainsi dans les différents clones obtenus on retrouve l'expression de différents gènes *stevor* alors que de nombreux clones n'en expriment aucun (Lavazec et al., 2007). L'expression des gènes *stevor* est donc clonale et variable. Ce phénomène a été confirmé au niveau protéique par Niang et ses collaborateurs qui ont généré deux anticorps dirigés contre les parties N-terminales de deux protéines STEVOR différentes. Des expériences

d'immunofluorescence, de Western-Blot et de cytométrie en flux ont montré que ces anticorps reconnaissent spécifiquement certains clones, qui expriment les gènes *stevor* contre lesquels les anticorps sont dirigés (Niang et al., 2009). Le sous-clonage de clones dont l'expression pour les gènes *stevor* avait déjà été établie (Lavazec et al., 2006) montre que l'expression des gènes *stevor* est soumise à un phénomène de « switching » (Lavazec et al., 2007) comme les protéines PfEMP1 (Scherf et al., 1998) .

La présence des variants antigéniques à la surface du globule rouge suggère qu'ils sont impliqués dans les interactions de la cellule parasitée avec son milieu extérieur. Ce rôle supposé laisse penser que ces protéines ne sont pas utiles au parasite dans une culture *in vitro*, en l'absence du système immunitaire de l'hôte. En effet, les gènes codant pour les familles multigéniques, y compris les *stevor*, sont tous plus exprimés chez les isolats cliniques que chez les souches adaptées à la culture en laboratoire (Daily et al., 2005), ces résultats ont été confirmés spécifiquement pour la famille multigénique *stevor* par RT-qPCR (Bachmann et al., 2012). Cette surexpression des protéines STEVOR *in vivo* a été confirmée au niveau protéique : en imagerie de fluorescence (Blythe et al., 2008) ainsi qu'en Western Blot (Bachmann et al., 2012). D'autre part, l'absence d'expression de *stevor* chez certaines souches (Blythe et al., 2008) et certains clones de NF54 (Lavazec et al., 2007) corrobore l'hypothèse d'un rôle de ces variants antigéniques uniquement *in vivo*, en présence de l'hôte du parasite.

4. Localisation et structure des STEVORs

a. Localisation des STEVORs

Au stade mérozoïte la protéine est localisée au pôle apical du parasite, en co-localisation avec les protéines du mérozoïte RH1 et MSP1 (Blythe et al., 2008; Khattab et al., 2008; Niang et al., 2014). C'est par immunomarquage en microscopie électronique que la présence des STEVORs a pu être identifiée au niveau des rhoptries du mérozoïte (Khattab et al., 2008). La présence de STEVOR chez le mérozoïte a été confirmée par cytométrie en flux et immunofluorescence sur des mérozoïtes non perméabilisés (Khattab and Meri, 2011; Niang et al., 2014). Le fait que ce variant antigénique se trouve à la

surface des mérozoïtes et au niveau des rhoptries pourrait suggérer un rôle des STEVORs lors de l'étape clef de l'invasion du globule rouge.

Aux stades intra-érythrocytaires asexués, les STEVORs semblent localisées au niveau des Maurer's clefts et de la membrane de l'érythrocyte parasité (Blythe et al., 2008; Kaviratne et al., 2002; Lavazec et al., 2006). De plus, des techniques d'immunofluorescence sur cellules vivantes, de cytométrie en flux et de microscopie à force atomique (AFM) ont mis en évidence que les STEVORs sont exprimées à la surface des érythrocytes parasités par des schizontes (Niang et al., 2009; Singh et al., 2017).
Chez les gamétocytes, les protéines STEVOR semblent associées à la membrane de l'érythrocyte hôte (McRobert et al., 2004). Cependant, les résultats de Western blot indiquent qu'une deuxième bande de plus faible poids moléculaire correspondant à STEVOR est présente chez les EIG et absente des formes asexuées (McRobert et al., 2004). Cette bande pourrait correspondre à une forme tronquée de STEVOR chez les gamétocytes. Enfin, les STEVORs sont détectées au niveau de la membrane des EIG immatures, et non des EIG matures, et sont exposées à la surface du globule rouge parasité (Tibúrcio et al., 2012).

b. Structure des STEVORs

La structure des protéines STEVOR à la membrane de l'érythrocyte parasité a longtemps été débattue.
Les premières études structurales *in silico* prévoient que les protéines STEVOR contiendraient deux domaines transmembranaires dont un incertain, qui n'est pas retrouvé dans tous les modèles de prédiction utilisés. Le dernier domaine transmembranaire serait orienté de façon à ce que l'extrémité C-terminale se situe dans le cytoplasme. Les deux domaines prédits pour être transmembranaires encadrent une séquence hypervariable, ce qui suggère que cette boucle entre les deux domaines transmembranaires est exposée à la surface de l'érythrocyte parasité (Cheng et al., 1998).
Certaines données expérimentales soutiennent l'hypothèse qu'un seul des deux domaines est effectivement transmembranaire: il a été observé par Western Blot que la partie N-terminale de la protéine est en partie (mais de manière non significative) digérée par la trypsine (Bachmann et al., 2015). De plus, Niang et ses collaborateurs ont montré

par immunofluorescence que des anticorps dirigés contre la partie N-terminale de la protéine ne reconnaissaient plus leurs épitopes après digestion des cellules à la trypsine (Niang et al., 2009). Récemment, l'insertion de la protéine STEVOR dans un système de microsome a permis de montrer que dans ce système *in vitro*, STEVOR est composé d'un seul domaine transmembranaire effectif (Wichers et al., 2019). Enfin, il a été montré que les sérums de patients infectés maliens reconnaissent les peptides correspondants à la partie semie-conservée de la protéine STEVOR (Zhou et al., 2019). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une topologie à un seul domaine transmembranaire des STEVORs, la partie C-terminale de la protéine étant du côté cytoplasmique et la partie N-terminale exposée à la surface de la cellule infectée. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour statuer sur la topologie des STEVORs. Il serait intéressant de générer un parasite transgénique présentant plusieurs étiquettes dans la séquence protéique. Plus précisément, il faudrait insérer une première étiquette dans la partie N-terminale avant le premier domaine transmembranaire prédit, puis une étiquette entre les deux domaines et enfin une dernière au niveau de la partie C-terminale de la protéine. Ainsi, en utilisant des anticorps dirigés contre toutes ces étiquettes on pourrait déterminer la topologie exacte des protéines STEVOR à la membrane des érythrocytes parasités.
L'absence de la protéine STEVOR à la membrane des EIG matures (Tibúrcio et al., 2012) suggère un changement de topologie de ces protéines lors de la gamétocytogenèse. Cette disparition pourrait être due soit à un clivage de la partie extracellulaire de la protéine, soit à une élimination de la protéine via la sécrétion de vésicules. Il est également possible qu'un changement de conformation de la protéine au stade V empêche sa détection par les anticorps.

5. Fonctions des protéines STEVOR

Au vu de leur expression au long du cycle de *P. falciparum* et de leur localisation cellulaire, les protéines STEVOR ont différentes fonctions au sein de l'érythrocyte parasité. Elles sont impliquées dans l'invasion du globule rouge, dans la déformabilité de la cellule hôte et dans le phénomène d'adhérence aux érythrocytes environnants.

a. Invasion de l'érythrocyte

La présence des STEVORs au pôle apical des mérozoïtes, leur confère un rôle dans l'invasion des érythrocytes. Ce rôle a été validé par l'effet inhibiteur de deux anticorps anti-STEVOR sur l'invasion. Ces anticorps inhibent l'invasion de manière dose dépendante, tout comme les anticorps dirigés contre la protéine MSP1, essentielle pour l'invasion de l'érythrocyte par le parasite. Plus précisément, les anticorps anti-STEVOR semblent inhiber l'étape initiale de fixation du mérozoïte au globule rouge (Niang et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés par une étude récente montrant que des sérums dirigés contre différentes protéines STEVOR inhibent la croissance des parasites. Plus spécifiquement, la croissance est diminuée à cause de l'inhibition de l'invasion des globules rouges par le mérozoïte (Wichers et al., 2019).

b. Déformabilité de l'érythrocyte parasité

Les STEVORs sont impliquées dans la perte de déformabilité du globule rouge au stade asexué et lors de la gamétocytogenèse. Le rôle de STEVOR dans la régulation des propriétés mécaniques de la cellule hôte a été montré en utilisant des clones qui exprimaient ou non un variant *stevor* ainsi que des parasites transgéniques surexprimant une protéine STEVOR ou inhibant l'expression de toute la famille multigénique. L'expression des STEVORs augmente la rigidité de l'érythrocyte parasité tandis qu'en l'absence de ces protéines, l'érythrocyte hôte est plus déformable (Sanyal et al., 2012).

Chez les gamétocytes, l'expression de STEVOR du stade I à IV entraine la rigidité de l'EIG tandis qu'au stade V, les protéines STEVOR ne sont plus détectées à la membrane de l'EIG qui devient déformable (Tibúrcio et al., 2012). La rigidité des EIG immatures est due à la phosphorylation de la partie C-terminale intra-cytoplasmique de la protéine STEVOR. Celle-ci est alors liée au cytosquelette de spectrine du globule rouge entrainant la rigidification de la membrane. Au stade V, les STEVORs ne sont plus phosphorylées ce qui entraine une augmentation de la déformabilité de l'érythrocyte parasité (Naissant et al., 2016).

c. Echappement au système immunitaire

Aucun rôle direct des protéines STEVOR dans l'échappement du parasite au système immunitaire de l'hôte n'a été clairement mis en évidence. Cependant, les gènes *stevor* appartiennent à une famille multigénique et exposent différents variants de façon clonales à la surface de l'érythrocyte parasité (Lavazec et al., 2007; Niang et al., 2009). La variation clonale due au changement d'expression des STEVORs entraine un changement des propriétés antigéniques de la cellule hôte (Niang et al., 2009). Ce changement de propriétés antigéniques pourrait participer à l'échappement au système immunitaire acquis de l'hôte. D'autre part, les gènes *stevor* sont plus exprimés *in vivo* que *in vitro* (Bachmann et al., 2012) où il n'y a aucune pression immunitaire sur le parasite. Comme les PfEMP1 et les RIFINs, les STEVORs pourraient donc participer à l'échappement au système immunitaire humain par le parasite.

d. Rosetting

Tout comme les protéines PfEMP1 et RIFIN, les protéines STEVOR sont impliquées dans le phénomène de rosetting, c'est-à-dire dans l'adhérence des érythrocytes parasités aux érythrocytes sains. La transfection des différents domaines de la protéine STEVOR dans des cellules COS a permis de montrer que le domaine semi-conservé de la partie N-terminale de la protéine se lie aux érythrocytes non-infectés et que des anticorps dirigés contre cette partie N-terminale inhibent cette adhérence. Des érythrocytes parasités par des schizontes de clones parasitaires surexprimant STEVOR adhèrent à plusieurs érythrocytes non-parasités et forment des rosettes. La formation de ces rosettes est inhibée par l'ajout d'anticorps anti-STEVOR. Ce phénomène de rosetting via STEVOR peut se faire indépendamment de PfEMP1 car une souche transgénique 3D7ΔMAHRP1, dans laquelle les protéines PfEMP1 ne peuvent pas être exportées à la surface de l'érythrocyte, peut former des rosettes (Niang et al., 2014). C'est via la glycophorine C (GPC), protéine érythrocytaire de surface, que les STEVORs engendrent l'adhérence de l'érythrocyte parasité aux érythrocytes environnants. En effet, des anticorps monoclonaux dirigés contre la GPC ainsi que la protéine recombinante de la GPC inhibent la formation de rosettes chez les souches exprimant STEVOR (Niang et al., 2014). La force d'interaction entre les érythrocytes parasités et les érythrocytes non-

parasités au sein de rosettes dépendantes de l'expression de STEVOR a été déterminée par microscopie de force atomique et par aspiration par micropipette (Singh et al., 2017). Enfin, ces rosettes peuvent être formées aussi bien en conditions statiques que dans un flux physiologique (Singh et al., 2017). Des analyses transcriptomiques sur des souches parasitaires enrichies pour leur capacité à former des rosettes ont montré une surexpression de certaines protéines STEVOR par rapport aux souches non-enrichies (Niang et al., 2014). Comme chez la famille multigénique des gènes *var*, seule une partie des gènes *stevor* semble donc être impliquée dans l'adhérence aux globules rouges.

La présence des protéines STEVOR à la membrane des EIG suggèrent que ces protéines pourraient être impliquées dans une éventuelle adhérence des EIG aux cellules de l'hôte parasité.

V. Les interactions entre le parasite et la moelle osseuse

La moelle osseuse est étroitement liée avec le parasite lors de l'affection par *P. falciparum*. Ce tissu est le siège de l'hématopoïèse, la production de toutes les cellules sanguine, alors que le parasite effectue une grande partie de son cycle de développement dans une cellule hôte érythrocytaire. De plus, les formes sexuées du parasite sont retrouvées en majorité dans la moelle osseuse. Ces interactions entre *Plasmodium* et la moelle osseuse sont à l'origine de diverses affections touchant la moelle et le sang qui constituent en partie la pathologie du paludisme.

1. Moelle osseuse et érythropoïèse

La moelle osseuse est un tissu complexe que l'on retrouve dans les os. Ce tissu extrêmement important est le siège de l'hématopoïèse définitive adulte. La production des cellules du sang se fait à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSC) qui sont multipotentes et peuvent donner lieu à toutes les lignées cellulaires sanguines. La quiescence des HSC permet de disposer d'un pool constant de cellules souches. Parallèlement à cet auto-renouvèlement, une partie des HSC vont donner naissance à des progéniteurs multipotents (MPP). Ces cellules ont perdu leur capacité d'auto-renouvèlement mais peuvent générer toutes les cellules sanguines. Les MPP peuvent se

différencier en deux types de cellules différentes : les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) qui vont générer la myélopoïèse et les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) qui vont générer la lymphopoïèse. D'un côté, les CLP se différencient en lymphocytes T, en lymphocytes B ou en lymphocytes natural killer. De l'autre côté les CMP se différencient soit en progéniteurs granulo-monocytaires (GMP) qui donneront naissance aux différentes cellules monocytaires et granulocytaires, soit en progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP) qui donneront naissance d'une part aux plaquettes et d'autre part aux globules rouges par le processus d'érythropoïèse. Toute l'hématopoïèse se fait dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse, appelé parenchyme, afin de produire les cellules sanguines qui, une fois matures, se retrouvent dans la circulation.

Récemment, de nouveaux modèles hiérarchiques du processus d'hématopoïèse ont été proposés. En effet, les MEP pourraient provenir directement des HSC sans passer par les étapes MPP et CMP (Notta et al., 2016; Yamamoto et al., 2013). Un autre modèle, plus proche du modèle classique, propose que les PNB se différencient plutôt à partir des MEP (Pellin et al., 2019). Nous pouvons donc en conclure que le schéma du processus hématopoïétique n'est pas encore clairement défini et pourrait évoluer au fil des futures études.

a. Structure du parenchyme

L'espace extravasculaire de la moelle osseuse est composé de moelle dite rouge et de moelle dite jaune. La moelle jaune correspond à du tissu adipeux et est composée en majorité d'adipocytes. La moelle rouge correspond à du tissu hématopoïétique et est composée de cellules souches, de progéniteurs et de précurseurs hématopoïétiques. La moelle rouge abrite donc la différenciation des cellules souches en cellules du sang comme les cellules érythroïdes, les plaquettes, les monocytes et les globules blancs. La proportion de moelle rouge et jaune peut varier dans le parenchyme en fonction des besoins hématopoïétiques. Si le besoin en cellules sanguines est important le tissu hématopoïétique va se développer au détriment du tissu adipeux et *vice versa* (Gimble et al., 1996). La moelle osseuse est traversée par des artères et des veines qui deviennent dans le parenchyme des structures vasculaires spécialisées appelées sinus (Branemark, 1959; Travlos, 2006). Une fois différenciées, les cellules sanguines peuvent rejoindre la

circulation en traversant la barrière endothéliale pour passer dans les vaisseaux sanguins traversant le parenchyme.

b. Erythropoïèse

L'érythropoïèse correspond à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse en globules rouges. Ce processus est essentiel au fonctionnement de tous les organes car ce sont les globules rouges qui transportent l'oxygène dans tout l'organisme, le distribuant dans les différents tissus. L'érythropoïèse engendre la production de 200 milliards d'érythrocytes par jour qui ont une durée de vie de 120 jours. La production de globules rouges est divisée en deux parties : d'abord l'érythropoïèse précoce puis l'érythropoïèse tardive appelée aussi différenciation terminale.

i. Erythropoïèse précoce

L'érythropoïèse commence par la différenciation des progéniteurs érythro-mégacaryocitaires (MEP) en BFU-E (Burst Forming Unit – Erythroid). Ces cellules sont définitivement ancrées dans la lignée érythroïde. Les BFU-E, qui ont une grande capacité de prolifération, se différencient en CFU-E (Colony Forming Unit – Erythroid) qui prolifèrent moins. L'érythropoïétine (EPO) et le facteur de cellules souches appelé « stem cell factor » (SCF) sont indispensables à la survie et à la prolifération des progéniteurs érythroïdes. Bien que les BFU-E et les CFU-E ne soient pas distinguables morphologiquement, on peut les différencier grâce à l'expression du cluster de différenciation 34 (CD34) qui est exprimé par les BFU-E mais plus par les CFU-E. De manière opposée, le cluster de différenciation 36 (CD36) n'est pas exprimé par les BFU-E mais devient exprimé par les CFU-E (Li et al., 2014).

ii. Différenciation terminale

Le début de l'érythropoïèse tardive débute par la différenciation des CFU-E en proérythroblastes. Commence alors la différenciation terminale où les proérythroblastes donnent lieu à des érythroblastes basophiles puis à des érythroblastes polychromatophiles et des érythroblastes acidophiles qui enfin donneront lieu à la production de réticulocytes, cellules énuclées précurseurs des globules rouges matures

ou normocytes. Le principal régulateur essentiel à l'érythropoïèse terminale est l'EPO sans laquelle les proérythroblastes ne peuvent pas donner naissance aux réticulocytes. Tout au long de la différenciation des proérythroblastes en érythroblastes acidophiles, les cellules voient leur taille diminuer et leur noyau se condenser peu à peu.

Un autre fait marquant de l'érythropoïèse terminale est le début de la synthèse d'hémoglobine par les érythroblastes. La molécule d'hémoglobine est essentielle au transport de l'oxygène dans le sang. Celle-ci est composée de quatre chaînes de globines qui contiennent chacune un hème, le cofacteur permettant la fixation de l'oxygène. La synthèse d'hémoglobine chez les érythroblastes commence au stade basophile et devient maximale au stade acidophile (Aviv et al., 1976).

Les différentes étapes de différenciation peuvent aussi être identifiées grâce aux différentes protéines de surfaces exprimées par les érythroblastes au long de l'érythropoïèse tardive (Hu et al., 2013) :

- L'expression du cluster de différenciation 71 (CD71) est très forte en début de différenciation puis diminue après le stade polychromatophile pour devenir nulle chez les réticulocytes matures et les normocytes. Le CD71 est utilisé comme un marqueur de la maturation des réticulocytes (Malleret et al., 2013).
- La glycophorine A (GPA) est exprimée à partir du stade proérythroblaste et atteint son maximum entre le stade basophile et polychromatophile. Elle continue ensuite à être exprimée jusqu'à la fin de la différenciation et chez les globules rouges matures, c'est un marqueur érythroïde.
- L'expression du transporteur membranaire échangeur d'anions bande 3 est acquise progressivement à partir du stade basophile et est maximale au stade acidophile.
- L'expression de l'intégrine α4 est très forte en début de différenciation puis diminue à partir du stade polychromatophile.

Une fois acidophiles, les érythroblastes vont expulser leur noyau très condensé qui donnera naissance à un pyrénocyte, phagocyté dans la moelle osseuse. La cellule énuclée qui résulte de cette expulsion est le réticulocyte qui traverse l'endothélium des sinus pour finir sa maturation une fois dans la circulation sanguine.

c. Ilots érythroblastiques

La différenciation des précurseurs érythropoïétiques se fait au sein d'une niche spécialisée appelée îlot érythroblastique. L'îlot érythroblastique a été découvert par le français Marcel Bessis en 1958 (Bessis, 1958). Cette niche érythropoïétique est composée d'un macrophage central, entouré de cellules érythroïdes en cours de développement. Entre 5 et 30 érythroblastes se trouvent généralement autour du macrophage (Lee et al., 1988) formant une structure de plusieurs dizaines de micromètres de diamètre. Les érythroblastes de l'îlot sont rattachés au macrophage central par des interactions ligands-récepteurs qui ont beaucoup été décrites dans la littérature. C'est tout d'abord la protéine Emp (Erythroblast macrophage protein) qui a été identifiée à la fois à la surface de l'érythroblaste et du macrophage comme étant capable de créer une liaison entre les deux types cellulaires (Hanspal and Hanspal, 1994). Depuis d'autres couples ligands récepteurs ont ensuite été identifiés. L'α4β1 intégrine à la surface de l'érythroblaste lie VCAM-1 à la surface du macrophage (Sadahira et al., 1995) et le récepteur érythroïde ICAM-4 lie l'α_V intégrine au macrophage central (Lee et al., 2006). D'autres récepteurs à la surface des macrophages (comme CD69 (Morris et al., 1991) et CD163 (Barbé et al., 1996)) ont été identifiés comme pouvant potentiellement participer à l'attachement des érythroblastes mais leurs ligands érythroïdes non pas été déterminés. La niche érythropoïétique que constitue l'îlot érythroblastique permet également des interactions entre les érythroblastes eux-mêmes. Ces interactions sont à l'origine d'un rétrocontrôle de l'érythropoïèse afin de ne pas mener à une surproduction de globules rouges dans des conditions normales d'hypoxie. Les érythroblastes immatures expriment à leur surface le récepteur FAS et les érythroblastes matures expriment le ligand de ce récepteur, FASL. Lorsque FAS entre en contact avec son ligand FASL il induit l'apoptose de sa cellule via l'activation des caspases. Ainsi, lorsqu'il y a suffisamment d'érythroblastes matures produits, la liaison FAS/FASL entraine l'apoptose et l'arrêt de la maturation des érythroblastes immatures (De Maria et al., 1999).

Le macrophage central a plusieurs rôles dans le développement des érythroblastes. Tout d'abord, la présence du macrophage augmente les capacités de prolifération des érythroblastes en contact avec celui-ci (Rhodes et al., 2008). De plus, le contact entre les

érythroblastes en développement et le macrophage central via les interactions Emp/Emp favorise la survie des érythroblastes en inhibant le phénomène d'apoptose (Hanspal and Hanspal, 1994; Hanspal et al., 1998). Au contraire, en fonction de la disponibilité en EPO, le macrophage central peut aussi avoir pour rôle d'inhiber la prolifération des érythroblastes afin de freiner l'érythropoïèse. Le macrophage peut sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α (Tumor Necrosis Factor) et l'IFN-γ (Interferon) favorisant l'apoptose des érythroblastes (Felli et al., 2005). Le macrophage est également une ressource en fer importante pour les cellules érythroïdes qui en ont besoin en grande quantité lors de leur développement (Bessis and Breton-Gorius, 1962). Il a aussi un rôle essentiel dans l'élimination des pyrénocytes produits lors de l'énucléation en les phagocytant (Bessis, 1958). Le macrophage central de l'îlot pourrait aussi être impliqué dans la mise en place de l'érythropoïèse de stress, c'est-à-dire dans la surproduction rapide d'érythrocytes due à une forte diminution de la pression partielle en oxygène. En effet, chez les souris traitées au clodronate qui ont donc un pool de macrophages fortement diminué, la mise en place d'une érythropoïèse de stress en réponse à un facteur anémiant est plus longue que chez les souris contrôles (Chow et al., 2013).

Les îlots érythroblastiques sont localisés de manière uniforme dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse. Chez le rat, les îlots localisés loin des sinus ont une grande proportion de proérythroblastes alors que les îlots proches des sinus sont composés en majorité d'érythroblastes acidophiles (Yokoyama et al., 2003). Cette observation chez ce modèle murin, bien qu'elle ne soit pas confirmée chez l'Homme, suggère que les îlots érythroblastiques pourraient se déplacer au cours de l'érythropoïèse vers le sinus afin de faciliter la sortie des réticulocytes dans la circulation périphérique.

2. Séquestration des gamétocytes immatures dans le parenchyme de la moelle osseuse

a. Détection des gamétocytes dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse

La présence de parasites, et plus particulièrement des gamétocytes, dans la moelle osseuse avait été détectée depuis plusieurs décennies (Smalley et al., 1981; Wickramasinghe et al., 1987). Des échantillons de moelle osseuse de patients atteints de

paludisme cérébral avaient permis d'observer des parasites sexués dans le sinus et dans le parenchyme. Les érythroblastes présents dans ces moelles de personnes impaludées présentaient des morphologies anormales (Wickramasinghe et al., 1987). Plus récemment, l'analyse histologique de biopsies et d'échantillons de moelle osseuse (Farfour et al., 2012; Joice et al., 2014) et des techniques de détection moléculaires (Aguilar et al., 2014a) ont confirmé à l'aide de marqueurs moléculaires spécifiques du stade sexué que les gamétocytes immatures sont localisés dans la moelle osseuse et que beaucoup se trouvent dans l'espace extravasculaire, c'est-à-dire en dehors de la circulation sanguine. Au contraire, les EIG matures de stade V sont localisés dans la circulation où ils peuvent être transmissibles au moustique.

Un modèle de souris humanisées immunodéprimées et greffées avec des érythrocytes humains puis injectées avec le parasite *P. falciparum* a permis d'observer l'enrichissement en gamétocytes dans la moelle osseuse et dans la rate des souris par immunohistochimie et détection moléculaire (Duffier et al., 2016). Ce modèle pourrait être un outil intéressant pour mieux comprendre la séquestration des gamétocytes dans le parenchyme de la moelle osseuse. Cependant, il présente des limitations du fait de l'inhibition de l'érythropoïèse et de la disparition des ilots érythroblastiques provoquées par la greffe des globules rouges humains.

Les gamétocytes de *P. vivax* ont également été observés dans le parenchyme de la moelle osseuse de singes infectés et de patients impaludés (Baro et al., 2017; Obaldia et al., 2018). Chez les souris infectées par *P. berghei*, les gamétocytes sont aussi localisés dans le parenchyme et protégés de la phagocytose par les macrophages résidents de la moelle osseuse (De Niz et al., 2018).

b. Présence des gamétocytes immatures au contact des îlots érythroblastiques

Dans le parenchyme de la moelle osseuse, les gamétocytes ont été observés en contact avec les îlots érythroblastiques et donc avec les précurseurs érythroïdes et le macrophage qu'abrite cette niche. Sur des coupes histologiques de patients impaludés décédés, 50 à 90% des gamétocytes marqués avec un anticorps spécifique anti-Pfs16 sont localisés au niveau des îlots érythroblastiques marqués avec des anticorps dirigés

contre la protéine érythroïde CD71 (Joice et al., 2014). De manière surprenante, les gamétocytes présents dans la moelle osseuse sont moins retrouvés dans les macrophages que les parasites asexués ce qui suggère qu'ils seraient moins susceptibles à la phagocytose par les macrophages résidents (Joice et al., 2014). Ce résultat propose une interaction particulière des gamétocytes avec les macrophages des îlots érythroblastiques présents dans la moelle osseuse.

c. Infection des érythroblastes par le parasite

En plus d'être au contact des îlots érythroblastiques, certains gamétocytes de *P. falciparum* ont été observés à l'intérieur des érythroblastes sur des coupes histologiques de personnes impaludées (Joice et al., 2014). Cette observation suggère que les précurseurs érythroïdes peuvent être des cellules hôtes pour *P. falciparum*. *In vitro*, il est possible d'infecter les cellules érythroïdes et d'y observer le développement du parasite du stade anneau jusqu'au stade schizonte (Joice et al., 2014; Tamez et al., 2009). Tamez et ses collaborateurs décrivent qu'il est possible d'infecter les érythroblastes uniquement à partir du stade acidophile, suggérant que les stades plus précoces sont réfractaires à l'infection (Tamez et al., 2009).

Les parasites de *P. vivax* ont un tropisme différent de *P. falciparum* puisqu'ils infectent des réticulocytes et non des normocytes matures (Malleret et al., 2015). Cependant ils peuvent aussi infecter les érythroblastes nucléés. Des parasites asexués dans des érythroblastes ont été observés par microscopie électronique sur des frottis de moelle osseuse de patients atteints de paludisme (Ru et al., 2009).
Les parasites asexués et les gamétocytes de l'espèce murine *P. berghei* se développent également dans les précurseurs érythroïdes. Après injection de parasites fluorescents, la plupart des parasites asexués et sexués sont présents au sein de précurseurs érythroïdes marqués par l'anticorps anti-CD44 qui reconnait les cellules érythroïdes jusqu'au stade réticulocyte (De Niz et al., 2018; Lee et al., 2018).
En ce qui concerne le stade sexué, peu de gamétocytes de *P. falciparum* ont été observés dans les érythroblastes, seuls des gamétocytes de stade I-II ont été identifiés dans des érythroblastes par colorimétrie et par immunofluorescence (Joice et al., 2014). Il est donc essentiel de comprendre si les parasites sexués peuvent se développer entièrement dans

les érythroblastes dans la moelle osseuse ou si les précédentes observations ne correspondent qu'à des artefacts *in vitro*.

Les gamétocytes sont enrichis dans la moelle osseuse par rapport à tous les autres organes. Cet enrichissement pourrait être la résultante d'un engagement préférentiel vers la gamétocytogenèse dans cet environnement et plus précisément lors de l'invasion des cellules érythroïdes de la moelle. En effet, la conversion en gamétocytes est augmentée dans les réticulocytes en comparaison avec les normocytes (Trager and Gill, 1992; Trager et al., 1999). Il est maintenant nécessaire de confirmer ces anciennes études avec les outils moléculaires récents caractérisant l'engagement du parasite vers la voie sexuée et de comparer la conversion des parasites en gamétocytes au sein de réticulocytes et d'érythroblastes en comparaison aux érythrocytes matures.

Les érythroblastes et les réticulocytes sont métaboliquement beaucoup plus actifs que les érythrocytes matures. La réponse du parasite aux antipaludiques dans les précurseurs érythroïdes pourrait donc être différente que dans les normocytes. En effet, il semblerait que les parasites de *P. berghei* dans les réticulocytes de la rate soient plus résistants à l'artémisinine que les parasites dans les érythrocytes matures (Lee et al., 2018). Cependant, cette démonstration a été faite de manière indirecte et il serait très intéressant de déterminer *in vitro* et *in vivo* la susceptibilité aux antipaludiques des érythroblastes parasités.

Le travail sur des érythroblastes humains est difficile à cause de la disponibilité des cellules primaires de moelle osseuse. Beaucoup de travaux tentent d'établir une lignée de cellules souches hématopoïétiques immortalisées qui peuvent se différencier en érythroblastes pour finalement produire des réticulocytes *in vitro* (Kurita et al., 2013; Trakarnsanga et al., 2017). Récemment, une nouvelle lignée de précurseurs érythroïdes a été mise au point, elle se différencie jusqu'au stade acidophile et permet la production d'une faible fraction de réticulocytes après 8 jours de culture (Scully et al., 2019). Cette lignée permet l'invasion de cellules nucléées par les parasites des espèces *P. falciparum* et *P. vivax* (Scully et al., 2019). Elle pourrait donc être un outil essentiel pour étudier le développement du parasite au sein de ces précurseurs nucléés et l'impact de l'invasion sur les érythroblastes.

d. Mécanismes d'entrée des parasites dans le parenchyme de la moelle osseuse

La façon par laquelle le parasite traverse la barrière endothéliale et pénètre dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse est encore inconnue. Il existe plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer l'entrée du parasite dans la moelle osseuse qui pourrait se faire :

1. par le passage d'un mérozoïte à travers la barrière endothéliale : le mérozoïte pourrait soit traverser en envahissant une cellule endothéliale soit en passant par les jonctions entre les cellules endothéliales.
2. par le passage d'un érythrocyte parasité soit par un jeune gamétocyte, soit par un parasite asexué, via par les jonctions cellulaires qui sont affaiblies lors de l'infection par *Plasmodium* (Mantel et al., 2016).
3. par le passage d'un érythrocyte parasité soit par un jeune gamétocyte, soit par un parasite asexué, par transmigration en contact avec une cellule immunitaire comme un leucocyte.

Une fois matures, les EIG pourraient retourner dans la circulation sanguine grâce à leur grande déformabilité (Aingaran et al., 2012; Dearnley et al., 2012; Tibúrcio et al., 2012) ou par la traversée active de la barrière endothéliale de manière mobile (De Niz et al., 2018).

3. L'érythropoïèse affectée par *Plasmodium*

Le fait que la majeure partie du cycle de vie de *Plasmodium* se déroule au sein des érythrocytes ainsi que la présence des gamétocytes immatures dans la moelle osseuse engendrent une relation très intime entre l'érythropoïèse et le paludisme. Le développement du parasite entraîne une forte anémie lors des affections sévères qui est due d'une part à l'élimination des globules rouges, parasités ou non, et d'autre part à une altération de l'érythropoïèse.

a. Anémie

L'une des principales conséquences du paludisme sévère est l'anémie, c'est-à-dire une baisse importante de l'hématocrite du sang donc du nombre de globules rouges.

L'anémie est un problème de santé majeur chez les patients atteints par *Plasmodium* et c'est une des principales causes de mortalité chez les enfants impaludés (Ekvall, 2003). Toutes les causes de cette anémie ne sont pas encore connues. L'un des facteurs favorisant l'anémie est la destruction des globules rouges par le parasite. En effet, lors de la transformation du schizonte en plusieurs mérozoïtes, le parasite détruit l'érythrocyte qui l'héberge. L'infection des globules rouges par le parasite augmente aussi leur rigidité (Nash et al., 1989), les érythrocytes parasités sont donc retenus par la rate lors de leur filtration puis éliminés, ce qui contribue au phénomène d'anémie. Cependant la diminution du taux d'hémoglobine chez les patients impaludés est supérieure à ce qu'elle pourrait être si elle n'était causée uniquement par la lyse des érythrocytes parasités (Dondorp et al., 1999; Egan et al., 2002). Ceci suggère donc que les globules rouges non parasités sont aussi éliminés. En effet, une étude sur des patients thaïlandais atteints de paludisme simple montre que 90% des érythrocytes éliminés ne sont pas parasités. Ce résultat met en lumière l'extrême importance de l'élimination des érythrocytes non-parasités lors de la colonisation par *Plasmodium* (Price et al., 2001). Plusieurs mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer cette élimination des érythrocytes non-parasités. La réponse immunitaire due à la présence du parasite engendre la sécrétion de plusieurs cytokines, la production excessive ou la sous-production de cytokines fait partie des facteurs augmentant le risque d'anémie sévère. Par exemple, la forte diminution de la concentration plasmatique d'IL-10 est liée au risque d'anémie grave (Kurtzhals et al., 1998). En effet, l'équilibre entre une réaction inflammatoire pour lutter contre l'infection et une réaction inflammatoire délétère pour l'organisme est difficile à maintenir. En conséquence de cette augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, les macrophages augmentent leur sécrétion de molécules oxydantes. Celles-ci vont générer un stress oxydatif chez les érythrocytes parasités ou non (Greve et al., 1999; Griffiths et al., 2001), ce qui va déstabiliser leur membrane et entraîner leur élimination de la circulation. En plus d'augmenter la rigidité des érythrocytes hôtes, l'infection par le parasite du paludisme augmente également la rigidité des globules rouges non-parasités (Dondorp et al., 1999). Cette réduction de la déformabilité entraîne une élimination des globules rouges lors de la filtration par la rate et participe donc au phénomène d'anémie sévère (Deplaine et al., 2011).

b. Perturbation de l'érythropoïèse

L'élimination des érythrocytes dans la circulation n'est pas la seule cause d'anémie chez l'Homme infecté par *Plasmodium*: la diminution de la production d'érythrocytes et la réponse inefficace de l'érythropoïèse à l'infection sont également des causes d'anémie.

Chez les personnes impaludées, la moelle osseuse est le siège d'une érythropoïèse inefficace : les précurseurs érythroïdes ont une morphologie altérée et la production de réticulocytes est diminuée (Wickramasinghe and Abdalla, 2000).

Les cytokines sécrétées en présence de *Plasmodium* sont impliquées lors de la dysérythropoïèse chez les patients impaludés. Le TNF-α, qui peut induire le clivage de GATA-1 (un facteur de transcription essentiel au développement des précurseurs érythroïdes), l'interféron-γ et MIF (macrophage migration inhibitory factor), sont liés à l'érythropoïèse inefficace en cas de paludisme (Awandare et al., 2011; McDevitt et al., 2006; Miller et al., 1989).

L'accumulation de pigments malariques est aussi une des causes de cette dysérythropoïèse (Aguilar et al., 2014b; Awandare et al., 2011; Boehm et al., 2018; Casals-Pascual et al., 2006; Lamikanra et al., 2009). Le pigment malarique est la résultante de l'hémozoïne synthétisée par le parasite à partir de la digestion de l'hémoglobine et de la détoxification de l'hème du globule rouge. L'hémozoïne a d'une part une action indirecte sur l'érythropoïèse en induisant la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires inhibiteurs de l'érythropoïèse comme le monoxyde d'azote (Awandare et al., 2011; Keller et al., 2004) et, d'autre part elle a une action directe en affectant la prolifération et en induisant l'apoptose des érythroblastes (Lamikanra et al., 2009). Il n'est toujours pas déterminé si l'action du pigment malarique est due au cristal d'hémozoïne en lui-même ou à des composants liés à l'hémozoïne qui pourraient être de nature protéique, lipidique ou des acides nucléiques (Jaramillo et al., 2009; Parroche et al., 2007). L'hémozoïne a également la capacité de convertir les acides gras en longues chaînes d'aldéhydes qui sont cytotoxiques, comme le 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Schwarzer et al., 2003). Or, le 4-HNE a été montré comme impliqué dans l'inhibition de l'érythropoïèse (Giribaldi et al., 2004; Skorokhod et al., 2010). L'hémozoïne pourrait donc de cette manière participer indirectement à la dysérythropoïèse due au paludisme. Une

récente étude a montré un lien direct entre la présence d'hémozoïne ou de milieu conditionné par le parasite sur la prolifération et la différenciation des érythroblastes *in vitro* (Boehm et al., 2018). Cette étude suggère que c'est un composant protéique qui serait à l'origine du retard de maturation des érythroblastes.

La concentration plasmatique d'EPO, cytokine clef dans le processus de prolifération différenciation des précurseurs érythroïdes, est élevée chez les personnes atteintes de paludisme. Cependant, cette augmentation n'est pas suffisante pour compenser l'anémie sévère chez les personnes impaludées (Burchard et al., 1995; Chang and Stevenson, 2004).

Enfin, une étude récente a montré qu'en plus d'avoir un effet inhibiteur sur la prolifération et la différenciation des cellules érythropoïétiques, la co-culture avec *P. falciparum* entraine un changement d'expression des gènes codants pour les globines du globule rouge. La présence du parasite induit une diminution de l'expression des ARN messagers (ARNm) codants pour la chaîne γ des globines ainsi qu'une diminution du ratio des ARNm α globines / non-α globines (Pathak et al., 2018). Cette modification de la balance d'expression des globines par le parasite pourrait être associée à un défaut de la réponse érythropoïétique lors d'anémies sévères causées par *P. falciparum*.

Plus généralement, le transcriptome d'érythroblastes parasités ou en co-culture avec *P. falciparum* révèle de nombreux changements d'expression de gènes en présence du parasite (Tamez et al., 2011). Plusieurs voies métaboliques et de signalisation cellulaire sont modifiées. Parmi les gènes les plus surexprimés lors de la co-culture avec le parasite on retrouve les gènes de la voie de réponse oxydative médiée par NRF2. Ces gènes sont impliqués dans la lutte contre le stress oxydatif, qui pourrait donc être induit par le parasite. Beaucoup d'autres gènes impliqués dans de grandes voies métaboliques ou de signalisation sont exprimés différemment, comme des gènes de la voie de réponse aux glucocorticoïdes, du fonctionnement des mitochondries, de la synthèse d'acides aminés, du métabolisme des drogues ou des lipides. Plusieurs gènes induits chez les érythroblastes lors de la co-culture avec *P. falciparum* pourraient être impliqués dans le dysfonctionnement de l'érythropoïèse. L'expression de *jun*, qui bloque la différenciation en provoquant le clivage de GATA-1 (Elagib et al., 2004), est augmentée tout comme l'expression de *rara* qui code pour une protéine empêchant la prolifération des

progéniteurs érythroïdes (Rusten et al., 1996; Zhu et al., 2001). Le gène codant pour la cytokine GDF15, appartenant à la superfamille des TGFβ, est aussi surexprimé lors de la co-culture des érythroblastes polychromatophiles avec le parasite. Ce résultat est très intéressant car les taux plasmatiques de GDF15 sont augmentés chez les patients symptomatiques atteints de paludisme (de Mast et al., 2010). La production de la cytokine GDF15 est intimement liée à une érythropoïèse défectueuse, et on retrouve des taux plasmatiques élevés de GDF15 chez les patients atteints d'autres maladies érythropoïétiques (Tanno et al., 2010).

Des expériences de microscopie classique et électronique ont pu montrer que chez des personnes infectées par *P. vivax*, les érythroblastes de la moelle ont une morphologie différente comparée à celle d'individus sains et la proportion d'érythroblastes dits matures (polychromatiques et acidophiles) est diminuée, ce qui suggère une dysérythropoïèse (Wickramasinghe et al., 1989). L'étude transcriptomique des érythroblastes chez des patients infectés par *P. vivax* montre une diminution de l'expression de certains miARN et d'autres petits ARN non-codants (Baro et al., 2017).

En conclusion, de multiples facteurs ont été identifiés comme pouvant affecter l'érythropoïèse lors de l'infection par le parasite *Plasmodium*. Cependant beaucoup restent au stade de corrélation et les mécanismes d'action directs du parasite ou de ces métabolites sur l'érythropoïèse sont encore largement inconnus.

VI. Hypothèses de séquestration des gamétocytes dans le parenchyme de la moelle osseuse et objectifs de la thèse

La séquestration des gamétocytes immatures dans le parenchyme de la moelle osseuse soulève beaucoup de questions. Les mécanismes d'entrée, de séquestration et de sortie des gamétocytes du parenchyme sont encore inconnus. **Lors de cette thèse, ce sont les mécanismes de rétention des gamétocytes dans le parenchyme de la moelle osseuse qui ont été étudiés et plus précisément les interactions avec l'îlot érythroblastique.**

Ci-après sont détaillées plus précisément les différentes hypothèses qui pourraient expliquer la rétention des gamétocytes immatures dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse.

1. Rétention mécanique

Il a été décrit précédemment que les propriétés mécaniques de la membrane des EIG variaient au cours de la gamétocytogenèse. La membrane érythrocytaire des EIG immatures est rigide alors que celle des EIG matures est beaucoup plus déformable (Aingaran et al., 2012; Dearnley et al., 2012; Tibúrcio et al., 2012). L'extrême rigidité des EIG immatures pourrait contribuer à leur rétention dans le parenchyme de la moelle osseuse, les empêchant de passer la barrière endothéliale pour se retrouver dans la circulation sanguine. Cette hypothèse est explorée par d'autres membres du laboratoire et ne sera pas le sujet de cette thèse.

2. Adhérence

Tout comme les parasites asexués adhèrent aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, les EIG immatures pourraient avoir des capacités de cytoadhérence aux cellules du parenchyme de la moelle osseuse. Comme les gamétocytes immatures ont été observés au contact des îlots érythroblastiques (Joice et al., 2014) nous pouvons supposer que les parasites sexués peuvent adhérer aux cellules qui composent l'îlot. **Le premier objectif de cette thèse est d'étudier si les EIG immatures de *P. falciparum***

peuvent adhérer aux érythroblastes humains. Nous émettrons l'hypothèse que cette adhérence pourrait se faire via les protéines de la famille multigénique *stevor* et la protéine érythroïde Glycophorine C. En effet, certains membres de la famille multigénique STEVOR, présents à la surface des érythrocytes parasités par des schizontes, peuvent se lier à la GPC présente à la surface des érythrocytes non-parasités et ainsi former des rosettes (Niang et al., 2014). Les protéines STEVOR ont été observées à la surface des EIG immatures (Tibúrcio et al., 2012) et la GPC est présente à la membrane des précurseurs érythroïdes (Hu et al., 2013) : l'interaction STEVOR-GPC pourrait donc engendrer l'adhérence des EIG immatures aux érythroblastes de l'îlot érythroblastique dans le parenchyme de la moelle osseuse.

Au stade mature, les protéines STEVOR semblent absentes de la membrane des EIG ce qui pourrait leur permettre de se décrocher de l'îlot érythroblastique et de retourner dans la circulation sanguine.

3. Infection des érythroblastes

Nous avons montré ci-dessus que les précurseurs érythroïdes pouvaient être parasités *in vitro* par plusieurs espèces de *Plasmodium* dont *P. falciparum*. Les gamétocytes immatures pourraient donc être retenus dans le parenchyme de la moelle osseuse en se développant au sein des érythroblastes de l'îlot érythroblastique après invasion d'un précurseur érythroïde par un mérozoïte. Le développement des érythroblastes du stade proérythroblaste au stade réticulocyte prend en moyenne 10 jours *in vitro*, ce qui correspond au temps de maturation d'un gamétocyte. Jusqu'ici, il a été montré que l'infection des érythroblastes par *Plasmodium* n'était possible qu'à partir du stade érythroblastes acidophiles (Tamez et al., 2009). Nous proposons donc de mieux définir le mécanisme d'infection des érythroblastes lors de l'érythropoïèse tardive afin d'étudier si le gamétocyte pourrait se développer dans l'érythroblaste en même temps que sa cellule hôte pour devenir mature lorsque l'érythroblaste devient un réticulocyte. Ainsi le gamétocyte mature dans un réticulocyte pourrait sortir dans la circulation sanguine en même temps que les autres réticulocytes de la moelle osseuse. **Le second objectif de cette thèse est d'étudier le développement gamétocytaire du parasite au sein d'un érythroblaste primaire humain.**

Globalement, comprendre les mécanismes d'entrée, de rétention, et de sortie des gamétocytes de la moelle osseuse est essentiel pour mieux élucider l'une des parties les plus obscures du cycle de *Plasmodium*. La lutte contre la transmission du parasite de l'Homme au moustique est une étape clef dans l'éradication du paludisme dans le monde.

Résultats

I. Etude de l'adhérence des EIG immatures aux érythroblastes primaires humains

1. Préambule

a. Contexte

Chez *Plasmodium falciparum*, les gamétocytes se développent en une dizaine de jours : les stades I à IV sont immatures et les gamétocytes de stade V sont matures. Les gamétocytes immatures sont séquestrés dans le parenchyme de la moelle osseuse alors que les gamétocytes matures sont présents dans la circulation sanguine (Aguilar et al., 2014a; Farfour et al., 2012; Joice et al., 2014). Plus précisément, les gamétocytes immatures ont été observés au contact des îlots érythroblastiques (Joice et al., 2014). Ces niches hématopoïétiques sont composées d'un macrophage central entouré d'érythroblastes qui prolifèrent et se développent. A ce jour, la nature des interactions des gamétocytes immatures avec les îlots érythroblastiques ainsi que leurs mécanismes de séquestration dans la moelle sont inconnus. L'absence d'expression de PfEMP1 chez les gamétocytes (Tibúrcio et al., 2013) et leur présence dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse suggèrent que les mécanismes de séquestration des EIG diffèrent de ceux des parasites asexués qui adhèrent aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins via PfEMP1 (Craig and Scherf, 2001; Miller et al., 2002). De plus, plusieurs études ont montré que les EIG n'adhèrent pas aux cellules endothéliales, y compris aux cellules endothéliales de moelle osseuse (Silvestrini et al., 2012; Tibúrcio et al., 2013). La proximité observée entre les gamétocytes immatures et les îlots érythroblastiques suggèrent que les EIG immatures pourraient adhérer aux précurseurs érythroïdes. Cette adhérence pourrait se faire de manière similaire au phénomène de rosetting décrit entre les érythrocytes parasités par des formes asexués et les érythrocytes non-parasités. Parmi les couples récepteurs-ligands identifiés comme étant à l'origine de la formation des rosettes chez les parasites asexués, on retrouve notamment le couple STEVOR-GPC (Niang et al., 2014) : les protéines STEVOR présentes à la surface des érythrocytes parasités par des schizontes se lient aux protéines GPC exprimées à la surface des érythrocytes non-parasités. Or, les protéines STEVOR semblent exportées à la

membrane des EIG immatures (Tibúrcio et al., 2012) et la GPC est exprimée chez les érythroblastes (Gautier et al., 2016; Hu et al., 2013). Lors de cette étude, nous émettons donc l'hypothèse que les EIG immatures adhèrent aux érythroblastes de l'îlot érythroblastique via une interaction entre les protéines parasitaires STEVOR et la GPC présente à la surface des érythroblastes.

b. Résultats

Afin de déterminer si les érythrocytes parasités par des gamétocytes de *P. falciparum* adhèrent aux cellules des îlots érythroblastiques nous avons mis au point un protocole d'adhérence de cellules en suspension entre les érythrocytes parasités et les cellules érythroïdes. Le protocole d'adhérence a été validé avec des érythrocytes parasités par des parasites asexués de la souche VarO, connus pour former des rosettes avec les érythrocytes environnants (Vigan-Womas et al., 2008). Nos résultats ont montré que les parasites asexués dans des érythrocytes de la souche VarO adhèrent avec une efficacité similaire aux érythrocytes et aux cellules de la lignée érythroïde K562. En revanche, nous avons observé que les EIG immatures de la souche NF54 n'adhèrent ni aux lignées érythroïdes (UT7 et K562) ni aux érythroblastes primaires humains, contrairement à ce que nous attendions. Afin d'expliquer ce résultat, nous avons émis l'hypothèse que l'absence d'adhérence pourrait être due au fait que les ligands parasitaires ne sont pas exprimés dans nos conditions expérimentales. Dans le cas de notre hypothèse que l'adhérence entre les EIG et les érythroblastes serait dépendante des protéines STEVOR, il est possible que la souche NF54 utilisée, qui est une population non clonale, n'exprime peut-être pas les variants de la famille STEVOR qui pourraient être à l'origine d'une adhérence. Afin de tester cette hypothèse, nous avons évalué l'adhérence des EIG de plusieurs clones de parasites exprimant différentes protéines STEVOR connues pour leurs propriétés adhésives au stade asexué. Cependant, nos résultats ont montré que les EIG de ces clones n'adhéraient pas aux cellules érythroïdes. Les gènes codant pour les protéines STEVOR chez *P. falciparum* étant généralement sous-exprimés chez les souches de laboratoire en comparaison avec les souches de terrain (Bachmann et al., 2012; Blythe et al., 2008), nous avons ensuite émis l'hypothèse que l'expression des protéines STEVOR n'était peut-être pas assez forte dans les lignées

clonales utilisées pour établir une adhérence. Afin d'écarter cette hypothèse, nous avons généré une lignée transgénique qui surexprime la protéine STEVOR PF3D7_1040200 capable de se lier à la GPC et aux érythrocytes au stade asexué (Niang et al., 2014). Cependant, aucune adhérence significative n'a pu être observée entre des EIG immatures de cette souche transgénique et des érythroblastes primaires humains ou des lignées cellulaires érythroïdes. Finalement, nous avons voulu confirmer que les protéines STEVOR étaient bien exportées à la surface des EIG immatures, comme le rapportait la littérature. Pour cela, nous avons marqué par immunofluorescence la partie N-terminale des protéines STEVOR et la membrane d'EIG immatures, avec ou sans perméabilisation. Afin de contrôler le niveau de perméabilisation des cellules et l'intégrité de la membrane, les EIG ont été marqués avec un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire de la GPA et avec un anticorps dirigé contre la partie intracellulaire de la protéine Bande 3. De manière surprenante, nous avons observé que la partie N-terminale des protéines STEVOR, qui présente des propriétés adhésives, n'était pas exposée à la surface des EIG.

c. Conclusion

En conclusion de ce travail, nous avons montré que dans nos conditions expérimentales *in vitro*, les EIG immatures n'adhèrent pas aux érythroblastes primaires humains et ce même lorsqu'une protéine STEVOR présentant des propriétés adhésives au stade asexué est surexprimée. Nous en avons conclu que la séquestration des gamétocytes immatures dans la moelle osseuse n'est probablement pas due à l'adhérence aux érythroblastes. Cette absence d'adhérence via les protéines STEVOR est consistante avec nos résultats montrant que celles-ci n'ont pas été retrouvées exposées à la surface des EIG immatures. Cette observation suggère une différence de conformation des protéines STEVOR entre les parasites asexués dans des érythrocytes et les EIG.

2. Article: *Plasmodium falciparum* gametocyte-infected erythrocytes do not adhere to human primary erythroblasts

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Plasmodium falciparum gametocyte-infected erythrocytes do not adhere to human primary erythroblasts

Received: 27 July 2018
Accepted: 16 November 2018
Published online: 14 December 2018

Gaëlle Neveu[1,2,3,4], Florian Dupuy[1,2,3,4], Meriem Ladli[1,2,3,4], Daniela Barbieri[1,2,3,4], Bernina Naissant[1,2,3,4], Cyrielle Richard[1,2,3,4], Rafael M. Martins[5], Jose-Juan Lopez-Rubio[5], Anna Bachmann[6], Frédérique Verdier[1,2,3,4] & Catherine Lavazec[1,2,3,4]

Plasmodium falciparum **gametocytes, the sexual stages responsible for malaria parasite transmission, develop in the human bone marrow parenchyma in proximity to the erythroblastic islands. Yet, mechanisms underlying gametocytes interactions with these islands are unknown. Here, we have investigated whether gametocyte-infected erythrocytes (GIE) adhere to erythroid precursors, and whether a putative adhesion may be mediated by a mechanism similar to the adhesion of erythrocytes infected with *P. falciparum* asexual stages to uninfected erythrocytes. Cell-cell adhesion assays with human primary erythroblasts or erythroid cell lines revealed that immature GIE do not specifically adhere to erythroid precursors. To determine whether adhesion may be dependent on binding of STEVOR proteins to Glycophorin C on the surface of erythroid cells, we used clonal lines and transgenic parasites that overexpress specific STEVOR proteins known to bind to Glycophorin C in asexual stages. Our results indicate that GIE overexpressing STEVOR do not specifically adhere to erythroblasts, in agreement with our observation that the STEVOR adhesive domain is not exposed at the surface of GIE.**

The spread of malaria in population relies on the ability of the *Plasmodium* parasites to be transmitted from infected individuals to mosquito vectors. Understanding the biology of *Plasmodium* gametocytes, the only parasite stages capable of transmission to mosquitoes, is therefore crucial to ablate parasite transmission. For *Plasmodium falciparum*, the causative agent of the most severe form of human malaria, gametocytes maturation lasts about 10 days and is conventionally divided into 5 morphological stages (I–V)[1]. From stage I to IV, immature gametocytes are sequestered away from peripheral circulation, and appear only as mature stages V in the peripheral blood where they are accessible for mosquito bites. Analyses of *ex-vivo* and autopsy specimens from malaria-infected patients revealed that immature gametocytes are predominantly localized in the bone marrow parenchyma, where they are enriched at erythroblastic islands[2–4]. These specialized niches, where the terminal erythroid differentiation occurs, consist of a macrophage surrounded by differentiating erythroblasts[5].

The unveiling of the hidden sites for gametocytes maturation raised the questions how these parasite stages develop and sequester in the bone marrow micro-environment and how they interact with the erythroblastic islands. Their presence in the bone marrow extra-vascular compartment and the absence of *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) expression in gametocytes[6] suggest that gametocytes sequester via different mechanisms than those of asexual stages, which depend on cytoadhesion of infected erythrocytes to vascular endothelium through the interaction of PfEMP1 with endothelial receptors[7,8]. Moreover, studies of gametocyte-infected erythrocytes (GIE) cytoadhesion failed to show any binding interactions of immature GIE with human endothelial cells from different tissues, including human bone marrow-derived endothelial cell lines[6,9–11]. The proximity of immature GIE with erythroblastic islands suggests that GIE may adhere to erythroid precursors. A binding interaction between these cells may be mediated by a mechanism similar to the adhesion of asexual stages-infected erythrocytes to uninfected erythrocytes. This phenomenon, called "rosetting", has been

[1]Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France. [2]Cnrs, UMR8104, Paris, France. [3]Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. [4]Laboratoire d'excellence GR-Ex, Paris, France. [5]UMR IRD 224-CNRS 5290-University Montpellier, MIVEGEC, Montpellier, France. [6]Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L. (email: catherine.lavazec@inserm.fr)

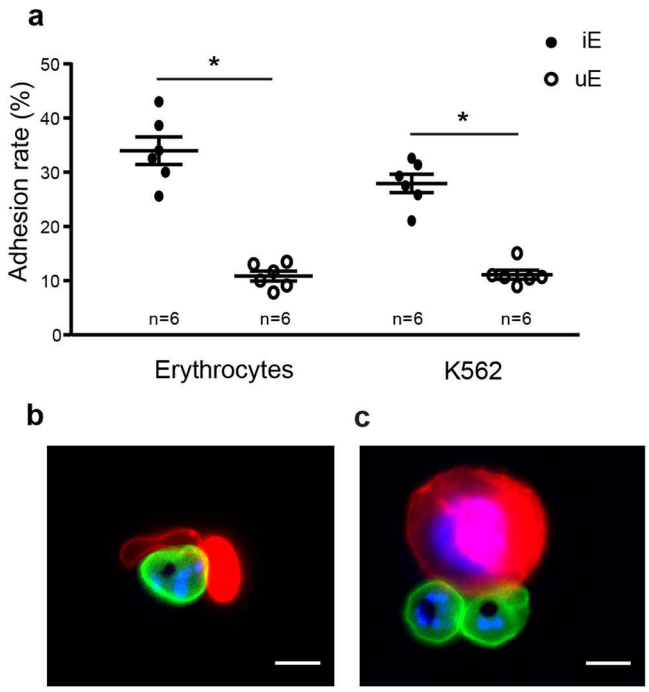


Figure 1. Validation of the cell-cell adhesion protocol. (**a**) Cell-cell adhesion assays of MACS-purified erythrocytes infected with asexual VarO trophozoites (iE) or uninfected erythrocytes (uE) to erythrocytes ($p = 0.03$) or K562 cells ($p = 0.03$). Error bars denote the standard error of the mean. n = number of experiments. (**b**,**c**) Live microscopy imaging showing adhesion of VarO-infected erythrocytes stained with PKH67 (green) to uninfected erythrocytes (**b**) or K562 cells (**c**) stained with PKH26 (red). DNA is stained with Hoechst 33342 (blue). Bars represent 5 µm.

linked to disease severity[12]. Although rosetting has been almost exclusively observed in asexual stages, we hypothesize that a "rosetting-like" adhesion may occur between GIE and erythroid precursors. Among the different erythrocyte receptors involved in rosetting of asexual stages, Glycophorin C (GPC) is one of the key host receptors for rosetting with erythrocytes infected with both *P. falciparum* and *P. vivax*[13,14]. GPC interacts with parasite proteins called STEVOR (SubTElomeric Variable Open Reading frame). These proteins belong to one of the major parasite proteins family and are exposed at the infected erythrocyte surface in late trophozoite stages[14–16]. Interestingly, STEVOR proteins are exported to the infected erythrocyte membrane by immature gametocytes[17,18], and one study has reported their presence at the surface of live GIE[17]. Moreover, GPC protein expression starts in the early stage of erythropoiesis[19,20]. Therefore, an interaction between the GPC located at the surface of erythroid precursors and STEVOR proteins exposed at the surface of immature GIE would be plausible. Based on this, we hypothesized that the adhesion of STEVORs to GPC might contribute to sequestration of immature gametocytes in the bone marrow parenchyma by promoting adhesion of immature GIE to erythroblasts. Yet, the ability of GIE to cytoadhere to erythroid cells has never been addressed, although one study suggested that GIE from *P. falciparum* isolates may be involved in rosette formation[13]. Moreover, STEVORs adhesive properties have never been investigated during sexual stages.

In the present study, we have performed cell-cell adhesion assays to investigate interactions between immature GIE and human primary erythroblasts or erythroid cell lines. To determine the contribution of STEVOR proteins to these interactions, we used clonal lines that express specific *stevor* genes as well as transgenic parasite lines that overexpress or down-regulate members of the *stevor* gene family. Our results show that GIE overexpressing STEVOR do not adhere to erythroblasts, and that STEVOR adhesive domain is not exposed at the surface of GIE.

Results

Validation of the cell-cell adhesion protocol. The presence of immature gametocytes near the erythroblastic islands in extravascular spaces of bone marrow suggests a direct adhesion of immature GIE to the developing erythroblasts. To test this hypothesis, we set up a cell-cell adhesion protocol with MACS-purified infected erythrocytes and erythroid cells. We first validated our protocol with the VarO parasite line known to adhere to the ABO blood group and commonly used as a model for *in vitro* rosetting[21]. With this adhesion protocol, erythrocytes infected with VarO asexual parasites significantly adhered to non-infected erythrocytes (Fig. 1a,b) and K562 erythroid cells (Fig. 1a,c), indicating that size and rigidity of nucleated erythroid cells are not a hindrance for infected erythrocyte adhesion.

NF54 GIE fail to adhere to erythroid cells. We then used our adhesion protocol to address whether immature GIE bind to primary erythroblasts derived from CD34+ progenitor cells from human bone marrow or to the erythroid cell lines K562 and UT7 (Fig. 2a,b). As VarO parasites do not produce gametocytes, we quantified

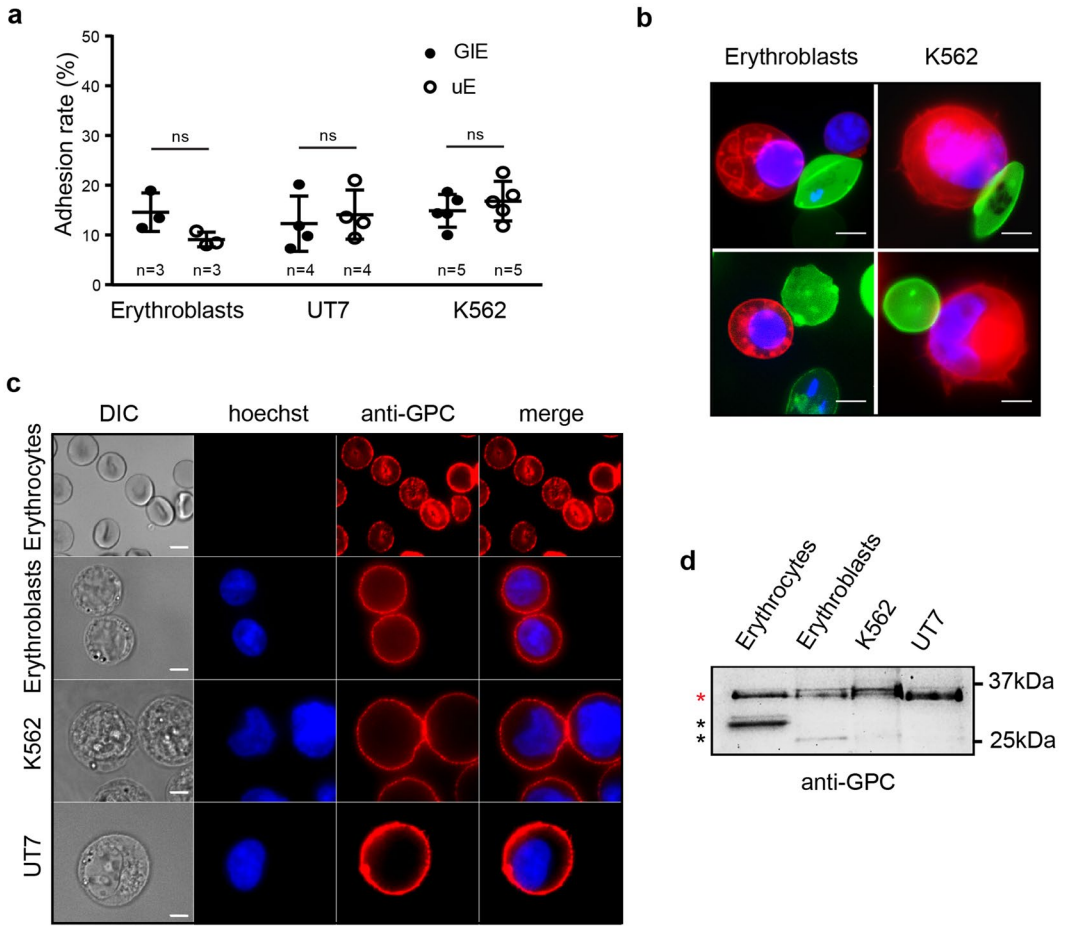


Figure 2. NF54 GIE fail to adhere to erythroid cells. (**a**) Cell-cell adhesion assays of MACS-purified NF54 GIE (GIE) or uninfected erythrocytes (uE) to human primary erythroblasts, UT7 cells and K562 cells. Error bars denote the standard error of the mean. ns, non-significant differences in adhesion rates. n = number of experiments. (**b**) Live microscopy imaging showing non-specific adhesion of MACS-purified NF54 GIE (upper panel) and uninfected erythrocytes (lower panel) stained with PKH67 (green) to human primary erythroblasts or K562 cells stained with PKH26 (red). DNA is stained with Hoechst 33342 (blue). Bars represent 5 µm. (**c**) Immunofluorescence analysis (IFA) of paraformaldehyde-fixed uninfected erythrocytes, erythroblasts, K562 cells and UT7 cells stained with anti-GPC mAb followed by anti-mouse Alexa594-conjugated IgG, showing the presence of GPC at the surface of all erythroid cells. DNA is stained with Hoechst 33342 (blue). Bars represent 5 µm. (**d**) Western blot analysis showing the presence and the size of GPC in erythrocytes, erythroblasts, K562 cells and UT7 cells. Red star indicates the expected size of fully glycosylated GPC (32 kDa). Black stars indicate degradation products. Full-length blot is presented in Supplementary Fig. S1.

adhesion of immature GIE from the NF54 gametocyte-producing strain. We observed that adhesion rates of MACS-purified immature NF54 GIE to erythroblasts or erythroid cell lines were not significantly different from those of uninfected erythrocytes from the same culture (Fig. 2a), indicating that NF54 GIE do not specifically adhere to erythroid precursors. Since we hypothesized that GIE might adhere to erythroid cells via interaction with GPC, we performed immunostaining of non-permeabilized UT7 cells, K562 cells, erythroblasts and erythrocytes with an anti-GPC antibody to confirm that GPC is properly expressed at the surface of all types of erythroid cells (Fig. 2c). Moreover, immunoblotting analysis detected in all types of cells a major band at 32 kDa that corresponds to the expected size of fully glycosylated GPC[22], suggesting that glycosylation levels are comparable in erythrocytes and erythroid precursors (Fig. 2d). These results indicate that NF54 immature GIE fail to adhere to erythroid cells expressing GPC. These findings suggest either that GIE and erythroblasts never bind together, or that adhesion is dependent on GIE protein(s) that are not expressed in the NF54 strain.

Endogenous levels of STEVOR expression do not promote GIE adhesion to erythroid cells. The absence of specific adhesion between NF54 GIE and erythroid cells may be explained by a too low expression of *stevor* genes in the NF54 polyclonal culture. Indeed, the expression of this multigenic family is clonally variant and undergoes switching[23], therefore the low level of transcription of *stevor* genes in comparison with the endogenous control gene expression in NF54 trophozoites (Fig. 3a) suggests that only a proportion of the parasite population efficiently transcribes *stevor* genes. Moreover, the STEVOR N-terminal sequence is variable among the 35

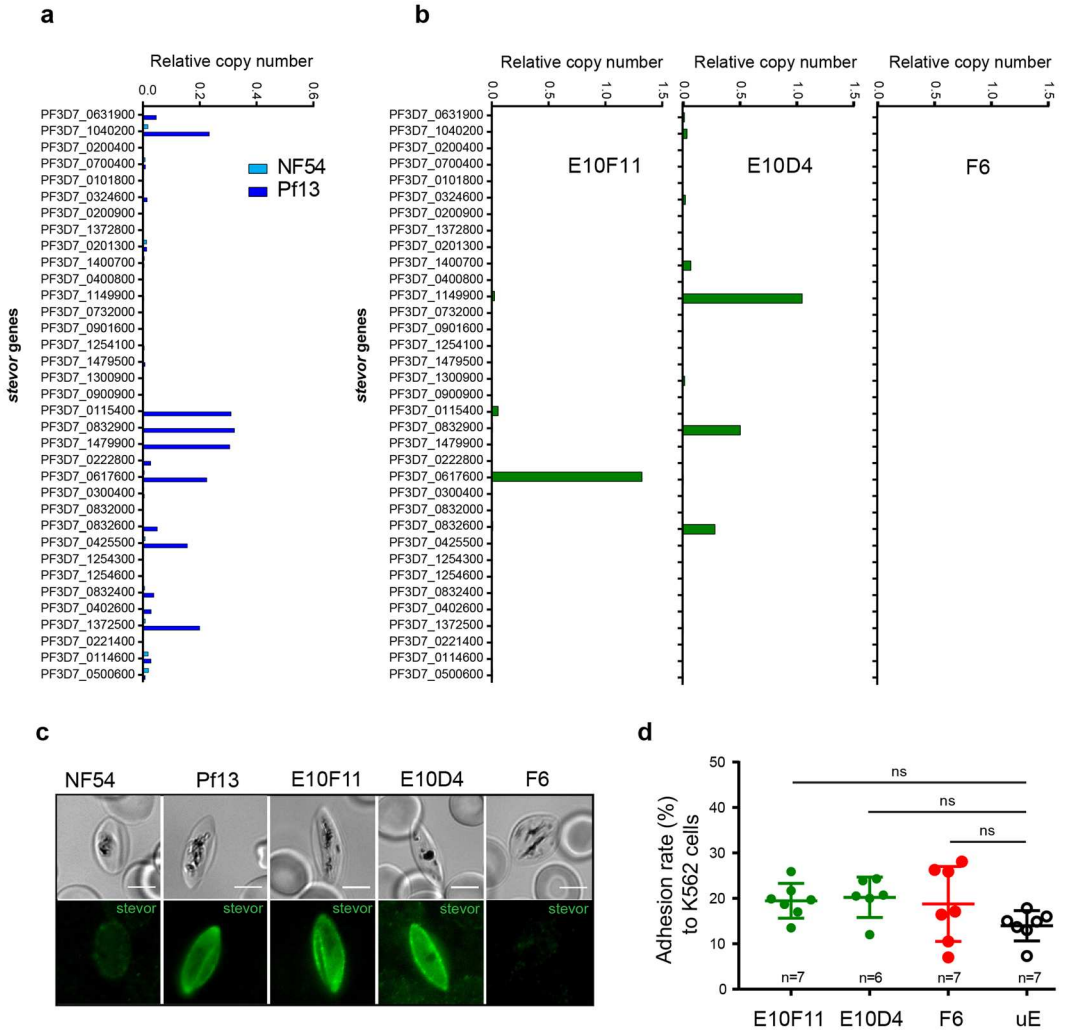


Figure 3. Endogenous levels of STEVOR expression do not promote GIE adhesion to erythroid cells. (**a**,**b**) RT-qPCR analysis of transcriptional levels for the 35 *stevor* genes in trophozoites (28 hours post-infection) of NF54 and 3D7/Pf13 lines (**a**), and of NF54 clones E10F11, E10D4 and F6 (**b**). Transcription levels were normalized to the transcription level of the *arginyltRNA synthetase* reference gene (*PF3D7_1218600*). (**c**) IFA of permeabilized GIE showing the expression of STEVOR protein (green) in NF54, 3D7/Pf13, E10F11, E10D4 and F6 parasite lines. GIE were stained with a rabbit polyclonal antibody directed against STEVOR PF3D7_0631900 protein followed by anti-rabbit Alexa488-conjugated IgG. Pictures were taken under identical exposure conditions. Bars represent 5 µm. (**d**) Cell-cell adhesion assays of MACS-purified GIE from NF54 clones or of uninfected erythrocytes (uE) to K562 cells. Error bars denote the standard error of the mean. ns, non-significant differences in adhesion rates. n = number of experiments.

members of the STEVOR family, and adhesive properties may not be conserved in the entire family. For instance, only a subset of PfEMP1 variants can mediate rosetting[24]. Since the ability to bind GPC has been addressed for just a few STEVOR members[14], it is thus possible that the members expressed in NF54 GIE are not involved in adhesion. To determine which STEVOR member(s) are likely involved in rosetting, we analyzed by RT-qPCR the *stevor* genes transcription profile in the 3D7/Pf13 parasite line that has been enriched for a rosetting phenotype[25] (Supplementary Fig. S2a). In contrast with NF54 parasites, seven *stevor* genes (*PF3D7_1040200*, *PF3D7_0115400*, *PF3D7_0832900*, *PF3D7_1479900*, *PF3D7_0617600*, *PF3D7_0425500*, and *PF3D7_1372500*) were significantly transcribed in trophozoites of this parasite line (Fig. 3a). Among them, four genes (*PF3D7_1040200*, *PF3D7_0115400*, *PF3D7_0832900*, and *PF3D7_0617600*) were selected in a published microarray analysis[14] as upregulated in two parasite lines enriched for rosetting. To determine the contribution of these STEVOR members to a potential adhesion to erythroid cells, we utilized parasite clones of NF54 that were previously characterized for *stevor* expression[23], instead of the 3D7/Pf13 line that poorly generates gametocytes (Supplementary Fig. S2b). In particular, we picked two clones which expressed one *stevor* detected in both our RT-qPCR analysis of the 3D7/Pf13 parasite line and the published microarray analysis, and one clone which did not express any *stevor* (Fig. 3b). Immunostaining of immature GIE from these clones with specific anti-STEVOR antibodies confirmed that STEVOR proteins are expressed in E10F11 and E10D4 gametocytes whereas no expression was

detected in the F6 clone (Fig. 3c). However, adhesion assays did not show any difference in GIE adhesion to K562 cells between these three clones and uninfected erythrocytes (Fig. 3d). These results suggest that the STEVOR members expressed in E10F11 and E10D4 clones (PF3D7_0617600 and PF3D7_0832900) may not be the ones responsible for the rosetting phenotype in the 3D7/Pf13 line, since we cannot exclude that these proteins may not have adhesive properties. Also, endogenous expression of the selected *stevor* genes may not be sufficient to promote adhesion to erythroid cells. In support of this hypothesis, previous studies have reported a reduction of STEVOR expression in laboratory-adapted parasite lines compared to parasites directly isolated from patients where STEVOR may play a crucial role in host-parasite interaction[26,27].

Overexpression of STEVOR does not promote GIE adhesion to erythroid cells. To rule out the hypothesis that endogenous expression of *stevor* genes is not sufficient to promote adhesion, we generated a transgenic parasite line (Stevor-Ty1) that episomally overexpresses a Ty1-tagged copy of *stevor* driven by the constitutive promotor of *calmodulin*. To exclude the possibility that the STEVOR members expressed in E10F11 and E10D4 clones are not functional, we opted for the overexpression of the *PF3D7_1040200 stevor* gene. This gene has been selected in our RT-qPCR analysis of the 3D7/Pf13 parasite line, and the PF3D7_1040200 protein has also been previously shown to mediate adhesion of asexual parasite-infected erythrocytes to GPC[14]. As a control, we promoted the shedding of the episome-encoded *PF3D7_1040200* by cultivating the Stevor-Ty1 line for several generations without blasticidin selection (-BSD) required to retain the episome. The transgenic Control parasite line[28], transfected with an empty plasmid, and the Null parasite line[28] that down-regulates the entire *stevor* gene family, were also used as negative controls. Immunoblotting and immunostaining of immature GIEs with antibodies against STEVOR and Ty1 tag indicated that STEVOR proteins were twenty-fold more expressed in the Stevor-Ty1 transgenic line than in the E10F11 clone (Fig. 4a) and that PF3D7_1040200-Ty1 was properly exported to the infected erythrocyte membrane (Fig. 4b). However, adhesion assays did not show any significant adhesion of immature GIE from this overexpressing parasite line to K562 cells (Fig. 4c) or to primary erythroblasts (Fig. 4d) compared to the control lines and uninfected erythrocytes. Similar results were obtained with another transgenic line overexpressing the PF3D7_0631900 protein[28] (Supplementary Fig. S4). These results indicate that overexpression of a STEVOR protein involved in adhesion to GPC in asexual stages does not promote adhesion of gametocyte stages to erythroid cells.

STEVOR adhesive domain is not exposed at the GIE surface. Failure of GIE to adhere to erythroid cells may be due to a different conformation of STEVOR proteins at the GIE membrane compared to asexual stages. To address whether the adhesive domain of STEVOR proteins is properly exposed at the surface of erythrocytes infected with gametocytes, we performed IFA on permeabilized and non-permeabilized immature GIE with antibodies directed against the N-terminus domain of STEVOR. This domain includes the variable domain, the first hydrophobic stretch and the semi-conserved region that promotes binding to GPC in asexual stages[14]. Unexpectedly, we observed that antibodies detected the STEVOR N-terminus domain in more than 53.1% of permeabilized cells (Fig. 5a) but in less than 1% of non-permeabilized cells (Fig. 5b) from the E10F11 clone, suggesting that the STEVOR adhesive domain may not be exposed at the surface of GIE. Furthermore, the few non-permeabilized cells positive for STEVOR were either recognized by antibodies directed against a cytoplasmic domain of Band 3, indicating the leakiness of the erythrocyte membrane, or were not recognized by anti-Glycophorin A antibodies, suggesting a loss of the erythrocyte membrane (Supplementary Fig. S5). Similar staining patterns were observed in GIE from the Stevor-Ty1 transgenic line and the 3D7/Pf13 parasite line, indicating that STEVOR exposure at the erythrocyte surface is not dependent on STEVOR expression level or parasite enrichment for rosetting (Fig. 5). Therefore, the missing of STEVOR adhesive domain at the erythrocyte surface likely accounts for the lack of GIE adhesion to erythroid cells.

Discussion

Deciphering the interactions between *P. falciparum* gametocytes and erythroblastic islands may provide insights into the parasite sequestration mechanisms in the bone marrow parenchyma. In the present study, we investigated whether immature GIE adhere to erythroid precursors. Our results indicated that GIE from the NF54 strain fail to adhere to erythroblasts, suggesting either that these cells never bind together, or that adhesion is dependent on protein(s) which are not expressed in the NF54 strain, as for proteins encoded by multigenic families. In support to this latter hypothesis, other adhesion phenotypes in *P. falciparum* are often mediated by antigenically variant proteins, such as PfEMP1 proteins that promote adhesion to endothelial cells or RIFIN (Repetitive Interspersed Family) and STEVOR proteins that are involved in asexual stages rosetting[29]. Therefore, we have investigated whether GIE may adhere to erythroid precursors via a mechanism similar to the rosetting mediated by STEVOR and GPC in asexual stages. Our results established that STEVOR proteins are not exposed on the GIE surface, thus making them unlikely candidates for binding to erythroid cells.

These results contrast with data reported for asexual stages where 10 to 13% of erythrocytes infected with schizonts are recognized with antibodies directed against the N-terminus domain of STEVOR[14–16,30]. In a previous study, STEVOR proteins have also been observed at the surface of live GIE[17], however antibodies used as controls for erythrocyte membrane integrity in this study were directed against the parasite (anti-Pfg27 antibodies) and may not be able to detect a low leakiness of the erythrocyte membrane as we observe here with anti-Band 3 antibodies. Despite the absence of surface exposure, we observed STEVOR proteins in association with the GIE membrane (Figs 3c, 4b and 5a), in agreement with previous studies[17,18,28]. These observations are consistent with a model of a two-transmembrane topology at the GIE membrane with a surface-exposed short hypervariable region and C-terminal and N-terminal regions facing the erythrocyte cytoplasm[31,32]. Further studies are needed to validate this predicted topology and confirm that it differs from the topology with only one transmembrane domain observed in asexual stages. It is tempting to speculate that the potential different topologies in asexual and

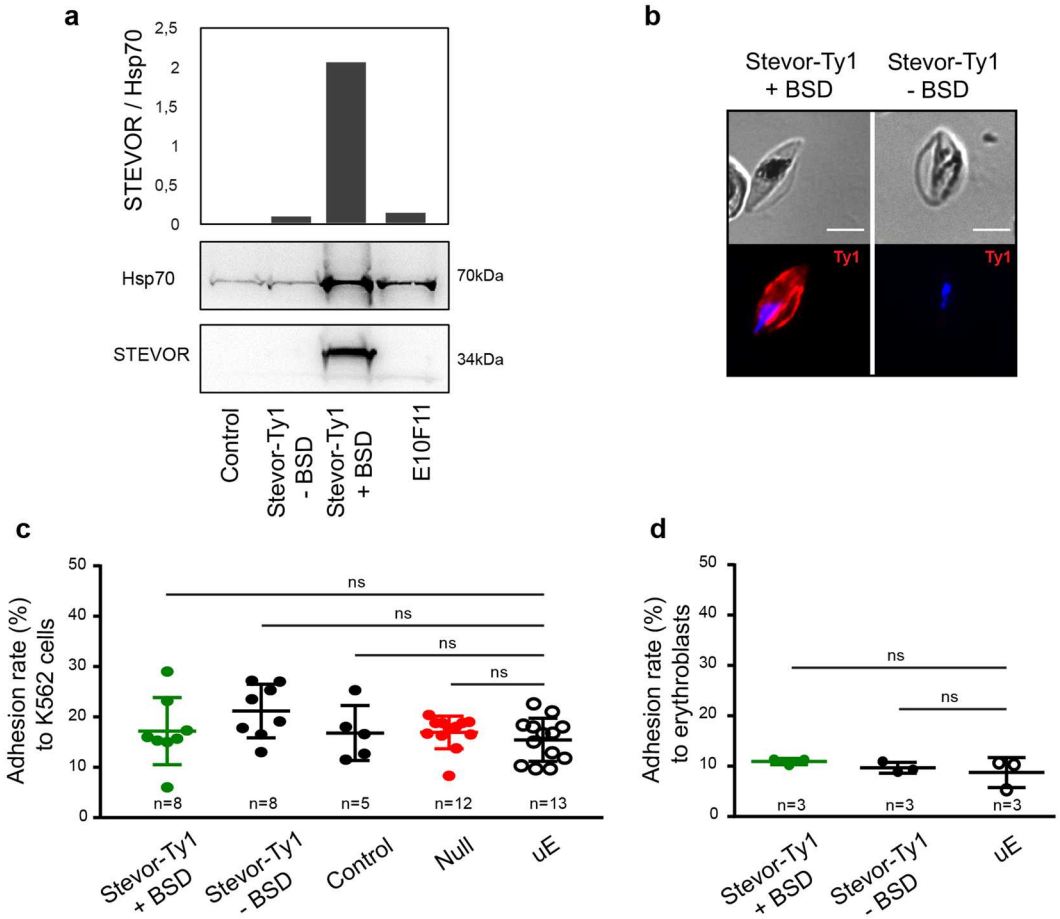


Figure 4. Overexpression of STEVOR does not promote GIE adhesion to erythroid cells. (**a**) Western blot analysis of STEVOR expression in stage III GIEs from the transgenic Stevor-Ty1 line cultivated with and without BSD, the transfection control line (Control) and the NF54 clone E10F11. Immunoblots were probed with a rabbit polyclonal antibody directed against STEVOR PF3D7_0300400 protein and with a mAb directed against PfHsp70. Quantification of STEVOR level relative to the loading control PfHsp70 was performed by densitometry (ImageJ software). Decrease of STEVOR expression in Stevor-Ty1 GIE cultivated without BSD indicates a loss of episomal expression of the epitope-tagged STEVOR protein. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S3. (**b**) IFA of methanol-fixed blood smears showing the expression and erythrocyte membrane localization of PF3D7_1040200 -Ty1 STEVOR protein (red) in Stevor-Ty1 GIE cultivated with and without BSD. GIE were stained with anti-Ty1 mAb followed by anti-mouse Alexa594-conjugated IgG, and parasite nuclei were counterstained with Hoechst 33342. Pictures were taken under identical exposure conditions. Absence of Ty1 expression in Stevor-Ty1 GIE cultivated without BSD indicates a loss of episomal expression of the epitope-tagged STEVOR protein. Bars represent 5 µm. (**c**,**d**) Cell-cell adhesion assay of MACS-purified transgenic Stevor-Ty1 GIE cultivated with and without BSD, of transfection control GIE (Control), of a transgenic GIE downregulating STEVOR expression (Null) or of uninfected erythrocytes (uE) to K562 cells (**c**) or to human primary erythroblasts (**d**). Error bars denote the standard error of the mean. ns, non-significant differences in adhesion rates. n = number of experiments.

sexual stages may reflect different functions of the protein and may reveal a strategy that the parasite has evolved to differently modify its host cell to adapt to different microenvironments. For instance, it has been proposed that the STEVOR-mediated stiffness of immature GIE may contribute to their sequestration by mechanical retention in the bone marrow parenchyma[17,33]. Since the increased erythrocyte stiffness depends on the interaction between the C-terminus domain of STEVOR and the erythrocyte cytoskeletal ankyrin complex[28], our results suggest that the STEVOR N-terminus domain may also interact with cytoskeletal proteins and contribute to the rigidification of the erythrocyte membrane. This interaction may occur in immature GIE but not in asexual stages where sequestration is mediated by infected cell adhesion to endothelium rather than mechanical retention. On the other hand, surface-exposed STEVOR proteins preferentially localize in proximity to knobs in asexual stages, and this localization has been proposed to confer an advantage to the parasite by reinforcing the cytoadherence of infected erythrocytes[16]. It is plausible that surface-exposure of the STEVOR adhesive domain is dependent on knobs formation, therefore the absence of knobs in gametocytes stages[6] may result in a the two-transmembrane topology leading to absence of STEVOR at the surface. Nevertheless, we cannot exclude that STEVOR exposure

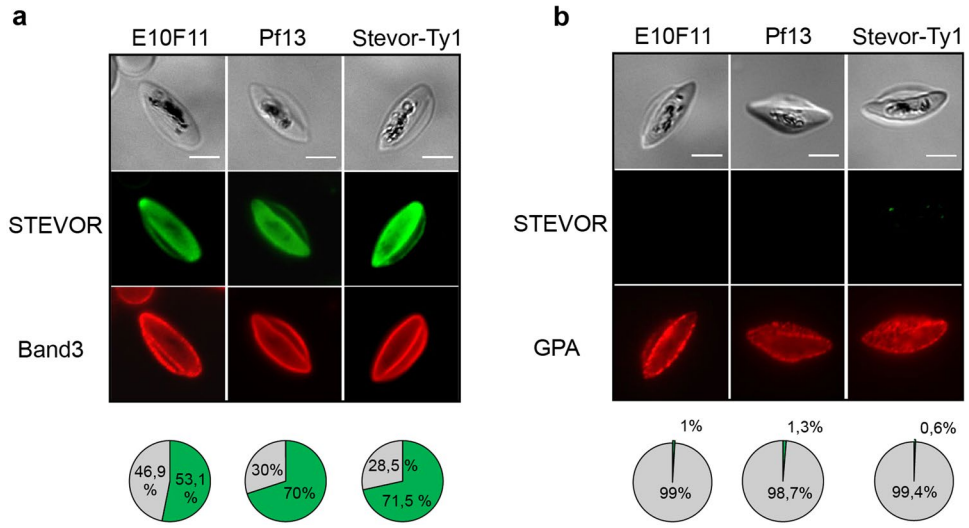


Figure 5. STEVOR proteins are not exposed at the GIE surface IFA of permeabilized (**a**) and non-permeabilized (**b**) immature GIE from the E10F11, 3D7/Pf13 and Stevor-Ty1 (+BSD) parasite lines. GIE were stained with a rabbit polyclonal antibody directed against the N-terminal domain of STEVOR PF3D7_0631900 (green) and with a mouse antibody directed against the cytoplasmic domain of Band 3 ((**a**), red) or with a mouse anti-Glycophorin A (GPA) (**b**, red). Pie charts show proportions of GIE positive (green) or negative (grey) for STEVOR staining. 300 cells per condition were examined. Band 3 and GPA staining control permeabilization and presence of the erythrocyte membrane, respectively. Pictures were taken under identical exposure conditions. Bars represent 5 µm.

and/or STEVOR-mediated adhesion requires an additional co-factor expressed *in vivo* but not *in vitro*, or not expressed in our parasite lines.

Other ligand(s) and receptor(s) may also promote adhesion between GIE and erythroblastic islands. For instance, the parasite proteins GEXP07 and GEXP10 exhibit adhesive properties and are exposed at the surface of erythrocytes infected with early gametocytes[34]. However this hypothesis is not supported by our results showing the absence of adhesion between several types of erythroid cells and NF54 GIE that constitutively express GEXP proteins. In contrast, other clonally variant adhesins expressed by multigenic families, such as RIFIN[35], may be involved in GIE adhesion to erythroid cells since they mediate rosetting in asexual stages via binding to the blood group A antigen and to the Glycophorin A[36]. Their presence in immature gametocytes[37] makes them interesting ligand candidates that need to be investigated in further studies.

It remains to be clarified how gametocytes sequester in the bone marrow parenchyma. The proposed contribution of infected erythrocyte stiffness to this phenotype is supported by recent data showing that sildenafil citrate, a phosphodiesterase inhibitor known to keep GIE in a rigid state[38], increases the enrichment of *Plasmodium berghei* gametocytes in the bone marrow of infected mice[39]. It is also possible that immature GIE adhere to non-erythroid bone marrow cells. Interestingly, recent work revealed that erythrocytes infected with immature gametocytes or with asexual stages adhere to human bone marrow mesenchymal cells via trypsin-sensitive parasite ligands exposed on the erythrocyte surface[40]. Although the ligand(s) and receptor(s) promoting this adhesion are not identified yet, this mechanism may contribute to immature GIE sequestration in the parenchyma. Furthermore, we cannot exclude that the association of immature gametocytes with erythroblastic islands reflects the infection of erythroblasts by gametocytes. Indeed, several experiments using *ex vivo* culture of human primary erythroblasts showed that the development of gametocytes could take place in hematopoietic cells as early as the orthochromatic stages[4], suggesting that gametocytes may preferentially develop in erythroblasts or reticulocytes in the human marrow.

In conclusion, this study provides insights into the interplay between *P. falciparum* gametocytes and human bone marrow cells. Also, our results highlight that STEVOR proteins may have different role and topology in asexual and sexual stages. These observations raise some questions about the function of other variant antigens in gametocytes.

Methods

Parasite culture. The VarO and the 3D7/Pf13 parasite lines were described elsewhere[21,25]. The *P. falciparum* isolate NF54[41] was used to generate clonal and transgenic lines (see Supplemental Table 1 for description of parasite lines). Parasites were cultivated *in vitro* as described[42] using RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated human serum, hypoxanthin 10 mM, gentamicin (20 µg/ml) and human erythrocytes at 5% hematocrit. Infected erythrocytes were cultivated at 37 °C, 5% CO2, 2% O2. To obtain synchronous asexual stages, parasites were synchronized by the isolation of trophozoites by magnetic isolation using a MACS depletion column (Miltenyi Biotec) in conjunction with a magnetic separator, and placed back into culture. After the invasion of merozoites, ring-stage parasites were selected by magnetic depletion of trophozoites to obtain a

tighter window of synchronization. Synchronous production of gametocytes was achieved as described[43]. Briefly, the culture medium was supplemented with 50 mM N-acetyl-glucosamine from day 0 onwards, and a medium replacement was continued for 5 to 6 days to eliminate the asexual stages.

DNA construct and transfection. To overexpress the PF3D7_1040200-tagged protein having two adjacent Ty1 at the carboxy-terminal domain, the plasmid pLN-*stevorPF3D7_1040200*-Ty1 was constructed by amplifying the *PF3D7_1040200* gene from NF54 genomic DNA using these primers: Fw, 5′-AAGGCCGGCCCTCGAGATGAAGATGTATTACCTTAAAATGATATTGTTTAAC and Rv, 5′-AAGGCGCGCCACTTACATAAATGTTTCTTGCATTGATGTTTCAATGAATTTTTTC. The PCR product was restriction digested with FseI and AscI and inserted into the expression vector pLN-Ty1C[44]. This expression vector contains an expression cassette that is driven by the *P. falciparum* 5′ *calmodulin* promoter and the 3′ *hsp86* terminator, to ensure a high expression level of *stevor* gene, and *blasticidin* (bsd) expression cassette for selection of transformed parasites. Sequence of the plasmid was confirmed by sequencing: Fw, 5′-TGTATATTGGGGTGATGATAAAATG and Rv, 5′-AATATGTATATTTTAAACTAGAAAAGG. Parasites were transfected into the NF54-derived B10 clone[17] as previously described, by electroporating ring-stage parasites[45]. Briefly, 0.2 cm electroporation cuvettes were loaded with 0.100 mL of ring-stage infected erythrocytes and 60 μg of plasmid DNA in cytomix solution. Positive selection was achieved using 2.5 μg/mL blasticidin (Euromedex). Episomal plasmid rescue experiment was performed by transforming *E. coli* competent cells with 100 ng of purified *P. falciparum* genomic DNA. To remove episomal overexpression, parasites were cultivated without blasticidin for 14 generations.

Erythroid Cell Culture. The K562 cell line was cultured in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, 200 mg/mL streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum[46]. The UT7 cell line was cultured in minimal essential medium (MEM) (Gibco) supplemented with 2 U/mL erythropoietin (Epo), 2 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, 200 mg/mL streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum[47]. The human primary erythroblasts culture method was adapted from Freyssinier *et al.*[48]. CD34+ progenitor cells were obtained from human donors who gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki Principles. The study has been approved by the French ministry of higher education and research review board (DC-2012–1645). CD34+ cells were collected from G-CSF mobilized peripheral blood after cytapheresis and purified by an immunomagnetic procedure (MACS CD34 isolation Kit; Miltenyi Biotech). CD34+ cells were cultured in 5% CO2 at 37 °C in Iscove DMEM (IMDM) containing 15% BIT 9500 (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), 100 ng/mL Stem Cell Factor (SCF, Milteny Biotech), 10 ng/mL IL6 and 10 ng/mL IL3. After 7 days of culture, a purified population of human erythroid progenitors was obtained by positive selection on CD36 immunomagnetic beads. CD36+ cells were cultured with 2 U/mL Epo, 100 ng/mL SCF and 10 ng/mL IL3 to allow the erythroid differentiation.

Adhesion assay. Infected-erythrocytes were purified by magnetic isolation using a MACS depletion column as described above. Purified infected-erythrocytes were stained with PKH67 (Sigma) according to manufacturer's instructions and Hoechst 33342 (Life Technologies) (1/20000). Erythroid cells were stained with PKH26 and Hoechst 33342. 20% of purified infected-erythrocytes were added to 80% of erythroid cells. Cells were allowed to adhere for 2 hours in 100% human serum at 37 °C, 5% CO_2, 2% O_2. After incubation, at least 300 cells per condition were counted at the X100 objective of a Leica DMi8 microscope. Statistical significances of adhesion rates were determined with the Wilcoxon test, and raw p-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure[49].

Antibodies. The 3D7 genomic DNA sequence coding for the N-terminal part including the semi-conserved region, the first hydrophobic stretch and the variable domain of STEVOR PF3D7_0631900 was amplified using the following primers: Fw: 5′-GGGAAGCTTACCCAAATCCATAATCCAC-3′; Rv: 5′-GGGGGATCCTTAAGGGGGAAATGCACCTATAGC-3′). Recombinant protein was produced in *E. coli* and antisera directed against the protein was produced in rabbits (Pineda Antikörper-Service).

Immunofluorescence assays (IFA). To detect the GPC at the surface of nucleated erythroid cells and erythrocytes were fixed during 10 minutes with a solution of 1X Phosphate-Buffered-Saline (PBS)/4% Paraformaldehyde (PFA) or 1% PFA, respectively. After 2 hours of pre-incubation in 1X PBS/2% Bovine Serum Albumin (BSA), slides were incubated overnight with a mouse monoclonal antibody directed against Glycophorin C/D (Santa Cruz) (1/200).

To assess STEVOR protein expression in the different parasite lines, GIE were fixed with a solution of 1X PBS/1% PFA/0.25% glutaraldehyde for 10 minutes and permeabilized with a solution of 1X PBS/0.1% Triton (Sigma) for 10 minutes or GIE were air-dried on glass blood smears and methanol-fixed at −20 °C for 10 minutes. After 2 hours of pre-incubation in 1X PBS/2% BSA, slides were incubated overnight with rabbit antibodies raised against STEVOR PF3D7_0300400[28] (1/200), with a mouse antibody raised against the intracellular domain of Band 3 protein (Santa Cruz) (1/10000) or with a mouse mAb directed against Ty1 (Diagenode) (1/50000).

For live surface IFA, GIE were incubated 1 hour at 37 °C with antibodies directed against STEVOR PF3D7_0300400 (1/200), the N-terminal domain of Glycophorin A/B (Santa Cruz) (1/500) and the intracellular domain of Band 3 protein (Santa Cruz) (1/10000).

All incubations with primary antibodies are followed by incubation with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (1/2000) and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse antibody (1/2000) and Hoechst 33342 (Life technologies) (1/20000) for 1 hour at room temperature. Samples were observed at X100 magnification using a Leica DMi8 microscope.

Western-blotting analysis. For the detection of the GPC in erythroid cells, proteins were extracted from whole cells with a RIPA buffer (Sigma) in the presence of protease inhibitor cocktail (Roche). Protein concentration was determined using a Pierce BSA assay kit (Thermo Scientific). 30 to 60 µg of proteins (depending on cell types) were denatured in protein loading buffer (Biorad) during 10 min at 95 °C and were separated by 4–12% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and blocked 2 hours in 5% non-fat dry milk. Immunoblots were probed overnight with primary mouse GPC antibody (Santa Cruz) (1/500) followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or IgG secondary antibodies (Promega) (1/10000) for 1 hour. Detection step was performed using the Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions.

To characterize transgenic parasite lines, stage III GIE were purified by magnetic isolation, pelleted by centrifugation at 1,800 rpm and kept at −80 °C until used. After protein separation and transfer to PVDF membrane, immunoblots were probed overnight with rabbit antibodies against STEVOR PF3D7_0300400[28] (1/2000) and mouse anti-PfHsp70[28] (1/5000) followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit IgG secondary antibodies (Promega) (1/10000) for 1 hour. Detection step was performed using the Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions. The levels of STEVOR were quantified by densitometry using the ImageJ software by determining the ratio of STEVOR level relative to the loading control PfHsp70.

RT-qPCR. RNA was extracted from mid-trophozoite stages at 28 hours post-invasion (hpi). RNA was prepared with Trizol (Invitrogen) as recommended by the manufacturer and treated with DNAse I (Roche). RNA was then reverse-transcribed using Superscript III that was primed with random hexamer primers (Invitrogen). The absence of genomic DNA contamination was confirmed by PCR amplification with *arginyl-tRNA synthetase* primers (*PF3D7_1218600)* on RNA samples that lacked reverse-transcriptase. Real-time PCR was performed using a Light Cycler 480 (Roche). Reactions were prepared in 10 µL volumes using SYBR Green PCR master mix (Roche) and 1 µM primers. Relative quantification of cDNA was performed using the standard curve method to determine the efficiency of the target and reference amplification and to quantify cDNA in each sample. The relative copy number for each gene was determined as the ratio of the relative amount of target gene cDNA/the relative amount of housekeeping control gene cDNA *arginyl-tRNA synthetase* (*PF3D7_1218600*). The threshold detection level (TDL) was defined as 3 CT below the CT value that was obtained for the water control or RNA samples treated without reverse-transcriptase. Gene-specific primers for *stevor* genes and housekeeping genes were published elsewhere[23].

References

1. Hawking, F., Wilson, M. E. & Gammage, K. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **65**, 549–559 (1971).
2. Aguilar, R. *et al.* Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. *Blood* **123**, 959–966, https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-520767 (2014).
3. 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, https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-285 (2012).
4. Joice, R. *et al.* Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Sci Transl Med* **6**, 244re245, https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008882 (2014).
5. Chasis, J. A. & Mohandas, N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* **112**, 470–478, https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-077883 (2008).
6. Tiburcio, M. *et al.* Early gametocytes of the malaria parasite Plasmodium falciparum specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. *Cell Microbiol*, https://doi.org/10.1111/cmi.12062 (2013).
7. Craig, A. & Scherf, A. Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Molecular and biochemical parasitology* **115**, 129–143 (2001).
8. Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. & Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**, 673–679, https://doi.org/10.1038/415673a (2002).
9. Rogers, N. J., Daramola, O., Targett, G. A. & Hall, B. S. CD36 and intercellular adhesion molecule 1 mediate adhesion of developing Plasmodium falciparum gametocytes. *Infect Immun* **64**, 1480–1483 (1996).
10. Rogers, N. J., Hall, B. S., Obiero, J., Targett, G. A. & Sutherland, C. J. A model for sequestration of the transmission stages of Plasmodium falciparum: adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. *Infect Immun* **68**, 3455–3462 (2000).
11. Silvestrini, F., Tiburcio, M., Bertuccini, L. & Alano, P. Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of Plasmodium falciparum on human endothelial cells are tissue independent. *PloS one* **7**, e31567, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031567 (2012).
12. Ho, M., Davis, T. M., Silamut, K., Bunnag, D. & White, N. J. Rosette formation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from patients with acute malaria. *Infect Immun* **59**, 2135–2139 (1991).
13. Lee, W. C. *et al.* Glycophorin C (CD236R) mediates vivax malaria parasite rosetting to normocytes. *Blood* **123**, e100–109, https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-541698 (2014).
14. Niang, M. *et al.* STEVOR is a Plasmodium falciparum erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. *Cell host & microbe* **16**, 81–93, https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.004 (2014).
15. Niang, M., Yan Yam, X. & Preiser, P. R. The Plasmodium falciparum STEVOR multigene family mediates antigenic variation of the infected erythrocyte. *PLoS Pathog* **5**, e1000307, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000307 (2009).
16. Singh, H. *et al.* Expression dynamics and physiologically relevant functional study of STEVOR in asexual stages of Plasmodium falciparum infection. *Cell Microbiol* **19**, https://doi.org/10.1111/cmi.12715 (2017).
17. Tiburcio, M. *et al.* A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. *Blood* **119**, e172–180, https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-414557 (2012).
18. McRobert, L. *et al.* Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the Plasmodium falciparum life cycle. *Infect Immun* **72**, 6597–6602 (2004).
19. Hu, J. *et al.* Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis *in vivo*. *Blood* **121**, 3246–3253, https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-476390 (2013).
20. Gautier, E. F. *et al.* Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Rep* **16**, 1470–1484, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.085 (2016).

21. Vigan-Womas, I. *et al*. An *in vivo* and *in vitro* model of Plasmodium falciparum rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. *Infect Immun* **76**, 5565–5580, https://doi.org/10.1128/IAI.00901-08 (2008).
22. Chasis, J. A. & Mohandas, N. Red blood cell glycophorins. *Blood* **80**, 1869–1879 (1992).
23. Lavazec, C., Sanyal, S. & Templeton, T. J. Expression switching in the stevor and Pfmc-2TM superfamilies in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **64**, 1621–1634, https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05767.x (2007).
24. Yam, X. Y., Niang, M., Madnani, K. G. & Preiser, P. R. Three Is a Crowd - New Insights into Rosetting in Plasmodium falciparum. *Trends Parasitol* **33**, 309–320, https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.12.012 (2017).
25. Vigan-Womas, I. *et al*. Allelic diversity of the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 entails variant-specific red cell surface epitopes. *PloS one* **6**, e16544, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016544 (2011).
26. Blythe, J. E. *et al*. Plasmodium falciparum STEVOR proteins are highly expressed in patient isolates and located in the surface membranes of infected red blood cells and the apical tips of merozoites. *Infect Immun* **76**, 3329–3336, https://doi.org/10.1128/IAI.01460-07 (2008).
27. Bachmann, A. *et al*. Temporal expression and localization patterns of variant surface antigens in clinical Plasmodium falciparum isolates during erythrocyte schizogony. *PloS one* **7**, e49540, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049540 (2012).
28. Naissant, B. *et al*. Plasmodium falciparum STEVOR phosphorylation regulates host erythrocyte deformability enabling malaria parasite transmission. *Blood* **127**, e42–53, https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-690776 (2016).
29. Scherf, A., Lopez-Rubio, J. J. & Riviere, L. Antigenic variation in Plasmodium falciparum. *Annu Rev Microbiol* **62**, 445–470, https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093134 (2008).
30. Bachmann, A. *et al*. A comparative study of the localization and membrane topology of members of the RIFIN, STEVOR and PfMC-2TM protein families in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Malar J* **14**, 274, https://doi.org/10.1186/s12936-015-0784-2 (2015).
31. Lavazec, C., Sanyal, S. & Templeton, T. J. Hypervariability within the Rifin, Stevor and Pfmc-2TM superfamilies in Plasmodium falciparum. *Nucleic Acids Res* **34**, 6696–6707, https://doi.org/10.1093/nar/gkl942 (2006).
32. Templeton, T. J. The varieties of gene amplification, diversification and hypervariability in the human malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Molecular and biochemical parasitology* **166**, 109–116, https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.003 (2009).
33. Tiburcio, M., Sauerwein, R., Lavazec, C. & Alano, P. Erythrocyte remodeling by Plasmodium falciparum gametocytes in the human host interplay. *Trends Parasitol* **31**, 270–278, https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.02.006 (2015).
34. Hermand, P. *et al*. Plasmodium falciparum proteins involved in cytoadherence of infected erythrocytes to chemokine CX3CL1. *Sci Rep* **6**, 33786, https://doi.org/10.1038/srep33786 (2016).
35. Kyes, S. A., Rowe, J. A., Kriek, N. & Newbold, C. I. Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 9333–9338 (1999).
36. Goel, S. *et al*. RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria. *Nat Med* **21**, 314–317, https://doi.org/10.1038/nm.3812 (2015).
37. Petter, M., Bonow, I. & Klinkert, M. Q. Diverse expression patterns of subgroups of the rif multigene family during Plasmodium falciparum gametocytogenesis. *PloS one* **3**, e3779, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003779 (2008).
38. Ramdani, G. *et al*. cAMP-Signalling Regulates Gametocyte-Infected Erythrocyte Deformability Required for Malaria Parasite Transmission. *PLoS Pathog* **11**, e1004815, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004815 (2015).
39. De Niz, M. *et al*. Plasmodium gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. *Sci Adv* **4**, eaat3775, https://doi.org/10.1126/sciadv.aat3775 (2018).
40. Messina, V. *et al*. Gametocytes of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum Interact With and Stimulate Bone Marrow Mesenchymal Cells to Secrete Angiogenetic Factors. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, 50, https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00050 (2018).
41. Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A. D. & Meuwissen, J. H. Chloroquine sensitivity of isolates of Plasmodium falciparum adapted to *in vitro* culture. *Trop Geogr Med* **33**, 50–54 (1981).
42. Trager, W. & Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673–675 (1976).
43. Fivelman, Q. L. *et al*. Improved synchronous production of Plasmodium falciparum gametocytes *in vitro*. *Molecular and biochemical parasitology* **154**, 119–123, https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.04.008 (2007).
44. Vembar, S. S., Scherf, A. & Siegel, T. N. Noncoding RNAs as emerging regulators of Plasmodium falciparum virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* **20**, 153–161, https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.013 (2014).
45. Wu, Y., Sifri, C. D., Lei, H. H., Su, X. Z. & Wellems, T. E. Transfection of Plasmodium falciparum within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 973–977 (1995).
46. Andersson, L. C., Nilsson, K. & Gahmberg, C. G. K562–a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer* **23**, 143–147 (1979).
47. Komatsu, N. *et al*. Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival. *Cancer Res* **51**, 341–348 (1991).
48. Freyssinier, J. M. *et al*. Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *Br J Haematol* **106**, 912–922 (1999).
49. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* **57**, 289–300 (1995).

Acknowledgements

GN was supported by a labex GR-Ex fellowship. 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. CL, GN, FD, BN and DB acknowledge the financial support from the Cnrs (ATIP-Avenir grant), Inserm and the Fondation pour la Recherche Médicale ("Equipe FRM" grant DEQ. 20170336722). We are grateful to Odile Mercereau-Puijalon and Micheline Guillotte for providing the VarO and the 3D7/Pf13 parasite lines. We thank Emmanuel Bischoff for his support with statistical analysis.

Author Contributions

G.N., F.D., M.L., D.B. and C.R. performed experiments; G.N., F.V. and C.L. analysed data; G.N. performed statistical analysis; R.M.M., J.J.L.R. and A.B. contributed new reagents or analytical tools; G.N., B.N., F.V. and C.L. designed the research; G.N. and C.L. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-018-36148-y.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

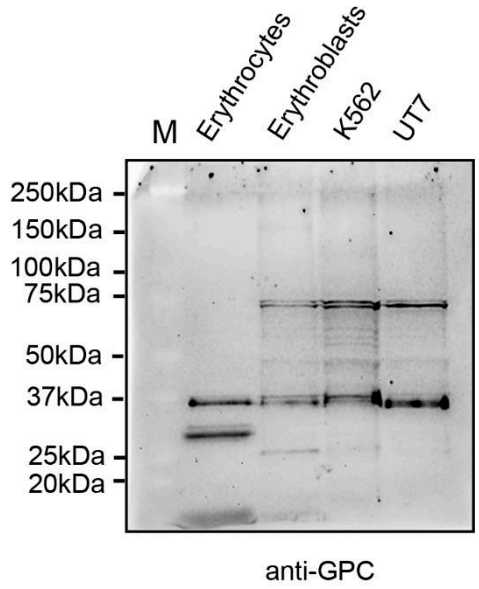
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative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

© The Author(s) 2018

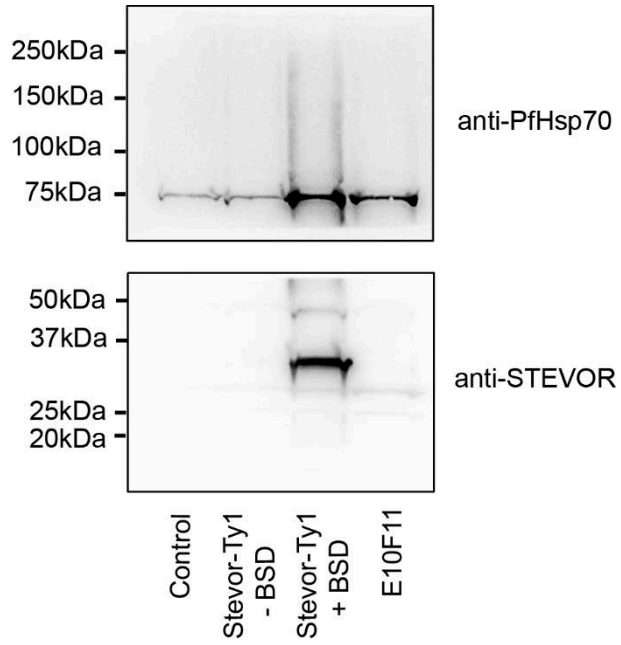
Plasmodium falciparum **gametocyte-infected erythrocytes do not adhere to human primary erythroblasts**

Gaëlle Neveu, Florian Dupuy, Meriem Ladli, Daniela Barbieri, Bernina Naissant, Cyrielle Richard, Rafael M. Martins, José-Juan Lopez-Rubio, Anna Bachmann, Frédérique Verdier, Catherine Lavazec.

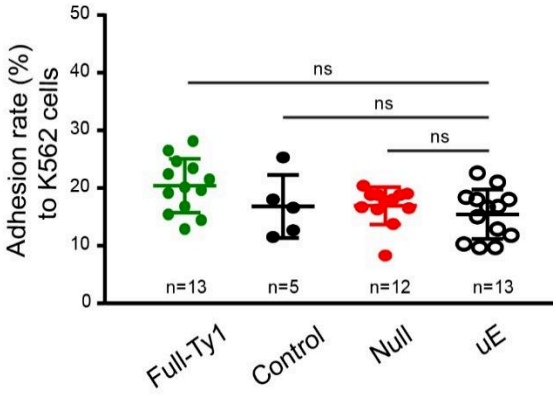
Supplemental Figures and legends



Supplemental Figure S1. Western blot analysis showing the presence and the size of GPC in erythrocytes, erythroblasts, K562 cells and UT7 cells. The full-length blot is presented. Detection step was performed using the Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions. Image was taken with Fusion FX (Vilber Lourmat). M: molecular weight.

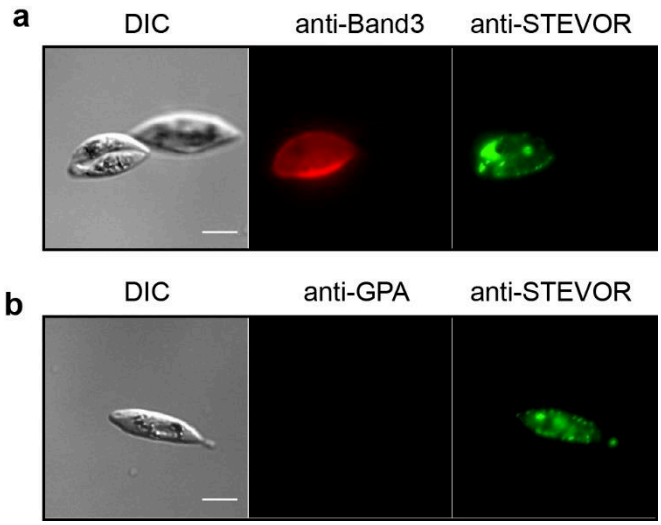


Supplemental Figure S2. Western blot analysis of STEVOR expression in stage III GIEs. 5.10^6 stage III GIE from the transgenic Stevor-Ty1 line cultivated with and without BSD, the transfection control line (Control) and the NF54 clone E10F11 were loaded on one gel. After protein separation and transfer to PVDF membrane, the immunoblot was cut in two pieces. The upper one was probed with a mAb directed against PfHsp70 (upper panel) and the lower one with a rabbit polyclonal antibody directed against STEVOR PFC0025c protein (lower panel). Full-length blots are presented. Detection step was performed using the Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions. Images were taken with Fusion FX (Vilber Lourmat).



Supplemental Figure S3. Overexpression of STEVOR PFF1550w does not promote GIE adhesion to K562 cells

Cell-cell adhesion assay of MACS-purified GIE from the transgenic line Full-Ty1, the transfection control line (Control), the transgenic line downregulating STEVOR expression (Null) or of uninfected erythrocytes (uE) to K562 cells. The Full-Ty1 line, characterized in Naissant *et al.*[27], episomally overexpresses a Ty1-tagged copy of the PFF1550w protein exported at the GIE membrane. Error bars denote the standard error of the mean. ns, non-significant differences in adhesion rates. n = number of experiments.



Supplemental Figure S4. Immunofluorescence analysis of STEVOR expression in non-permeabilized GIE

IFA of non-permeabilized immature GIE showing the detection of STEVOR protein (green) in 1 % cells from the E10F11 clone. GIE were stained with a rabbit polyclonal antibody directed against STEVOR PFF1550w (green) and with a mouse anti-Band 3 (a, red) or a mouse anti-Glycophorin A (GPA) (b, red) antibody. Band 3 positive signal indicates leakiness of the erythrocyte membrane (a), and absence of GPA signal indicates loss of the erythrocyte membrane (b). Pictures were taken under identical exposure conditions. Bars represent 5 µm.

II. Caractérisation du développement des gamétocytes de *P. falciparum* chez les érythroblastes primaires humains

1. Préambule

a. Contexte

Alors que nos résultats ne supportent pas l'hypothèse d'une adhérence des EIG aux cellules érythroïdes de l'îlot érythroblastique, la présence des gamétocytes dans cette niche pourrait être expliquée par l'infection des érythroblastes par le parasite. En effet, de précédents travaux ont montré que les érythroblastes primaires humains peuvent être infectés *in vitro* par des parasites asexués de *P. falciparum* (Joice et al., 2014; Tamez et al., 2009). Dans cette étude, nous émettons l'hypothèse que les gamétocytes peuvent se développer au sein des précurseurs érythroïdes du stade I à IV, parallèlement au développement de l'érythroblaste. Une telle infection pourrait fournir aux gamétocytes un moyen de séquestrer dans le parenchyme grâce à l'adhérence des érythroblastes au macrophage de l'îlot érythroblastique. Une fois mature, le gamétocyte au sein d'un réticulocyte pourrait regagner la circulation sanguine afin d'être disponible pour la transmission par le moustique. Cependant, il reste à déterminer si le développement complet des gamétocytes est possible dans les précurseurs érythroïdes puisque seuls des gamétocytes de stade I-II ont été observés au sein de cellules érythroïdes nucléées (Joice et al., 2014). De plus, les travaux de Tamez et collaborateurs suggèrent que l'invasion n'est possible que chez des érythroblastes tardifs, ce qui ne laisserait pas le temps nécessaire pour la maturation complète des gamétocytes avant l'énucléation (Tamez et al, 2009). Pour déterminer si les gamétocytes peuvent se développer au sein des précurseurs érythroïdes il est donc nécessaire d'étudier plus précisément les mécanismes de développement du parasite chez les érythroblastes lors de l'érythropoïèse tardive.

b. Résultats

Afin de caractériser le développement des gamétocytes chez les précurseurs érythroïdes, nous avons mis au point un protocole d'infection des érythroblastes primaires humains par des souches transgéniques fluorescentes de *P. falciparum*. Grâce à ce protocole nous avons pu observer et quantifier la formation de parasites asexués et de gamétocytes immatures dans des érythroblastes nucléés, confirmant ainsi ce qui avait été précédemment observé (Joice et al., 2014; Tamez et al., 2009). Ce protocole d'infection nous a permis d'obtenir un rendement suffisant d'érythroblastes parasités par des gamétocytes immatures pour les caractériser par cytométrie en flux, par microscopie électronique et par microscopie à immunofluorescence. Ces approches ont mis en évidence que les gamétocytes se développant dans les érythroblastes sont dotés des structures typiques des gamétocytes tels que le réseau de microtubules et l'IMC. De plus, ils ont la capacité d'exporter à la membrane de l'érythroblaste des protéines parasitaires. De manière intéressante, nous avons pu observer que 6 jours après l'infection, seuls les gamétocytes persistent au sein des érythroblastes nucléés. Ce résultat ouvre la voie à une analyse plus profonde de l'engagement vers la voie sexuée au sein des précurseurs érythropoïétiques, et sur la capacité des parasites asexués à se répliquer et effectuer plusieurs cycles dans cette niche hématopoïétique.

La seconde étape de ce projet a été de déterminer si les gamétocytes pouvaient se développer jusqu'au stade mature au sein des érythroblastes. Sachant que le développement des érythroblastes du stade proérythroblaste jusqu'à la formation de réticulocytes prend en moyenne 10 jours *in vitro*, tout comme la maturation des gamétocytes, nous avons donc émis l'hypothèse que le parasite devait envahir les érythroblastes dès le début de la différenciation terminale afin d'effectuer sa maturation parallèlement à celle de l'érythroblaste. Pour vérifier cette théorie nous avons synchronisé très finement la différenciation des érythroblastes primaires humains et avons infecté les précurseurs érythroïdes au stade proérythroblaste, basophile, polychromatique et orthochromatique. Au contraire de ce qui avait déjà été observé (Tamez et al., 2009), l'invasion des érythroblastes par *P. falciparum* peut avoir lieu dès le stade érythroblaste basophile. En revanche, l'infection des stades basophiles ne perdure pas au-delà de 2

jours et seulement l'infection à partir du stade polychromatique permet d'observer des parasites dans des cellules nucléées 6 jours après l'infection. De manière surprenante, lorsque l'infection à lieu à ce stade tardif de l'érythropoïèse terminale, les gamétocytes immatures peuvent se développer entièrement au sein d'une cellule nucléée, menant, 10 jours après l'infection, à la production de gamétocytes matures au sein de réticulocytes. Ce résultat suggère que le parasite empêcherait ou retarderait la différenciation des érythroblastes en réticulocytes pour se développer jusqu'au stade IV au sein d'une cellule nucléée.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons quantifié par cytométrie en flux la production de réticulocytes. Cette approche nous a permis d'observer que la conversion en réticulocytes dans une culture d'érythroblastes infectés était fortement diminuée en comparaison à une culture non-parasitée 8 jours après l'infection. Nous avons pu montrer que cet effet était dû à un ou plusieurs facteurs sécrétés par le parasite dans le milieu de culture. Plus précisément, nous avons mis en évidence que les vésicules extracellulaires (VE) sécrétées par les parasites dans le milieu de culture contribuent au retard de maturation des érythroblastes.

Afin d'élucider le mécanisme d'action des VE sur les érythroblastes primaires humains nous avons déterminé le taux d'oxydation des érythroblastes en leur présence, car il est décrit dans la littérature que le stress oxydatif est un des facteurs principaux pouvant affecter l'érythropoïèse (Zhao et al., 2016). Nos résultats ont montré que le stress oxydatif des cellules augmente significativement chez les érythroblastes non-parasités cultivés en présence de VE.

c. Conclusion

Cette étude a permis de montrer que les gamétocytes de *P. falciparum* peuvent se développer entièrement au sein des précurseurs érythroïdes et ce lorsque l'infection se fait à partir du stade d'érythroblaste acidophile. L'infection des érythroblastes entraîne un retard de leur maturation en réticulocytes via la production de VE par le parasite. Les VE engendrent une augmentation du stress oxydatif chez les érythroblastes ce qui pourrait être lié au retard de maturation. En résumé, ces résultats indiquent que l'infection des précurseurs érythroïdes et le développement des gamétocytes au sein de ces cellules

pourraient être un mécanisme de séquestration des gamétocytes immatures dans le parenchyme de la moelle osseuse. Une fois matures, les gamétocytes dans les réticulocytes pourraient rejoindre la circulation sanguine. Les conséquences d'une telle infection des érythroblastes de l'îlot érythroblastique pourraient être liées aux nombreuses affections de l'érythropoïèse lors de l'infection par *Plasmodium*.

2. **Manuscrit: *Plasmodium falciparum* sexual parasites develop in human erythroblasts**

Plasmodium falciparum sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis

Gaëlle Neveu[1,2], Cyrielle Richard[1,2] , Prativa Behera[3], Fiona Volpe[1,2], Florian Dupuy[1,2], Pradeep Annamalai[4], Patrice Vallin[1,2], Muriel Andrieu[1,2], Rafael M. Martins[5] , Audrey Lorthiois[1,2], José-Juan Lopez-Rubio[5], Dominique Mazier[4], Silvia Portugal[6], Sanghamitra Satpathi[3], Samuel Wessmer[7], Frédérique Verdier[1,2#], Catherine Lavazec[1,2#*].

[1] Inserm U1016, CNRS UMR8104, Université de Paris, Institut Cochin, Paris, France

[2] Laboratoire d'excellence GR-Ex, Paris, France

[3]Department of Pathology, Ispat General Hospital, Rourkela, Odisha, India

[4] Inserm U1135, CNRS ERL8255, Sorbonne Université, CIMI, Paris, France

[5] UMR IRD 224-*CNRS 5290*-University Montpellier, MIVEGEC, Montpellier, France

[6] Heidelberg University, Heidelberg, Germany

[7] London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK

* Corresponding author: catherine.lavazec@inserm.fr

# Equal contribution

ABSTRACT

Plasmodium falciparum gametocytes, the only stages responsible for parasites transmission from human to mosquitoes, are key targets for malaria elimination. Gametocytes sequester in the human bone marrow parenchyma where they are enriched at erythroblastic islands. The cross-talk of gametocytes with these islands is unexplored and may affect erythropoiesis. Here, we show that gametocytes develop within human erythroblasts *in vitro* and *in vivo*, leading to mature gametocytes within reticulocytes. Parasite infection induces a delay in erythroid maturation that allows gametocytes to complete their development. This delayed erythropoiesis occurs through parasite-secreted extracellular vesicles inducing oxidative stress in erythroblasts. Altogether these results decipher a mechanism that might be crucial for maintenance of immature gametocytes in the bone marrow and provide new insights how *Plasmodium* parasites interfere with erythropoiesis in malaria patients. This study highlights how intracellular parasites as Plasmodium hijack mammalian host cells to complete their life cycle.

INTRODUCTION

Malaria remains one of the major public health threats in the world with half a million deaths annually. *Plasmodium falciparum* is the human parasite that causes the most severe form of the disease. Sexual parasites, called gametocytes, are the only parasite stages responsible for transmission from humans to *Anopheles* mosquitoes that spread the parasite in the population. Thus, understanding the biology of gametocyte development is crucial for successful malaria elimination. *P. falciparum* gametocytes development takes about 10 days and their maturation is divided into 5 stages (Fivelman et al., 2007; Hawking et al., 1971). Only mature stages V gametocytes circulate into the bloodstream, available for mosquito bites, whereas immature gametocytes from stages I to IV are sequestered in deep tissues presumably to avoid clearance by the spleen. Recent examination of autopsies and *ex vivo* samples from malaria-infected patients revealed that immature gametocytes are enriched in the bone marrow (Aguilar et al., 2014a; Farfour et al., 2012; Joice et al., 2014). The emerging role of bone marrow in hosting gametocytes raises the question of mechanisms that regulate homing and maintenance of sexual parasites in this niche. Unlike asexual parasites that sequester by cytoadhesion of infected erythrocytes through PfEMP1 interaction with endothelial receptors, gametocytes do not express the PfEMP1 adhesin and immature gametocyte-infected erythrocytes (GIE) do not significantly adhere to endothelial cells from different organs, including bone marrow hBMECs (Silvestrini et al., 2012; Tibúrcio et al., 2013). These features are consistent with the observation that gametocytes preferentially accumulate in the extravascular space of bone marrow (Joice et al., 2014). Several hypotheses have been advanced for the mechanism of gametocyte sequestration in the bone marrow parenchyma. For instance, immature GIE maintenance in this microenvironment may be dependent on adhesion to non-endothelial bone marrow cells, since erythrocytes infected by asexual and immature gametocytes adhere to bone marrow mesenchymal cells via trypsin-sensitive parasite ligands exposed on the erythrocyte surface (Dantzler et al., 2019; Messina et al., 2018). Moreover, the important stiffness of immature GIE may also contribute to their sequestration by mechanical retention in this niche (Tibúrcio et al., 2012). Although both assumptions have yet to be validated in vivo, they do not fully reconcile with histological analyses of the bone marrow parenchyma

reporting that gametocytes are predominantly localized in close proximity to erythroblastic islands (Joice et al., 2014). These specialized niches, where occurs the terminal erythroid differentiation, consist of a macrophage surrounded by differentiating erythroblasts (Bessis, 1958). So far, the nature of the interactions between gametocytes and these islands remains elusive. As immature GIE fail to adhere to human primary erythroblasts or erythroid cell lines (Neveu et al., 2018), the vicinity observed between immature gametocytes and erythroblastic islands may reflect erythroblasts infection by parasites followed by the maturation of gametocytes within these nucleated cells. Indeed, previous studies have demonstrated that nucleated erythroid cells support *Plasmodium falciparum* invasion (Bei et al., 2010; Egan et al., 2015; Kanjee et al., 2017). Moreover, the development of *P. falciparum* asexual parasites can take place in *ex vivo* culture of human primary erythroblasts and immature gametocytes of stages I and II have been observed in nucleated cells *in vitro* (Joice et al., 2014; Tamez et al., 2009). This hypothesis underlies that gametocytes might benefit from direct adhesion of erythroblasts to the erythroblastic islands nursing macrophages through Emp homophilic binding, α4β1 integrin binding to VCAM-1, or ICAM-4 binding to αV integrin (Chasis and Mohandas, 2008). These interactions may contribute to the maintenance of immature gametocytes from stage I to IV in the bone marrow parenchyma until their release in the blood circulation as mature gametocytes within reticulocytes. The consequences of these infections on human erythropoiesis are unknown but may be linked to erythroid disorders observed in malaria patients (White, 2018).

Therefore, erythroblast infection by gametocytes may play a key role in the cross-talk between *Plasmodium* and the bone marrow, however little is known about parasite sexual maturation in erythroid precursors. It remains to be determined whether gametocytes can complete their development within erythroblasts since no gametocyte more advanced than stage II has ever been observed in these nucleated cells. In addition, previous work suggests that only late erythroblasts are susceptible to *P. falciparum* infection (Tamez et al., 2009), which would not leave enough time for the full maturation of gametocytes until stage IV within erythroid precursors before their enucleation and their release into the bloodstream.

Here, we set up a protocol to produce and quantify *P. falciparum* gametocytes in a synchronized culture of human primary erythroblasts. Although only late stages erythroblasts support gametocytes development, a delay in the erythroid maturation process upon infection allows gametocytes to undergo their development until stage IV before enucleation. This delay is dependent on parasite-secreted extracellular vesicles (EVs) which trigger oxidative stress in erythroblasts.

RESULTS

Immature gametocytes properly develop within human primary erythroblasts

To address whether *P. falciparum* gametocytes can develop within erythroid precursors, we set up an infection protocol where MACS-purified synchronized schizonts were added to human primary erythroblasts derived from G-CSF mobilized peripheral blood (Figure 1A). As previously reported (Joice et al., 2014; Tamez et al., 2009), we observed young asexual parasites within erythroblasts 24 hours after the infection. We then observed trophozoites and schizonts at 2 days post-infection (dpi) and immature gametocytes at 6 dpi (Figure 1B and 1C). Immature gametocytes developing within erythroblasts presented typical features of sexual parasites as a microtubular network and an inner membrane complex (Dearnley et al., 2012; Sinden, 1982) (Figure 1D). Moreover, the presence of multiple membranous compartments in the infected erythroblast cytosol suggests that gametocytes develop an exo-membrane trafficking system to export proteins to the host cell, as observed in infected erythrocytes (Sherling 2016). This hypothesis is supported by the detection of the gametocyte-specific protein Pf11-1 (PF3D7_1038400.1) at the membrane of the infected erythroblast (Scherf et al., 1992b), indicating that immature gametocytes properly establish their trafficking system within the cytoplasm of their nucleated host cell (Figures 1E and S1). These results suggest that immature gametocytes are adapted to develop in nucleated primary erythroblasts *in vitro*.

To evaluate infection efficiency by flow cytometry, human primary erythroblasts were infected with two transgenic lines expressing fluorescent reporters: the Hsp70-GFP line (Figure S2) expressing GFP throughout the entire *parasite* life cycle under the control of the constitutive promoter *hsp70* to monitor total parasitemia, and the Pfs16-GFP line expressing GFP under the control of the gametocyte-specific promoter *Pfs16* to monitor gametocytemia (Figure 1F). The infection yield was lower in erythroblasts than in erythrocytes under the same conditions of infection, however total parasitemia in nucleated cells two days after infection was 13.45% (± 2.4%), indicating that the infection protocol is efficient (Figure 1G). Although we detected 3-fold more erythroblasts infected with Hsp70-GFP parasites than with the Pfs16-GFP line at 2 dpi, total parasitemia and gametocytemia were roughly similar at 4 dpi and 6 dpi (Figure 1H), suggesting that all the

parasites remaining within nucleated cells were gametocytes. This result suggests that sexual parasites can persist during several days in erythroblast culture.

Infection of erythroblasts allows the complete gametocytogenesis

To determine whether gametocytes undergo full maturation within erythyroid precursors, erythroblast infection was followed for 10 days (Figure 2). We observed that nucleated cells supported immature gametocyte development from stage I to IV during 8 days, leading to the production of mature gametocytes in reticulocytes at 10 dpi (Figure 2A). Furthermore, upon a temperature drop and an increase in serum concentration, mature gametocytes were able to undergo a release of round or motile flagellated gametes from reticulocytes (Figure 2B and 2C), indicating that they are functionally viable. These data indicate that gametocytes could achieve their maturation from stage I to IV in nucleated cells and that resulting mature gametocytes within reticulocytes are potentially transmissible to mosquitoes.

To address whether these *in vitro* observations can be translated *in vivo*, we analyzed by immunofluorescence microscopy bone marrow smears from a *Plasmodium falciparum*-infected Indian patient. Importantly, gametocytes stained with antibodies against the gametocyte-specific protein Pf11-1 were detected within nucleated cells that were positive for the erythroid lineage-specific Glycophorin A (GPA) staining, which is specific for the (Figure 3). These results indicate that gametocytes can develop in bone marrow erythroblasts *in vivo*.

Intra-erythroblastic gametocyte development occurs from the polychromatic stage

Terminal erythroid differentiation *in vitro* takes usually 8 to 10 days from pro-erythroblasts to reticulocytes (Gautier et al., 2016). Thus, erythroblast infection should theoretically take place at the early stages of terminal erythropoiesis to allow a complete development of immature gametocytes in nucleated cells. However, we never observed gametocytes within pro-erythroblasts or basophilic stages (Figure 2A), in line with previous study reporting that orthochromatic cells are the earliest stages that may be invaded by *P. falciparum* (Tamez et al., 2009). To determine if parasites could infect erythroblasts earlier in the erythropoiesis, we tightly synchronized human primary erythroblasts and we

infected them at different stages of maturation. Erythroid differentiation was monitored from pro-erythroblasts to reticulocytes by May-Grünwald Giemsa staining to determine cell size, cytoplasm basophily and chromatin condensation (Figure 4A), and by flow cytometry to quantify reticulocyte production and expression of the surface markers Band 3, α-4-integrin, CD71 and GPA (Figure 4B and 4C). Synchronized erythroid precursors were infected at pro-erythroblast, basophilic, polychromatic and orthochromatic stages with the Hsp70-GFP and the Pfs16-GFP lines, then parasitemia and gametocytemia were monitored at 2 dpi, 4 dpi and 6 dpi (Figure 4D). First, we observed that parasite invasion could occur from basophilic stages (Figure 4E). However, only polychromatic and orthochromatic erythroblasts sustained parasite and gametocyte development until 6 dpi (Figure 4E and 4F). The similar percentage of Hsp70-GFP and Pfs16-GFP-positive cells at 6 dpi confirmed our previous observation that only gametocytes are present for several days in the erythroblast culture. These results indicate that the maturation length of gametocytes in erythroblasts (about 10 days) is longer than the time usually required by uninfected erythroblasts to develop from orthochromatic stages to reticulocytes *in vitro* (about 3-4 days). Therefore, our data suggest that parasites could prevent or delay the differentiation of erythroblasts into reticulocytes in order to complete their development in nucleated cells.

Erythroblast infection and parasite-conditioned medium induce a delay in erythroid maturation

To address whether *P. falciparum* induces a delay in erythroid maturation, we monitored by flow cytometry the impact of infection on the conversion of erythroblasts into reticulocytes. At 8 dpi, the reticulocyte rate of infected erythroblast culture was 49.5% vs 66.7% in the uninfected culture (Figures 5A and S3). This observation suggests that the differentiation of erythroblasts into reticulocytes is delayed by *Plasmodium* parasites. Since only 5% of cells were infected at 8 dpi (Figure 5A), this observation also suggests that parasites not only hamper the maturation of their host cells but also induce a bystander effect on the other uninfected cells in the culture. As *P. falciparum* has already been shown to affect host cells (Lucchi et al., 2011; Silva et al., 2019; Wilson et al., 2008) or erythropoiesis (Boehm et al., 2018; Yap and Stevenson, 1994) by modifying the culture

medium, we hypothesized that the delay in erythroblast maturation may be due to parasite-derived factors secreted in the medium. Thus, uninfected erythroblasts were exposed to a medium conditioned by a culture of *Plasmodium*-infected erythroblasts (iEb-CM). After 8 days, the reticulocyte rate of erythroblasts cultivated in the iEb-CM was significantly lower than that of erythroblasts cultivated with regular medium (control) or with medium conditioned by uninfected erythroblasts (uEb-CM), indicating a parasite-specific effect on erythropoiesis (Figure 5B and Figure S4A). A significant decrease in reticulocyte production was also induced by addition of medium conditioned by *Plasmodium*-infected erythrocytes (iE-CM and Figure S4B) (Figure 5C). Due to the scarcity of human primary erythroblasts, iE-CM was then used for further experiments. The delay effect of iE-CM was observed from 4 days of culture (Figure S4) and was dependent on the parasitemia in the culture providing the conditioned medium (Figure 5D and Figure S5A). We then addressed the effect of media conditioned either by immature gametocyte-infected erythrocytes (gE-CM) (Figure 5E) or by erythrocytes infected with asexual parasites from a line which has lost the ability to produce gametocytes (Figure 5F) (Vigan-Womas et al., 2008). Both conditions triggered similar delays in reticulocyte production, indicating that the observed effect was not dependent on the parasite stage (Figure 5E, 5F, S5B and S5C).

To decipher whether this delay was due to an enrichment in specific parasite-secreted factors or to a depletion in specific nutrients essential for erythroblasts development, iE-CM was supplemented with several components of the erythroblast culture medium: serum substitute (BIT), erythropoietin (EPO), L-glutamine (L-Glu), a pool of amino acids (AA), human serum (HS) or a pool of all of these components (Pool). However, none of these conditions was able to reverse the delay phenotype (Figure 5G and S6). Although we have not exhaustively tested all the medium components, these data support the hypothesis that erythroid cellular development is affected by parasite-secreted factors rather than the consumption of essential nutrients by the parasite.

Parasite-derived extracellular vesicles delay erythropoiesis and induce oxidative stress

As EVs produced by *P. falcip*arum-infected erythrocytes have been shown to directly affect host cells by altering vascular functions of endothelial cells (Mantel et al., 2016) or by activating natural killers cells (Ye et al., 2018), we addressed whether EVs could affect erythroid precursors. First, flow cytometry quantification of GPA-labelled EVs (Figures S7A and S7B) showed that parasite infection increases the production of EVs by erythroblasts as similar level than by erythrocytes (Figure 6A). Electron microscopy analysis of EVs purified from a culture of infected erythrocytes confirmed the presence of vesicular structures with an average size of 189 nm (Figure 6B). Importantly, adding 10µg/mL of purified EVs to uninfected erythroblasts for 8 days significantly decreased the reticulocyte rate, suggesting that EVs negatively affect erythropoiesis (Figures 6C and S8A). To confirm this result, erythroid precursors were cultivated for 8 days with iE-CM or with iE-CM depleted in EVs (iE-CM -EV). After validating that iE-CM -EV contained 500-fold less EVs than the complete iE-CM, we observed that EVs depletion attenuated the iE-CM-induced delay in erythropoiesis (Figures 6D and S8B). These experiments provide evidence that parasite-secreted EVs contribute to the erythropoiesis delay induced by *P. falciparum*.

Among many factors affecting erythropoiesis, oxidative stress in erythroblasts has been shown to negatively impact enucleation and reticulocyte rate (Zhao et al., 2016). To examine if the EV-induced delay in erythropoiesis was related to an increase of oxidative stress in erythroblasts, we monitored the oxidation of erythroblasts by using dihydroethidium (DHE). Importantly, erythroblasts cultivated with 10µg/mL of purified EVs or with iE-CM were five-fold more oxidized than erythroblasts cultivated with control medium or with iE-CM -EV (Figure 6E and 6F). These results show that EVs induce oxidation of erythroid precursors *in vitro*, which could be linked to the delay in erythroblast maturation previously observed.

DISCUSSION

Unravelling the retention mechanisms of immature GIE in the bone marrow parenchyma appears to be a key step to decipher *P. falciparum* transmission biology. Several

hypotheses have been advanced to elucidate gametocytes localization in the bone marrow. Sequestration of gametocytes in this niche may be mediated by cytoadhesion of immature GIE to bone marrow mesenchymal cells (Messina et al., 2018), or may depend on mechanical retention, which could be due to the important stiffness of immature GIE (Aingaran et al., 2012; Dearnley et al., 2012; Tibúrcio et al., 2012). In this study, we addressed another hypothesis that gametocytes could mature within erythroblasts adhering to the erythroblastic islands nursing macrophages. We demonstrate that *Plasmodium* parasites secrete EVs that impede enucleation of erythroblasts, thereby allowing immature gametocytes to complete their development within these nucleated cells. Our results raise a new model where gametocytes develop within erythroblasts by delaying their conversion into reticulocytes through extracellular vesicles secretion. Once mature inside reticulocytes, stage V gametocytes could reach the blood circulation to be available for transmission to mosquitoes.

One of the fundamental unanswered question in malaria biology is whether erythrocytes containing gametocyte-committed parasites actively home to the bone marrow or whether the sexual commitment is specifically stimulated in this niche. The latter hypothesis implies that sexual commitment is preferentially induced in erythroblasts and is in line with results suggesting that *Plasmodium* gametocytes formation is enhanced in erythroid precursors (Lee et al., 2018; Peatey et al., 2013; Trager et al., 1999). Our results showing that gametocytemia is lower in erythroblasts than in erythrocytes do not support this hypothesis. However, our infection protocol only allows to monitor gametocyte production in the direct route of the Same Cycle Conversion, when sexual conversion occurs within the same cycle than the commitment signal (Bancells et al., 2019). We cannot exclude that commitment may be enhanced in the case of the Next Cycle Conversion pathway in which parasites complete a replicative cycle as committed forms before converting into gametocytes upon re-invasion. However, it remains unknown whether parasites that have developed in erythroblasts can replicate for several cycles and re-invade other erythroid precursors. Our results suggest that only gametocytes are able to persist for several days in erythroblast culture. The decline of asexual parasites after 2 days of culture could result either from the high infection rate applied in our protocol, or to different mechanical properties of the erythroblast membrane that may preclude schizonts to egress. Although

features of the complete asexual cycle of *P. falciparum* within these nucleated cells may differ from that within normocytes, our study suggests that gametocytogenesis appears to proceed in a similar manner in erythroblasts and in their mature counterparts. Gametocytes seem to export their proteins to the membrane of the infected erythroblast, however it is still unclear whether these proteins also remodel the mechanical and adhesive properties of the nucleated host cells. Deciphering mechanical properties of infected erythroblasts may provide new insights into the cross talk between gametocytes and the bone marrow parenchyma.

The most striking impact of gametocytes development within erythroblasts appears to be the inhibition of their conversion into reticulocytes. This result contrasts with precedent studies showing that *Plasmodium vivax* parasites accelerate aging of infected reticulocytes (Malleret et al., 2015). These observations highlight how *Plasmodium* may hijack the maturation of its host cell in order to complete its own development. This is in line with the usual subversion of mammalian cell functions by protozoan parasites (Vyas et al., 2007). Impaired erythropoiesis observed in *P. falciparum* infected erythroblasts may be due to a direct effect of gametocytes on their host cell, or to parasite factors secreted in the extracellular environment. Although EVs produced by apicomplexans have already been shown to contribute to the manipulation of their host cells, our results show for the first time an effect of *Plasmodium*-secreted vesicles on erythropoiesis. We demonstrated that parasite-derived EVs play a key role in impairing the erythroid maturation process, however the molecular identity of the EVs-embedded factor(s) triggering this delay remains elusive. These factors may be nucleic acids or proteins, since EVs contain miRNAs affecting host cells (Mantel et al., 2016), and the effect of parasite-conditioned medium on erythroblast differentiation has been shown to be protein dependent (Boehm et al., 2018). Among multiple outcomes that EVs may induce in erythroid precursors, our results show that EVs secretion causes oxidative stress. This is in line with a transcriptomic assay which reported that co-culture of erythroid precursors with *P. falciparum* increases the expression of several genes involved in the NFR2-mediated oxidative stress response (Tamez et al., 2011). As oxidative stress can lead to inhibition of erythroid maturation and dyserythropoiesis, this increase in oxidation may be responsible for the observed delay in erythroblast enucleation (Zhao et al., 2016).

Importantly, dyserythropoiesis is one major contributor to malarial anemia (White, 2018), and has been associated with a higher prevalence of gametocytes in bone marrow, suggesting a relationship between hematological disturbances and gametocyte development in this tissue (Aguilar et al., 2014a). Therefore parasite-derived EVs secreted in the bone marrow parenchyma may be involved in erythroid disorders in patients infected with *Plasmodium*.

Altogether these results decipher a mechanism that might be crucial for maintenance of immature gametocytes in the bone marrow extravascular space. Moreover, they provide new insights into the mechanisms by which *Plasmodium* parasites subvert their host cell and interfere with erythropoiesis in malaria patients.

STAR METHODS

Lead contact and material availability

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Catherine Lavazec (catherine.lavazec@inserm.fr).

Experimental model and subject detail

- Parasite strains

The VarO gametocytes non-producing line and the NF54-pfs47-Pfs16-GFP (called Pfs16-GFP) line were described elsewhere (Vigan-Womas et al., 2008) (Bouyer et al., submitted). The *P. falciparum* NF54 (Ponnudurai et al., 1981) clone B10 was used to generate the transgenic NF54-pfs47-Hsp70-GFP line (called Hsp70-GFP) described below. Parasites were cultivated *in vitro* as described (Trager and Jensen, 1976) using RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated human serum, hypoxanthine (10 mM), gentamicin (20 µg/ml) and human erythrocytes at 5% hematocrit. Infected erythrocytes were cultivated at 37 °C, 5% CO2, 5% O2. To obtain synchronous asexual stages, trophozoites were isolated by magnetic isolation using a MACS depletion column (Miltenyi Biotec) in conjunction with a magnetic separator, and placed back into culture. 3-4 hours after the invasion of merozoites, ring-stage parasites were selected by magnetic depletion of schizonts. Synchronous production of gametocytes was achieved by treating synchronized asexual cultures at the ring stage (10-15% parasitaemia, day 0) with 50 mM N-acetylglucosamine for 5 days.

- Human primary erythroblasts

The human primary erythroblasts culture method is fully described in Gautier et al. (Gautier et al., 2016). Briefly, CD34+ progenitor cells were obtained from human donors who gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki Principles. The study has been approved by the INSERM Institutional Review Board IRB 00003888. CD34+ cells were collected from G-CSF mobilized peripheral blood after cytapheresis and purified by an immunomagnetic procedure (MACS CD34 isolation Kit; Miltenyi Biotec). CD34+ cells were cultured at 37 °C, 5% CO2, in Iscove DMEM (IMDM) containing 15% BIT 9500 (StemCell Technologies), Stem Cell Factor (100 ng/mL) (SCF, Milteny Biotec),

IL6 (10 ng/ml) and IL3 (10 ng/ml) (Milteny Biotec). After 7 days of culture, a purified population of human erythroid progenitors was obtained by positive selection on CD36 immunomagnetic beads (CD36 FA6.152, Beckman Coulter). CD36+ cells were cultured with Erythropoietin (EPO) (2 U/mL), SCF (100 ng/mL), IL3 (10 ng/mL) and dexamethasone (2.10^{-7}M) (Sigma) during 5 days for progenitors amplification. To synchronously induce terminal differentiation, cells were washed with Phosphate Buffer Saline (PBS) and cultivated with RU-486 (3µM) (Sigma) to block dexamethasone effects, SCF (40 ng/ml), EPO (4U/ml) and heat-inactivated human serum (3%). Then, cells were daily diluted to 0.8 million cells/ml with culture medium containing 3% heat-inactivated human serum and EPO only.

Method details

- Generation of transgenic parasites

To generate the NF54-pfs47-Hsp70-GFP line expressing GFP under the control of the constitutive promoter *Hsp70*, cultures of the NF54 clone B10 were co-transfected with 70 µg of plasmid pDC2-Cas9-hDHFRyFCU and 70 µg of plasmid pBLD588-Hsp70-GFP and selected with 2.5 nM WR99210 as previously described (Ghorbal et al., 2014). The plasmid pDC2-Cas9-hDHFRyFCU (Knuepfer et al., 2017) encodes a single guide RNA that recognizes a sequence located in the *Pfs47* locus. The plasmid pBLD588-Hsp70-GFP contains two homology regions, HR1 and HR2, corresponding to the sequences in the *Pfs47* gene and upstream of the *Pfs47* gene, respectively. HR1 and HR2 flank the *Hsp70* 5'flanking region followed by the *gfp* coding sequence and the PbDT 3′ regulatory region. Details about the generation of the plasmids and PCR validation of the NF54-pfs47-Hsp70-GFP are provided in Figure S1. Following transfection and drug selection, clones were obtained by limiting dilution.

- Characterization of erythroid differentiation

Erythroid differentiation was analyzed by May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining of cytospun samples and by flow cytometry using the following antibodies: PE-conjugated anti-CD34 (1/50), FITC-conjugated anti-CD36 (1/100), FITC-conjugates anti-CD71 (1/50), PC7-conjugated anti-GPA (1/50), APC-conjugated anti-CD49d (α4-integrin) (1/10) (all

from Beckman Coulter) and PE-conjugated anti-BRIC6 (anti-Band3) (1/200) (International Blood Group Reference Laboratory NHS Blood and Transplant). Reticulocytes production was monitored using the Draq5 probe (1/5000) (Thermofisher), labelling the DNA.

- Erythroblasts infection

Tightly synchronized schizonts of 40 hours post infection (hpi) were purified by magnetic isolation and were added to human primary erythroblasts at the multiplicity of infection 2 (MOI 2). Infected cells were cultivated at 37 °C, 5% CO2, 5% O2 in IMDM containing 15% BIT 9500, EPO (4U/ml), hypoxanthine (10 mM) and heat-inactivated human serum (10%). 24 hours after infection, non-infected erythrocytes were removed by adding erythrocyte lysis buffer (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Infected erythroblasts cultures were daily diluted to 0.8 million cells/ml. Gametocytemia and total parasitemia were monitored by flow cytometry in the Pfs16-GFP and in the Hsp70-GFP lines, respectively, using a BD Accuri C6 cytometer. DNA was labelled with the Draq5 probe (1/5000) (Thermofisher) and levels of DNA content allowed to discriminate erythroblasts and *Plasmodium*-infected reticulocytes.

- Electronic microscopy

Erythroblasts infected at 6 dpi were washed twice with 0.1M phosphate buffer, pH 7.2 and then fixed with 2% Paraformaldehyde (PFA), 2% glutaraldehyde, 1 mM calcium chloride in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2 for 10 minutes at room temperature. Further, the fixed cells were embedded in 4% low melting agarose and either stored at 4°C until further use or processed immediately by washing 5 times with 0.2M cacodylate buffer, pH 7.4 and fixed with 2% Osmium tetroxide for 1 hour and washed 5 times with water, followed by fixation with 5% uranyl acetate for 1 hour and washed 5 times with water. Next, the cells were dehydrated with 50%, 75%, 90%, 95% and absolute ethanol and saturated with a mixture of epoxy resin and ethanol (50:50) overnight followed by embedding the cells with epoxy resin in gelatin capsules at 60°C for 48 hours. The resin blocks were further processed with ultramicrotome to cut the 500 nm semithin sections and stained with toluidine blue to access the quality of samples and also to locate the area of interest. The selected region of interest is further cut into 70 nm ultrathin sections and collected on

copper grids and treated with lead citrate for 5 minutes and taken for electron microscopy for imaging on the microscope Hitachi Transmission Electron Microscopy HT7700.

EVs were incubated on Formvar® coated grids for 2 minutes and then with uranyl acetate 1% for 2 minutes. EVs were directly observed with a JEOL 1011 transmission electron microscope. Acquisitions were performed with a GATAN Orius 1000 camera. Quantification of EVs size was performed with ImageJ software.

- Fluorescent microscopy

Infected-erythroblasts were fixed during 10 minutes with a solution of 1X PBS/4% PFA. Then, cells were stained with Hoechst 33342 (Thermofisher) (1/20000) and PKH26 (Sigma) according to manufacturer's instructions, PKH26 is a red fluorescent probe that label lipid membranes. Cells were permeabilized if needed in a solution of 0.1% Triton in PBS1X 10 min at room temperature. For immunofluorescence, cells were pre-incubated 2 hours in 1X PBS/2% Bovine Serum Albumin (BSA) and incubated overnight with a mouse monoclonal antibody directed against Glycophorin A (Santa Cruz) (1/500) and with rabbit antibody raised again the Pf11-1 protein (1/2000) (Scherf et al., 1992a). Then, cells were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (1/2000) and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse antibody (1/2000) (Thermofisher) and Hoechst 33342 (1/20000) for 1 hour at room temperature.
All samples were observed at X100 magnification using a Leica DMi8 microscope.

- Gamete egress assay

Pfs16-GFP gametocytes were allowed to develop within erythroblasts during 10 days. At 10 dpi, infected erythroblast culture was pelleted and rapidly mixed in 50 µl human serum at room temperature for 30 minutes during which gametogenesis took place. Samples were then observed at X100 magnification using a Leica DMi8 microscope.

- Elaboration of the conditioned medium

To generate parasite-conditioned medium from erythrocytes culture (iE-CM) or erythroblasts culture (iEb-CM), cultures between 5 to 10 % parasitemia (or 0.5 %, 2% and 20% if specified) were cultivated during 24 hours at 5% hematocrit with erythroblasts culture medium adapted to parasites: IMDM containing 15% BIT 9500, EPO (4U/ml), hypoxanthine (10 mM) and heat-inactivated human serum (10%). After incubation, the

conditioned medium was centrifuged 15min at 600g, 1600g and 3600g to eliminate cells from the supernatant. Conditioned medium was filtered at 0.8µM and stored à 4°C.

- Purification of extracellular vesicles (EVs)

Protocol for EVs purification was adapted from (Mbagwu et al., 2017). Briefly, a parasite culture between 5 to 10 % parasitemia was cultivated overnight in complete parasite medium with human serum depleted in EVs (HS -EVs). To prepare HS -EVs, human serum was ultracentrifuged 2 hours at 100000g and the supernatant was filtered at 0.1 µM. The supernatant of the parasite culture was centrifuged 15min at 600g, 1600g and 3600g and ultracentrifuged 1 hour at 100000g. After ultracentrifugation, the supernatant was filtered at 0.1 µM, leading to iE-CM depleted in EVs (iE-CM -EV). The pellet was washed with PBS1X and ultracentrifuged 1 hour at 100000g. EVs in the pellet were carefully resuspended in PBS1X and layered on the top 60% sucrose solution and centrifuged for 1 h at 100000g with low acceleration and low brake at 4°C. EVs were collected at the interphase on top of the sucrose and washed in PBS1X. EVs amount was determined by protein content using a Pierce BCA protein assay kit (Thermofisher).
Purified EVs and conditioned medium were labeled with PC7-conjugated anti-GPA (1/10) (Beckman Coulter) or with the isotypes-PC7 conjugated monoclonal antibody (1/10) (Beckman Coulter). EVs were analyzed with MoFlo Astrios (Beckman Coulter, Brea, CA) equipped with a PhotoMulTiplicator (PMT)-Forward SCatter (FSC) at CYBIO core facility (Cochin Institute, Paris). Flow cytometer performance was assessed before cell analyzing experiments. Polystyrene beads called Megamix (BioCytex) of known dimensions (100 nm, 300, 500 nm and 900 nm in diameter) were used to standardize PMT-FSC parameters and to define the total EV gate. Side SCatter (SSC) signals were acquired on both 488 and 561 nm lasers. Same time speed of acquisition were used in all cases to compare samples. Total EVs were determined and count on the basis of size (between 100 and 600 nm) and the number and percentage of GPA positive particles. Flow cytometry data were analyzed with FlowJo software (vX, Ashland, OR).

- Determination of the oxidative stress

Two days after erythroblast incubation with EV, iE-CM or iE-CM -EV, erythroblasts were incubated with dihydroethidium (DHE) (2mM) (Sigma) during 30 min at 37 °C, 5% CO2.

Percentage of oxidized cells were determined by flow cytometry using a BD Accuri C6 cytometer.

Quantification and statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7. To compare 2 conditions, statistical significance was determined by an unpaired T-Test. To compare more than 2 conditions, statistical significance was determined by one-way ANOVA test. Sidak corrections for multiple comparisons were applied when different pairs of conditions were compared together. Dunnett corrections for multiple comparisons were applied when the means of each conditions were compared to the mean of the control condition.

Data and code availability

This study did not generate/analyze datasets/code.

REFERENCES

Aguilar, R., Magallon-Tejada, A., Achtman, A.H., Moraleda, C., Joice, R., Cisteró, P., Li Wai Suen, C.S.N., Nhabomba, A., Macete, E., Mueller, I., et al. (2014). Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. Blood 123, 959–966.

Aingaran, M., Zhang, R., Law, S.K., Peng, Z., Undisz, A., Meyer, E., Diez-Silva, M., Burke, T.A., Spielmann, T., Lim, C.T., et al. (2012). Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Cell. Microbiol. 14, 983–993.

Bancells, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., Kafsack, B.F.C., and Cortés, A. (2019). Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite Plasmodium falciparum. Nat. Microbiol. 4, 144–154.

Bei, A.K., Brugnara, C., and Duraisingh, M.T. (2010). In vitro genetic analysis of an erythrocyte determinant of malaria infection. J. Infect. Dis. 202, 1722–1727.

Bessis, M. (1958). L'ilot erythroblastique. Unite functionelle de la moelle osseuse. Rev Hematol 13:8–11.

Boehm, D., Healy, L., Ring, S., and Bell, A. (2018). Inhibition of ex vivo erythropoiesis by secreted and haemozoin-associated Plasmodium falciparum products. Parasitology 145, 1865–1875.

Bouyer, G., Barbieri, D., Dupuy, F., Marteau, A., Abdoulaye, S., N'Dri, M.-E., Neveu, G., Bedault, L., Roman, D., Houzé, S., et al. (Submitted). Activation of erythrocyte permeability enhances drug uptake by malaria sexual parasites.

Chasis, J.A., and Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood 112, 470–478.

Chillemi, R., Zappacosta, B., Simporè, J., Persichilli, S., Musumeci, M., and Musumeci, S. (2004). Hyperhomocysteinemia in acute Plasmodium falciparum malaria: an effect of host-parasite interaction. Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem. 348, 113–120.

Dantzler, K.W., Ma, S., Ngotho, P., Stone, W.J.R., Tao, D., Rijpma, S., De Niz, M., Nilsson Bark, S.K., Jore, M.M., Raaijmakers, T.K., et al. (2019). Naturally acquired immunity against immature Plasmodium falciparum gametocytes. Sci. Transl. Med. 11.

Dearnley, M.K., Yeoman, J.A., Hanssen, E., Kenny, S., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Tilley, L., and Dixon, M.W.A. (2012). Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of Plasmodium falciparum gametocytes. J. Cell Sci. 125, 2053–2063.

Egan, E.S., Jiang, R.H.Y., Moechtar, M.A., Barteneva, N.S., Weekes, M.P., Nobre, L.V., Gygi, S.P., Paulo, J.A., Frantzreb, C., Tani, Y., et al. (2015). Malaria. A forward genetic screen identifies erythrocyte CD55 as essential for Plasmodium falciparum invasion. Science 348, 711–714.

Farfour, E., Charlotte, F., Settegrana, C., Miyara, M., and Buffet, P. (2012). The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for Plasmodium falciparum gametocyte maturation? Malar. J. 11, 285.

Fivelman, Q.L., McRobert, L., Sharp, S., Taylor, C.J., Saeed, M., Swales, C.A., Sutherland, C.J., and Baker, D.A. (2007). Improved synchronous production of Plasmodium falciparum gametocytes in vitro. Mol. Biochem. Parasitol. 154, 119–123.

Gautier, E.-F., Ducamp, S., Leduc, M., Salnot, V., Guillonneau, F., Dussiot, M., Hale, J., Giarratana, M.-C., Raimbault, A., Douay, L., et al. (2016). Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. Cell Rep. 16, 1470–1484.

Ghorbal, M., Gorman, M., Macpherson, C.R., Martins, R.M., Scherf, A., and Lopez-Rubio, J.-J. (2014). Genome editing in the human malaria parasite Plasmodium falciparum using the CRISPR-Cas9 system. Nat. Biotechnol. 32, 819–821.

Hawking, F., Wilson, M.E., and Gammage, K. (1971). Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of Plasmodium falciparum. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 549–559.

Joice, R., Nilsson, S.K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K.B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K.C., et al. (2014). Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. Sci. Transl. Med. 6, 244re5.

Kanjee, U., Grüring, C., Chaand, M., Lin, K.-M., Egan, E., Manzo, J., Jones, P.L., Yu, T., Barker, R., Weekes, M.P., et al. (2017). CRISPR/Cas9 knockouts reveal genetic interaction between strain-transcendent erythrocyte determinants of Plasmodium falciparum invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, E9356–E9365.

Knuepfer, E., Napiorkowska, M., van Ooij, C., and Holder, A.A. (2017). Generating conditional gene knockouts in Plasmodium - a toolkit to produce stable DiCre recombinase-expressing parasite lines using CRISPR/Cas9. Sci. Rep. 7, 3881.

Lee, R.S., Waters, A.P., and Brewer, J.M. (2018). A cryptic cycle in haematopoietic niches promotes initiation of malaria transmission and evasion of chemotherapy. Nat. Commun. 9.

Lucchi, N.W., Sarr, D., Owino, S.O., Mwalimu, S.M., Peterson, D.S., and Moore, J.M. (2011). Natural hemozoin stimulates syncytiotrophoblast to secrete chemokines and recruit peripheral blood mononuclear cells. Placenta 32, 579–585.

Malleret, B., Li, A., Zhang, R., Tan, K.S.W., Suwanarusk, R., Claser, C., Cho, J.S., Koh, E.G.L., Chu, C.S., Pukrittayakamee, S., et al. (2015). Plasmodium vivax: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. Blood 125, 1314–1324.

Mantel, P.-Y., Hjelmqvist, D., Walch, M., Kharoubi-Hess, S., Nilsson, S., Ravel, D., Ribeiro, M., Grüring, C., Ma, S., Padmanabhan, P., et al. (2016). Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. Nat. Commun. 7, 12727.

Mbagwu, S., Walch, M., Filgueira, L., and Mantel, P.-Y. (2017). Production and Characterization of Extracellular Vesicles in Malaria. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 1660, 377–388.

Messina, V., Valtieri, M., Rubio, M., Falchi, M., Mancini, F., Mayor, A., Alano, P., and Silvestrini, F. (2018). Gametocytes of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum

Interact With and Stimulate Bone Marrow Mesenchymal Cells to Secrete Angiogenetic Factors. Front. Cell. Infect. Microbiol. 8, 50.

Neveu, G., Dupuy, F., Ladli, M., Barbieri, D., Naissant, B., Richard, C., Martins, R.M., Lopez-Rubio, J.-J., Bachmann, A., Verdier, F., et al. (2018). Plasmodium falciparum gametocyte-infected erythrocytes do not adhere to human primary erythroblasts. Sci. Rep. 8, 17886.

Peatey, C.L., Watson, J.A., Trenholme, K.R., Brown, C.L., Nielson, L., Guenther, M., Timmins, N., Watson, G.S., and Gardiner, D.L. (2013). Enhanced gametocyte formation in erythrocyte progenitor cells: a site-specific adaptation by Plasmodium falciparum. J. Infect. Dis. 208, 1170–1174.

Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A.D., and Meuwissen, J.H. (1981). Chloroquine sensitivity of isolates of Plasmodium falciparum adapted to in vitro culture. Trop. Geogr. Med. 33, 50–54.

Scherf, A., Petersen, C., Carter, R., Alano, P., Nelson, R., Aikawa, M., Mattei, D., da Silva, L.P., and Leech, J. (1992a). Characterization of a Plasmodium falciparium mutant that has deleted the majority of the gametocyte-specific Pf11-1 locus. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87 Suppl 3, 91–94.

Scherf, A., Carter, R., Petersen, C., Alano, P., Nelson, R., Aikawa, M., Mattei, D., Pereira da Silva, L., and Leech, J. (1992b). Gene inactivation of Pf11-1 of Plasmodium falciparum by chromosome breakage and healing: identification of a gametocyte-specific protein with a potential role in gametogenesis. EMBO J. 11, 2293–2301.

Silva, L.S., Pinheiro, A.S., Teixeira, D.E., Silva-Aguiar, R.P., Peruchetti, D.B., Scharfstein, J., Caruso-Neves, C., and Pinheiro, A.A.S. (2019). Kinins Released by Erythrocytic Stages of Plasmodium falciparum Enhance Adhesion of Infected Erythrocytes to Endothelial Cells and Increase Blood Brain Barrier Permeability via Activation of Bradykinin Receptors. Front. Med. 6, 75.

Silvestrini, F., Tibúrcio, M., Bertuccini, L., and Alano, P. (2012). Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of Plasmodium falciparum on human endothelial cells are tissue independent. PloS One 7, e31567.

Sinden, R.E. (1982). Gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in vitro: an electron microscopic study. Parasitology 84, 1–11.

Tamez, P.A., Liu, H., Fernandez-Pol, S., Haldar, K., and Wickrema, A. (2009). Stage-specific susceptibility of human erythroblasts to Plasmodium falciparum malaria infection. Blood 114, 3652–3655.

Tamez, P.A., Liu, H., Wickrema, A., and Haldar, K. (2011). P. falciparum modulates erythroblast cell gene expression in signaling and erythrocyte production pathways. PloS One 6, e19307.

Tibúrcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P.A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P.H., et al. (2012). A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. Blood 119, e172–e180.

Tibúrcio, M., Silvestrini, F., Bertuccini, L., Sander, A.F., Turner, L., Lavstsen, T., and Alano, P. (2013). Early gametocytes of the malaria parasite Plasmodium falciparum specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. Cell. Microbiol. 15, 647–659.

Trager, W., and Jensen, J.B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673–675.

Trager, W., Gill, G.S., Lawrence, C., and Nagel, R.L. (1999). Plasmodium falciparum: enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. Exp. Parasitol. 91, 115–118.

Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Le Scanf, C., Igonet, S., Petres, S., Juillerat, A., Badaut, C., Nato, F., Schneider, A., Lavergne, A., et al. (2008). An in vivo and in vitro model of Plasmodium falciparum rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. Infect. Immun. 76, 5565–5580.

Vyas, A., Kim, S.-K., Giacomini, N., Boothroyd, J.C., and Sapolsky, R.M. (2007). Behavioral changes induced by Toxoplasma infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 6442–6447.

White, N.J. (2018). Anaemia and malaria. Malar. J. 17, 371.

Wilson, N.O., Huang, M.-B., Anderson, W., Bond, V., Powell, M., Thompson, W.E., Armah, H.B., Adjei, A.A., Gyasi, R., Tettey, Y., et al. (2008). Soluble factors from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce apoptosis in human brain vascular endothelial and neuroglia cells. Mol. Biochem. Parasitol. 162, 172–176.

Yap, G.S., and Stevenson, M.M. (1994). Inhibition of in vitro erythropoiesis by soluble mediators in Plasmodium chabaudi AS malaria: lack of a major role for interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon. Infect. Immun. 62, 357–362.

Ye, W., Chew, M., Hou, J., Lai, F., Leopold, S.J., Loo, H.L., Ghose, A., Dutta, A.K., Chen, Q., Ooi, E.E., et al. (2018). Microvesicles from malaria-infected red blood cells activate natural killer cells via MDA5 pathway. PLoS Pathog. 14, e1007298.

Zhao, B., Mei, Y., Yang, J., and Ji, P. (2016). Erythropoietin-regulated oxidative stress negatively affects enucleation during terminal erythropoiesis. Exp. Hematol. 44, 975–981.

FIGURES

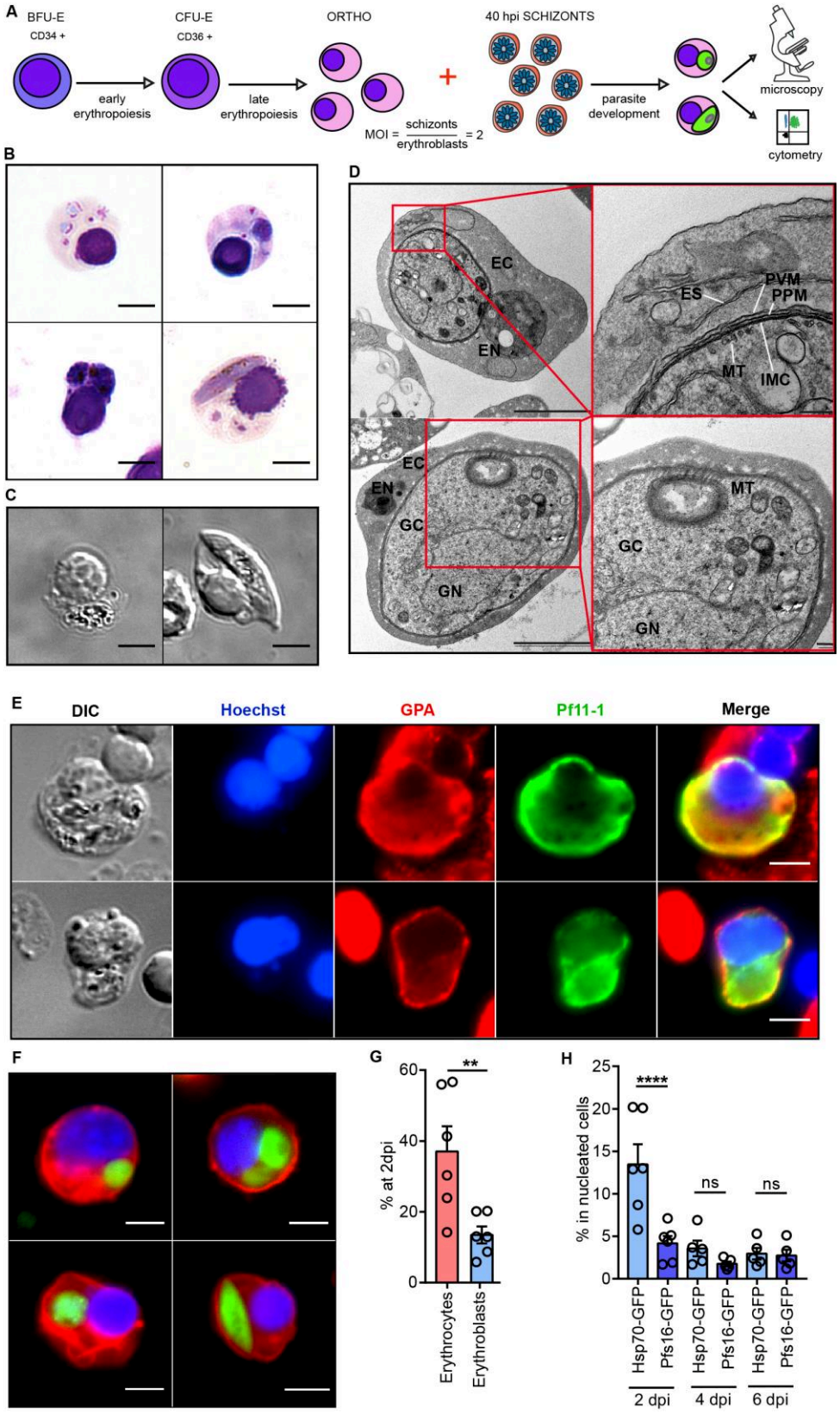

A
BFU-E
CD34 +
early erythropoiesis
CFU-E
CD36 +
late erythropoiesis
ORTHO
MOI = schizonts / erythroblasts = 2
40 hpi SCHIZONTS
parasite development
microscopy
cytometry
B
C
D
EC
EN
ES
PVM
PPM
MT
IMC
GC
GN
E
DIC
Hoechst
GPA
Pf11-1
Merge
F
G
% at 2dpi
Erythrocytes
Erythroblasts
H
% in nucleated cells
Hsp70-GFP
Pfs16-GFP
2 dpi
4 dpi
6 dpi
ns

Figure 1. Immature gametocytes properly develop within human primary erythroblasts.

(A) Diagram illustrating the erythroblast infection protocol. Burst Forming Unit-Erythroid cells (BFU-E) expressing the cluster of differentiation 34 (CD34) were cultivated to generate Colony Forming Unit-Erythroid cells (CFU-E) expressing the cluster of differentiation 36 (CD36), then CFU-E were allowed to differentiate into orthochromatic erythroblasts (ORTHO). Synchronized GFP-expressing schizonts at 40 hours post invasion (hpi) were added to erythroblasts at a multiplicity of infection (MOI) of 2. After several days of culture, infected erythroblasts were analyzed by fluorescent microscopy and flow cytometry. (B) Erythroblast infection was observed by May-Grünwald Giemsa staining at 1 dpi (left, upper panel), 2 dpi (right, upper panel and left, middle panel), and 6 dpi (right, middle panel). Gametocytes within erythroblasts at 6 dpi were observed by differential interference contrast microscopy (lower panels). Bars represent 5 µm. (C) Transmission electronic microscopy shows that immature gametocytes within infected erythroblasts present typical sexual structures as the microtubular network (MT) and the inner membrane complex (IMC). (EN: erythroblast nucleus, EC: erythroblast cytosol, GC: gametocyte cytosol, GN: gametocyte nucleus, ES: exomembrane system). Bars: 1µm (left panels) and 200nm (right panels). (D) Immunofluorescence analysis (IFA) of paraformaldehyde-fixed gametocyte-infected erythroblast at 6 dpi stained with anti-Pf11-1 antibodies (green) and with anti-glycophorine A (GPA) labelling the erythroblast membrane (red). (E) Infection with the Hsp70-GFP line (upper panels) and with the Pfs16-GFP line (lower panels) were observed by fluorescent microscopy. Erythroblast membrane is stained with PKH-26 (red). (D-E) DNA is stained with Hoechst 33342 (blue). Bars represent 5 µm. (F) Infection of erythrocytes or erythroblasts with the Hsp70-GFP and Pfs16-GFP lines is evaluated by flow cytometry at 2dpi. (G) Infection of erythroblasts with the Hsp70-GFP and Pfs16-GFP lines is evaluated by flow cytometry at 2 dpi, 4 dpi and 6dpi. Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the standard error of the mean (SEM). **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, ns: non-significant difference.

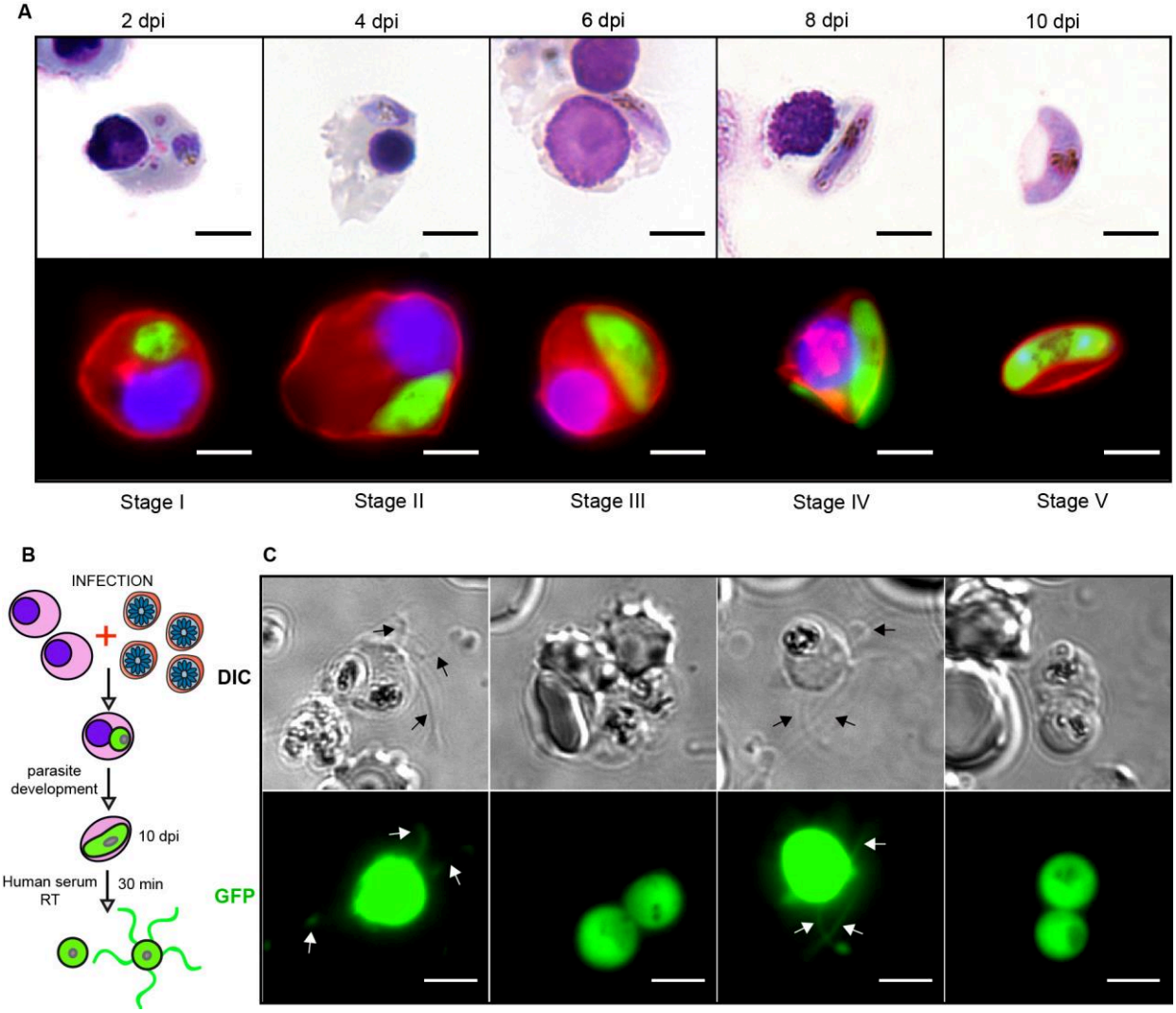

A
2 dpi
4 dpi
6 dpi
8 dpi
10 dpi
Stage I
Stage II
Stage III
Stage IV
Stage V
B
INFECTION
parasite development
10 dpi
Human serum RT
30 min
C
DIC
GFP

Figure 2. Infection of erythroblasts allows the complete gametocytogenesis

(A) Gametocyte maturation after erythroblasts infection with the Pfs16-GFP line was observed by light microscopy after May-Grünwald Giemsa staining (upper panel) and by fluorescent microscopy (lower panel). Erythroblast membrane was stained with PKH-26 (red). DNA was stained with Hoechst 33342 (blue). Bars represent 5 µm. (B) Diagram illustrating the gamete activation protocol. After infection of erythroblasts with Pfs16-GFP schizonts, gametocytes were allowed to differentiate for 10 days within erythroid precursors. Mature gametocytes were activated in human serum at room temperature (RT) during 30 min, leading to gamete activation. (C) Fluorescence microscopy of activated gametes from a culture of infected erythroblasts with the Pfs16-GFP line. Arrows indicate flagella. Bars represent 5 µm.

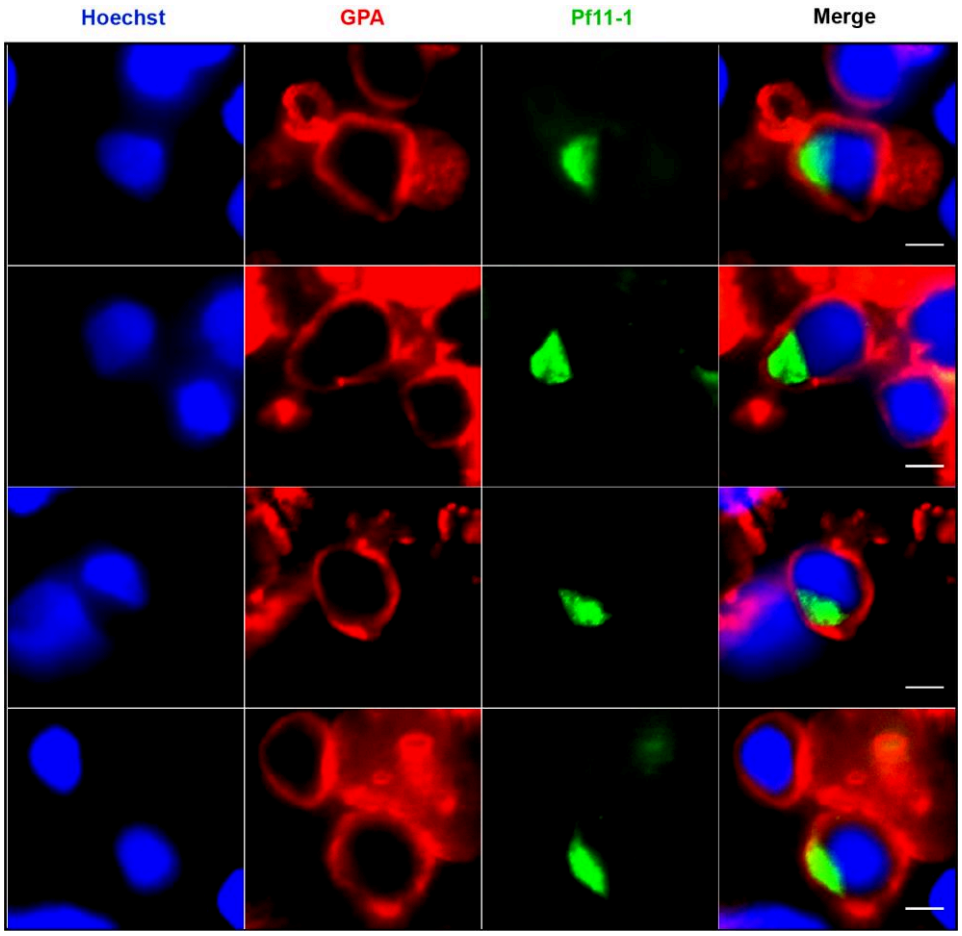

Hoechst
GPA
Pf11-1
Merge

Figure 3. In vivo imaging of gametocytes within erythroblasts.

IFA of gametocyte-infected erythroblasts on a methanol-fixed bone marrow smear from a malaria-infected patient. Gametocytes were stained with anti-Pf11-1 antibody (green) and erythroblasts with anti-glycophorine A (GPA) labelling the erythroid membrane (red). DNA is stained with Hoechst 33342 (blue). Bars represent 5 µm.

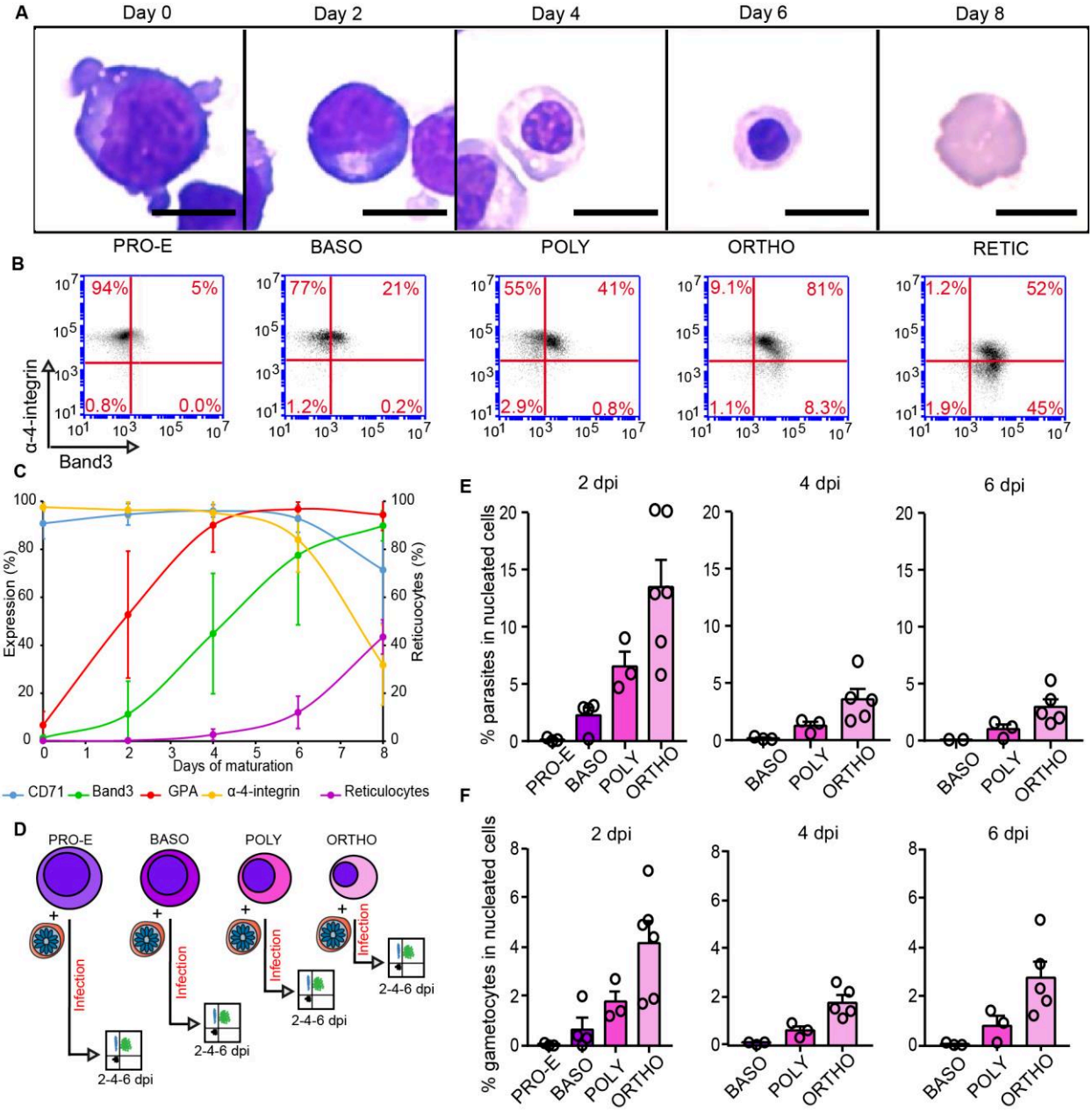

A
Day 0
Day 2
Day 4
Day 6
Day 8
PRO-E
BASO
POLY
ORTHO
RETIC
B
94%
5%
0.8%
0.0%
77%
21%
1.2%
0.2%
55%
41%
2.9%
0.8%
9.1%
81%
1.1%
8.3%
1.2%
52%
1.9%
45%
α-4-integrin
Band3
C
Expression (%)
Reticulocytes (%)
Days of maturation
CD71
Band3
GPA
α-4-integrin
Reticulocytes
D
PRO-E
BASO
POLY
ORTHO
Infection
2-4-6 dpi
E
2 dpi
4 dpi
6 dpi
% parasites in nucleated cells
F
% gametocytes in nucleated cells

Figure 4. Intra-erythroblastic gametocyte development occurs from the polychromatic stage

(A) Morphological analysis of developing erythroblasts was performed by May-Grünwald Giemsa staining; a representative experiment is shown at pro-erythroblasts, basophilic, polychromatic, orthochromatic and reticulocyte stages. Bars represent 5 µm. (B) Representative experiment of erythroblasts differentiation monitored by flow cytometry at pro-erythroblast, basophilic, polychromatic, orthochromatic and reticulocyte stages by cell surface expression of Band3 and α-4-integrin. (C) Evolution of cell surface markers CD71, Band3, GPA and α-4-integrin and of reticulocyte rate measured by flow cytometry during terminal erythropoiesis. (D) Diagram illustrating the infection protocol of synchronized erythroblasts. Synchronized schizonts at 40 hpi were added to pro-erythroblasts, basophilic, polychromatic and orthochromatic erythroblasts at a MOI of 2. Infected erythroblasts were analyzed by flow cytometry at 2, 4 and 6 dpi. (E-F) Total parasitemia (E) and gametocytemia (F) in erythroblasts is evaluated by flow cytometry at 2 dpi, 4 dpi and 6 dpi after infection of erythroblasts from each stage with the Hsp70-GFP and Pfs16-GFP lines, respectively. Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: non-significant difference.

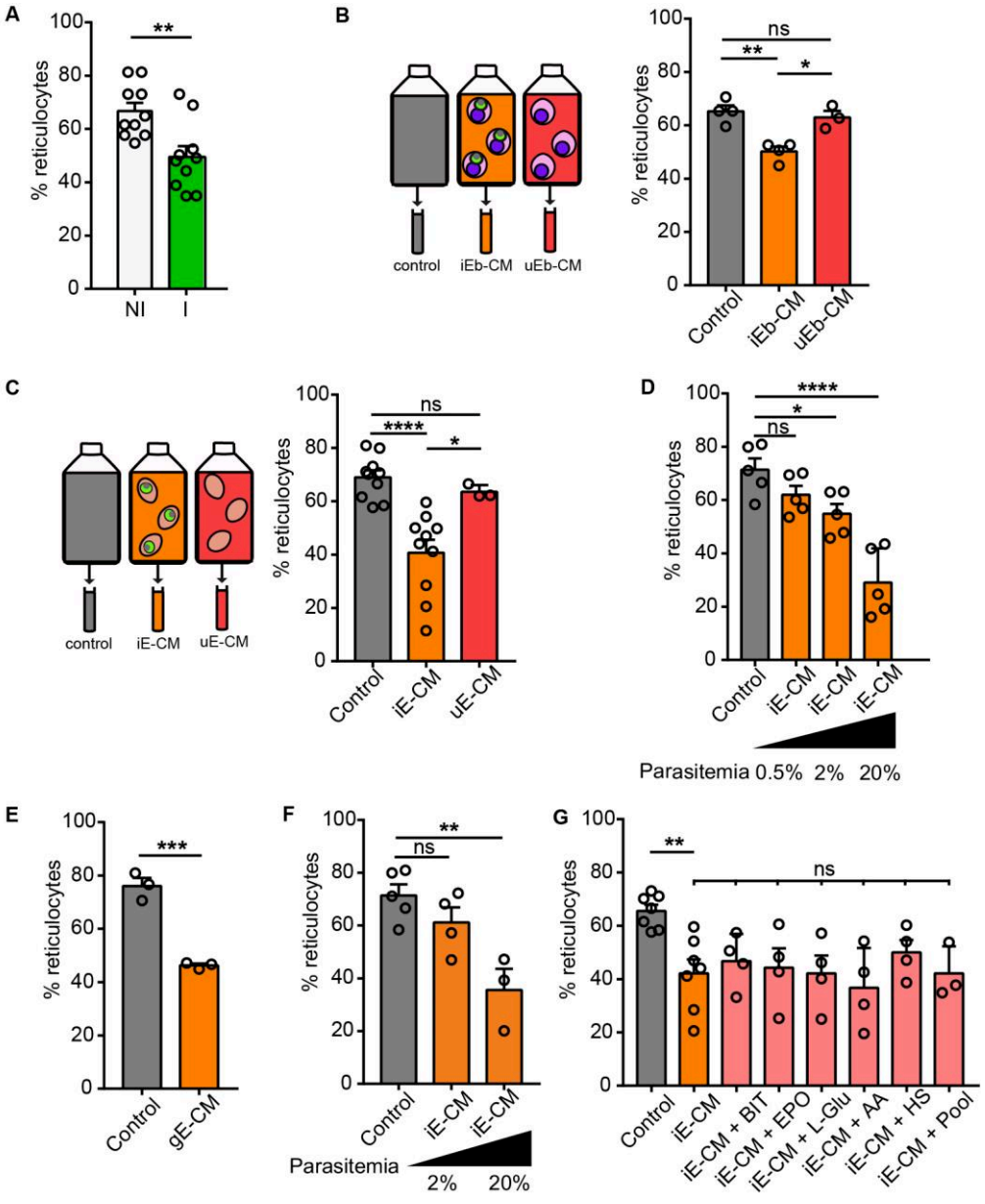

A
% reticulocytes
NI
I
B
control
iEb-CM
uEb-CM
Control
iEb-CM
uEb-CM
C
control
iE-CM
uE-CM
Control
iE-CM
uE-CM
D
Control
iE-CM
iE-CM
iE-CM
Parasitemia 0.5% 2% 20%
E
Control
gE-CM
F
Control
iE-CM
iE-CM
Parasitemia
2%
20%
G
Control
iE-CM
iE-CM + BIT
iE-CM + EPO
iE-CM + L-Glu
iE-CM + AA
iE-CM + HS
iE-CM + Pool

Figure 5. Erythroblast infection and parasite-conditioned medium induce a delay in erythroid maturation

(A) Percentage of reticulocytes in erythroblast culture, infected (I) or not (NI), is evaluated by flow cytometry at 8 dpi. (B and C) Percentage of reticulocytes in uninfected erythroblast culture at 8 days after addition of conditioned medium obtained with a culture of infected erythroblasts (iEb-CM, B), uninfected erythroblasts (uEb-CM, B), infected erythrocytes (iE-CM, C), uninfected erythrocytes (uE-CM, C), or control medium (Control). (D) Percentage of reticulocytes in erythroblast culture at 8 days after addition of iE-CM obtained with parasite cultures at 0.5%, 2% or 20% parasitaemia, or with control medium. (E) Percentage of reticulocytes in erythroblast culture at 8 days after addition of conditioned medium obtained with gametocytes-infected erythrocytes culture (gE-CM). (F) Percentage of reticulocytes in erythroblast culture at 8 days after addition of iE-CM obtained with parasite cultures of the gametocyte non-producing line VarO at 2% and 20% parasitaemia, or control medium. (G) Percentage of reticulocytes in erythroblasts at 8 days after addition of control medium, iE-CM or iE-CM supplemented with serum substitute (BIT), erythropoietin (EPO), L-glutamine (L-Glu), a pool of amino acids (AA), human serum (HS) or all of these components together (Pool). Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: non-significant difference.

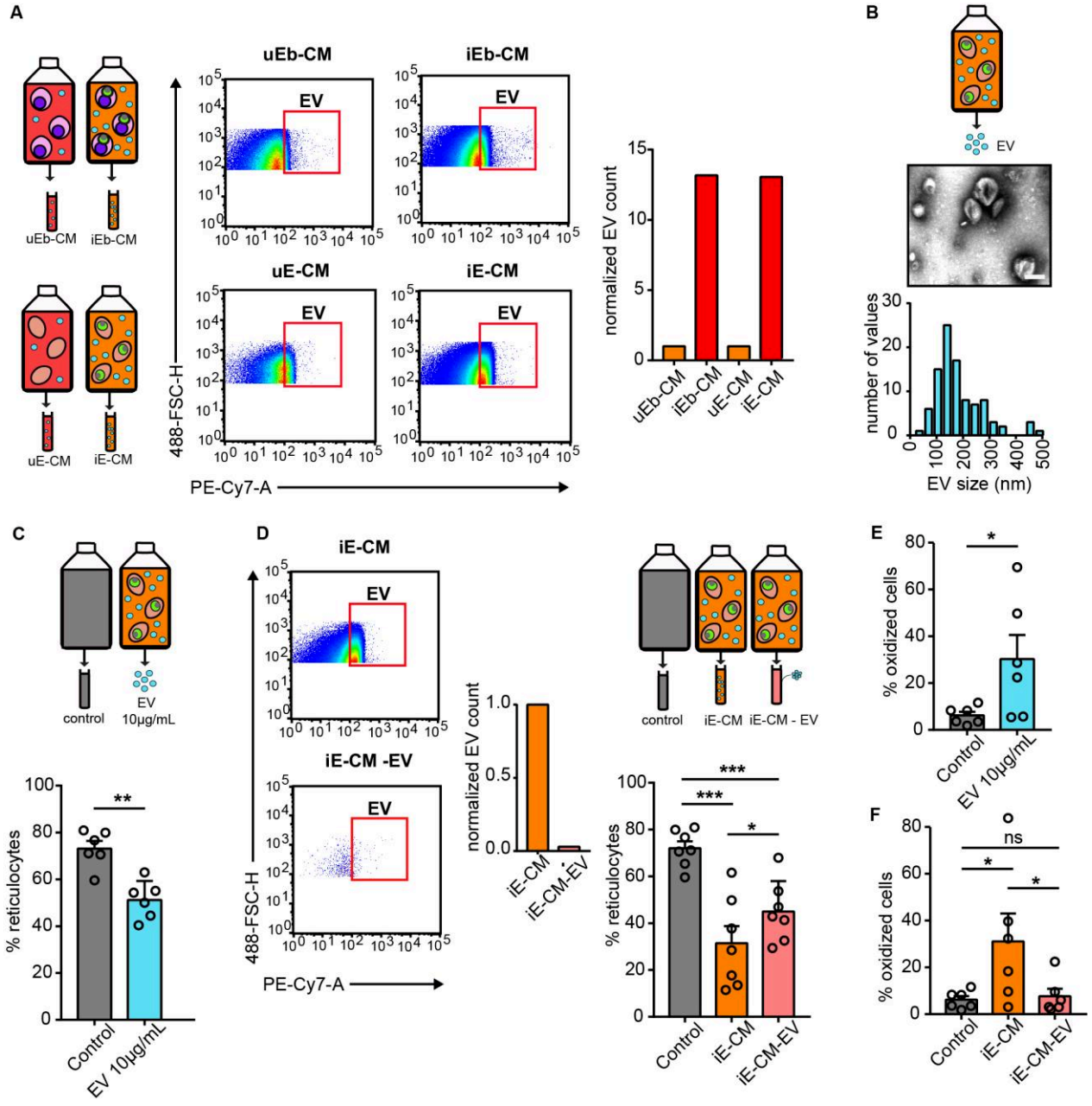

A
uEb-CM
iEb-CM
uE-CM
iE-CM
uEb-CM
iEb-CM
uE-CM
iE-CM
EV
488-FSC-H
PE-Cy7-A
normalized EV count
B
EV
number of values
EV size (nm)
C
control
EV 10µg/mL
% reticulocytes
Control
EV 10µg/mL
D
iE-CM
iE-CM -EV
EV
488-FSC-H
PE-Cy7-A
normalized EV count
iE-CM
iE-CM-EV
control
iE-CM
iE-CM - EV
% reticulocytes
Control
iE-CM
iE-CM-EV
E
% oxidized cells
Control
EV 10µg/mL
F
% oxidized cells
ns
Control
iE-CM
iE-CM-EV

Figure 6. Parasite-derived extracellular vesicles delay the erythroid maturation and induce oxidative stress

(A) EVs in conditioned medium obtained with a culture of infected erythroblasts (iEb-CM), uninfected erythroblasts (uEb-CM), infected erythrocytes (iE-CM) or uninfected erythrocytes (uE-CM) were observed (middle panel) and quantified (right panel) by flow cytometry with a GPA-PC7 labelling. EV counts in iEb-CM and iE-CM are normalized to uEb-CM and uE-CM, respectively. Gating strategy is in Figure S4. (B) EVs purified from a culture of infected erythrocytes were observed by electron microscopy with a negative staining. Bar represent 100 nm. The frequency distribution of EVs size is represented. (C) Percentage of reticulocytes in erythroblast culture at 8 days after addition of 10µg/mL EV or control medium (Control). (D) Upper panel: EVs in iE-CM or in iE-CM -EV were observed and quantified by flow cytometry with a GPA-PC7 labelling. Lower panel: Percentage of reticulocytes in erythroblast at 8 days after addition of iE-CM, iE-CM -EV or control medium (Control). (E) Percentage of oxidized erythroblasts is evaluated by flow cytometry with DHE staining 2 days after addition of 10µg/mL EV or control medium (Control). (F) Percentage of oxidized erythroblasts 2 days after adding iE-CM, iE-CM -EV or control medium (Control). Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. ***p<0.001, **p<0.01, * p < 0.05, ns: non-significant difference.

SUPPLEMENTAL FIGURES

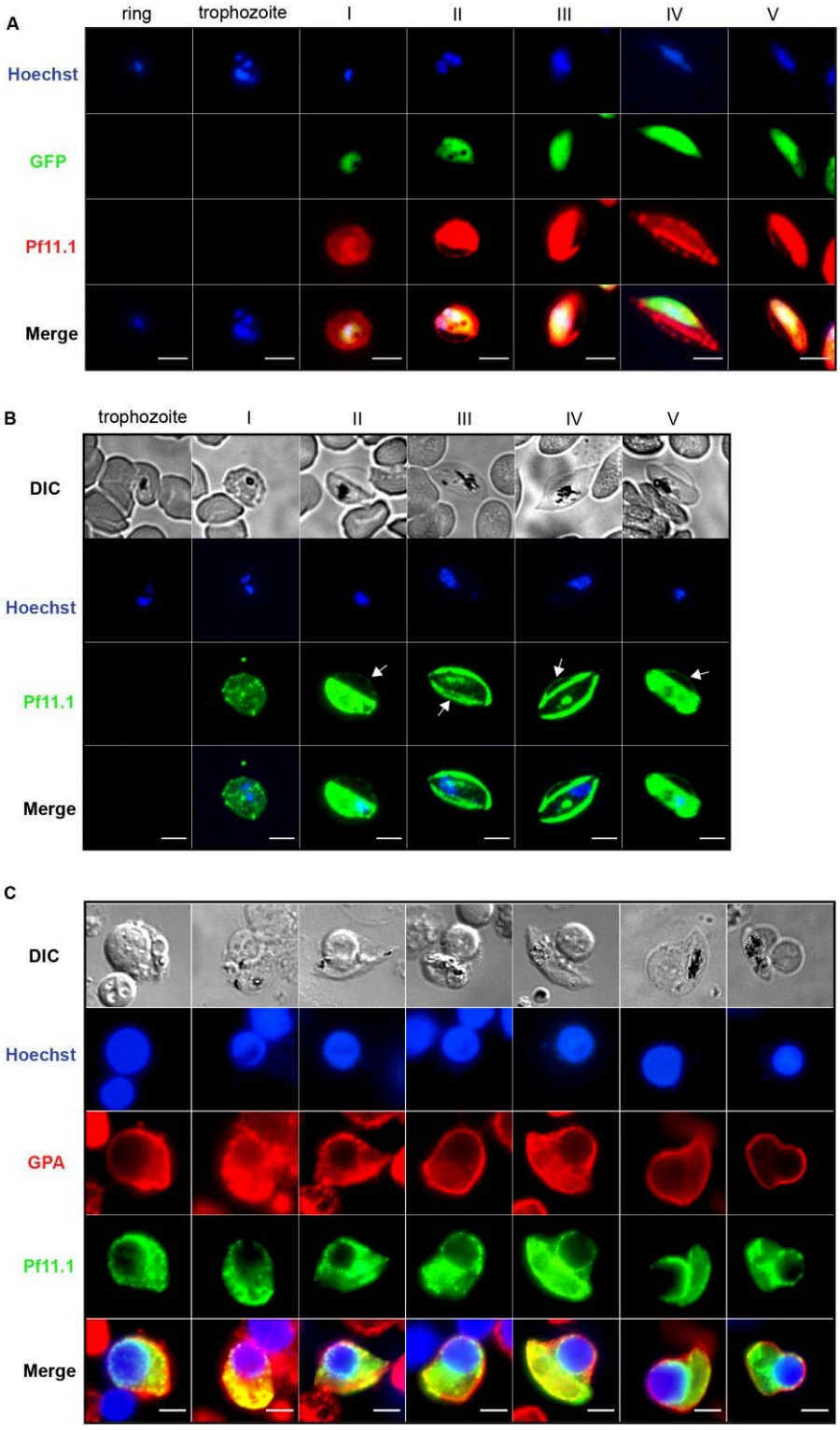


Figure S1. Related to Figure 1.

(A) IFA of the Pfs16-GFP line showing the expression of the gametocyte specific protein Pf11-1 (red) during gametocytogenesis. Pf11-1 is not expressed in asexual stages. (B) IFA of NF54 gametocytes from stage I to stage V showing the export of Pf11-1 (red) to the erythrocyte membrane (arrows). (C) IFA of infected erythroblasts at 6 dpi stained with anti-Pf11-1 antibodies (green) and with anti-glycophorine A (GPA) labelling the erythroblast membrane (red). DNA is stained with Hoechst 33342 (blue). Bars represent 5 µm.

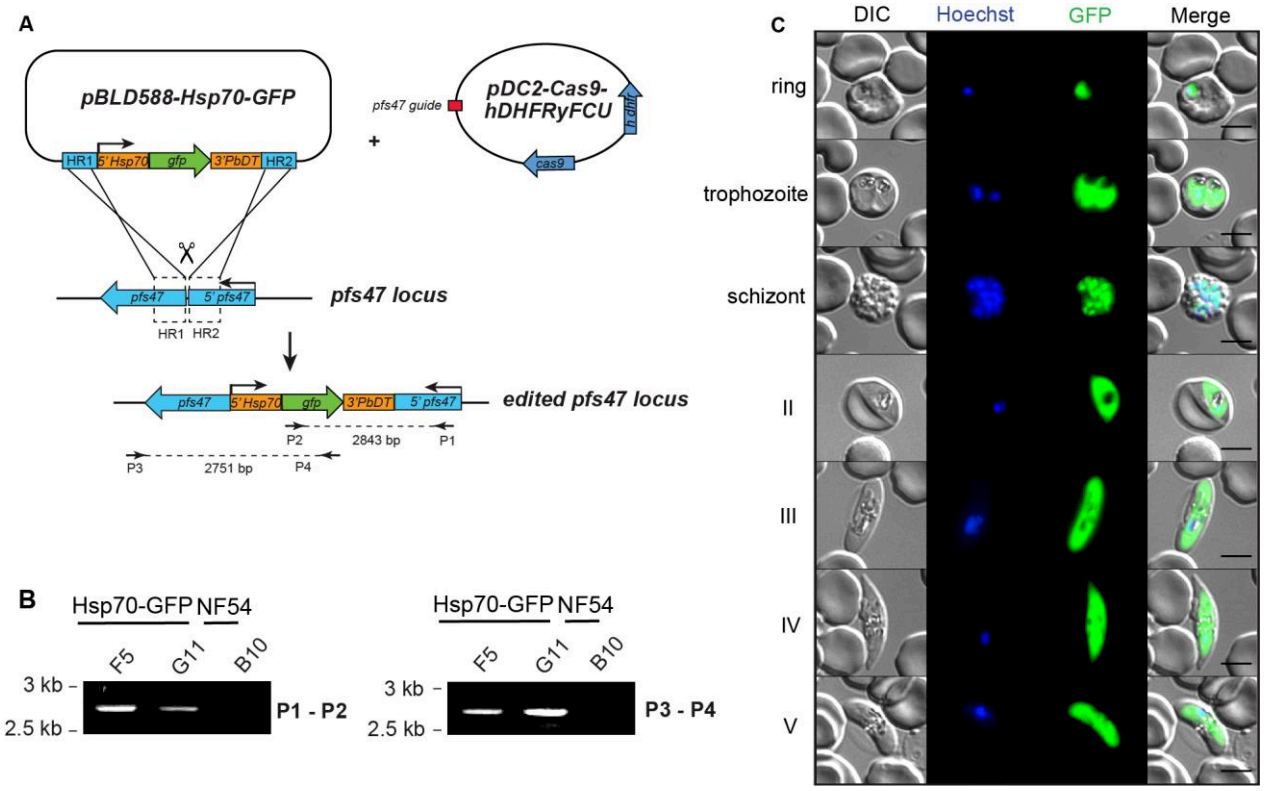

A
pBLD588-Hsp70-GFP
HR1
5' Hsp70
gfp
3'PbDT
HR2
pfs47 guide
+
pDC2-Cas9-hDHFRyFCU
cas9
pfs47 locus
pfs47
5' pfs47
HR1 HR2
edited pfs47 locus
P2
2843 bp
P1
P3
2751 bp
P4
B
Hsp70-GFP
NF54
F5
G11
B10
3 kb
2.5 kb
P1 - P2
P3 - P4
C
DIC
Hoechst
GFP
Merge
ring
trophozoite
schizont
II
III
IV
V

Figure S2. Related to Figure 1.

Generation of parasites expressing GFP under the control of the *hsp70* promoter using CRISPR-Cas9 technology. (A) Schematic (not to scale) of the GFP insertion into the *pfs47* locus. The scissors indicate the Cas9 cleavage site. Genomic DNA from NF54 parasites was used for the amplification of 5'*hsp70* with P5 and P6 primers. The *gfp* sequence was amplified from EGFP-Vimentin-7 plasmid (Addgene) with P2 and P4 primers. Generation of pBLD588-Hsp70-GFP was performed by a double digestion of the pBLD588 plasmid with SpeI and XhoI restriction enzymes. Both 5'*hsp70* and *gfp* fragments were then cloned in frame using the In-Fusion system (Ozyme). (B) PCR analysis of genomic DNA from F5 and G11 clones obtained by limiting dilution of the NF54-pfs47-Hsp70-GFP line. The NF54 clone B10 was used as control. Arrows indicate the position of primers used to confirm plasmid integration into the *pfs47* locus. P1: CCTAACACATTATGTGTATAACATTTTATGC, P2: AAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG, P3: GCGATATGTAATTCCATTACTGC, P4: CGTTATGTTACTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC, P5: TTTATAGTACACTAGTACAATATGAATTTATAGAGCAAATTTATATAG, P6: GCTCACCATAAGCTTGTTGAAGAAAGTATAAATAGAAAAATGG. (C) Fluorescence microscopy analysis of the clone F5 showing GFP in all asexual and sexual stages. DNA is stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bars: 5 µm.

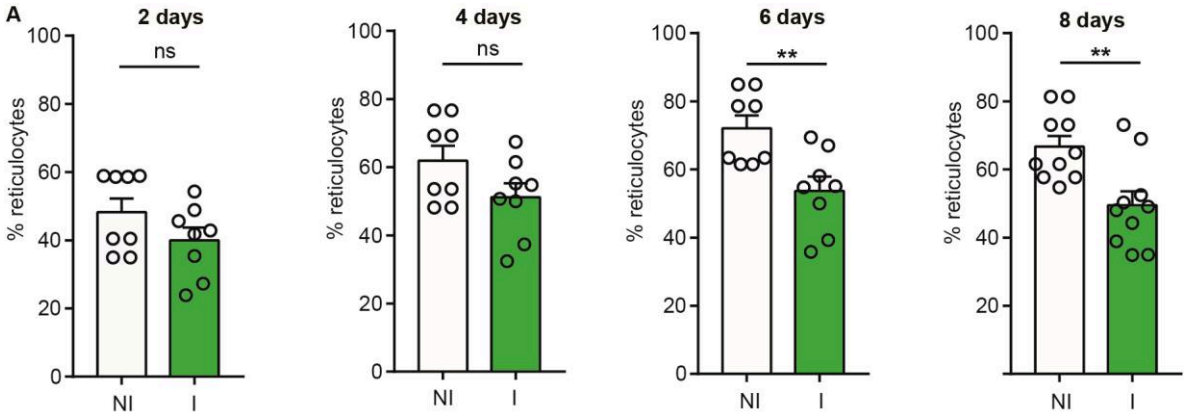


Figure S3. Related to Figure 4.

Percentage of reticulocytes in infected (I) or not infected (NI) erythroblast culture, is evaluated by flow cytometry 2 days, 4 days, 6 days and 8 days after the infection. Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. ** $p < 0.01$, ns: non-significant difference.

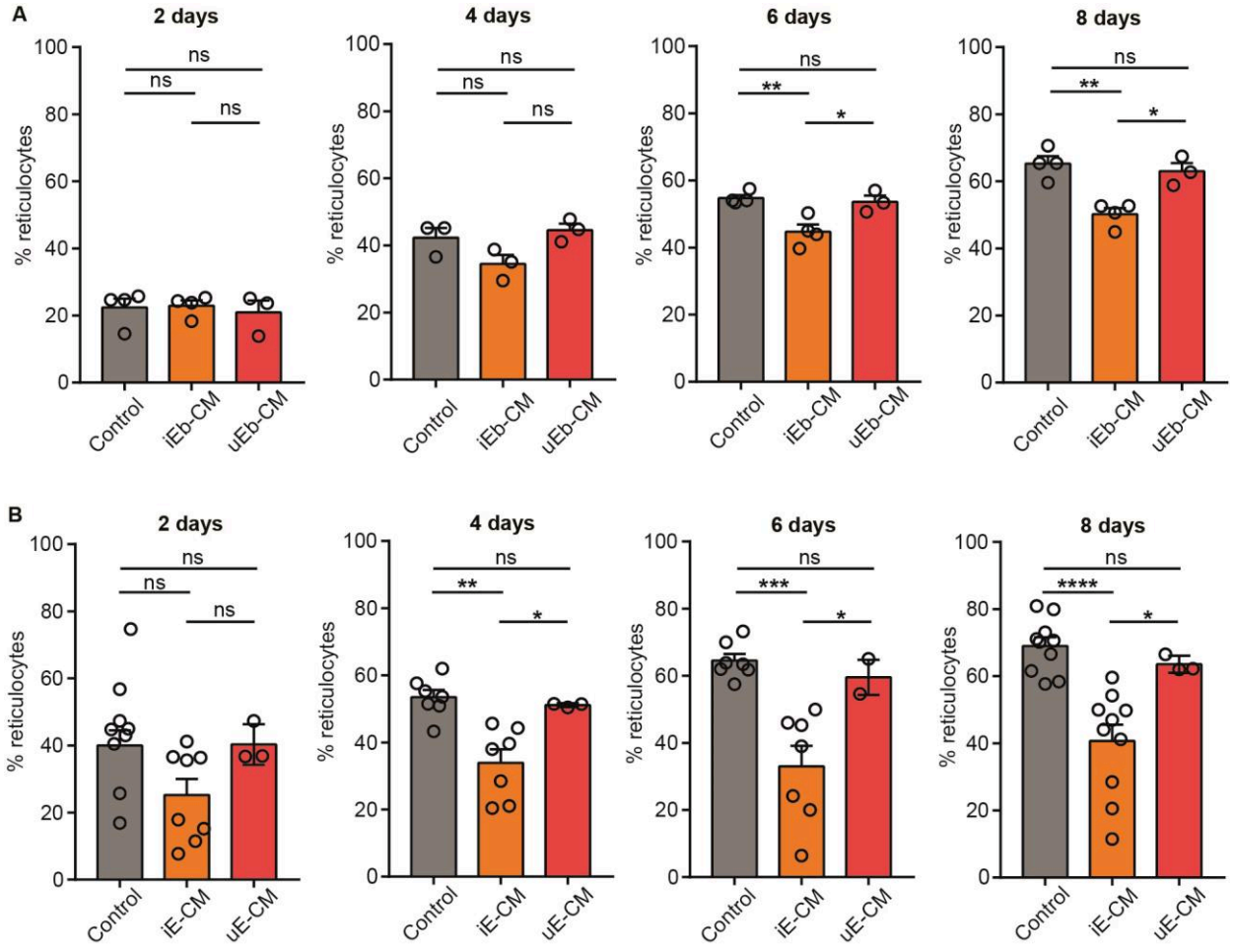


Figure S4. Related to Figure 4.

(A and B) Percentage of reticulocytes in erythroblast culture at 2 days, 4 days, 6 days and 8 days after addition of conditioned medium obtained with a culture of infected erythroblasts (iEb-CM, A), uninfected erythroblasts (uEb-CM, A), infected erythrocytes (iE-CM, B), uninfected erythrocytes (uE-CM, B), or control medium (Control). Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: non-significant difference.

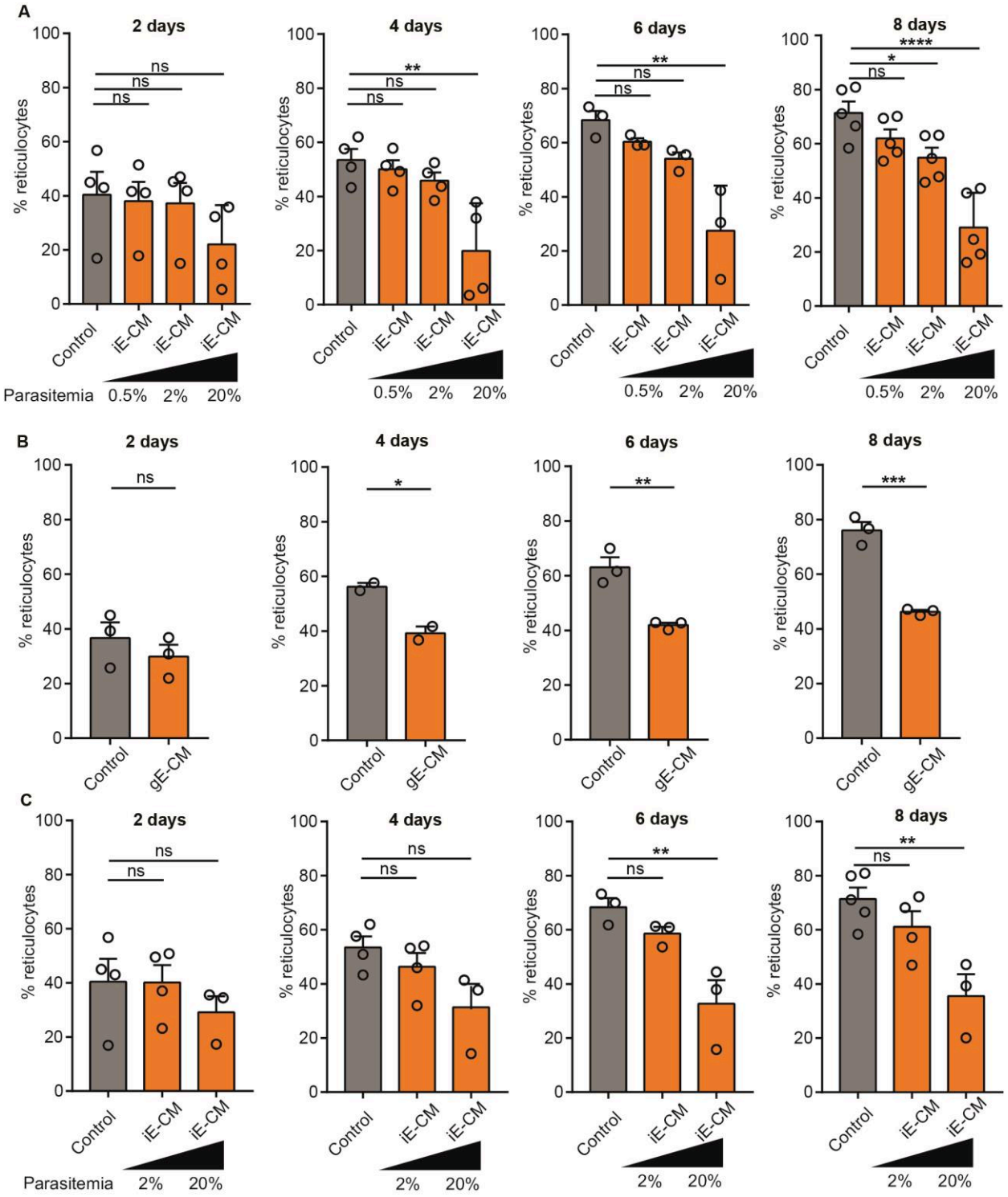

A
2 days
4 days
6 days
8 days
% reticulocytes
ns
**
****
*
Control
iE-CM
Parasitemia
0.5%
2%
20%
B
gE-CM
***
C

Figure S5. Related to Figure 5.

(A) Percentage of reticulocytes in erythroblast culture at 2 days, 4 days, 6 days and 8 days after addition of iE-CM obtained with parasite cultures at 0.5%, 2% and 20% parasitaemia, or control medium. (B) Percentage of reticulocytes in erythroblasts culture at 2 days, 4 days, 6 days and 8 days after addition of medium conditioned by a culture of erythrocytes infected by gametocytes (gE-CM) or control medium (control). (C) Percentage of reticulocytes in erythroblasts culture at 2 days, 4 days, 6 days and 8 days after addition of iE-CM obtained with parasite cultures at 0.5%, 2% and 20% parasitaemia of the gametocytes non-producing line VarO line, or control medium (control). Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: non-significant difference.

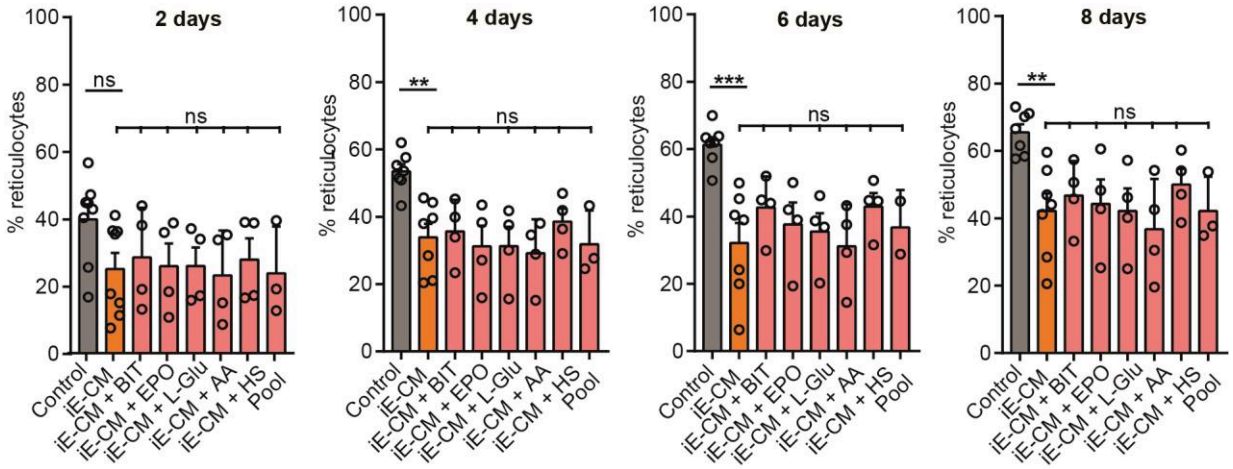


Figure S6. Related to Figure 5.

Percentage of reticulocytes in erythroblasts culture at 2days, 4 days and 8 days after addition of control medium, iE-CM or iE-CM supplemented with serum substitute (BIT), erythropoietin (EPO), L-glutamine (L-Glu), a pool of amino acids (AA), human serum (HS) or all of these components together (Pool). For each graphical, circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, ns: non-significant difference.

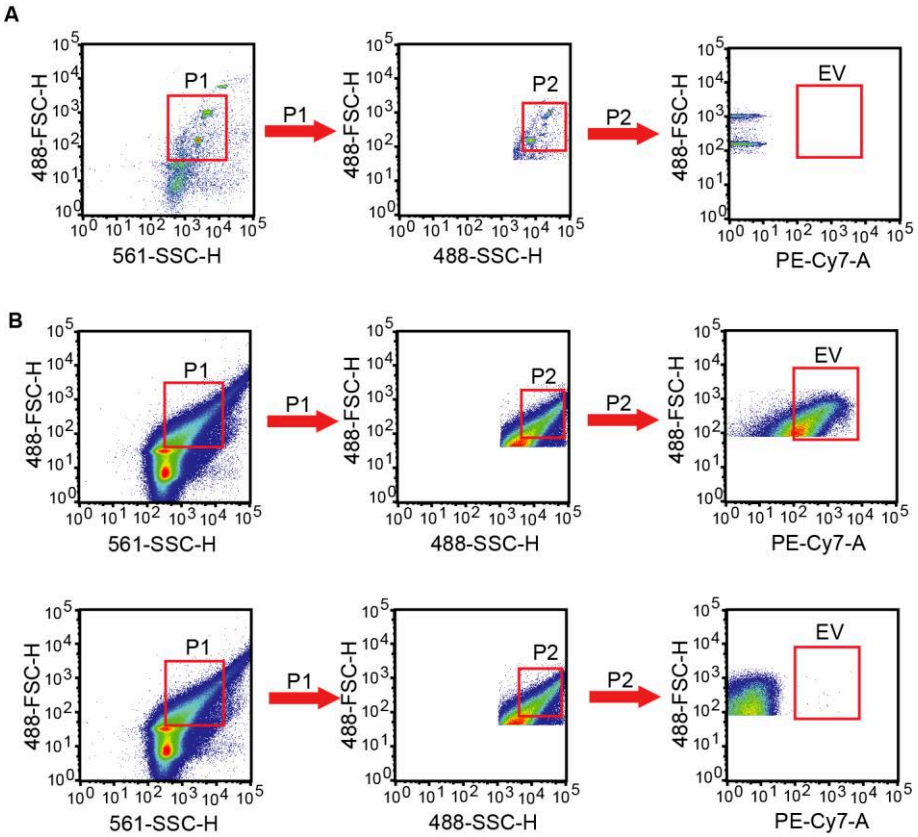


Figure S7. Related to Figure 6.

Scatter plots showing the gating strategy for EVs observation. (A) Gating strategy on Megamix beads of 900 nm, 500 nm, 300 nm and 100 nm. (B) Gating strategy on purified EVs labeled with GPA-PC7 antibody (upper panel) or with IgG-isotype-PC7 antibody (lower panel).

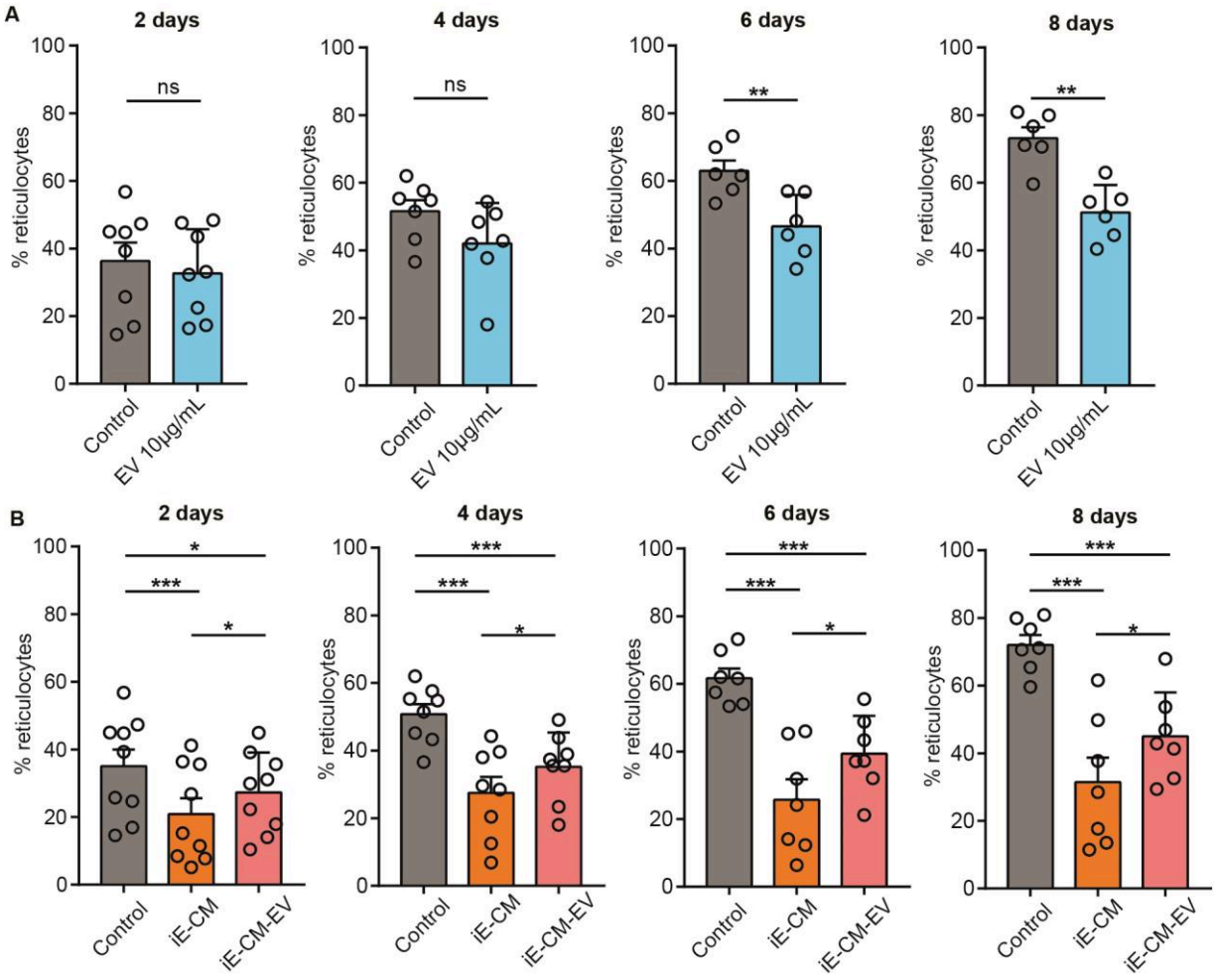


Figure S8. Related to Figure 6.

(A) Percentage of reticulocytes in erythroblast culture at 2 days, 4 days, 6 days and 8 days after addition of 10µg/mL EVs or control medium (Control). (B) Percentage of reticulocytes in erythroblast culture at 2 days, 4 days, 6 days and 8 days after addition of iE-CM, iE-CM –EV or control medium (Control). Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. ***p<0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05, ns: non-significant difference.

Discussion

I. Comment le parasite s'adapte à son environnement

Lors de son cycle biologique, le parasite *Plasmodium* évolue dans des environnements totalement différents. A chaque fois, il s'adapte de façon remarquable aux tissus et aux cellules qu'il parasite en adoptant une forme cellulaire spécialisée et en déployant tout un arsenal moléculaire adapté à sa localisation.

Lors de son passage par son hôte définitif, l'anophèle, le parasite passe par différents environnements, sous forme intracellulaire ou extracellulaire. Le zygote et l'ookinète se trouvent dans le bol alimentaire du moustique, dans son intestin. Ensuite, les oocystes formés puis les sporozoïtes qu'ils relâchent se développent dans le liquide lymphatique du moustique : l'hémocœle. Puis, les sporozoïtes mobiles évoluent dans les canaux des glandes salivaires du moustique. Une fois chez l'Homme, les sporozoïtes traversent la peau, puis rejoignent la circulation sanguine et atteignent rapidement le foie. Dans le tissu hépatique le parasite s'adapte en changeant de forme et en commençant une phase de développement intracellulaire, nécessaire pour se protéger du système immunitaire dans le foie. Enfin, lors du stade intra-érythrocytaire, le parasite est confronté à deux environnements différents : la circulation sanguine pour les parasites asexués et les gamétocytes matures et l'espace extravasculaire de la moelle osseuse pour les gamétocytes immatures.

a. Des propriétés adhésives adaptées aux environnements du parasite

Les érythrocytes parasités par des parasites asexués et sexués présentent des caractéristiques moléculaires et cellulaires différentes qui reflètent leurs différences de lieu de séquestration. Par exemple, les propriétés de cytoadhérence des érythrocytes parasités sont divergentes entre les parasites asexués et les gamétocytes. Comme décrit lors de l'introduction de cette thèse, les érythrocytes hôtes des parasites asexués adhèrent principalement aux cellules endothéliales et aux érythrocytes environnants via les protéines des trois grandes familles multigéniques parasitaires : PfEMP1, RIFIN et STEVOR. Cependant, l'absence d'expression de PfEMP1 chez les EIG et leur incapacité à adhérer aux cellules endothéliales reflètent une différence d'interaction avec leurs tissus de séquestration respectifs (Silvestrini et al., 2012; Tibúrcio et al., 2013).

Lors de ce travail, nous avons exploré l'hypothèse selon laquelle les EIG immatures pouvaient adhérer aux érythroblastes présents dans les îlots érythroblastiques de la moelle osseuse. Or, nos résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, les EIG immatures n'adhèrent ni aux lignées érythroïdes ni aux érythroblastes primaires humains. Même lors de la surexpression de protéines STEVOR présentant des propriétés adhésives au stade asexué, les EIG immatures n'adhèrent pas aux érythroblastes. Cependant, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que l'adhérence aux précurseurs érythroïdes pourrait être dépendante de l'expression d'autres variants antigéniques du parasite. Les protéines PfEMP1 n'étant pas exprimées lors de la gamétocytogenèse (Tibúrcio et al., 2013), les protéines RIFIN sont des candidates potentielles comme ligands des érythroblastes. La famille multigénique des gènes *rif* comprend 160 variants, il est donc difficile d'étudier individuellement les propriétés adhésives de chaque RIFIN. Néanmoins, pour exclure totalement le fait que les EIG immatures n'adhèrent pas aux précurseurs érythroïdes, il faudrait étudier l'effet de la surexpression des protéines RIFIN sur une potentielle adhérence aux cellules érythropoïétiques. L'utilisation de souches de terrains pour faire des essais d'adhérence de cellules en suspension pourrait être une bonne option afin de tester les propriétés adhésives de ces parasites chez lesquels les familles multigéniques sont beaucoup plus exprimées que dans les souches adaptées en laboratoire.

Bien qu'ils ne semblent pas adhérer aux cellules érythroïdes, les EIG immatures adhèrent à un autre type cellulaire localisé dans le parenchyme de la moelle osseuse : les cellules mésenchymateuses (Messina 2018). Les cellules du mésenchyme sont des cellules multipotentes qui peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires comme les chondrocytes (qui constituent le tissu cartilagineux), les ostéoblastes (qui constituent les os) et les adipocytes (qui constituent le tissu graisseux) (Pittenger et al., 1999). Après avoir mis en place un système de co-culture en trois dimensions de cellules humaines primaires mésenchymateuses de moelle osseuse et d'EIG, les auteurs ont pu observer la maturation complète des EIG dans cette reconstitution partielle de tissu de moelle osseuse. Les érythrocytes hôtes des parasites asexués ou des gamétocytes immatures adhèrent aux cellules du mésenchyme via un récepteur encore inconnu mais sensible au traitement à la trypsine (Messina et al., 2018). Les protéines PfGEXP07 et PfGEXP10 du

côté parasitaire et la cytokine de surface CX3CL1 du côté des cellules de la moelle pourraient être à l'origine de cette adhérence. En effet, CX3CL1 est exprimée à la surface des cellules du mésenchyme (Honczarenko et al., 2006) et se lie aux protéines PfGEXP07 et PfGEXP70 (Hermand et al., 2016) qui sont présentes à la surface des EIG immatures (Dantzler et al., 2019; Silvestrini et al., 2010).

En plus d'adhérer aux cellules du mésenchyme de la moelle osseuse, les parasites affectent leur environnement en induisant l'augmentation de la production de facteurs angiogéniques par les cellules mésenchymateuses. La présence d'EIG immatures engendre aussi la formation par ces cellules de structures s'apparentant à des capillaires (Messina et al., 2018). Les vaisseaux sanguins ainsi néo-formés pourraient faciliter le passage du parasite entre la circulation sanguine et le parenchyme de la moelle osseuse. Ces résultats suggèrent que les parasites pourraient s'adapter à l'environnement de la moelle osseuse en modifiant son tissu : ils augmenteraient l'angiogenèse afin de permettre leur entrée et/ou leur sortie de la moelle osseuse. Ce résultat est très intéressant étant donné du peu d'informations actuelles concernant l'entrée et la sortie des parasites du parenchyme de la moelle osseuse.

Le fait que les érythrocytes hôtes des parasites asexués adhèrent également aux cellules du mésenchyme suggère l'existence d'un cycle de réplication asexué cryptique du parasite dans le parenchyme de la moelle osseuse. En réponse aux caractéristiques de ce nouvel environnement le parasite pourrait adapter son cycle biologique. Par exemple, la diminution du taux de lysoPC dans le parenchyme de la moelle osseuse par rapport à la circulation sanguine pourrait favoriser la différenciation des parasites vers la voie sexuée dans la moelle osseuse (Brancucci et al., 2017), ce qui pourrait expliquer la présence des gamétocytes immatures dans cette niche.

b. STEVOR, une protéine parasitaire différente selon l'environnement ?

Les protéines exportées par *Plasmodium* à la membrane de l'érythrocyte parasité sont essentielles au parasite pour s'adapter à son environnement. Lors de cette thèse, nous avons observé une topologie différente des protéines STEVOR chez les EIG immatures par rapport à ce qui est décrit dans la littérature pour les parasites asexués. En effet, chez les parasites sexués, les STEVOR ne semblent pas être exposées à la

surface de la cellule hôte alors qu'elles sont exportées à la surface des érythrocytes par les parasites asexués (Niang et al., 2009, 2014; Singh et al., 2017).

Ce changement de conformation pourrait refléter l'adaptation du parasite à ses différents environnements : la circulation sanguine pour les parasites asexués et le parenchyme de la moelle osseuse pour les parasites sexués.

Dans la circulation sanguine, les protéines STEVOR jouent un rôle dans l'adhérence des érythrocytes infectés par des parasites asexués aux cellules endothéliales ainsi que dans la rigidité de la membrane de l'érythrocyte parasité. Ainsi, cette famille multigénique pourrait contribuer à la séquestration des parasites asexués dans les tissus profonds et promouvoir sa persistance dans l'organisme hôte. Chez les gamétocytes, les protéines STEVOR semblent avoir un rôle uniquement dans la déformabilité des EIG. Les protéines STEVOR pourraient donc participer à la séquestration des gamétocytes immatures dans le parenchyme de la moelle osseuse en induisant une rétention mécanique des parasites sexués. Ces protéines ont donc potentiellement des fonctions différentes en fonction de l'environnement où se trouve le parasite dans l'organisme au cours de son cycle de développement.

II. Comment le parasite détourne sa cellule hôte

1. Modification de la membrane de l'érythroblaste par le gamétocyte.

Comme évoqué lors de l'introduction de cette thèse, le parasite modifie profondément la membrane de l'érythrocyte qu'il parasite. Or, les résultats de cette thèse montrent que les gamétocytes peuvent se développer entièrement *in vitro* au sein des érythroblastes. Les conséquences de l'invasion des précurseurs érythroïdes par *Plasmodium* et du développement des gamétocytes au sein de ces cellules nucléées sont largement inconnues. De nombreuses interrogations peuvent être posées quant à la modification de la membrane de l'érythroblaste par le parasite asexué et par le gamétocyte. Ces modifications sont-elles semblables ou au contraire différentes de celles retrouvées chez l'érythrocyte mature en termes d'expression de protéines, de déformabilité de la membrane, de perméabilité et de propriétés adhésives ?

a. Les protéines parasitaires exportées chez les érythroblastes

Lors de ce travail, nous avons montré que le gamétocyte peut exporter des protéines parasitaires à la membrane de l'érythroblaste parasité comme en témoignent les expériences d'immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre la protéine Pf11.1, spécifique des stades sexués. Cependant, beaucoup de travail reste à faire afin de caractériser l'exportome du parasite dans les précurseurs érythroïdes. Les autres protéines de gamétocytes telles que les PfGEXPs sont-elles exportées à la membrane de l'érythroblaste parasité ? Certaines protéines sont-elles exposées à la surface de la cellule hôte ? Se pose également la question de l'expression des protéines appartenant aux grandes familles multigéniques de *P. falciparum* comme les protéines PfEMP1, RIFIN et STEVOR. Des résultats préliminaires nous ont permis d'observer que le variant VarO de la famille multigénique des gènes *var* était présent à la surface de l'érythroblaste hôte de parasites asexués.

Ces observations ouvrent la voie à la caractérisation de l'expression des protéines des autres familles multigéniques dans les érythroblastes parasités. En particulier, au vue des résultats de l'étude de l'expression des protéines STEVOR à la surface des EIG immatures décrits dans la première partie des résultats de cette thèse, il serait intéressant de déterminer la topologie des protéines STEVOR à la membrane des érythroblastes infectés par des parasites asexués et par des gamétocytes.

Au contraire des érythrocytes matures qui sont des cellules dépourvues d'organelles, les érythroblastes sont des cellules beaucoup plus complexes qui possèdent un noyau, un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi, ainsi que plusieurs organelles. A l'inverse des normocytes, ces cellules nucléées possèdent donc leur propre système d'export de protéines. On peut se poser la question si le parasite exporte ses protéines dans l'érythroblaste hôte par les mêmes mécanismes qu'il met en place chez les normocytes. Dans ces érythrocytes matures, le parasite établit son propre système d'export pour pallier à ce manque. La voie canonique d'export des protéines parasitaires hors de la vacuole passe par l'ajout d'un motif d'export sur les protéines concernées : le motif PEXEL/HT (Plasmodium EXport ELement / Host-Targeting) (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004). De très nombreuses protéines exportées à la membrane du globule rouge

comportent un motif PEXEL/HT comme les protéines des familles multigéniques RIFIN et STEVOR (van Ooij et al., 2008; Sargeant et al., 2006). D'autres protéines sont exportées hors de la vacuole parasitaire par des voies non-canoniques comme les PNEPs (PEXEL-negative exported proteins) (Heiber et al., 2013), telles que les protéines PfEMP1 et la protéine Pf11.1. La grande majorité des protéines exportées à destination de la membrane de la cellule hôte transitent via des sacs membranaires créés par le parasite, les Maurer's clefts (MC). Les MC fusionnent avec la membrane de l'érythrocyte parasité ce qui permet l'insertion des protéines parasitaires dans la membrane érythrocytaire. Dans les érythroblastes, le parasite pourrait donc soit utiliser sa propre machinerie d'export, soit détourner celle déjà en place chez les précurseurs érythroïdes. Afin de répondre à cette question, il serait intéressant d'étudier la voie d'export chez les érythroblastes, en particulier la présence de MC. Les protéines SBP1 sont généralement considérées comme un marqueur des MC en raison de leur présence dans ces sacs membranaires (Blisnick et al., 2000). Lors d'expériences préliminaires, nous avons pu observer la présence de la protéine SBP1 chez les érythroblastes hôtes des parasites asexués: la localisation de la protéine SBP1 en de multiples points dans le cytosol de la cellule infectée semble typique des MC.

Cependant, ces expériences ne peuvent pas exclure que la protéine SBP1 n'est pas localisée dans le réticulum endoplasmique de l'érythroblaste. Des expériences d'immunofluorescences avec des anticorps dirigés contre les protéines du réticulum endoplasmique humain permettraient d'observer si les protéines SBP1 co-localisent avec un marquage du réticulum. Sur les images de microscopie électronique obtenues sur une culture d'érythroblastes parasités par *P. falciparum*, on peut observer des structures membranaires dans le cytoplasme de l'érythroblaste parasité. Ces structures pourraient correspondre à des MC mises en place par le gamétocyte pour exporter ses protéines à la membrane de son hôte. Pour vérifier si ces structures membranaires pourraient effectivement être des MC, il sera nécessaire de marquer de manière immunologique la protéine SBP1 afin d'observer si elle est localisée au niveau de ces membranes. Plus de travaux sont donc nécessaires afin de déterminer si le parasite détourne une nouvelle fois la machinerie cellulaire de son hôte pour son propre développement.

b. Quelles sont les propriétés mécaniques de l'érythroblaste parasité ?

Le changement des propriétés mécaniques de la membrane des globules rouges parasités lors de la gamétocytogenèse a été proposé comme jouant un rôle dans la rétention des gamétocytes immatures dans le parenchyme de la moelle osseuse (Tiburcio 2012). Ce changement de rigidité de la membrane de la cellule hôte pourrait également avoir lieu chez les précurseurs érythroïdes. Cependant, l'évolution de la rigidité des précurseurs érythroïdes lors de l'érythropoïèse tardive est très peu décrite. Les études existantes ont été menées sur des érythroblastes issus de l'érythropoïèse primitive chez le fœtus murin. Ces érythroblastes ont la caractéristique d'être présents dans la circulation sanguine sous forme nucléée, avant d'atteindre leur maturité (Kingsley et al., 2004; Palis et al., 1999). Cependant, malgré le fait qu'ils soient en circulation, les érythroblastes immatures issus de l'érythropoïèse primitive sont très rigides ce qui suggère qu'ils n'ont pas besoin d'acquérir une grande déformabilité pour se maintenir dans la circulation sanguine, au contraire des érythrocytes matures chez l'humain adulte (Huang et al., 2017). Lors de l'érythropoïèse définitive adulte, seule la déformabilité des réticulocytes a été étudiée. La membrane des réticulocytes est beaucoup plus rigide que la membrane des normocytes et la stabilité de la membrane augmente au cours de la maturation des réticulocytes (Chasis et al., 1989; Malleret et al., 2013; Waugh, 1991). Il serait donc informatif d'étudier les propriétés mécaniques de la membrane des érythroblastes et des réticulocytes parasités par *P. falciparum*. Le développement du parasite induit-il une augmentation de la rigidité de la membrane de sa cellule hôte ? Afin de mener ces études, il serait tout d'abord nécessaire de déterminer les changements de déformabilité de la membrane de l'érythroblaste lors de l'érythropoïèse définitive humaine. Lors de cette thèse, nous avons eu l'occasion de mettre au point la technique d'aspiration par micropipette et avons observé une évolution de la rigidité de la membrane entre les érythroblastes nucléés, les réticulocytes et les normocytes.

Bien que nous ayons observé que le parasite retarde la maturation des érythroblastes afin de se développer dans une cellule nucléée jusqu'au stade IV, il est envisageable que des gamétocytes se retrouvent au sein de réticulocytes avant leur maturité, notamment si l'infection se produit au stade acidophile. Il faudrait alors déterminer si les gamétocytes

immatures accentuent la rigidité de la membrane des réticulocytes, ce qui pourrait constituer une autre stratégie utilisée par les parasites afin d'éviter leur extravasation dans la circulation sanguine avant leur maturation. Le changement de déformabilité observé chez les EIG entre le stade IV et le stade V de la gamétocytogenèse a-t-il également lieu chez les réticulocytes ? Répondre à ces questions permettra de mieux comprendre les mécanismes de rétention des gamétocytes immatures dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse.

c. Le parasite modifie-t-il la perméabilité de l'érythroblaste ?

La démonstration du développement des gamétocytes chez les érythroblastes soulève la question de la perméabilité de ces cellules nucléées lors de la maturation du parasite. En effet, l'infection par des parasites augmente-t-elle la perméabilité de la cellule hôte comme observé chez les érythrocytes? Cette perméabilité diminue-t-elle au cours de la gamétocytogenèse? Pour répondre à ces questions, il faut également prendre en compte que peu de données sont disponibles quant à l'évolution de la perméabilité de la membrane cellulaire au cours de l'érythropoïèse. Dans le cadre de cellules parasitées, nous pouvons faire l'hypothèse que les NPPs sont moins activés chez les érythroblastes parasités que chez les érythrocytes parasités. Comme notre équipe a pu montrer lors de ma thèse que la perméabilité de l'érythrocyte parasité via les NPPs contribuait à l'absorption des molécules antipaludiques par le parasite, la faible perméabilité des érythroblastes parasités pourrait modifier l'effet des antipaludiques sur les gamétocytes dans la moelle osseuse. Il sera donc essentiel d'examiner dans le futur la susceptibilité aux drogues antipaludiques des gamétocytes dans des érythroblastes, en comparaison aux EIG. Des premiers travaux chez la souris ont déjà montré en ce sens une corrélation entre l'infection des précurseurs érythroïdes par *P. berghei* et une plus forte résistance à l'artémisinine chez les souris impaludées (Lee et al., 2018).

d. Les érythroblastes parasités ont-ils des propriétés adhésives ?

L'infection par *Plasmodium* change profondément les propriétés adhésives des érythrocytes puisque ceux-ci peuvent alors adhérer à différents types cellulaires, ce qui cause les symptômes les plus graves du paludisme. Les propriétés adhésives des érythroblastes parasités sont pour l'instant totalement inconnues. Le fait que nous ayons

observé dans une expérience préliminaire la présence de PfEMP1 à la surface de l'érythroblaste parasité pose de nombreuses questions. Chez les érythrocytes, l'adhérence des protéines PfEMP1 aux cellules endothéliales est nécessaire à la séquestration des trophozoïtes et des schizontes dans les vaisseaux sanguins des organes profonds pour éviter la filtration et l'élimination par la rate. L'expression de PfEMP1 chez les érythroblastes parasités a-t-elle un rôle fonctionnel dans le parenchyme de la moelle osseuse ou cette observation correspond-elle à un artefact obtenu *in vitro* ? Il semblerait que dans la moelle osseuse, les parasites n'aient pas besoin d'adhérer aux cellules endothéliales, cependant certains ligands de la protéine PfEMP1 sont présents à la surface de cellules composants le parenchyme de la moelle osseuse, comme ICAM qui est présent à la surface des érythroblastes. PfEMP1 pourrait donc être à l'origine d'une adhérence des parasites asexués aux érythroblastes qui s'apparenterait à un phénomène de rosetting. Cette cytoadhérence pourrait faciliter la ré-invasion de cellules érythroïdes dans le cadre d'un cycle cryptique de réplication du parasite dans la moelle. Les EIG immatures, tout comme les érythrocytes hôtes des parasites asexués adhèrent aux cellules du mésenchyme de la moelle osseuse. L'adhérence des érythroblastes parasités à ces cellules pourrait être un mécanisme supplémentaire pour la rétention des gamétocytes immatures dans l'espace extravasculaire de la moelle.

2. Modification de la cellule hôte via la sécrétion de vésicules extracellulaires par le parasite

La sécrétion de vésicules extracellulaires est impliquée dans de multiples processus cellulaires et est très conservée chez les organismes vivants. Les VE sont composées d'une bicouche lipidique sphérique qui peut contenir de nombreuses molécules comme des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Yáñez-Mó et al., 2015). Les VE sont divisées en trois catégories : les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques. Les exosomes font entre 40 et 120 nm de diamètre et sont produites par la fusion de la membrane plasmique et de l'endosome. Les microvésicules font de 50 à 1000 nm de diamètre et sont issues du bourgeonnement de la membrane plasmique. Les corps apoptotiques font entre 500 et 2000 nm de diamètre et sont formés au cours de l'apoptose de la cellule (EL Andaloussi et al., 2013), les VE peuvent être sécrétées par

les virus, les bactéries et les parasites ainsi que par les cellules infectées. Les VE font partie intégrante du processus de pathogénicité et de l'échappement au système immunitaire de l'organisme infecté (Schorey et al., 2015).

a. Les VE, particules omniprésentes chez les parasites eucaryotes

Lors des différentes interactions hôtes-parasites impliquant les parasites *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Leishmania* et *Trichomonas*, les cellules hôtes augmentent leur sécrétion de VE en réponse à la présence du parasite. Les macrophages et les cellules dendritiques parasités par *Toxoplasma gondii* sécrètent des exosomes pro-inflammatoires et présentateurs d'antigènes qui stimulent le système immunitaire (Aline et al., 2004; Bhatnagar et al., 2007). De la même manière, les exosomes sécrétés par les macrophages et les cellules dendritiques parasités par *Leishmania* réduisent la réponse de ces cellules immunitaires à l'intrusion du parasite en diminuant leur production en cytokines pro-inflammatoires (Silverman et al., 2010). Afin d'échapper à la réponse immunitaire, le parasite *Trypanosoma cruzi* induit la sécrétion de microvésicules qui empêchent l'action du complément et donc protègent le parasite (Cestari et al., 2012). Les EV peuvent aussi avoir d'autres rôles chez différentes espèces parasitaires, par exemple les exosomes sécrétés par *Trichomonas vaginalis* ont un rôle dans la communication entre les parasites pour promouvoir leurs capacités d'adhérence (Twu et al., 2013).

b. Les VE chez *Plasmodium*

Lors de l'infection par *Plasmodium*, la sécrétion de VE par les cellules parasitées joue un rôle important dans la pathogenèse du paludisme. Tout d'abord, il a été identifié que l'infection par *P. falciparum* lors de paludisme cérébral augmente la sécrétion de VE par les cellules endothéliales (Combes et al., 2004). Le contenu protéique des VE lors de l'infection par *Plasmodium* a été révélé par le protéome des VE de souris impaludées. Ce contenu diffère lors de l'infection et est régulé par les cytokines TNF et TGFβ1 (Tiberti et al., 2016). Plus globalement, la présence de VE chez les individus infectés par *Plasmodium* est plus importante que chez les individus non-infectés et les individus qui viennent de guérir de l'infection. La sécrétion de VE est donc intimement liée à la pathologie du paludisme.

Les VE sécrétées par les érythrocytes parasités contiennent des biomolécules issues de l'érythrocyte et du parasite (Mantel et al., 2013). La présence de protéines parasitaires à leur surface, comme la protéine RESA, permet de les distinguer des VE sécrétées par les globules rouges sains. De plus, les érythrocytes parasités sécrètent une quantité de VE dix fois plus importante que les érythrocytes non-parasités, ce qui suggère que l'infection par *Plasmodium* augmente activement le processus de formation de VE chez les érythrocytes (Nantakomol et al., 2011). Plusieurs effets des VE sur l'hôte ont déjà été décrits dans la littérature. Les VE produites par les globules rouges parasités peuvent être internalisées par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Ces VE contiennent de nombreux petits ARN non codants (Babatunde et al., 2018), dont des miARN qui une fois dans les cellules endothéliales peuvent modifier l'expression de certains gènes de la cellule. C'est le cas du miR-451a qui s'associe avec la protéine Argonaute-2 pour former un complexe RISC qui a pour rôle d'inhiber l'expression de certains gènes des cellules endothéliales. Les gènes réprimés ont un rôle dans l'établissement des jonctions cellulaires entre les cellules. Ainsi, l'infection par le parasite qui induit la sécrétion de VE par les érythrocytes parasités engendre l'affaiblissement de la barrière endothéliale par le biais de miARN. Cette altération de la fonction endothéliale pourrait participer aux passages des parasites à travers la barrière cérébrale lors des cas graves de paludisme (Mantel et al., 2016). Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que les VE pourraient fragiliser la barrière endothéliale au niveau de la moelle osseuse et ainsi faciliter le passage des parasites dans le parenchyme de la moelle. Les VE sécrétées par les érythrocytes parasités peuvent également affecter les cellules du système immunitaire de l'hôte. En effet, les VE peuvent être internalisées par les lymphocytes NK qui sont alors activés via la voie MDA5 par des ARN présents dans les VE sécrétées (Ye et al., 2018). Les VE de *P. falciparum* peuvent également participer à l'activation des monocytes et des neutrophiles ainsi que des macrophages en augmentant la production de cytokines pro-inflammatoires (Mantel et al., 2013).

En plus d'avoir un effet sur les cellules de l'hôte, les VE peuvent aussi avoir un rôle de communication entre les parasites. Les VE peuvent être incorporées spécifiquement par les érythrocytes parasités pour transmettre du matériel génétique entre parasites (Mantel et al., 2013). Bien que les VE n'aient pas d'impact sur la réplication des parasites asexués,

elles semblent affecter la gamétocytogenèse. En effet, l'ajout de VE augmente la production de gamétocytes dans la culture (Mantel et al., 2013; Regev-Rudzki et al., 2013), ce qui pourrait expliquer pourquoi le milieu conditionné par une culture parasitaire augmente la gamétocytogenèse (Dyer and Day, 2003). Cependant, ces résultats ont été réfutés par les travaux de Brancucci et de ses collaborateurs qui ont montré que les VE n'étaient pas à l'origine de l'engagement des parasites vers la voie sexuée. En effet, le milieu conditionné dont les VE ont été éliminées induit également la gamétocytogenèse et c'est la déplétion en LysoPC qui est à l'origine de la production de gamétocytes (Brancucci et al., 2017).

c. Les VE de *P. falciparum* retardent l'érythropoïèse terminale

Lors de ces travaux de thèse, nous avons mis en évidence un nouveau rôle des VE lors de l'affection par *P. falciparum*. Nous avons observé que les VE semblent contribuer au retard de maturation des érythroblastes lors de leur infection ou lors de leur culture avec du milieu conditionné (CM) par une culture parasitaire. Cependant, le mode d'action des VE sur les précurseurs érythroïdes n'est pas encore élucidé. Parmi les premiers éléments de réponse, nous savons que l'ajout de VE sur une culture d'érythroblastes primaires induit une augmentation du stress oxydatif chez ces cellules. Lors de l'érythropoïèse tardive, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) diminue au cours de la maturation des érythroblastes. La régulation de la production des ERO est dépendante de la production d'EPO et de l'import du fer dans les érythroblastes au cours de l'érythropoïèse. Chez les érythroblastes immatures, la présence d'ERO inhibe l'énucléation chez ces cellules alors que chez les érythroblastes matures, la diminution de la production d'ERO permet l'énucléation et la production de réticulocytes. Or, lorsque la production d'ERO est augmentée chez les érythroblastes matures, l'énucléation et donc la différenciation en réticulocytes est inhibée (Zhao et al., 2016). L'augmentation du stress oxydatif observée chez les érythroblastes parasités par *P. falciparum* et chez les érythroblastes cultivés en présence d'EV pourrait donc être directement la cause du retard de production des réticulocytes. Il est maintenant essentiel de comprendre comment la sécrétion d'EV induit une augmentation du stress oxydatif chez les érythroblastes.

La régulation du métabolisme du fer étant étroitement lié aux mécanismes de régulation du stress oxydatif chez les érythroblastes, il serait instructif d'étudier les modifications

éventuelles du métabolisme du fer chez les érythroblastes parasités ou exposés à des VE. L'expression des récepteurs au fer comme ceux de la transferrine est-elle augmentée (Kawabata, 2019)? A l'inverse, l'expression de la ferroportine impliquée dans le relargage du fer et dans la protection contre le stress oxydatif, est-elle diminuée (Zhang et al., 2018)?

Le facteur de transcription FOXO3 (Forkhead box O3) a été identifié comme directement impliqué dans la régulation du stress oxydatif chez les érythroblastes : l'absence de FOXO3 induit une augmentation du stress oxydatif chez les précurseurs érythropoïétiques (Marinkovic et al., 2007). Le parasite, via la sécrétion de VE pourrait donc influer sur l'expression de FOXO3 chez les érythroblastes, soit en inhibant son expression par la présence de miARN, soit en affectant la voie de signalisation menant à la phosphorylation de FOXO3 et donc à son inactivité. En effet, l'activation des protéines FOXO se fait via la voie de signalisation PI3K/AKT : en réponse à différents stimuli, la kinase AKT phosphoryle FOXO qui est alors déplacé dans le cytosol et ne peut donc plus activer les gènes de réponse au stress oxydatif (Greer and Brunet, 2005). Parmi les miARN identifiés dans les VE d'érythrocytes parasités sont présents des miARN qui ont pour cible des gènes de la voie de signalisation FOXO (Babatunde et al., 2018). Certains ARN non-codants contenus dans les VE pourraient donc inhiber l'expression de gènes nécessaires à l'expression de FOXO3 et ainsi augmenter le stress oxydatif dans les érythroblastes. De manière plus générale, la sécrétion de VE due à la présence de *Plasmodium* pourrait affecter la production et le fonctionnement des enzymes anti-oxydantes chez les précurseurs érythroïdes.

D'autre miARN présents dans les VE pourraient affecter l'érythropoïèse. En particulier, les miARN miR451a, miR486-5p et miR92a-3p sont présents dans les VE issues d'érythrocytes parasités (Babatunde et al., 2018). De manière intéressante, ces miARN ciblent des gènes impliqués dans le processus d'érythropoïèse. miR451a est impliqué dans la différenciation des érythroblastes ainsi que dans la réponse des précurseurs érythroïdes au stress oxydatif (Patrick et al., 2010). Le miR486-5p, quant à lui, est impliqué dans la prolifération et la différenciation des érythroblastes (Wang et al., 2015). L'étude de l'impact des miARN contenus dans les VE sur les érythroblastes est donc très

prometteuse pour comprendre le mode d'action du parasite sur le retard de maturation des érythroblastes.

Chez les macrophages, l'hémozoïne est à l'origine d'une augmentation de la production d'ERO (Jaramillo et al., 2005). L'hémozoïne pourrait donc être également responsable du stress oxydatif chez les érythroblastes parasités. Afin de vérifier cette théorie, il faudrait évaluer la présence de cristaux d'hémozoïne dans les VE ainsi que l'impact de l'ajout d'hémozoïne pure sur la maturation des érythroblastes.

L'action des VE sur les érythroblastes pourrait avoir comme conséquence la surproduction de certaines cytokines. Par exemple, l'expression du gène *gdf15* codant pour la cytokine du même nom a été identifiée comme augmentée lors de la co-culture des érythroblastes polychromatiques avec *P. falciparum*, tout comme d'autres gènes qui pourraient être impliqués dans l'érythropoïèse (Tamez et al., 2011). Le taux plasmatique de GDF15 est plus élevé dans le plasma des personnes impaludées que chez les individus sains (de Mast et al., 2010). Cette augmentation pourrait s'expliquer par une augmentation de l'expression de la cytokine GDF15 par les érythroblastes lors de la présence de *Plasmodium*. En effet, la production de GDF15 est associée à une érythropoïèse inefficace et au stress oxydatif (Tanno et al., 2010) : la sécrétion de cette cytokine pourrait être la conséquence de l'augmentation de stress oxydatif dans les érythroblastes. Afin de mieux comprendre par quels mécanismes les VE affectent les érythroblastes primaires humains il sera donc essentiel d'étudier l'expression des différentes protéines codées par des gènes dont l'expression est modifiée lors de la co-culture des érythroblastes avec le parasite, comme c'est le cas pour GDF15. Le contenu des VE pourrait également induire l'expression des gènes *jun* et *rara* dont les produits inhibent la prolifération et la différenciation des érythroblastes. Il serait donc intéressant d'étudier au niveau génomique et au niveau protéique l'expression de ces facteurs chez les érythroblastes cultivés en présence de VE.

Lors de ces travaux de thèse, nous avons observé un retard de différenciation lors de la conversion des érythroblastes acidophiles en réticulocytes. Cependant, l'effet des VE sur les érythroblastes pourrait aussi agir plus tôt lors de l'érythropoïèse tardive, dès les stades proérythroblastes ou érythroblastes basophiles. En effet, chez les érythroblastes immatures où la chromatine est beaucoup moins condensée, l'activité transcriptionnelle

est plus active que chez les érythroblastes acidophiles. Afin de déterminer si *P. falciparum* peut affecter la maturation des érythroblastes dès le début de l'érythropoïèse tardive nous avons cultivé les érythroblastes en présence de milieu conditionné (CM) dès le stade basophile. Ces expériences préliminaires montrent que l'ajout de milieu conditionné affecte l'expression de différents marqueurs érythroïdes étudiés lors de la différenciation. Lorsque les érythroblastes sont cultivés en présence de CM à partir du stade basophile :

- la diminution de l'expression de CD71 en fin de différenciation est ralentie
- l'augmentation de l'expression de la Band3 en début de différenciation est ralentie
- l'expression de la GPA reste inchangée
- la diminution de l'expression de l'α4intégrine en fin de différenciation semble restée inchangée
- la production de réticulocytes est diminuée

Les différences d'expression de ces marqueurs de différenciation en présence de CM indiquent une légère inhibition de la maturation des érythroblastes. Bien que ces résultats soient préliminaires et doivent être reproduits, ils suggèrent que le CM peut retarder la maturation des érythroblastes dès le début de l'érythropoïèse tardive. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'ajout de VE dès le stade pro-érythroblaste et de déterminer par quelles voies moléculaires les érythroblastes sont retardés dans leur différenciation.

Beaucoup de travail reste donc à effectuer pour comprendre le mode d'action des VE produites lors de l'infection par le parasite *P. falciparum* sur les érythroblastes humains.

Les deux grands axes principaux à étudier dans le futur sont :

- Quels facteurs contenus dans les VE ont un effet sur la maturation des érythroblastes ?
- Par quelles voies moléculaires le contenu des VE agit-il sur la différenciation érythroblastique et plus précisément comment provoque-t-il l'augmentation du stress oxydatif observé dans ces cellules ?

La sécrétion de VE semble être un moyen pour le parasite de détourner sa cellule hôte érythroblaste afin de retarder sa maturation pour y permettre son développement en gamétocyte.

Conclusions générales

L'objectif de ces travaux de thèse était d'améliorer la compréhension des mécanismes d'interactions entre les formes sexuées du parasite *Plasmodium falciparum* et les précurseurs érythroïdes présents dans le parenchyme de la moelle osseuse, les érythroblastes.

Lors de la première partie de cette étude nous avons mis en évidence que dans nos conditions expérimentales, les EIG immatures n'ont pas la capacité d'adhérer aux érythroblastes primaires humains. Aucune adhérence n'a pu être mise en évidence, même lors de la surexpression des protéines parasitaires STEVOR, identifiées comme adhérant à la GPC chez les stades parasitaires asexués. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les protéines STEVOR ne semblent pas être exposées à la surface des EIG immatures, contrairement à ce qui est décrit au stade asexué. Ce changement de conformation pourrait être à l'origine de la différence entre les propriétés adhésives des érythrocytes parasités par des parasites asexués et par des gamétocytes.

Lors de la seconde partie de cette thèse, nous avons caractérisé le développement des gamétocytes au sein des précurseurs érythroïdes. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que lorsque l'infection par *P. falciparum* se fait au stade érythroblaste acidophile les gamétocytes immatures peuvent se développer entièrement dans les érythroblastes nucléés, ce qui mène à la production de gamétocytes matures dans des réticulocytes. Nous avons également pu constater que le parasite entraîne un retard de maturation des précurseurs érythroïdes en réticulocytes. Ce retard de l'érythropoïèse terminale est dû à la sécrétion de vésicules extracellulaires par le parasite. Ces vésicules extracellulaires engendrent un stress oxydatif des érythroblastes primaires humains *in vitro*.

Ces différents résultats nous permettent de proposer le modèle suivant quant à la séquestration des gamétocytes immatures dans le parenchyme de la moelle osseuse.
L'invasion des érythroblastes acidophiles entourant l'îlot érythroblastique pourrait mener au développement des gamétocytes dans ces cellules nucléées. Les parasites présents dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse sécrèteraient des vésicules extracellulaires qui une fois en contact avec les érythroblastes retarderaient leur développement en érythrocytes matures. Ce retard permettrait aux gamétocytes de se développer entièrement au sein des érythroblastes de l'îlot érythroblastique. Une fois

matures, les gamétocytes dans des réticulocytes pourraient être extravasés dans la circulation sanguine afin d'être disponibles pour le moustique anophèle.

Ce modèle de séquestration des parasites sexués dans la moelle osseuse pourrait s'additionner à un mécanisme de rétention mécanique des EIG immatures ainsi qu'à l'adhérence des érythrocytes parasités aux cellules du mésenchyme de la moelle.

En conclusion, cette étude a permis d'en savoir plus sur le développement des gamétocytes qui est la partie la plus obscure du cycle biologique du parasite *Plasmodium falciparum*. Ces travaux montrent que le parasite peut se développer dans un autre type de cellule sanguine que les érythrocytes : les érythroblastes. Ainsi, la compréhension plus profonde de la biologie de *Plasmodium* dans les précurseurs érythroïdes me semble un sujet essentiel à venir, aussi vaste qu'intéressant.

Annexes

I. Manuscrit de revue: Erythrocyte membrane makeover by *Plasmodium falciparum* gametocytes

Erythrocyte membrane makeover by *Plasmodium falciparum* gametocytes

Gaëlle Neveu[1,2] and Catherine Lavazec[1,2*]

[1] Inserm U1016, CNRS UMR8104, Université de Paris, Institut Cochin, Paris, France

[2] Laboratoire d'excellence GR-Ex, Paris, France

[*] Correspondence: Catherine Lavazec: catherine.lavazec@inserm.fr

Abstract

Plasmodium falciparum sexual parasites, called gametocytes, are the only parasite stages responsible for transmission from humans to *Anopheles* mosquitoes. During their maturation, *P. falciparum* gametocytes remodel the structural and mechanical properties of the membrane of their erythrocyte host. This remodeling is induced by the export of several parasite proteins and a dynamic reorganization of the erythrocyte cytoskeleton. Some of these modifications are specific for sexual stages and play a key role for gametocyte maturation, sequestration in internal organs, subsequent release in the bloodstream and ability to persist in circulation. Here we discuss the mechanisms developed by gametocytes to remodel their host cell and the functional relevance of these modifications.

Introduction

To interact with the external environment, the parasite *Plasmodium falciparum* drastically remodels its erythrocyte host. Such modifications are mediated by the export of parasite proteins into the erythrocyte that alter the architecture of the host cell membrane. By modifying the cytoadherence, deformability and permeability properties of the host cell membrane, these proteins contribute to parasite survival, virulence, and immune evasion. All these processes are extensively described during *P. falciparum* asexual stages, however they are less characterized in gametocytes, which are the sexual stages responsible for the transmission from humans to mosquitoes. Unlike asexual stages that replicate in a cycle of 48 hours, gametocytes develop over a period of 10 days, progressing through five distinct stages of maturation (Hawking et al., 1971). Immature gametocytes from stage I to IV are absent from peripheral circulation and sequester in bone marrow parenchyma (Aguilar et al., 2014; Joice et al., 2014). The mechanisms underlying their sequestration remain poorly understood but are likely drastically different from that of asexual stages, which sequester by cytoadhesion to endothelial cells (Baruch et al., 1995; Smith et al., 1995). At maturation, erythrocytes infected with stage V gametocytes are released in the bloodstream and freely circulate for several days waiting to be taken up by mosquitoes. During this time, gametocytes should be able to circulate through the spleen and avoid immune recognition. To adapt to these different microenvironments, gametocytes express a range of proteins among which more than 10 % are exported to the erythrocyte (Silvestrini et al., 2010). These proteins specifically remodel the erythrocyte membrane to allow gametocytes to interact with the host, indicating that the parasite evolved efficient strategies to renovate its host cell according to the specific needs of each life cycle phase. This review summarizes our current knowledge of the mechanisms developed by gametocytes to remodel the structural and mechanical properties of their erythrocyte host cell. We discuss the functional relevance of these modifications for gametocytes sequestration and circulation within their host.

Protein export at the erythrocyte membrane

Upon infection with *P. falciparum,* the architecture of the erythrocyte membrane is deeply altered by parasite proteins (Figure 1B and Table 1). These proteins are either secreted on the erythrocyte surface by parasite apical organelles during invasion, or are exported by the developing parasite into the erythrocyte cytosol. Secreted proteins include the Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen (RESA) contributing to the stabilization of the erythrocyte membrane skeleton (Pei et al., 2007), and the members of the RhopH protein family involved in the new permeability pathway (Counihan et al., 2017; Ito et al., 2017; Sherling et al., 2017). Many of the parasite-exported proteins possess a canonical export motif termed the *Plasmodium* export element (PEXEL) or host-targeting (HT) motif (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004). In addition, the *P. falciparum* exportome also includes a large number of PEXEL-negative exported proteins (PNEPs) (Heiber et al., 2013). To reach the erythrocyte cytosol, all parasite-exported proteins should pass through the parasitophorous vacuole membrane that envelops the parasite and its surrounding vacuole. Both PEXEL proteins and PNEPs cross this membrane through a protein translocon called *Plasmodium* Translocon of EXported proteins (PTEX) (de Koning-Ward et al., 2009), then transit by an exo-membranous trafficking system established by the parasite in the erythrocyte cytosol, and eventually some of them traffic further to the erythrocyte cytoskeleton and plasma membrane. Parasite proteins involved in the export machinery are expressed in both asexual and sexual stages, and proteins containing a PEXEL motif or identified as PNEPs are found at the gametocyte-infected erythrocyte membrane (Figure 1) (Ingmundson et al., 2014). For instance, early studies showed that the gametocyte-specific giant protein Pf11-1 is exported to the cytoplasm of infected erythrocytes where it interacts with the erythrocyte membrane (Scherf et al., 1992). Later, comparative analysis of the proteome of asexual stages and gametocytes revealed that sexual differentiation is accompanied by an intense export of gametocyte proteins putatively involved in erythrocyte remodeling (Silvestrini et al., 2010). Some of these proteins, over-represented in early gametocytes, were called *P. falciparum* Gametocyte EXported Proteins (PfGEXP) (Silvestrini et al., 2010). The export of several PfGEXPs to the infected erythrocyte has been experimentally validated, including Pfg14.744 (Eksi et al., 2005), PfGECO (Morahan et al., 2011), PfGEXP5 (Tiburcio et al., 2015) and

PfGEXP10 (Silvestrini et al., 2010). A recent report confirmed these findings and identified novel exported proteins by proteomics and immune profiling (Dantzler et al., 2019). Trypsin treatment, immunofluorescence and flow cytometry studies demonstrated erythrocyte surface exposure for six antigens, including PfGEXP7 and PfGEXP10. These proteins probably impact the properties of the gametocyte-infected erythrocyte (GIE) membrane, however it is difficult to predict their function and their role in membrane remodeling due to the lack of any obvious functional annotation for most of the GEXPs. Several GEXPs, as PfGEXP5, belong to the PHIST (Plasmodium Helical Interspersed SubTelomeric) protein family (Silvestrini et al., 2010). This family of 89 exported proteins is implicated in various molecular and cellular processes (Warncke et al., 2016), and several PHIST proteins localize to the erythrocyte cytoskeleton during asexual stages where they contribute to erythrocyte remodeling (Oberli et al., 2016; Parish et al., 2013). However, since most of GEPXPs are conserved in asexual and sexual stages, they are unlikely to contribute to the specific needs of gametocytes.

Major specificities of protein export in gametocytes are the absence of the Knob-Associated Histidine Protein (KAHRP) at the erythrocyte skeleton and the reduced levels of the *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) exposed on the erythrocyte surface (Tiburcio et al., 2013) (Figure 1B). In contrast, the other multigenic families STEVOR and RIFIN are highly expressed during sexual differentiation (McRobert et al., 2004; Petter et al., 2008; Wang et al., 2010). Immunofluorescence studies with antibodies distinguishing A and B RIFINs revealed that only A-type RIFINs are detectable in the cytoplasm of erythrocytes infected by immature gametocytes and are localized at the erythrocyte membrane (Petter et al., 2008). STEVOR proteins have also been shown to be associated with the erythrocyte membrane in immature gametocytes stages (McRobert et al., 2004; Tiburcio et al., 2012). Although the adhesive domain of STEVOR was detected at the erythrocyte surface in asexual stages where it plays a role in rosetting (Niang et al., 2014; Niang et al., 2009; Singh et al., 2017; Wichers et al., 2019), recent immunofluorescence studies convincingly showed that this domain is not exposed at the surface of erythrocytes infected with immature gametocytes (Neveu et al., 2018). At the mature gametocyte stage, STEVOR proteins are no longer detectable at the erythrocyte membrane, probably as a result of conformational changes upon dephosphorylation

(Naissant et al., 2016; Tiburcio et al., 2012) (Figure 1B). Other parasite proteins also probably disappear from the membrane after stage III since recent a report highlighted that antigens exposed at the surface of stage I/II GIE, but not of mature GIE, are recognized by plasma from naturally exposed individuals (Dantzler et al., 2019). This reduced antigen expression may be due to a decreased in protein export in mature stages. Indeed, PTEX components are expressed in stage I/II gametocytes but undergo degradation during further progression of gametocyte maturation, suggesting that protein export mostly occurs in the first stages of gametocytogenesis (Matthews et al., 2013). This hypothesis would be consistent with the development of the Inner Membrane Complex from stage III onwards (Dearnley et al., 2012). Indeed, this system of flattened membrane compartments underneath the gametocyte plasma membrane could represent a major obstacle for proteins to be trafficked to the erythrocyte cytosol. In addition, the reduction of protein exposure may also result from protease activity or release via extracellular vesicles. Since proteins exposed at the surface of immature GIE may be involved in the interactions with the bone marrow parenchyma, their disappearance may contribute to the release of mature GIE in the blood circulation.

Reorganization of the erythrocyte plasma membrane and cytoskeleton

The export of hundreds of parasite proteins to the host cell and the synthesis of novel cellular structures induce a dynamic reorganization of the erythrocyte plasma membrane and of the underlying cytoskeleton. One of the major changes in the plasma membrane of erythrocytes infected with asexual stages is the appearance of thousands of small protrusions at the cell surface termed knobs that act as a scaffold for the presentation of the virulence protein PfEMP1 (Figure 1A) (Crabb et al., 1997; Langreth et al., 1978; Luse and Miller, 1971). Knobs, whose formation depends on the parasite-derived protein KAHRP, consist of an electron-dense ring-shaped structure underpinned by a spiral structure and connected by multiple links to the actin-spectrin meshwork of the erythrocyte membrane skeleton (Figure 1C) (Crabb et al., 1997; Looker et al., 2019). Scanning and transmission electron microscopy analyses revealed that the surface of erythrocytes infected by developing gametocytes from stage II to V are devoid of knobs (Figure 1A) (Sinden, 1982; Tiburcio et al., 2012). In contrast, an early study reported that knobs are present at the surface of stage I GIE (Day et al., 1998). Of note, this study did not benefit

from state-of-the-art tools to distinguish asexual from early sexual stages and rather used standard light microscopy for parasite stages differentiation. More recently, transgenic parasites expressing a fluorescent reporter under a gametocyte-specific promoter allowed separation of stage I gametocytes from asexual trophozoites (Silvestrini et al., 2010). Electron microscopy analysis of purified early gametocytes from this transgenic line established that stage I gametocytes do not modify their surface with knob structures (Tiburcio et al., 2013). The erythrocyte membrane modifications induced by gametocyte development rather occur in the cytoskeleton, with remodeling of both lateral and vertical interactions within the skeleton (Dearnley et al., 2016). As observed in asexual stages (Shi et al., 2013), atomic force microscopy of the cytoplasmic surface of the membrane of mechanically-sheared infected erythrocytes revealed that the length of the spectrin cross-members and the size of the skeletal meshwork increase in developing immature GIE (Figure 1C) (Dearnley et al., 2016). This expansion is accompanied by enhanced coupling of the membrane skeleton to the membrane bilayer in immature stages, as evidenced by an altered lateral mobility of Band 3 monitored by microscope-based photobleaching (Dearnley et al., 2016; Parker et al., 2004). In parallel, erythrocytic actin is relocated from the skeleton to the parasite-derived organelles known as Maurer's Clefts (Dearnley et al., 2016). However, in the absence of knobs, which act as anchoring points for these organelles in asexual stages, actin relocation does not tether Maurer's Clefts onto the erythrocyte membrane in gametocytes, thereby increasing their mobility (Cyrklaff et al., 2011; Dearnley et al., 2016). All these modifications are then reversed in stage V GIE, which exhibit a spectrin length and a Band 3 mobile fraction similar to uninfected erythrocytes (Figure 1C). A composite model predicting the physical consequences of restructuring the skeletal meshwork revealed that these reversible changes are likely linked to the switch in GIE deformability occurring at the transition from immature to mature gametocyte stages (Dearnley et al., 2016; Tiburcio et al., 2012).

Changes in erythrocyte deformability

The profound reorganization of the membrane nanostructure deeply affects the mechanical properties of the infected erythrocyte membrane. During *P. falciparum* asexual development, the infected erythrocyte becomes progressively rigid and the erythrocyte membrane loses its elasticity (Cranston et al., 1984; Nash et al., 1989), in part

due to the export of parasite proteins that interact with the erythrocyte skeleton, including KAHRP, PfEMP3, RESA and STEVOR (Figure 1B and Table 1) (Glenister et al., 2002; Mills et al., 2007; Sanyal et al., 2012). Similar biophysical changes occur during gametocytogenesis: an increase in rigidity is observed upon infection with immature gametocytes from stage I to IV, followed by a switch in deformability at the transition between stage IV and stage V (Aingaran et al., 2012; Dearnley et al., 2012; Tiburcio et al., 2012). Increased stiffness of immature GIE may contribute to their sequestration in the bone marrow parenchyma by mechanical retention, whereas the newly acquired deformability of mature GIE leads to a restored ability to cross narrow apertures and may help them survive in the circulation, where they can be picked up by mosquitoes. The regulation of GIE deformability results from a combination of several factors that are beginning to be elucidated. While it has long been thought that immature GIE stiffness was fully dependent on the gametocyte microtubule skeleton, a study reported that disruption of the microtubule network did not influence immature GIE rigidity (Dearnley et al., 2016). These observations suggest that regulation of GIE deformability mainly results from the parasite-induced modifications of its host erythrocyte rather than from the parasite cytoskeleton. In contrast, treatment of immature GIE with cytochalasin D increased GIE deformability, suggesting an important role of the actin cytoskeleton in the GIE membrane stiffness (Dearnley et al., 2016).

As shown in asexual stages, GIE membrane viscoelasticity is affected by the export of parasite proteins to the erythrocyte membrane skeleton. For instance, modulation of GIE deformability is dependent on presence of the parasite proteins STEVOR at the erythrocyte membrane (Tiburcio et al., 2012) and on the interaction of the cytoplasmic domain of STEVOR with erythrocyte proteins composing the ankyrin complex (spectrin α, spectrin β, ankyrin and Band 3) (Figure 1B) (Naissant et al., 2016). This interaction is dependent on PKA-mediated phosphorylation of the STEVOR cytoplasmic tail and is tightly regulated by the parasite. STEVOR phosphorylation only occurs in immature stages and is due to increased cAMP levels resulting from a low expression of the plasmodial phosphodiesterase δ (PfPDEδ) at this stage. Rising expression of PfPDEδ in mature stages leads to a drop of cAMP levels that reduce the phosphorylation of both STEVORs and their cytoskeletal partner(s) and consequently weaken or abolish their

interactions, eventually resulting in an increase of infected erythrocyte deformability (Naissant et al., 2016; Ramdani et al., 2015). In accordance with the key role of PfPDEδ in this mechanism, the marketed PDE inhibitor sildenafil (Viagra®) increases cAMP concentration in mature GIE and impairs their circulation in an *in vitro* model for splenic retention (Ramdani et al., 2015). In line with these observations, treatment of *P. berghei*-infected mice with sildenafil increases gametocytes homing to sequestration sites, suggesting that PDE inhibitors may cause gametocytes to become mechanically trapped in the bone marrow and splenic cords (De Niz et al., 2018).

Remodeling of adhesives properties

To sequester away from the peripheral circulation, asexual parasites deeply modify the adhesive properties of their host erythrocyte membrane and adhere to the host microvasculature via specific ligand-receptor interactions, primarily mediated by the parasite antigen PfEMP1 (Baruch et al., 1995). This adhesin is anchored on knobs at the surface of infected erythrocytes and binds to host endothelial receptors such as ICAM-1 and CD36 (Figure 1B and 1C) (Miller et al., 2002). Erythrocytes infected with asexual parasites could also adhere to surrounding non-infected erythrocytes through binding of different antigenic variants of the parasite (PfEMP1, STEVOR and RIFIN) to different receptors on the surface of the erythrocyte, leading to rosette formation (Chen et al., 1998; Goel et al., 2015; Niang et al., 2014). Unlike asexual stages, the adhesive properties of the GIE membrane have long been debated and are still elusive. Early studies produced conflicting data on GIE adhesion efficiency and reported low binding of immature GIE, but not of mature stages, to C32 melanoma or bone marrow stromal cell lines (Rogers et al., 1996; Rogers et al., 2000). This conclusion was however not confirmed by another report showing that stage I GIE adhere to CD36-expressing C32 melanoma cells while stage II to V GIE lose their adhesive properties (Day et al., 1998). More recent studies have convincingly shown that immature stage I-IV GIE do not adhere to a panel of endothelial cell lines from various human organs (Silvestrini et al., 2012; Tiburcio et al., 2013). These results are in accordance with the detection of immature gametocytes in extravascular spaces of bone marrow in *ex vivo* and autopsy specimens from malaria-infected patients (Farfour et al., 2012; Joice et al., 2014). The unveiling of the hidden sites for gametocytes maturation led to the hypothesis that they could adhere to non-endothelial bone marrow

cells. Recent work using an *in vitro* tridimensional co-culture system revealed that immature GIE adhere to human bone marrow mesenchymal stem cells via trypsin-sensitive parasite ligands exposed on the erythrocyte surface (Messina et al., 2018). This adhesion induces stimulation of mesenchymal cells to secrete a panel of cytokines and growth factors involved in angiogenesis, thus suggesting a mechanism used by the parasite to remodel the bone marrow endothelium. It has been proposed that the GIE surface proteins GEXP7 and GEXP10, which are able to bind CX3CL1, a chemokine expressed on bone marrow stromal cells, may be involved in this adhesion (Hermand et al., 2016; Messina et al., 2018). However, their insensitivity to trypsin treatment does not support this hypothesis (Dantzler et al., 2019). Although the ligand(s) and receptor(s) promoting such interactions are not identified yet, this mechanism may contribute to immature GIE sequestration in the parenchyma. In contrast, cell-cell adhesion assays with human primary erythroblasts revealed that immature GIE do not specifically adhere to erythroid precursors, despite the fact that some parasite antigens involved in rosetting of asexual stages are expressed by gametocytes and may bind to their receptors present at the surface of erythroblasts (Neveu et al., 2018). The absence of a rosetting-like phenotype in sexual stages is likely due to the reduced levels of PfEMP1 (Tiburcio et al., 2013) and to the failure to detect STEVOR at the surface of immature GIE (Neveu et al., 2018). These observations highlighted that some parasite adhesins may have different role and topology in asexual and sexual stages, which may reflect a strategy that the parasite has evolved to differently modify its host cell to adapt to different microenvironments (Neveu et al., 2018).

Concluding remarks

Recent studies have greatly improved our understanding of how *P. falciparum* gametocytes redecorate the surface of their erythrocyte host with parasite antigens and how they remodel the erythrocyte deformability and adhesive properties. Many questions remain outstanding regarding the sequestration mechanisms of immature gametocytes in the bone marrow parenchyma and how erythrocyte remodeling contributes to these processes. The increase in erythrocyte membrane stiffness and the export of adhesive molecules at the erythrocyte surface may contribute to immature GIE sequestration by mechanical retention and by adhesion to bone marrow cells, respectively. Besides these

mechanisms, the maintenance of immature gametocytes in the bone marrow parenchyma may also be mediated by the infection of erythroblasts constituting the erythroblastic islands. In support of this hypothesis, the development of asexual parasites can take place in a culture of human erythroblasts and immature gametocytes of stages I and II have been observed in these cells (Joice et al., 2014; Tamez et al., 2009). Whether gametocytes can complete their development in erythroblasts and how the parasite remodels these nucleated cells remains to be investigated.

Our current understanding of the host cell remodeling induced by *P. falciparum* gametocytes opens avenues towards the design of novel interventions to interrupt parasite transmission and the spread of malaria, including transmission-blocking drugs targeting GIE mechanical properties and transmission-blocking vaccines targeting GIE surface antigens.

Author Contribution

GN drafted and CL edited the manuscript.

Conflict of Interest Statement

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

Acknowledgments

GN was supported by a labex GR-Ex fellowship. 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. CL and GN acknowledge the financial support from the Cnrs, Inserm and the Fondation pour la Recherche Médicale (“Equipe FRM” grant DEQ20170336722).

References

Aguilar, R., Magallon-Tejada, A., Achtman, A.H., Moraleda, C., Joice, R., Cistero, P., Li Wai Suen, C.S., Nhabomba, A., Macete, E., Mueller, I.*, et al.* (2014). Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. Blood *123*, 959-966.

Aingaran, M., Zhang, R., Law, S.K., Peng, Z., Undisz, A., Meyer, E., Diez-Silva, M., Burke, T.A., Spielmann, T., Lim, C.T.*, et al.* (2012). Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Cell Microbiol *14*, 983-993.

Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldman, M., Taraschi, T.F., and Howard, R.J. (1995). Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. Cell *82*, 77-87.

Chen, Q., Barragan, A., Fernandez, V., Sundstrom, A., Schlichtherle, M., Sahlen, A., Carlson, J., Datta, S., and Wahlgren, M. (1998). Identification of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite P. falciparum. J Exp Med *187*, 15-23.

Counihan, N.A., Chisholm, S.A., Bullen, H.E., Srivastava, A., Sanders, P.R., Jonsdottir, T.K., Weiss, G.E., Ghosh, S., Crabb, B.S., Creek, D.J.*, et al.* (2017). Plasmodium falciparum parasites deploy RhopH2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate. Elife *6*.

Crabb, B.S., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Waller, R.F., Caruana, S.R., Davern, K.M., Wickham, M.E., Brown, G.V., Coppel, R.L., and Cowman, A.F. (1997). Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. Cell *89*, 287-296.

Cranston, H.A., Boylan, C.W., Carroll, G.L., Sutera, S.P., Williamson, J.R., Gluzman, I.Y., and Krogstad, D.J. (1984). Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability. Science *223*, 400-403.

Cyrklaff, M., Sanchez, C.P., Kilian, N., Bisseye, C., Simpore, J., Frischknecht, F., and Lanzer, M. (2011). Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Science *334*, 1283-1286.

Dantzler, K.W., Ma, S., Ngotho, P., Stone, W.J.R., Tao, D., Rijpma, S., De Niz, M., Nilsson Bark, S.K., Jore, M.M., Raaijmakers, T.K.*, et al.* (2019). Naturally acquired immunity against immature Plasmodium falciparum gametocytes. Science translational medicine *11*.

Day, K.P., Hayward, R.E., Smith, D., and Culvenor, J.G. (1998). CD36-dependent adhesion and knob expression of the transmission stages of Plasmodium falciparum is stage specific. Mol Biochem Parasitol *93*, 167-177.

de Koning-Ward, T.F., Gilson, P.R., Boddey, J.A., Rug, M., Smith, B.J., Papenfuss, A.T., Sanders, P.R., Lundie, R.J., Maier, A.G., Cowman, A.F.*, et al.* (2009). A newly discovered protein export machine in malaria parasites. Nature *459*, 945-949.

De Niz, M., Meibalan, E., Mejia, P., Ma, S., Brancucci, N.M.B., Agop-Nersesian, C., Mandt, R., Ngotho, P., Hughes, K.R., Waters, A.P.*, et al.* (2018). Plasmodium gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. Sci Adv *4*, eaat3775.

Dearnley, M., Chu, T., Zhang, Y., Looker, O., Huang, C., Klonis, N., Yeoman, J., Kenny, S., Arora, M., Osborne, J.M.*, et al.* (2016). Reversible host cell remodeling underpins deformability changes in malaria parasite sexual blood stages. Proc Natl Acad Sci U S A *113*, 4800-4805.

Dearnley, M.K., Yeoman, J.A., Hanssen, E., Kenny, S., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Tilley, L., and Dixon, M.W. (2012). Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of Plasmodium falciparum gametocytes. J Cell Sci *125*, 2053-2063.

Duez, J., Holleran, J.P., Ndour, P.A., Loganathan, S., Amireault, P., Francais, O., El Nemer, W., Le Pioufle, B., Amado, I.F., Garcia, S.*, et al.* (2015). Splenic retention of Plasmodium falciparum gametocytes to block the transmission of malaria. Antimicrob Agents Chemother *59*, 4206-4214.

Eksi, S., Haile, Y., Furuya, T., Ma, L., Su, X., and Williamson, K.C. (2005). Identification of a subtelomeric gene family expressed during the asexual-sexual stage transition in Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol *143*, 90-99.

Farfour, E., Charlotte, F., Settegrana, C., Miyara, M., and Buffet, P. (2012). The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for Plasmodium falciparum gametocyte maturation? Malar J *11*, 285.

Fernandez, V., Hommel, M., Chen, Q., Hagblom, P., and Wahlgren, M. (1999). Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte are encoded by the rif gene family and are the target of human immune responses. J Exp Med *190*, 1393-1404.

Glenister, F.K., Coppel, R.L., Cowman, A.F., Mohandas, N., and Cooke, B.M. (2002). Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. Blood *99*, 1060-1063.

Goel, S., Palmkvist, M., Moll, K., Joannin, N., Lara, P., Akhouri, R.R., Moradi, N., Ojemalm, K., Westman, M., Angeletti, D.*, et al.* (2015). RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria. Nat Med *21*, 314-317.

Hawking, F., Wilson, M.E., and Gammage, K. (1971). Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of Plasmodium falciparum. Trans R Soc Trop Med Hyg *65*, 549-559.

Heiber, A., Kruse, F., Pick, C., Gruring, C., Flemming, S., Oberli, A., Schoeler, H., Retzlaff, S., Mesen-Ramirez, P., Hiss, J.A.*, et al.* (2013). Identification of new PNEPs indicates a substantial non-PEXEL exportome and underpins common features in Plasmodium falciparum protein export. PLoS pathogens *9*, e1003546.

Hermand, P., Ciceron, L., Pionneau, C., Vaquero, C., Combadiere, C., and Deterre, P. (2016). Plasmodium falciparum proteins involved in cytoadherence of infected erythrocytes to chemokine CX3CL1. Sci Rep *6*, 33786.

Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C., and Haldar, K. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. Science *306*, 1934-1937.

Ingmundson, A., Alano, P., Matuschewski, K., and Silvestrini, F. (2014). Feeling at home from arrival to departure: protein export and host cell remodelling during Plasmodium liver stage and gametocyte maturation. Cell Microbiol *16*, 324-333.

Ito, D., Schureck, M.A., and Desai, S.A. (2017). An essential dual-function complex mediates erythrocyte invasion and channel-mediated nutrient uptake in malaria parasites. Elife *6*.

Joice, R., Nilsson, S.K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K.B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K.C.*, et al.* (2014). Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. Science translational medicine *6*, 244re245.

Kyes, S.A., Rowe, J.A., Kriek, N., and Newbold, C.I. (1999). Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with Plasmodium falciparum. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 9333-9338.

Langreth, S.G., Jensen, J.B., Reese, R.T., and Trager, W. (1978). Fine structure of human malaria in vitro. J Protozool *25*, 443-452.

Looker, O., Blanch, A.J., Liu, B., Nunez-Iglesias, J., McMillan, P.J., Tilley, L., and Dixon, M.W.A. (2019). The knob protein KAHRP assembles into a ring-shaped structure that underpins virulence complex assembly. PLoS pathogens *15*, e1007761.

Luse, S.A., and Miller, L.H. (1971). Plasmodium falciparum malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. Am J Trop Med Hyg *20*, 655-660.

Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E., and Cowman, A.F. (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. Science *306*, 1930-1933.

Matthews, K., Kalanon, M., Chisholm, S.A., Sturm, A., Goodman, C.D., Dixon, M.W., Sanders, P.R., Nebl, T., Fraser, F., Haase, S.*, et al.* (2013). The Plasmodium translocon of exported proteins (PTEX) component thioredoxin-2 is important for maintaining normal blood-stage growth. Mol Microbiol *89*, 1167-1186.

McRobert, L., Preiser, P., Sharp, S., Jarra, W., Kaviratne, M., Taylor, M.C., Renia, L., and Sutherland, C.J. (2004). Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the Plasmodium falciparum life cycle. Infect Immun *72*, 6597-6602.

Messina, V., Valtieri, M., Rubio, M., Falchi, M., Mancini, F., Mayor, A., Alano, P., and Silvestrini, F. (2018). Gametocytes of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum Interact With and Stimulate Bone Marrow Mesenchymal Cells to Secrete Angiogenetic Factors. Front Cell Infect Microbiol *8*, 50.

Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., and Doumbo, O.K. (2002). The pathogenic basis of malaria. Nature *415*, 673-679.

Mills, J.P., Diez-Silva, M., Quinn, D.J., Dao, M., Lang, M.J., Tan, K.S., Lim, C.T., Milon, G., David, P.H., Mercereau-Puijalon, O.*, et al.* (2007). 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.

Morahan, B.J., Strobel, C., Hasan, U., Czesny, B., Mantel, P.Y., Marti, M., Eksi, S., and Williamson, K.C. (2011). Functional analysis of the exported type IV HSP40 protein PfGECO in Plasmodium falciparum gametocytes. Eukaryot Cell *10*, 1492-1503.

Naissant, B., Dupuy, F., Duffier, Y., Lorthiois, A., Duez, J., Scholz, J., Buffet, P., Merckx, A., Bachmann, A., and Lavazec, C. (2016). Plasmodium falciparum STEVOR phosphorylation regulates host erythrocyte deformability enabling malaria parasite transmission. Blood *127*, e42-53.

Nash, G.B., O'Brien, E., Gordon-Smith, E.C., and Dormandy, J.A. (1989). Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by *Plasmodium falciparum*. Blood *74*, 855-861.

Neveu, G., Dupuy, F., Ladli, M., Barbieri, D., Naissant, B., Richard, C., Martins, R.M., Lopez-Rubio, J.J., Bachmann, A., Verdier, F.*, et al.* (2018). Plasmodium falciparum gametocyte-infected erythrocytes do not adhere to human primary erythroblasts. Sci Rep *8*, 17886.

Niang, M., Bei, A.K., Madnani, K.G., Pelly, S., Dankwa, S., Kanjee, U., Gunalan, K., Amaladoss, A., Yeo, K.P., Bob, N.S.*, et al.* (2014). STEVOR is a Plasmodium falciparum erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. Cell host & microbe *16*, 81-93.

Niang, M., Yan Yam, X., and Preiser, P.R. (2009). The *Plasmodium falciparum* STEVOR multigene family mediates antigenic variation of the infected erythrocyte. PLoS pathogens *5*, e1000307.

Oberli, A., Zurbrugg, L., Rusch, S., Brand, F., Butler, M.E., Day, J.L., Cutts, E.E., Lavstsen, T., Vakonakis, I., and Beck, H.P. (2016). Plasmodium falciparum Plasmodium helical interspersed subtelomeric proteins contribute to cytoadherence and anchor P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 to the host cell cytoskeleton. Cell Microbiol *18*, 1415-1428.

Parish, L.A., Mai, D.W., Jones, M.L., Kitson, E.L., and Rayner, J.C. (2013). A member of the Plasmodium falciparum PHIST family binds to the erythrocyte cytoskeleton component band 4.1. Malar J *12*, 160.

Parker, P.D., Tilley, L., and Klonis, N. (2004). Plasmodium falciparum induces reorganization of host membrane proteins during intraerythrocytic growth. Blood *103*, 2404-2406.

Pei, X., Guo, X., Coppel, R., Bhattacharjee, S., Haldar, K., Gratzer, W., Mohandas, N., and An, X. (2007). The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of Plasmodium falciparum stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion. Blood *110*, 1036-1042.

Petter, M., Bonow, I., and Klinkert, M.Q. (2008). Diverse expression patterns of subgroups of the rif multigene family during Plasmodium falciparum gametocytogenesis. PLoS One *3*, e3779.

Ramdani, G., Naissant, B., Thompson, E., Breil, F., Lorthiois, A., Dupuy, F., Cummings, R., Duffier, Y., Corbett, Y., Mercereau-Puijalon, O.*, et al.* (2015). cAMP-Signalling Regulates Gametocyte-Infected Erythrocyte Deformability Required for Malaria Parasite Transmission. PLoS pathogens *11*, e1004815.

Rogers, N.J., Daramola, O., Targett, G.A., and Hall, B.S. (1996). CD36 and intercellular adhesion molecule 1 mediate adhesion of developing Plasmodium falciparum gametocytes. Infect Immun *64*, 1480-1483.

Rogers, N.J., Hall, B.S., Obiero, J., Targett, G.A., and Sutherland, C.J. (2000). A model for sequestration of the transmission stages of Plasmodium falciparum: adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. Infect Immun *68*, 3455-3462.

Sanyal, S., Egee, S., Bouyer, G., Perrot, S., Safeukui, I., Bischoff, E., Buffet, P., Deitsch, K.W., Mercereau-Puijalon, O., David, P.H.*, et al.* (2012). Plasmodium falciparum STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties. Blood *119*, e1-8.

Scherf, A., Carter, R., Petersen, C., Alano, P., Nelson, R., Aikawa, M., Mattei, D., Pereira da Silva, L., and Leech, J. (1992). Gene inactivation of Pf11-1 of Plasmodium falciparum by chromosome breakage and healing: identification of a gametocyte-specific protein with a potential role in gametogenesis. EMBO J *11*, 2293-2301.

Sherling, E.S., Knuepfer, E., Brzostowski, J.A., Miller, L.H., Blackman, M.J., and van Ooij, C. (2017). The Plasmodium falciparum rhoptry protein RhopH3 plays essential roles in host cell invasion and nutrient uptake. Elife *6*.

Shi, H., Liu, Z., Li, A., Yin, J., Chong, A.G., Tan, K.S., Zhang, Y., and Lim, C.T. (2013). Life cycle-dependent cytoskeletal modifications in Plasmodium falciparum infected erythrocytes. PLoS One *8*, e61170.

Silvestrini, F., Lasonder, E., Olivieri, A., Camarda, G., van Schaijk, B., Sanchez, M., Younis Younis, S., Sauerwein, R., and Alano, P. (2010). Protein export marks the early phase of gametocytogenesis of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Mol Cell Proteomics *9*, 1437-1448.

Silvestrini, F., Tiburcio, M., Bertuccini, L., and Alano, P. (2012). Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of Plasmodium falciparum on human endothelial cells are tissue independent. PLoS One *7*, e31567.

Sinden, R.E. (1982). Gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in vitro: an electron microscopic study. Parasitology *84*, 1-11.

Singh, H., Madnani, K., Lim, Y.B., Cao, J., Preiser, P.R., and Lim, C.T. (2017). Expression dynamics and physiologically relevant functional study of STEVOR in asexual stages of Plasmodium falciparum infection. Cell Microbiol *19*.

Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., Roberts, D.J., Hudson-Taylor, D.E., Peterson, D.S., Pinches, R., Newbold, C.I., and Miller, L.H. (1995). Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. Cell *82*, 101-110.

Tamez, P.A., Liu, H., Fernandez-Pol, S., Haldar, K., and Wickrema, A. (2009). Stage-specific susceptibility of human erythroblasts to Plasmodium falciparum malaria infection. Blood *114*, 3652-3655.

Tiburcio, M., Dixon, M.W., Looker, O., Younis, S.Y., Tilley, L., and Alano, P. (2015). Specific expression and export of the Plasmodium falciparum Gametocyte EXported Protein-5 marks the gametocyte ring stage. Malar J *14*, 334.

Tiburcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P.A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P.H.*, et al.* (2012). A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. Blood *119*, e172-180.

Tiburcio, M., Silvestrini, F., Bertuccini, L., Sander, A., Turner, L., Lavstsen, T., and Alano, P. (2013). Early gametocytes of the malaria parasite Plasmodium falciparum specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. Cell Microbiol.

Wang, C.W., Mwakalinga, S.B., Sutherland, C.J., Schwank, S., Sharp, S., Hermsen, C.C., Sauerwein, R.W., Theander, T.G., and Lavstsen, T. (2010). Identification of a major rif transcript common to gametocytes and sporozoites of Plasmodium falciparum. Malar J *9*, 147.

Warncke, J.D., Vakonakis, I., and Beck, H.P. (2016). Plasmodium Helical Interspersed Subtelomeric (PHIST) Proteins, at the Center of Host Cell Remodeling. Microbiol Mol Biol Rev *80*, 905-927.

Wichers, J.S., Scholz, J.A.M., Strauss, J., Witt, S., Lill, A., Ehnold, L.I., Neupert, N., Liffner, B., Luhken, R., Petter, M.*, et al.* (2019). Dissecting the Gene Expression, Localization, Membrane Topology, and Function of the Plasmodium falciparum STEVOR Protein Family. MBio *10*.

Figures and legends

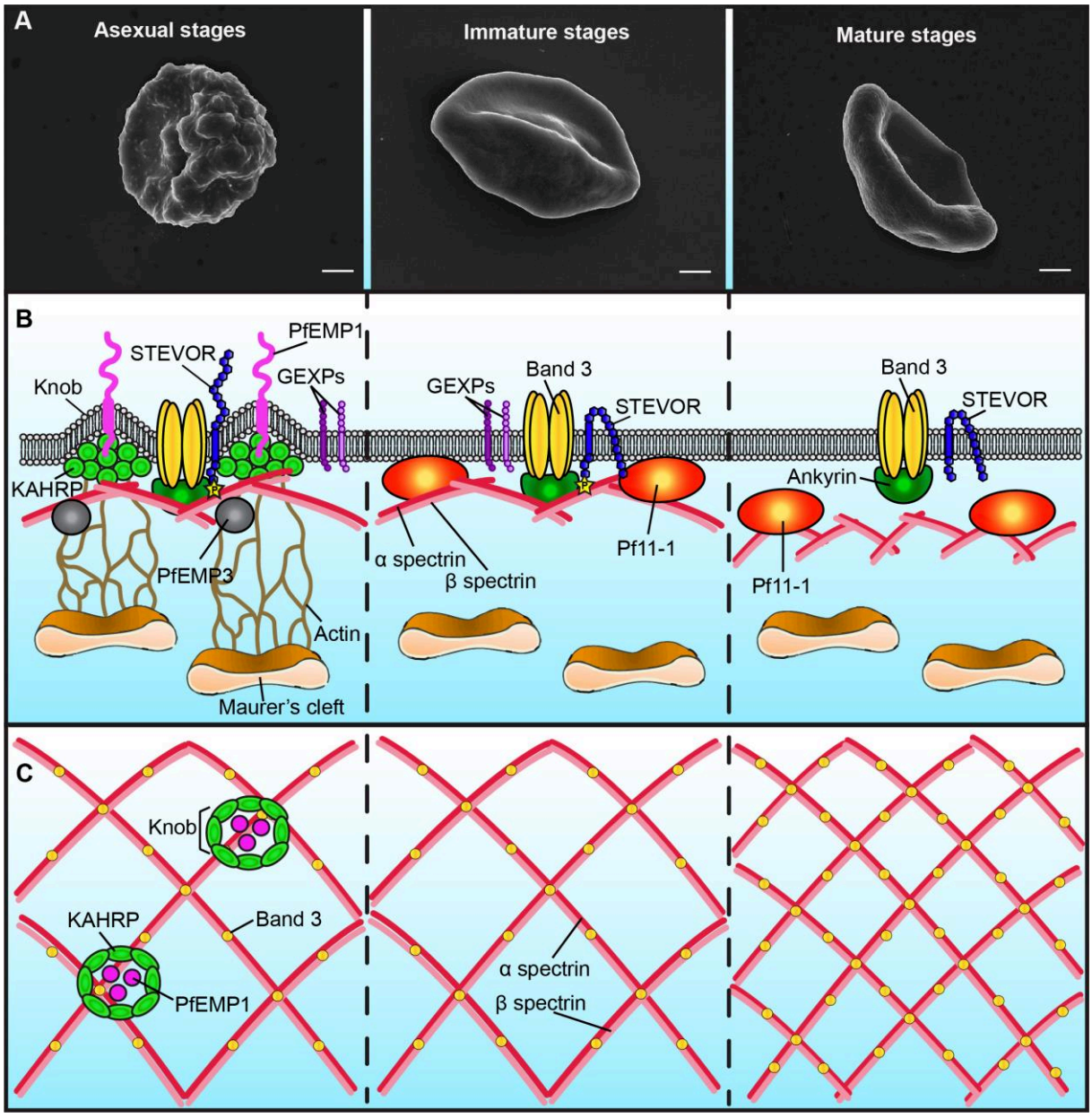


Figure 1. Schematic representation of the plasma membrane and cytoskeleton of *P. falciparum*-infected erythrocytes. Only major differences between different parasite stages are shown.

A. Scanning electron microscopy images showing the presence of knobs at the membrane of erythrocytes infected with asexual stages (left panel), but not with gametocytes (middle and right panels). Bars represent 1µm.

B. Schematic representation of the infected-erythrocyte membrane. Left panel: During asexual stages the membrane of infected erythrocytes presents knobs formed by the parasite protein KAHRP. Knobs act as a scaffold for the presentation of PfEMP1 and are connected by actin filaments to the Maurer's clefts. PfEMP3 and STEVOR interact with the spectrin network. The N-terminal domain of STEVOR is exposed at the host cell surface and the C-terminal domain is phosphorylated and linked to the ankyrin complex. GEXPs are exposed at the infected erythrocyte surface of both asexual and gametocyte stages. Middle panel: During immature gametocyte stages, knobs, PfEMP1 and KAHRP are absent from the membrane. The gametocyte-specific protein Pf11-1 is associated to the membrane. Maurer's clefts are not tethered to the membrane by actin. The N-terminal domain of STEVOR is localized at the cytoplasmic face of the infected cell. Right panel: During the mature gametocyte stage, STEVOR is dephosphorylated and its association with the ankyrin complex is abolished. GEXPs are absent from the infected erythrocyte surface. The level of coupling between the membrane skeleton and the plasma membrane decreases.

C. Schematic representation of the spectrin meshwork in different parasite stages. During asexual and immature gametocyte stages the length of the spectrin cross-members and the size of the skeletal meshwork are expanded (left and middle panels). Deformable mature GIE exhibit a reduced spectrin meshwork size comparable to that in uninfected erythrocytes (right panel).

Protein	Localization	Stage	Role in erythrocyte remodeling	References
RESA	erythrocyte skeleton	asexual & sexual	stabilization of the erythrocyte skeleton	*(Pei et al., 2007)*
RhopH	erythrocyte membrane	asexual	New Permeability Pathway	*(Counihan et al., 2017; Ito et al., 2017; Sherling et al., 2017)*
Pf11-1	erythrocyte cytosol & skeleton	sexual	unknown	*(Scherf et al., 1992)*
Pfg14.744	erythrocyte cytosol	sexual	unknown	*(Eksi et al., 2005)*
PfGECO (PfGEXP1)	erythrocyte cytosol	sexual	unknown	*(Morahan et al., 2011)*
PfGEXP5	erythrocyte cytosol	sexual	unknown	*(Tiburcio et al., 2015)*
PfGEXP10	erythrocyte surface	asexual & sexual	antigenic exposure, adhesion	*(Dantzler et al., 2019; Hermand et al., 2016; Silvestrini et al., 2010)*
PfGEXP7	erythrocyte surface	asexual & sexual	antigenic exposure, adhesion	*(Dantzler et al., 2019; Hermand et al., 2016; Silvestrini et al., 2010)*
KAHRP	erythrocyte skeleton	asexual	deformability, knobs formation	*(Crabb et al., 1997; Glenister et al., 2002; Looker et al., 2019)*
PfEMP1	MC, erythrocyte surface	asexual	adhesion, antigenic variation	*(Baruch et al., 1995; Chen et al., 1998)*
STEVOR	MC, erythrocyte membrane and surface	asexual & sexual	adhesion, deformability, antigenic variation	*(Naissant et al., 2016; Neveu et al., 2018; Niang et al., 2014; Niang et al., 2009; Sanyal et al., 2012; Tiburcio et al., 2012; Wichers et al., 2019)*
RIFIN	MC, erythrocyte membrane and surface	asexual & sexual	adhesion, immune evasion, antigenic variation	*(Fernandez et al., 1999; Goel et al., 2015; Kyes et al., 1999)*
PfEMP3	MC, erythrocyte skeleton	asexual	deformability	*(Glenister et al., 2002)*

Table 1. Parasite proteins involved in erythrocyte membrane makeover.

Localization, expression at asexual or sexual stages and involvement in erythrocyte remodeling are indicated with corresponding references. MC: Maurer's Clefts.

II. Manuscrit: Activation of erythrocyte permeability enhances drug uptake by malaria sexual parasites

Activation of erythrocyte permeability enhances drug uptake by malaria sexual parasites

Guillaume Bouyer*[1,2], Daniela Barbieri*[2,3], Florian Dupuy[2,3], Anthony Marteau[2,3], Abdoulaye Sissoko[2,4], Marie-Esther N'Dri[2,3], Gaelle Neveu[2,3], Laurianne Bedault[2,3], Diana Roman[2,4], Sandrine Houzé[2,4], Giulia Siciliano[5], Pietro Alano[5], Rafael M. Martins[6], Jose-Juan Lopez-Rubio[6], Jérome Clain[2,4], Romain Duval[2,4], Stéphane Egée #[1,2], Catherine Lavazec #[2,3]

[1] Sorbonne Université, CNRS UMR 8227, Station Biologique de Roscoff, France

[2] Laboratoire d'excellence GR-Ex, France

[3] Université de Paris, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, France

[4] Université de Paris, IRD 261, MERIT, France

[5] Istituto Superiore di Sanita, Roma, Italy

[6] Université de Montpellier 1 & 2, CNRS 5290, IRD 224, MIVEGEC, France

* contributed equally to this work

# contributed equally to this work

Correspondence to: catherine.lavazec@inserm.fr

Most antimalarials, including the actual reference drug artemisinin and its derivatives, have been selected on the basis of activity against the pathogenic asexual stages of *Plasmodium falciparum*, but they are less effective against the sexual stages, called gametocytes, which ensure transmission to mosquitoes[1,2]. As a consequence, infected individuals constitute a reservoir for propagation even after complete cure. It remains unclear why gametocytes become less sensitive to artemisinin as their maturation progresses from stage I to stage V[3,4]. It has been known for long that *P. falciparum* asexual stages render infected erythrocytes more permeable to a range of nutrients[5,6] and to several antimalarials[7-10] by generating New Permeability Pathways (NPP) through weakly selective anion channels activated in the erythrocyte membrane. However, the role of NPP in artemisinin uptake is unknown, and NPP activity has never been detected in gametocyte-infected erythrocytes (GIE). Here, we show that NPP are still active in erythrocytes infected with immature gametocytes and that this activity declines along gametocyte maturation. Our results indicate that NPP contribute to the uptake of artemisinin derivatives by immature stages and suggest that the slowdown of NPP activity in mature stages may account for their refractoriness to these drugs. Importantly, we found that NPP are regulated by cyclic AMP (cAMP) signaling, and that activation of this pathway with phosphodiesterase (PDE) inhibitors can reactivate NPP and restore uptake of artemisinin derivatives by mature gametocytes. These processes are predicted to play a key role in *P. falciparum* gametocytes susceptibility to antimalarials and are proposed to represent novel route to target parasite transmission.

Refractoriness of gametocytes to lysis upon short exposition to isosmotic sorbitol solution has led to the dogma that NPP are totally absent in gametocyte stages[11]. However, this hypothesis is not supported by recent RNA sequencing analyzes highlighting that sexually-committed parasites show higher transcription of *RhopH* and *clag* genes[12], whose products are involved in NPP activity[13-15]. To evaluate the NPP activity in gametocytes, we first performed measurements of isosmotic lysis in sorbitol, a sugar alcohol permeant through NPP[6]. Sorbitol uptake was drastically reduced in stage II GIE compared to asexual stages, however about 36% GIE were lysed after 60 minutes in

sorbitol, suggesting that erythrocyte permeability is modified by immature gametocytes (Fig. 1a). GIE lysis was significantly inhibited by the general anion channel inhibitors 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) and furosemide, and by the benzodiazepines Ro5-4864 and PK11195, which have all been shown to inhibit NPP (Fig. 1b)[16,17]. Equivalent lysis kinetics observed in alanine or phenyltrimethylammonium ($PhTMA^+$) isosmotic solutions, with a slightly greater lysis in $PhTMA^+$ than in sorbitol, confirmed that uptake occurred through NPP (Fig. 1c). Measurement of membrane currents using whole-cell patch-clamp strengthened observations obtained with isosmotic lysis. Quantification of total ion fluxes across the host membrane of individual infected erythrocytes indicated that membrane conductance at -100 mV was 6-fold lower in stage II GIE than in asexual stages (Fig. 1d). However, conductance in early GIE showed anion selectivity, inward rectification and NPPB sensitivity (Fig. 1e), which are three fundamental characteristics of the correlate membrane currents of NPP activity[18]. Pharmacological inhibition of NPP is expected to lead to nutrient starvation and accumulation of toxic metabolic wastes eventually leading to parasite death. Thus, we measured viability of early gametocytes (stages I-II) upon NPP inhibition by using a luciferase-based assay with a transgenic parasite expressing luciferase under the control of the gametocyte-specific promoter *Pfs16*[19]. We observed a significant decrease in early gametocytes viability 48 hours after a 3 hours exposure to 100 µM NPPB, consistent with a vital role of NPP activity (Fig. 1f). Therefore, organic solute uptake, patch-clamp and viability studies indicate that NPP are weaker than in asexual stages but are still active and necessary in immature GIE. To further analyze the evolution of this permeability along gametocytogenesis, we performed isosmotic lysis experiments in sorbitol, alanine and $PhTMA^+$ for synchronous cultures of stage I, II, III, IV, and V gametocytes (Fig. 1g and Extended Data Fig. 2). A transgenic parasite expressing GFP under the control of the *Pfs16* promoter was used to discriminate stage I gametocytes from asexual stages (Extended Data Fig. 3). From stage I to stage V, we observed a progressive decrease in permeability for the three different solutes, leading to undetectable NPP activity in mature GIE. Electrophysiological experiments using whole cell configuration performed on GIE from all stages confirmed that membrane conductance declines along gametocyte maturation, leading to currents

in mature GIE corresponding to levels usually recorded in uninfected erythrocytes (Fig. 1h and Extended Data Fig.1).

Interestingly, the decline in NPP activity during gametocytogenesis parallels the decrease in gametocytes sensitivity to several antimalarials[1,3], suggesting that NPP may contribute to the uptake of these drugs. To determine whether artemisinin derivatives require NPP-mediated uptake to reach the gametocyte, we used Fluo-DHA, a fluorescent probe mimicking the clinical antimalarials dihydroartemisinin (DHA) and artemether[20]. The Fluo-DHA probe was synthesized from DHA and a 4-nitrobenzoxadiazole (NBD) fluorophore (Fig. 2a). First we validated that Fluo-DHA was detectable in the gametocyte cytoplasm after 2 hours incubation (Fig. 2b) and exhibited antiplasmodial activity against early gametocytes as assessed by a luciferase-based viability assay (Fig. 2c). Flow cytometry quantification showed that Fluo-DHA was embeded by about 80% of stage II GIE, whereas uninfected erythrocytes were all negative (Fig. 2d, 2e and Extended Data Fig. 4). The pharmacological specificity of this probe was validated by a competition assay with an excess of DHA (Fig. 2f). Importantly, pre-incubation with the NPP inhibitors NPPB and furosemide induced a significant decrease in the proportion of positive cells, indicating that Fluo-DHA uptake is partly mediated by NPP in early GIE (Fig. 2g). About 40% cells remained fluorescent upon NPPB treatment, suggesting that Fluo-DHA uptake may also partly occur by diffusion through the erythrocyte membrane or by another route. As observed for the decline in NPP activity during gametocyte maturation, the proportion of Fluo-DHA-positive GIE slowed down in stage III and reached the same level that of NPPB-treated cells in mature GIE (Fig. 2h). This profile correlates with the previously described chemosensitivity shift occurring at the transition from stage III to stage IV[3,21]. The role of NPP in drug uptake was confirmed by showing that the viability at 48 hours of early GIE following a 3-hours pulse exposure to 150 nM Fluo-DHA or 5 µM artemisinin was significantly increased upon pre-incubation with NPPB, suggesting that NPP inhibition impacts the transport of these antimalarials into the infected erythrocytes (Fig. 2i and 2j). Altogether, these results indicate that NPP contribute to the uptake of artemisinin derivatives.

These observations substantiate the idea that the slowdown of NPP activity in mature stages accounts for their refractoriness to artemisinin and its derivatives. Thus, we hypothesized that a reactivation of NPP activity in mature GIE may increase their susceptibility to these drugs. However, a range of NPP inhibitors has been described[22], but no molecule capable of activating these channels has been identified to date. Even though key proteins involved in the NPP have been characterized, like CLAG3, RhopH1 and RhopH2 or constituent of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR)[13-16], the full identity of the NPP has never been conclusively established and their regulatory mechanisms remain unclear[23]. Interestingly, we have previously observed that cAMP/PKA pathway regulates ion channels in the membrane of erythrocytes infected with asexual stages[24]. To address whether cAMP-signaling also modulates NPP during gametocytes stages, we performed sorbitol lysis experiments on early GIE pre-incubated with KT5720 and H89, two independent and widely used PKA inhibitors that have already been shown to inhibit PKA activity in *P. falciparum*[25,26]. We found that both compounds strongly ablated GIE permeability (Fig. 3a), whereas the cAMP analogue 8-Bromide-cyclic adenosine-monophosphate (8Br-cAMP) significantly increased the sorbitol-induced lysis (Fig. 3b). As an alternative way to investigate the effects of inhibiting PKA activity, we used a transgenic parasite that overexpresses the regulatory subunit of PKA using an episome selected by the antimalarial drug pyrimethamine (pHL*pfpkar*)[24,26]. The down-regulation of PKA activity in this parasite line also resulted in a significant decrease in permeability of early GIE (Fig. 3c). This phenotype was reverted to the levels of wild-type parasites upon incubation with 8Br-cAMP, or in a revertant parasite line that has shed the overexpressing episome[26] (Fig. 3c). We observed a similar inhibition of alanine- or $PhTMA^+$-induced isosmotic lysis of stage II GIE for the pHL*pfpkar* line (Extended Data Fig. 5). These results indicate that PKA activity contributes to NPP in immature GIE, as described for asexual stages[24]. In a previous study we have reported that cAMP concentration in GIE decreases during gametocytogenesis due to the rising expression of PfPDEδ in mature GIE[26]. In addition, we showed that PDE inhibitors raising cAMP levels in stage V GIE impact infected erythrocyte deformability[26]. Combined with our present results, these observations suggest that interfering with cAMP pathway in mature GIE may turn on NPP activity. As expected, raising cAMP levels in mature GIE upon incubation with 8Br-cAMP or with the

PDE inhibitors sildenafil and tadalafil restored the sorbitol-induced lysis to the levels observed in early GIE (Fig. 3d, 3e and Extended Data Fig. 6). Consistently, the loss of PDE activity in a transgenic parasite in which the *Pfpdeδ* gene had been deleted[27] also resulted in a drastic increase in permeability of mature GIE (Fig. 3f and Extended Data Fig. 5). These findings show that activating the cAMP/PKA pathway can reactivate NPP in mature stages.

Next, we analyzed whether cAMP-signaling also regulates the uptake of artemisinin derivatives. In early GIE, we observed that both pharmacological and genetic inhibition of PKA activity decreased the proportion of Fluo-DHA-positive cells (Fig. 4a and 4b). Moreover, PKA inhibition upon pre-incubation with H89 renders early GIE less susceptible to artemisinin (Fig. 4c), suggesting that cAMP-signaling regulates the uptake of this drug by immature GIE. Then, we addressed whether activating the cAMP/PKA pathway in stage V GIE may enhance drug uptake. Pre-incubation of mature GIE with the PDE inhibitors sildenafil and tadalafil strongly increased the proportion of Fluo-DHA-positive cells, reaching the level observed in early GIE (Fig. 4d and Extended Data Fig.7). To investigate the gametocytocidal effect of combining PDE inhibitors and artemisinin, we performed a gamete egress assay based on the ability of functionally viable mature gametocytes to undergo a temperature-dependent release of gametes from their host erythrocytes. We observed that the incubation of mature GIE with a combination of 5 µM artemisinin and 30 µM tadalafil drastically reduced the proportion of egressed gametes compared to tadalafil or artemisinin alone, indicating that phosphodiesterase inhibitors potentiate the effect of artemisinin in mature gametocytes (Fig. 4e).

Altogether these results show for the first time that the regulation of infected erythrocyte permeability plays a key role in gametocyte biology and chemosensitivity. We demonstrated that re-activation of NPP with drugs that raise cAMP levels enhances artemisinin uptake by mature gametocytes, thereby abolishing their refractoriness to this antimalarial. As PDE inhibitors render mature GIE rigid and hence may promote their clearance by the spleen[26], they represent novel drug leads potentially capable of blocking malaria transmission by impacting on both gametocytes circulation and susceptibility to artemisinin derivatives.

References

1 Plouffe, D. M. *et al.* High-Throughput Assay and Discovery of Small Molecules that Interrupt Malaria Transmission. *Cell Host Microbe* **19**, 114-126, doi:10.1016/j.chom.2015.12.001 (2016).

2 Birkholtz, L. M., Coetzer, T. L., Mancama, D., Leroy, D. & Alano, P. Discovering New Transmission-Blocking Antimalarial Compounds: Challenges and Opportunities. *Trends Parasitol* **32**, 669-681, doi:10.1016/j.pt.2016.04.017 (2016).

3 Lucantoni, L., Fidock, D. A. & Avery, V. M. Luciferase-Based, High-Throughput Assay for Screening and Profiling Transmission-Blocking Compounds against Plasmodium falciparum Gametocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **60**, 2097-2107, doi:10.1128/AAC.01949-15 (2016).

4 Delves, M. J., Angrisano, F. & Blagborough, A. M. Antimalarial Transmission-Blocking Interventions: Past, Present, and Future. *Trends Parasitol* **34**, 735-746, doi:10.1016/j.pt.2018.07.001 (2018).

5 Desai, S. A., Bezrukov, S. M. & Zimmerberg, J. A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* **406**, 1001-1005, doi:10.1038/35023000 (2000).

6 Ginsburg, H., Krugliak, M., Eidelman, O. & Cabantchik, Z. I. New permeability pathways induced in membranes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* **8**, 177-190 (1983).

7 Baumeister, S. *et al.* Fosmidomycin uptake into Plasmodium and Babesia-infected erythrocytes is facilitated by parasite-induced new permeability pathways. *PLoS One* **6**, e19334, doi:10.1371/journal.pone.0019334 (2011).

8 Biagini, G. A. *et al.* Heme binding contributes to antimalarial activity of bis-quaternary ammoniums. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2584-2589 (2003).

9 Dana, S. *et al.* Potent antimalarial activity of acriflavine in vitro and in vivo. *ACS Chem Biol* **9**, 2366-2373, doi:10.1021/cb500476q (2014).

10 Stead, A. M. *et al.* Diamidine compounds: selective uptake and targeting in Plasmodium falciparum. *Mol Pharmacol* **59**, 1298-1306 (2001).

11 Saul, A., Graves, P. & Edser, L. Refractoriness of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum gametocytes to lysis by sorbitol. *Int J Parasitol* **20**, 1095-1097 (1990).

12 Brancucci, N. M. B. *et al.* Probing Plasmodium falciparum sexual commitment at the single-cell level. *Wellcome Open Res* **3**, 70, doi:10.12688/wellcomeopenres.14645.4 (2018).

13 Counihan, N. A. *et al.* Plasmodium falciparum parasites deploy RhopH2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.23217 (2017).

14 Nguitragool, W. *et al.* Malaria parasite clag3 genes determine channel-mediated nutrient uptake by infected red blood cells. *Cell* **145**, 665-677, doi:10.1016/j.cell.2011.05.002 (2011).

15 Sherling, E. S. *et al.* The Plasmodium falciparum rhoptry protein RhopH3 plays essential roles in host cell invasion and nutrient uptake. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.23239 (2017).

16 Bouyer, G. *et al.* Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by Plasmodium falciparum. *Blood* **118**, 2305-2312, doi:10.1182/blood-2011-01-329300 (2011).

17 Kirk, K., Horner, H. A., Elford, B. C., Ellory, J. C. & Newbold, C. I. Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J Biol Chem* **269**, 3339-3347 (1994).

18 Staines, H. M. *et al.* Electrophysiological studies of malaria parasite-infected erythrocytes: current status. *Int J Parasitol* **37**, 475-482, doi:10.1016/j.ijpara.2006.12.013 (2007).

19 Cevenini, L. *et al.* Multicolor bioluminescence boosts malaria research: quantitative dual-color assay and single-cell imaging in Plasmodium falciparum parasites. *Anal Chem* **86**, 8814-8821, doi:10.1021/ac502098w (2014).

20 Sissoko, A. *et al.* A chemically-stable fluorescent mimic of dihydroartemisinin, artemether and arteether with conserved biological activity and specificity shows high mechanistic relevance to the clinical antimalarial drugs. (submitted).

21 Wang, Z. *et al.* A flow cytometry-based quantitative drug sensitivity assay for all Plasmodium falciparum gametocyte stages. *PLoS One* **9**, e93825, doi:10.1371/journal.pone.0093825 (2014).

22 Pillai, A. D., Pain, M., Solomon, T., Bokhari, A. A. & Desai, S. A. A cell-based high-throughput screen validates the plasmodial surface anion channel as an antimalarial target. *Mol Pharmacol* **77**, 724-733, doi:10.1124/mol.109.062711 (2010).

23 Gilson, P. R., Chisholm, S. A., Crabb, B. S. & de Koning-Ward, T. F. Host cell remodelling in malaria parasites: a new pool of potential drug targets. *Int J Parasitol* **47**, 119-127, doi:10.1016/j.ijpara.2016.06.001 (2017).

24 Merckx, A. *et al.* Plasmodium falciparum regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog* **4**, e19, doi:10.1371/journal.ppat.0040019 (2008).

25 Leykauf, K. *et al.* Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. *PLoS Pathog* **6**, e1000941, doi:10.1371/journal.ppat.1000941 (2010).

26 Ramdani, G. *et al.* cAMP-Signalling Regulates Gametocyte-Infected Erythrocyte Deformability Required for Malaria Parasite Transmission. *PLoS pathogens* **11**, e1004815, doi:10.1371/journal.ppat.1004815 (2015).

27 Taylor, C. J., McRobert, L. & Baker, D. A. Disruption of a Plasmodium falciparum cyclic nucleotide phosphodiesterase gene causes aberrant gametogenesis. *Mol Microbiol* **69**, 110-118, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06267.x (2008).

Acknowledgements

The authors thank D. Baker (LSHTM) for providing the PfPDEδ^{-} line. The authors acknowledge the Flow Cytometry core facility CYBIO of the Institut Cochin for technical help. This study was supported by grants from Laboratory of Excellence GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051. The labex GR-Ex is funded by the IdEx program “Investissements d’avenir” of the French National Research Agency, reference ANR-18-IDEX-0001. CL, DB, FD, AM, MEN, GN, and LB acknowledge the financial support from the Cnrs, Inserm and the Fondation pour la Recherche Médicale (“Equipe FRM” grant EQ20170336722).

Author contributions

G.B., S.E. and C.L. conceived the project. G.B., D.B., J.C., R.D., S.E. and C.L. designed and interpreted the experiments. G.B., D.B., F.D., A.M., A.S., M-E.N., G.N., L.B., D.R. and C.L. performed the experiments. S.H., G.S., P.A., R.M.M., J-J.L-R. and R.D. contributed resources or data. C.L. wrote the article, with major input from G.B., J.C., R.D. and S.E.

Declaration of Interests

The authors declare no competing interests.

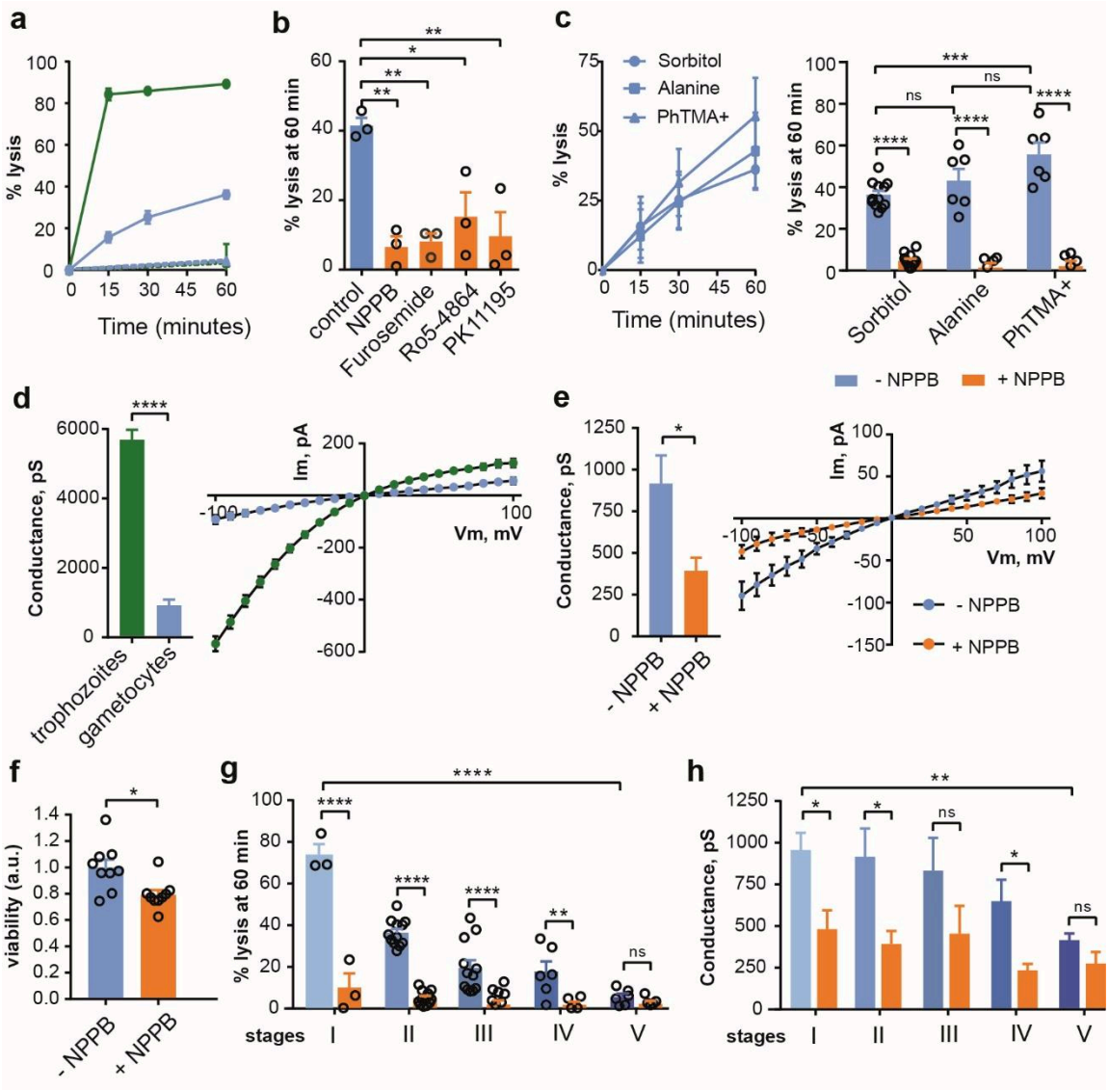

a
% lysis
Time (minutes)
b
% lysis at 60 min
control
NPPB
Furosemide
Ro5-4864
PK11195
c
Sorbitol
Alanine
PhTMA+
% lysis
Time (minutes)
% lysis at 60 min
Sorbitol
Alanine
PhTMA+
- NPPB
+ NPPB
d
Conductance, pS
trophozoites
gametocytes
Im, pA
Vm, mV
e
Conductance, pS
- NPPB
+ NPPB
Im, pA
Vm, mV
f
viability (a.u.)
- NPPB
+ NPPB
g
% lysis at 60 min
stages
I
II
III
IV
V
h
Conductance, pS
stages
I
II
III
IV
V

Figure 1. NPP are still active in immature gametocytes and decline along gametocytogenesis

a. Kinetics of sorbitol-induced isosmotic lysis of erythrocytes infected with trophozoites (green lines) and stage II gametocytes (blue lines) in presence (dotted lines) or absence (full lines) of 100 µM NPPB during 60 minutes. n = 3 experiments. **b.** % lysis of stage II GIE in sorbitol at 60 minutes with or without 100 µM NPPB, Furosemide, Ro5-4864, or PK11195. **c.** Lysis kinetics (left) and % lysis at 60 minutes (right) of stage II GIE in sorbitol, alanine or $PhTMA^+$. **d.** Patch clamp experiments on erythrocytes infected with trophozoites or stage II gametocytes (number of cells = 14 and 14, respectively). Left: whole cell conductance calculated at -100 mV. Right: I-V plot from patch clamp experiments. **e.** Patch clamp experiments on stage II GIE in presence or absence of NPPB (number of cells = 14 and 5, respectively). Left: whole cell conductance calculated at -100 mV. Right: I-V plot from patch clamp experiments. **f.** Viability (luciferase activity) of early gametocytes of the NF54-cg6-pfs16-CBG99 line 48 hours after a 3-hour incubation with or without 100 µM NPPB. The graph shows relative viability normalized by the average luciferase activity of control (without NPPB). a.u.: arbitrary units. **g.** Sorbitol-induced isosmotic lysis of GIE from stage I to stage V with (orange) or without (blue) 100 µM NPPB. **h**. Whole cell conductance calculated at -100 mV on GIE from stage I to stage V with (orange) or without (blue) 100 µM NPPB. Corresponding I-V plots are shown in Extended Data Figure 1. In a-g, circles indicate the number of independent experiments and error bars show the standard error of the mean (SEM). Statistical significance is determined by a Mann Whitney test (d, e, f, h) or by one-way ANOVA with Dunnet correction (b) or Sidak correction (c, g) for multiple comparisons.

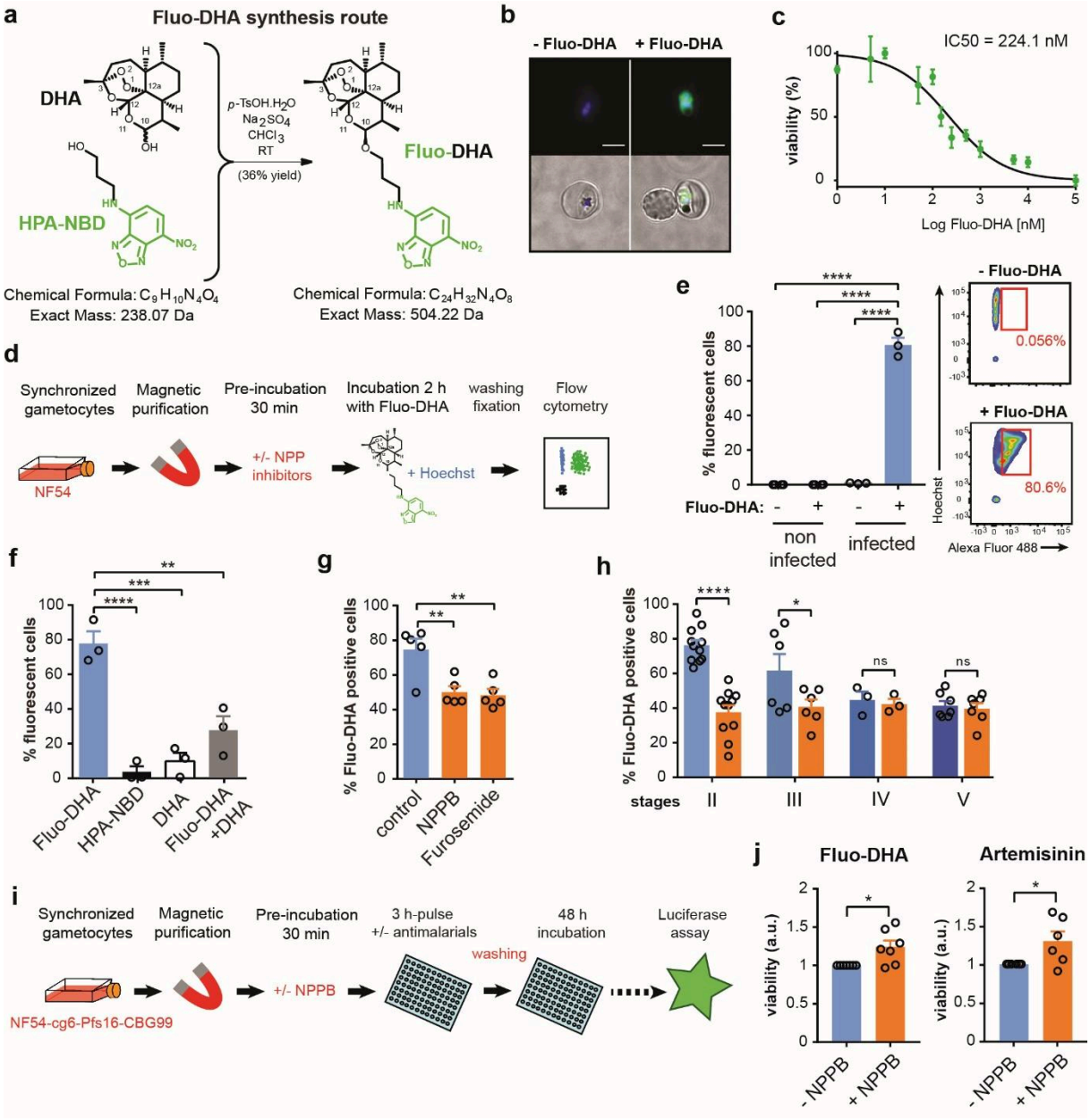

a
Fluo-DHA synthesis route
DHA
HPA-NBD
p-TsOH.H2O
Na2SO4
CHCl3
RT
(36% yield)
Fluo-DHA
Chemical Formula: C9H10N4O4
Exact Mass: 238.07 Da
Chemical Formula: C24H32N4O8
Exact Mass: 504.22 Da
b
- Fluo-DHA
+ Fluo-DHA
c
IC50 = 224.1 nM
viability (%)
Log Fluo-DHA [nM]
d
Synchronized gametocytes
Magnetic purification
Pre-incubation 30 min
Incubation 2 h with Fluo-DHA
washing fixation
Flow cytometry
NF54
+/- NPP inhibitors
+ Hoechst
e
% fluorescent cells
Fluo-DHA:
non infected
infected
- Fluo-DHA
0.056%
+ Fluo-DHA
80.6%
Hoechst
Alexa Fluor 488
f
% fluorescent cells
Fluo-DHA
HPA-NBD
DHA
Fluo-DHA +DHA
g
% Fluo-DHA positive cells
control
NPPB
Furosemide
h
% Fluo-DHA positive cells
stages
II
III
IV
V
ns
i
Synchronized gametocytes
Magnetic purification
Pre-incubation 30 min
3 h-pulse +/- antimalarials
washing
48 h incubation
Luciferase assay
NF54-cg6-Pfs16-CBG99
+/- NPPB
j
Fluo-DHA
Artemisinin
viability (a.u.)
- NPPB
+ NPPB

Figure 2. NPP contribute to the uptake of artemisinin derivatives

a. Schematic of Fluo-DHA synthesis from dihydroartemisinin (DHA) and the fluophore HPA-NBD. **b.** Fluorescence microscopy imaging of paraformaldehyde-fixed early GIE showing Fluo-DHA uptake (green). DNA is stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bars: 5 µm. **c.** Dose-response curve and IC50 value for Fluo-DHA in early gametocytes from the NF54-cg6-pfs16-CBG99 line. Viability (luciferase activity) was determined 48 hours after a 3-hour incubation with serial dilutions of Fluo-DHA. Error bars show the SEM. **d.** Diagram illustrating the uptake assay. **e.** Left: Quantification of Fluo-DHA uptake in uninfected erythrocytes and in early GIE by flow cytometry. Right: scatter plots showing the gating strategy for Fluo-DHA uptake. **f.** Competition assay between Fluo-DHA and DHA, and control of HPA-NBD and DHA-induced fluorescence levels. **g.** Inhibition of Fluo-DHA uptake in early GIE upon 100 µM NPPB or Furosemide incubation. **h.** Quantification of Fluo-DHA uptake during gametocytogenesis with (orange) or without (blue) 100 µM NPPB. **i.** Diagram illustrating the viability assay. **j.** Viability (luciferase activity) of early gametocytes of the NF54-cg6-pfs16-CBG99 line 48 hours after a 3-hour incubation with 150 nM Fluo-DHA or 5 µM artemisinin, with or without 100 µM NPPB. The graph shows the ratio of luciferase activity (drug-treated/control) and is normalized to the condition without NPPB. a.u.: arbitrary units. In e-j, circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. Statistical significance is determined by one-way ANOVA with Dunnet correction (e, f, g) or Sidak correction (h) for multiple comparisons or by a Mann Whitney test (j).

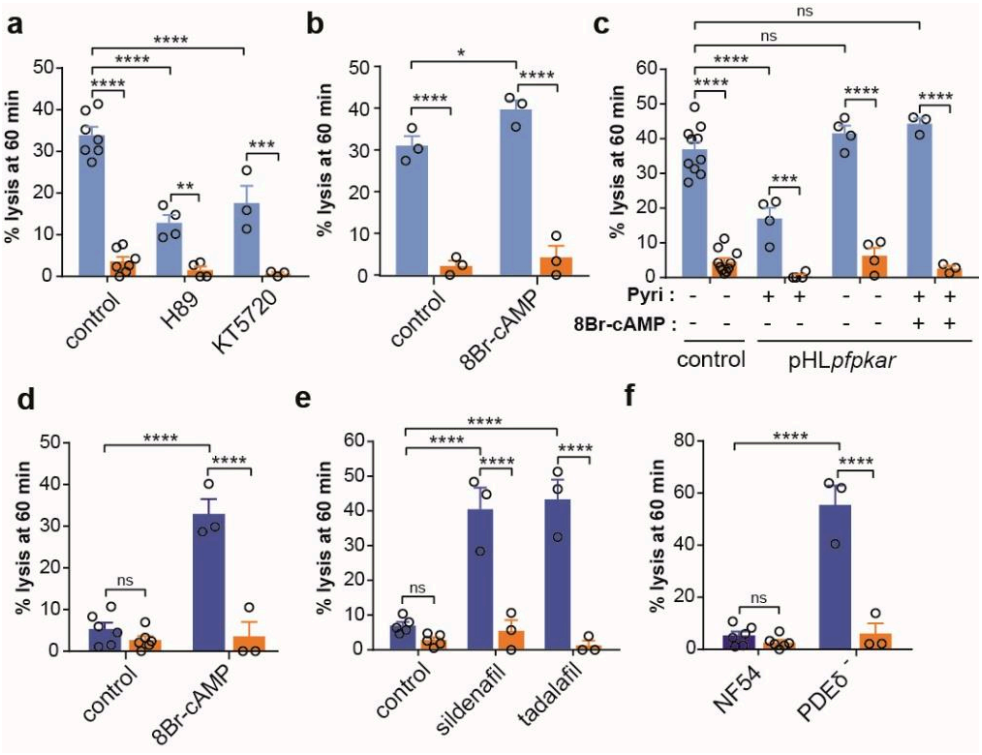


Figure 3. NPP activity is regulated by cAMP-signaling

a-b. Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage II GIE with 100 µM H89 or 10 µM KT5720 (a), or with 100 µM 8Br-cAMP (b). **c.** Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage II GIE from the NF54 isolate (Control) and the transgenic pHL*pfpkar* line, cultivated with or without pyrimethamine (Pyri), or pre-incubated with 100 µM 8Br-cAMP. **d-e.** Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage V GIE with 100 µM 8Br-cAMP (d), sildenafil (e) or tadalafil (e). **f.** Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage V gametocytes from the NF54 isolate and the transgenic line PDEδ^{-}. All experiments were performed in presence (orange) or absence (light and dark blue) of 100 µM NPPB. In a-f, circles indicate the number of independent experiments, error bars show the SEM and statistical significance is determined by one-way ANOVA with Sidak correction for multiple comparisons.

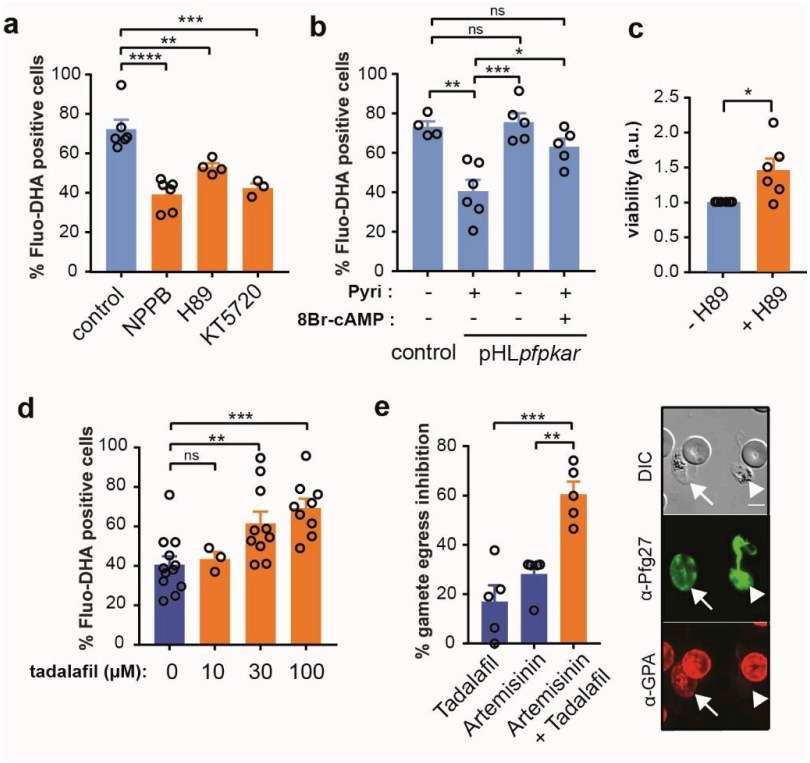


Figure 4. cAMP-signaling regulates uptake of artemisinin derivatives

a. Fluo-DHA uptake in early GIE upon 100 µM H89 or 10 µM KT5720 incubation. **b**. Fluo-DHA uptake in early GIE from NF54 (Control) and the transgenic pHL*pfpkar* line, cultivated with or without pyrimethamine (Pyri), or pre-incubated with 100 µM 8Br-cAMP. **c.** Viability (luciferase activity) of early gametocytes from the NF54-cg6-pfs16-CBG99 line 48 hours after a 3-hour incubation with 5 µM artemisinin, with or without 100 µM H89. The graph shows the ratio of luciferase activity (artemisinin-treated/DMSO-treated) and is normalized to the condition without H89. a.u.: arbitrary units. **d.** Fluo-DHA uptake in stage V GIE upon 0, 10, 30 and 100 µM tadalafil incubation. **e.** Left: % inhibition of gamete egress after a 24-hour incubation with 5 µM artemisinin, with or without 30 µM tadalafil. Right: gamete egress observed by IFAs. Samples were co-stained with mouse anti-glycophorin A (GPA, red) and rabbit anti-Pfg27 (green) IgG. DIC: Differential Interference Contrast. Arrow: mature GIE with an intact erythrocyte membrane, arrowhead: egressed gamete. Scale bars: 5 µm. In a-e, circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. Statistical significance is determined by a Mann Whitney test (c) or by one-way ANOVA with Dunnet correction (a, d) or Sidak correction (b, e) for multiple comparisons.

Methods

Parasite culturing and gametocyte production

The *P. falciparum* NF54 strain, the B10 clone and the transgenic lines pHL*pfpkar*, PfPDEδ$^-$ and NF54-cg6-pfs16-CBG99 have been described elsewhere[19,24,27,28]. The generation of the NF54-pfs47-pfs16-GFP line is described below. Parasites were cultivated *in vitro* under standard conditions using RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated human serum and human erythrocytes at a 5% haematocrit. Synchronous production of specific gametocytes stages was achieved by treating synchronized cultures at the ring stage (10-15% parasitaemia, day 0) with 50 mM N-acetylglucosamine (NAG) for 5 days to eliminate asexual parasites. Gametocyte preparations were enriched in different experiments by magnetic isolation using a MACS depletion column (Miltenyi Biotec) in conjunction with a magnetic separator. Stage I GIE were collected at day 1 post NAG treatment, stage II GIE were collected at days 2 and 3, stage III GIE were collected at days 4 and 5, stage IV GIE were collected at days 6 and 7, and stage V GIE were collected at day 8 onwards.

Generation of the NF54-pfs47-pfs16-GFP line

To generate the NF54-pfs47-pfs16-GFP line expressing GFP under the control of the gametocyte-specific promoter *Pfs16*, cultures of the NF54 clone B10 were co-transfected with 70 µg of plasmid pDC2-Cas9-hDHFRyFCU and 70 µg of plasmid pBLD588-Pfs16-GFP and selected with 2.5 nM WR99210 for 5 days as previously described[29]. The plasmid pDC2-Cas9-hDHFRyFCU[30] encodes a single guide RNA that recognizes a sequence located in the *Pfs47* locus. The plasmid pBLD588-pfs16-GFP contains two homology regions, HR1 and HR2, corresponding to the sequences in the *Pfs47* gene and upstream of the *Pfs47* gene, respectively. HR1 and HR2 flank the *Pfs16* 5'flanking region[31] followed by the *gfp* coding sequence and the PbDT 3′ regulatory region. Details about the generation of the plasmids and PCR validation of the NF54-pfs47-pfs16-GFP are provided in Extended data Fig. 3. Following transfection and drug selection, clones were obtained by limiting dilution.

Isosmotic lysis

500 µl of *P. falciparum* cultures (gametocytes at different stages or trophozoites) with a parasitemia >0.5% were washed once with RPMI and incubated in 1.5ml tubes for 60 min

at 37°C in 500µl isosmotic solution containing either 300 mM sorbitol, 300 mM Alanine or 150 mM $PhTMA^+$ supplemented with 10 mM Hepes, 5 mM glucose and with a pH adjusted to 7.4. For each experiment, 5 tubes were prepared including one tube containing 100 µM NPPB, Furosemide, Ro5-4864, or PK11195 (all purchased from Sigma-Aldrich). At each sampling time, one tube was spinned and smears were prepared and stained with Giemsa R solution (RAL diagnostics). Parasitemia was estimated for each point by counting infected cells out of at least 4000 erythrocytes, and lysis percentage was calculated using the formula: % lysis (t)= [1-(parasitemia (t)/parasitemia (t0))]*100

The percentage of lysis of stage I GIE was determined using the NF54-pfs47-pfs16-GFP line by fluorescence microscopy at X40 magnification on a Leica DMi8 microscope. To address the role of cAMP-signaling in isosmotic lysis, stage II GIE (day 2 and 3 post NAG treatment) were pre-incubated 30 minutes with 100 µM H89, 10 µM KT5720 or 100 µM 8Br-cAMP, and mature GIE (day 8-11 post NAG treatment) were pre-incubated 30 minutes with tadalafil or sildenafil at different concentrations (from 10 µM to 100 µM). All inhibitors were purchased from Sigma-Aldrich or Euromedex.

Patch-clamp

Patch clamp experiments were performed at room temperature using the whole cell configuration. Pipettes were pulled using a DMZ Universal Puller (Zeitz Instruments, Germany) from borosilicate glass capillaries (GC150F-10, Harvard apparatus, UK) to obtain a tip resistance of 10-15 MΩ. Pipette solution was: 145 mM KCl, 1.85 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, 10 mM, pH 7.2. Bath solution was: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Hepes, 10 mM glucose, pH 7.4. Seal resistance were 4-20 GΩ, and whole cell configuration was obtained by a brief electrical pulse (zap) and was assessed by development of small capacitance transient currents and reduction of access resistance. Whole cell current were recorded using either an Axopatch 200B (Molecular Devices, USA) or a RK400 (Biologic, France) amplifier, with voltage command protocols and current analysis done with pclamp10 suite software (Molecular Devices, USA) or WinWCP4.7 software (J. Dempster, Strathclyde University, UK), respectively. Currents were elicited by generating a series of membrane potentials from +100 to -100 mV in -10 mV steps for 500 ms, from a holding potential of 0 mV. For

stage I GIE, the gametocyte fluorescent line NF54-pfs47-pfs16-GFP line was used to decipher between asexual and early sexual stages.

Fluorescence microscopy

GIE were incubated 2 hours with Fluo-DHA or DMSO 0.1 % at 37 °C. Cells were stained with Hoechst 33342 (1/20,000, Thermo Fisher Scientific) for 10 min at 37 °C. After one wash with Phosphate-Buffered-Saline (PBS) 1X, cells were fixed for 10 min at room temperature with 1 % paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy Science) and 0.25 % glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS 1X. After three washes with PBS 1X, infected cells were observed on a glass slide at X100 magnification using a Leica DMi8 microscope.

Quantification of Fluo-DHA uptake assay

The synthesis of the Fluo-DHA probe was described in Sissoko *et al*[20]. Quantification of Fluo-DHA uptake was performed using flow cytometry. GIE were pre-incubated or not with 100 µM NPPB or with 100 µM Furosemide for 30 minutes and then incubated with 1 µM of Fluo-DHA for 2 hours at 37°C, 5% CO2 and 5% O2. To address the role of cAMP-signaling in Fluo-DHA uptake, early GIE (day 2 post NAG treatment) were pre-incubated 30 minutes with 100 µM H89, 10 µM KT5720 or 100 µM 8Br-cAMP, and mature GIE (day 8-11 post NAG treatment) were pre-incubated 30 minutes with tadalafil or sildenafil at different concentrations (from 10 µM to 100 µM). To assess the specificity of Fluo-DHA uptake, early GIE were pre-incubated or not with 20 µM DHA for 2 hours and then incubated with Fluo-DHA (1 µM) for 2 hours. DHA alone (20 µM) and HPA-NBD (1 µM) were used as control. Twenty minutes before the end of incubation, GIE were stained with Hoechst 33342 (1/10,000). Cells were then washed with PBS 1 X and fixed for 10 min at room temperature with PBS, 1 % PFA and 0.25 % Glutaraldehyde. The percentage of GFP positive cells were quantified using Fortessa (BD Biosciences) cytometer.

Gametocyte survival assay

To calculate the IC50 for Fluo-DHA on early gametocytes, 2.10^5 MACS-purified early GIE (day 2 post-NAG treatment) from the NF54-cg6-Pfs16-CBG99 line were incubated with serial dilutions of Fluo-DHA for 3 hours, then GIE were washed and incubated with

complete medium without drugs for 48 hours. To perform viability assays with drugs and inhibitors, early GIE were pre-incubated at 37°C for 30 minutes with 100 µM NPPB, 100 µM H89 or 0.1 % DMSO in complete medium and then incubated with the same inhibitors supplemented with 5 µM artemisinin (Sigma-Aldrich), 150 nM Fluo-DHA or 0.1 % DMSO for 3 hours. GIE were then washed and incubated with complete medium without inhibitors and drugs for 48 hours. Cell viability was evaluated by adding a non lysing formulation of 0.5 mM D-Luciferin substrate[19] (Sigma-Aldrich) and measuring luciferase activity for 1 second on a plate Reader Infinite 200 PRO (Tecan®). All experiments were performed in triplicate on 96 well plates.

Gamete egress assay

NF54 cultures containing 2% to 5% stage V gametocytes were incubated for 24 h at 37°C with 5 µM artemisinin supplemented or not with 30 µM tadalafil. Controls comprising gametocytes exposed to the same final concentration of DMSO (0.1%) were processed in parallel. After the incubation, 100 µl samples from each condition were pelleted at 1,000 g for 1 min and rapidly resuspended in 50 µl human serum at room temperature for 30 minutes during which gametogenesis took place. Samples were then pelleted at 1,000 g for 1 min, smeared on glass slides, methanol-fixed and co-stained with mouse anti-glycophorin A (GPA, 1/1,000, Santa Cruz Biotechnology) and rabbit anti-Pfg27[32] (1/2,000) followed by anti-rabbit Alexa 488- and anti-mouse Alexa 594-conjugated IgG (1/2,000, Life technologies). Samples were observed at 1000X magnification using a Leica DMi8. At least 100 GIE were analyzed for each sample. Percent gamete egress was determined by calculating the % of GPA-negative round gametes in the total GIE population detected by Pfg27 staining.

Methods References

27 Taylor, C. J., McRobert, L. & Baker, D. A. Disruption of a Plasmodium falciparum cyclic nucleotide phosphodiesterase gene causes aberrant gametogenesis. *Mol Microbiol* **69**, 110-118, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06267.x (2008).

28 Lavazec, C., Sanyal, S. & Templeton, T. J. Expression switching in the stevor and Pfmc-2TM superfamilies in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* **64**, 1621-1634, doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05767.x (2007).

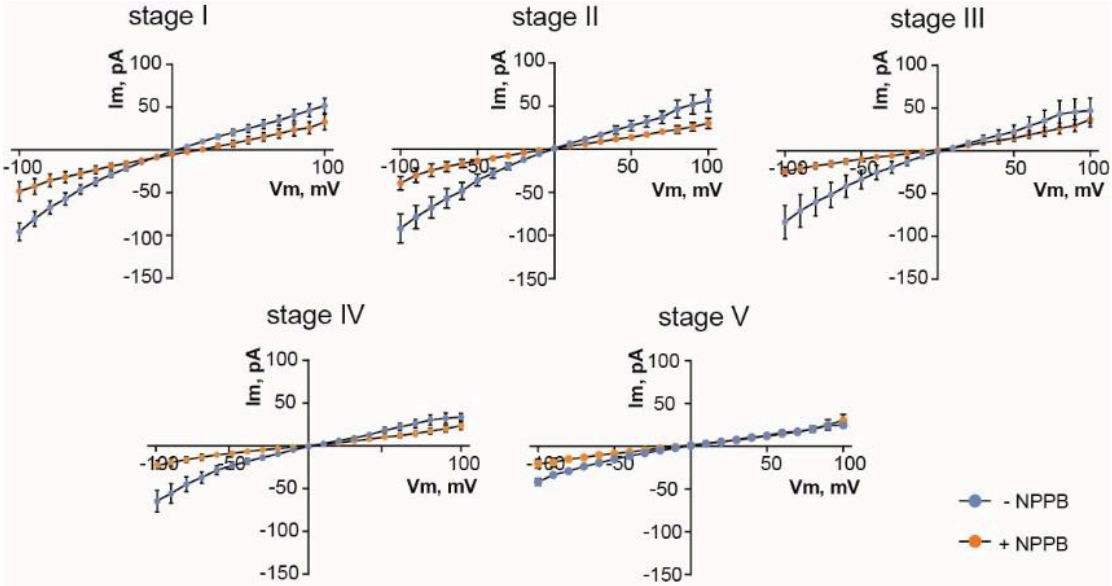
29 Ghorbal, M. *et al.* Genome editing in the human malaria parasite Plasmodium falciparum using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Biotechnol* **32**, 819-821, doi:10.1038/nbt.2925 (2014).

30 Knuepfer, E., Napiorkowska, M., van Ooij, C. & Holder, A. A. Generating conditional gene knockouts in Plasmodium - a toolkit to produce stable DiCre recombinase-expressing parasite lines using CRISPR/Cas9. *Sci Rep* **7**, 3881, doi:10.1038/s41598-017-03984-3 (2017).

31 Eksi, S., Suri, A. & Williamson, K. C. Sex- and stage-specific reporter gene expression in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **160**, 148-151, doi:10.1016/j.molbiopara.2008.04.005 (2008).

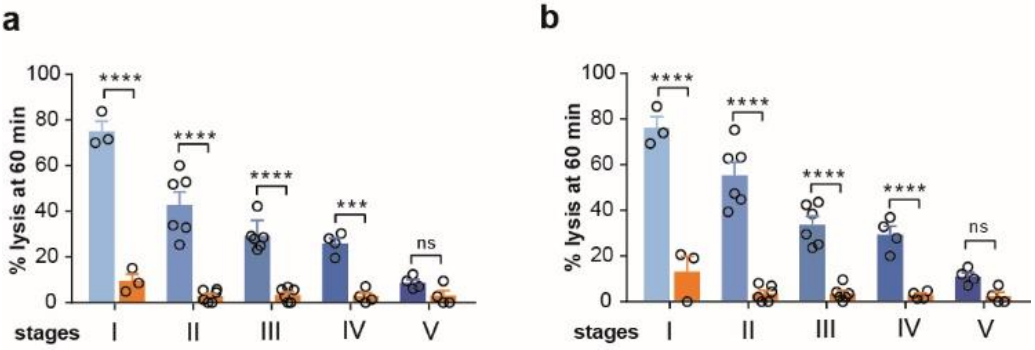
32 Olivieri, A. *et al.* The Plasmodium falciparum protein Pfg27 is dispensable for gametocyte and gamete production, but contributes to cell integrity during gametocytogenesis. *Mol Microbiol* **73**, 180-193, doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06762.x (2009).

Extended Data



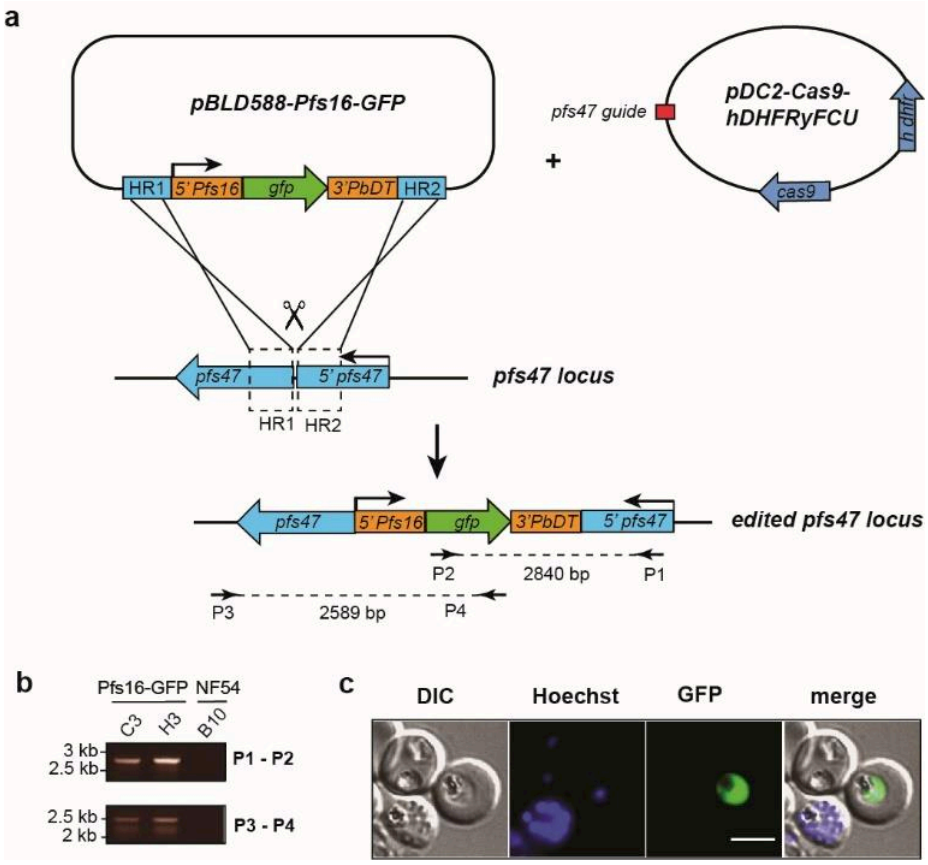
Extended Data Figure 1.

I-V plots from whole cell patch experiments performed on GIE from stage I to stage V with or without 100 µM NPPB. Error bars show the SEM.



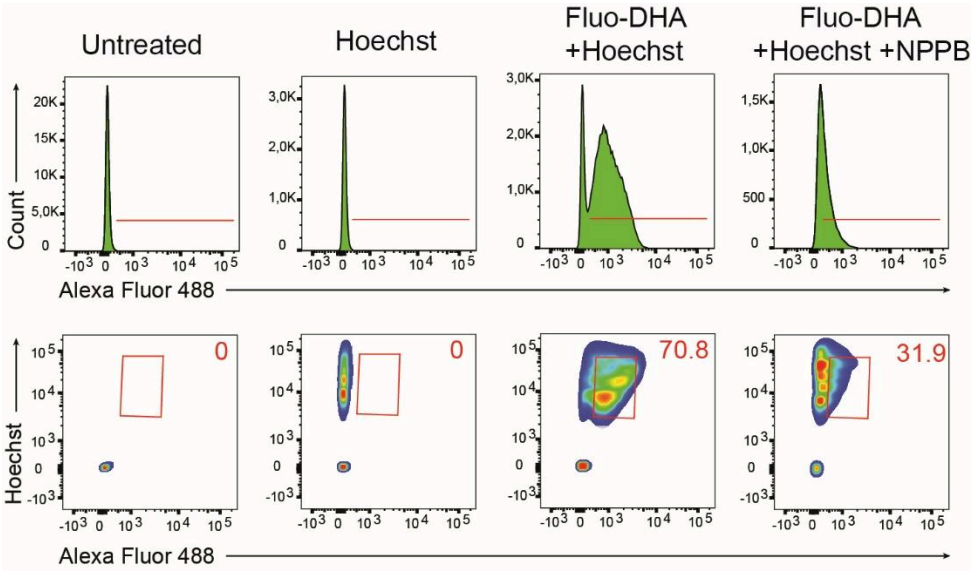
Extended Data Figure 2.

Alanine-induced (a) and $PhTMA^+$-induced (b) isosmotic lysis of GIE from stage I to stage V with (orange) or without (blue) 100 µM NPPB. Statistical significance is determined by one-way ANOVA with Sidak correction for multiple comparisons. Error bars show the SEM. Circles indicate the number of independent experiments.



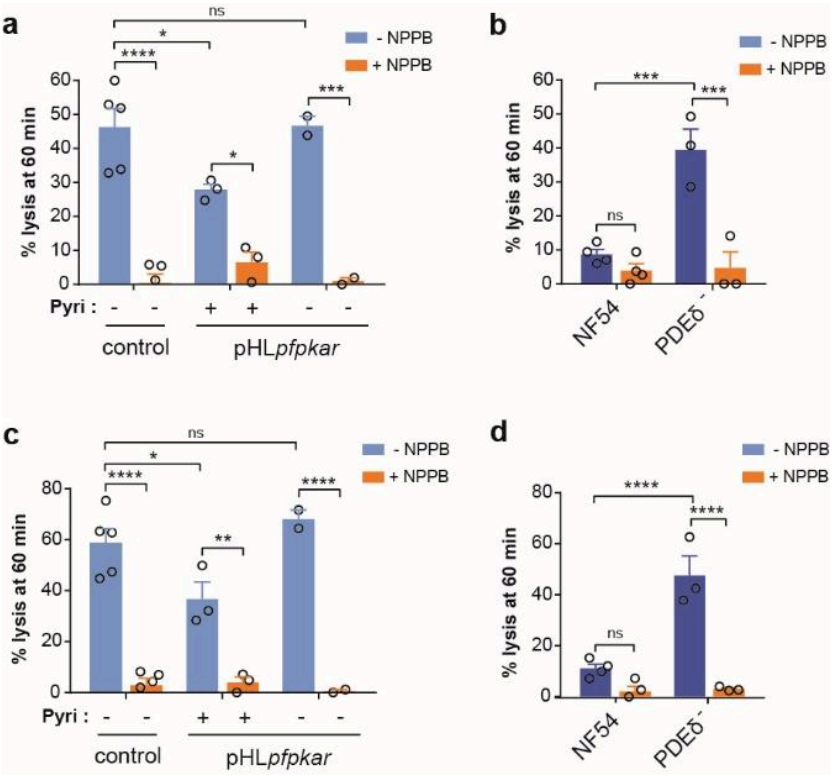
Extended Data Figure 3. Generation of parasites expressing GFP under the control of the gametocyte-specific promoter of *Pfs16* using CRISPR-Cas9 technology.

a. Schematic (not to scale) of the GFP insertion into the *Pfs47* locus. The scissors indicate the Cas9 cleavage site. Genomic DNA from NF54 parasites was used for the amplification of *5'Pfs16 w*ith P5 and P6 primers. The *gfp* sequence was amplified from EGFP-Vimentin-7 plasmid (Addgene) with P2 and P4 primers. Generation of pBLD588-Pfs16-GFP was performed by a double digestion of the pBLD588 plasmid with SpeI and XhoI restriction enzymes. Both *5'Pfs16* and *gfp* fragments were then cloned in frame using the In-Fusion system (Ozyme). **b.** PCR analysis of genomic DNA from C3 and H3 clones obtained by limiting dilution of the NF54-pfs47-pfs16-GFP line. The NF54 clone B10 was used as control. Arrows indicate the position of primers used to confirm plasmid integration into the *pfs47* locus. All primers are described in Extended Data Table 1. **c.** Fluorescence microscopy analysis of the clone C3 showing GFP in early GIE. DNA is stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 5 µm.



Extended Data Figure 4.

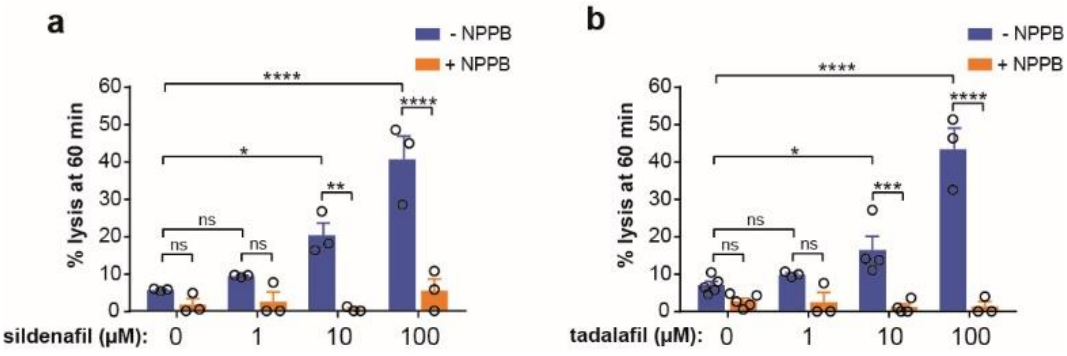
Scatter plots showing the gating strategy for Fluo-DHA uptake. Early GIE were pre-incubated or not with 100 µM NPPB for 30 minutes and then incubated with 1 µM of Fluo-DHA for 2 hours. Twenty minutes before the end of incubation, GIE were stained with Hoechst 33342. Percentages of Fluo-DHA uptake are shown.



Extended Data Figure 5.

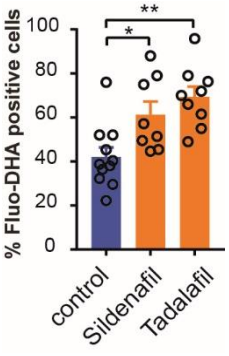
a, c. Alanine-induced (a) and PhTMA^{+}-induced (c) isosmotic lysis of stage II GIE from the NF54 isolate (Control) and the transgenic pHL*pfpkar* line, cultivated with and without pyrimethamine (Pyri).

b, d. Alanine-induced (b) and PhTMA^{+}-induced (d) isosmotic lysis of stage V GIE from the NF54 isolate and the transgenic line PDEδ^{-}. All experiments were performed in presence or absence of 100 µM NPPB. Circles indicate the number of independent experiments, error bars show the SEM and statistical significance is determined by one-way ANOVA with Sidak correction for multiple comparisons.



Extended Data Figure 6.

Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage V GIE with 1 µM, 10 µM or 100 µM sildenafil (a) or 100 with 1 µM, 10 µM or 100 µM tadalafil (a). All experiments were performed in presence or absence of 100 µM NPPB. Circles indicate the number of independent experiments, error bars show the SEM and statistical significance is determined by one-way ANOVA with Sidak correction for multiple comparisons.



Extended Data Figure 7.

Fluo-DHA uptake in stage V GIE upon 100 µM tadalafil or 100 µM sildenafil incubation. Circles indicate the number of independent experiments, error bars show the SEM and statistical significance is determined by one-way ANOVA with Dunnett correction for multiple comparisons.

Primer Name	Nucleotide sequence 5' – 3'	Restriction enzyme
P1	CCTAACACATTATGTGTATAACATTTTATGC	
P2	**AAGCTT**ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	HindIII site
P3	GCGATATGTAATTCCATTACTGC	
P4	CGTTATGTTA**CTCGAG**TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	XhoI site
P5	TTTATAGTAC**ACTAGT**ACAATATGAATTTATAGAGCAAATTTATATAG	SpeI site
P6	GCTCACCAT**AAGCTT**GTTGAAGAAAGTATAAATAGAAAAATGG	HindIII site

Extended Data Table 1. Primers used to generate the NF54-pfs47-pfs16-GFP line.
Restriction sites are indicated in bold and are underlined.

III. Manuscrit: A chemically stable fluorescent mimic of dihydroartemisinin, artemether and arteether with conserved biological activity and specificity shows high pharmacological relevance to the clinical antimalarial drugs

Soumis au Journal of Medicinal Chemistry

A chemically stable fluorescent mimic of dihydroartemisinin, artemether and arteether with conserved biological activity and specificity shows high pharmacological relevance to the clinical antimalarial drugs

Abdoulaye Sissoko,[a,b] Pedro Vásquez-Ocmín,[c] Alexandre Maciuk,[c] Daniela Barbieri,[d,b] Gaëlle Neveu,[d,b] Raphaël Grougnet,[e] Pascale Leproux,[e] Magali Blaud,[e] Karim Hammad,[e] Sylvie Michel,[e] Catherine Lavazec,[d,b] Jérôme Clain,[a,b] Sandrine Houzé[a,f] and Romain Duval*[a,b]

[a] Université de Paris, MERIT, IRD, F-75006 Paris, France
[b] Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France
[c] Université Paris-Sud 11, BioCIS, CNRS, F-92290 Châtenay-Malabry, France
[d] Université de Paris, U 1016, INSERM and UMR 8104, CNRS, F-75014 Paris, France
[e] Université de Paris, CiTCoM, CNRS, F-75006 Paris, France
[f] CNR du Paludisme, AP-HP, Hôpital Bichat – Claude-Bernard, F-75018 Paris, France

Correspondence and request for materials should be adressed to R. D. (email: romain.duval@ird.fr).

Abstract

Three novel fluorescent tracers designed as structural mimics of artemisinin-derived antimalarial drugs (i. e., dihydroartemisinin, artemether, arteether and artemisone) were synthesized from dihydroartemisinin. The dihydroartemisinin / artemether / arteether mimic showed a combination of excellent physicochemical and biological properties such as chemical stability, high inhibitory potency against blood-stage parasites, similar ring-stage survival assay values than the clinical drugs, specific covalent labelling of *P. falciparum* proteome consistent with a multi-target action of these drugs, as well as high cytopermeability and specific labelling of *P. falciparum* cells. Our study demonstrated that probes mimicking the very structural units of clinical artemisinin derivatives are relevant tools to decipher the complex mechanisms of these frontline, yet threatened, antimalarial

drugs. In addition, a biologically inactive but structurally unprecedented aminal-lactone desoxyartemisinin derivative was produced from dihydroartemisinin, arising from a unique aminating version of the Kornblum-DeLaMare rearrangement.

Introduction

Artemisin (ART) and its derivatives (ARTDs) continue to be the frontline antimalarials prescribed worldwide. They are estimated to have saved millions of lives along the last two decades due to their fast curative action against malaria parasites, particularly the most deadly and Africa-prevalent *Plasmodium falciparum*.[1] This major achievement is currently threatened by the worrying spread of ARTD-resistant parasite strains in South-East Asia, which emerged one decade ago in the greater Mekong region.[2] Resistance to ARTDs is conferred by mutations on the PfK13 kelch-containing protein and manifests as delayed clearance of young, ring stage parasites.[3,4] The protection mechanisms confered by mutant PfK13, resulting in increased parasite survival, are still poorly understood.[5-9] Even more alarming is the fact that PfK13 mutants exhibit a decreased sensitivity to several ARTD companion drugs (e. g., piperaquine).[10] The possible spread or emergence of these resistance mutations in Sub-Saharan Africa, where *ca.* 90 % malaria cases and deaths occur, would have catastrophic sanitary consequences. These facts underline the urgency to understand which are the clinical targets of ARTDs and why these drugs specifically select for PfK13 mutations. This knowledge could facilitate the rational design of novel generation, target-specific ARTDs unaffected by these mutations, and contain resistance in the future. The actual mechanisms of action of ARTDs against *P. falciparum* remain the subject of intense research. Recently, a small number of ARTD-mimicking proteomic probes were demonstrated to covalently bind up to 124 plasmodial proteins, including important enzymes.[11,12] These results validated the long-suspected protein alkylation mechanism for ART[13-15] *via* Fe(II)-dependent reductive cleavage of the endoperoxide and generation of carbon-centered, protein-reactive radicals and epoxides,[16-19] although the source and localisation of bioactivating iron (heme +/- non-heme iron) remain highly controversial up to now.[5,11,12,18,20,21] The apparently low-specificity, pleiotropic and irreversible modification of *P. falciparum* proteome by ARTDs is consistent with earlier reports that ART was a powerful alkylator of isolated proteins[15,22]

but also heme,[16,23-25] with incorporation into hemozoin.[25] Regarding protein alkylation, a recent scenario has emerged where ARTDs were to cause a “two-pronged” action, involving protein damage and inhibition of the proteasome function. Together with the production of abundant misfolded or unfolded proteins by ARTDs, the loss of the intracellular protein homeostasy by the proteasome would result in the accumulation of abnormal, damaged and polyubiquitinated proteic wastes leading to parasite death *via* the endoplasmic reticulum stress pathway.[6,7] In comparison with this direct inhibition and/or modification of targets, the generation of reactive oxygen species (ROS) by ARTDs radicals is likely to be a minor phenomenon, and their known oxidative toxicity[26-28] the undirect result of the destruction of redox homeostasis following proteome-wide alkylation within the parasite. Indeed, ARTDs are irreversibly bioactivated with destruction of their endoperoxide pharmacophore, and therefore cannot possibly act as redox cyclers; second, this bioactivation leads to oxygen radicals that quickly rearrange to carbon-centered radicals,[16-19] demonstrated to be the true effectors of antiplasmodial effects;[19] third, ROS observed *in vitro* were induced at very high drug concentrations (100-2,000 □M),[29] whereas the growth inhibition activity of ARTDs is exerted at 1-5 nM concentrations *in vitro* and *ca.* 700 nM *in vivo*.[3,4] ROS production by biologically-relevant concentrations of ARTDs was modest and consistent with undirect effects.[30,31] Therefore, a cell-wide alkylation of protein targets seems to mainly account for the bioactivity of ARTDs, in addition to heme alkylation / inhibition of hemozoin formation which actual contributions remain speculative. However, the pharmacological analysis of promiscuous protein alkylation by ARTDs in the malaria parasite remains difficult to delineate for a number of reasons:

(i) ARTDs correspond to DHA **1** and its derivatives, i. e. artemether (ARTMT), arteether (ARTET), artesunate (ARTS) and artemisone (ARTMS). The behavior of ARTDs remains poorly characterized in biochemical and cellular contexts where a great bulk of malaria research is conducted. They are sensitive to mild chemical[32-34] and biochemical[34,35] hydrolysis generally with release of DHA **1** itself, in addition to being *in vivo* prodrugs of DHA **1** mainly through liver CYP 3A4 metabolization.[33,36-38] For these reasons, the biological and clinical action of ARTDs is believed to recapitulate that of DHA **1**. However, the distinct IC_{50} values of ARTDs *in vitro* seem to reflect an activity combining time-

dependent hydrolysis into DHA **1** *in situ* together with the action of ARTDs themselves. Furthermore, the preclinical lead artemisone (ARTMS)[39,40] was shown not to be a prodrug of DHA **1** *in vitro* nor *in vivo*.[38,40]

(ii) in order to tackle the potential unstability of ARTDs at their C-10 center, featuring an hemiacetal group in DHA, acetal groups in ARTMT and ARTET, an aminal group in ARTMS or an acetal ester group in ARTS, all ART-derived proteomic probes designed so far[11,12,41] - as well as several imaging probes[18,42] - are generic tetrahydropyrane analogues at C-10 of DHA **1** (Fig. 1). While these probes have proven suitable for establishing a pleiotropic protein alkylation mechanism for ARTDs in *P. falciparum*, their total specific binding (i. e., assessed by competition with radiolabelled ART/ARTDs)[22,43] and relevance to the parents drugs has never been demonstrated, suggesting that a number of actual protein targets could have fallen off-detection. Similarly, these probes relative specific binding against parent ARTDs was only seldom verified,[11] and to the best of our knowledge, never quantified.

(iii) most of the target candidates identified with the aforementioned probes consist of abundant proteins of the trophozoite stage of *P. falciparum*.[5] Among these, the identity of key targets accounting for the inhibitory activity of the clinical drugs remain to be established,[44] relatively to abundant protein ballast not relevant in parasite killing.

(iv) covalent inhibition of protein targets by ARTD-mimicking probes has only been documented in ART-sensitive *P. falciparum* lines,[11-13] and never investigated in ART-resistant genotypes.

(v) parasite persistance in Ring Survival Assay (RSA) provides up to now the most robust *in vitro* assay assessing PfK13-mediated ART resistance, correlating with clinical resistance.[4] RSA values of *P. falciparum* K13 mutants exposed to ARTD-mimicking proteomic probes need to be similar to that of the clinical ARTDs to establish their clinical relevance, but this has never been assessed so far for any of the described ART-derived probes.

For these reasons, we designed and synthesized the first fluorescent surrogates of ARTDs retaining the key heteroatomic linkages at C-10 (Fig. 1), studied their stability by

monitoring fluorophore release in conditions relevant to proteome and cell labelling experiments, then investigated key biochemical, cellular and pharmacological properties in comparison with parent ARTDs.

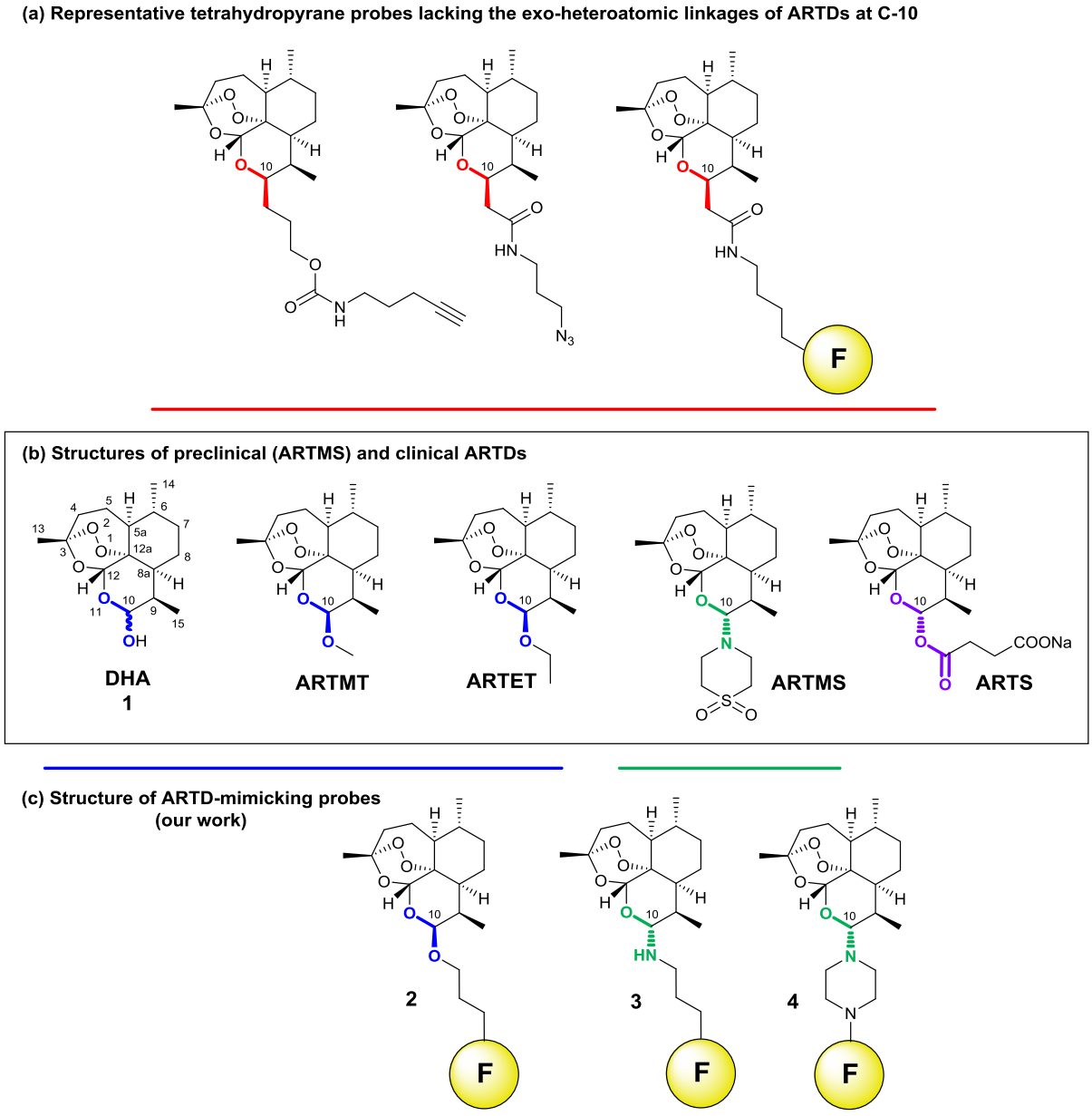


Fig. 1 Comparison of generic tetrahydropyrane probes in the ART series with designed ARTD-mimicking tracers integrating exo-heteroatomic linkages at C-10 as in the parent drugs. Abbreviations used: DHA, dihydroartemisinin; ARTMT, artemether; ARTET, arteether; ARTMS, artemisone; ARTS, artesunate; F, fluorophore.

Results and discussion

Synthesis. All fluorescent ARTD mimics consisted in derivatives of DHA **1**, used as starting material under the form of a diasteroisomeric mixture (□/□ 11:89 mol/mol by NMR analysis in $CDCl_3$).[45] We targeted 4-nitrobenzoxadiazole (NBD) and related 4-dimethylsulfamoylbenzoxadiazole (SBD) fluorophores for the tagging of DHA due to their compact size, aiming to keep to a minimum the pharmacological alteration of the tracers in comparison with the mimicked drugs (Fig. 1 and 2). NBD and SBD also feature strong fluorescence emissions in the green-yellow region of the visible spectrum, allowing dedicated analytical (i. e., DAD-HPLC), biochemical (e. g., SDS-PAGE) and imaging (i. e., cell microscopy and FACS) detection of the probes in systems where biological autofluorescence could be an issue. We chose a spacer size of 4-5 atoms to properly separate the endoperoxide pharmacophore and the fluorescent labels without implementing excessive lipophilicity. 3-Amino-1-propanol **5** reacted regioselectively with NBD-Cl by a S_NAr reaction under basic conditions, yielding the fluorophore-spacer moiety **6** with a 23 % yield. Similarly, *N*-BOC-diaminopropane **7** furnished the amino congener **8** under its trifluoroacetate (TFA) salt with a 31 % yield by a two-steps, “one-pot” sequence (Fig. 2). When DHA **1** was reacted under acidic conditions with alcohol **6**, clean acetalization occurred at C-10 *via* the oxonium intermediate to furnish **2** as the desired □ diastereoisomer ($^3J_{H10\text{-}H9a}$ = 3.6 Hz),[46] isolated with a 36 % yield. Following a modified two-steps general procedure for stereoselectively introducing secondary amines at C-10,[47,48] DHA **1** was firstly activated into a □-trimethylsilyloxyle intermediate by action of TMS-Cl in a triethylamine / dichloromethane medium, with a quantitative yield. This intermediate was then allowed to react with *N*-piperazino-SBD **9** in presence of TMS-Br and hexafluoro-2-propanol, to yield tertiary aminal **4** as the desired □ diastereoisomer ($^3J_{H10\text{-}H9a}$ = 10.4 Hz)[49] resulting from a double Walden inversion, isolated with a 18 % yield over a two-steps, “one-pot” sequence (Fig. 2). Unexpectedly, when **1** was allowed to react with **8** in precisely buffered conditions (triethylamine / **8** 10 : 1 mol/mol) at 50 °C, a single derivative formed that did not possess the awaited structure of C-10 secondary aminal **3**. Instead, 1-deoxyartemisinin derivative **10**, featuring an ether bridge at C-3, aminal linkage at C-12 and oxidation at C-10 under the form of a lactone group (using the numbering system of DHA **1** and ART), was produced with a 35 % yield (Fig. 2). The structure of **10**,

featuring an aminal-lactone skeleton unprecedented among all ART analogues described so far, was elucidated from extensive 1D and 2D NMR including ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}C HSQC, ^{1}H-^{13}C HMBC, ^{1}H-^{15}N HMBC, HRMS and IR analysis (see Electronic Supporting Information). Regarding the existence of **10** as 1-desoxy-ART analogue, while the presence of the endoperoxide bridge in DHA **1** accounted for a strong chemical shift of C-3 (104.3 ppm), it is lowered (94.1 ppm) in **10** as the result of the formed ether bridge. Interestingly, this trends did not apply to C-12a, which exhibited similar chemical shifts in DHA **1** (81.3 pppm) and in **10** (81.2 ppm). This can be explained by the fact that C-12a is at a cycle junction, that is fully sp3-hybridized in DHA **1** but sp2-hybidized at C-10 in **10** due to the presence of the lactone group. This hybridization imparting more cyclic rigidity to the system, C-12a is expected to be more deshielded in **10** than in DHA **1**. However, this effect is compensated by the endoperoxide to ether transformation inducing a lower chemical shift of C-12a. Regarding the attributed heteroatomic pattern of **10**, its *N*-methylene protons on the spacer chain are diastereotopic (2.83 and 3.21 ppm), one correlating through a ^{3}J coupling constant in the HMBC spectrum with C-3 (94.1 ppm) and the other with C-12 (96.5 ppm). Moreover, H-12 shows four correlations through ^{3}J coupling constants with the *N*-methylene carbon on the spacer chain, with the C-10 lactone carbonyle, as with the C-3, together with a correlation through a ^{2}J coupling constant with C-12a. These data are fully consistent with the structure of **10**. The alternative regioisomer **11**, featuring the aminal-lactame linkage typical of derivatives of ART with primary amines[50-52] (Fig. 2), was excluded as a possible structure. Indeed, the observed correlation between the *N*-methylene protons on the spacer chain and C-3 would occur through a ^{5}J coupling constant, thus very unlikely to be detected on the HMBC spectrum.

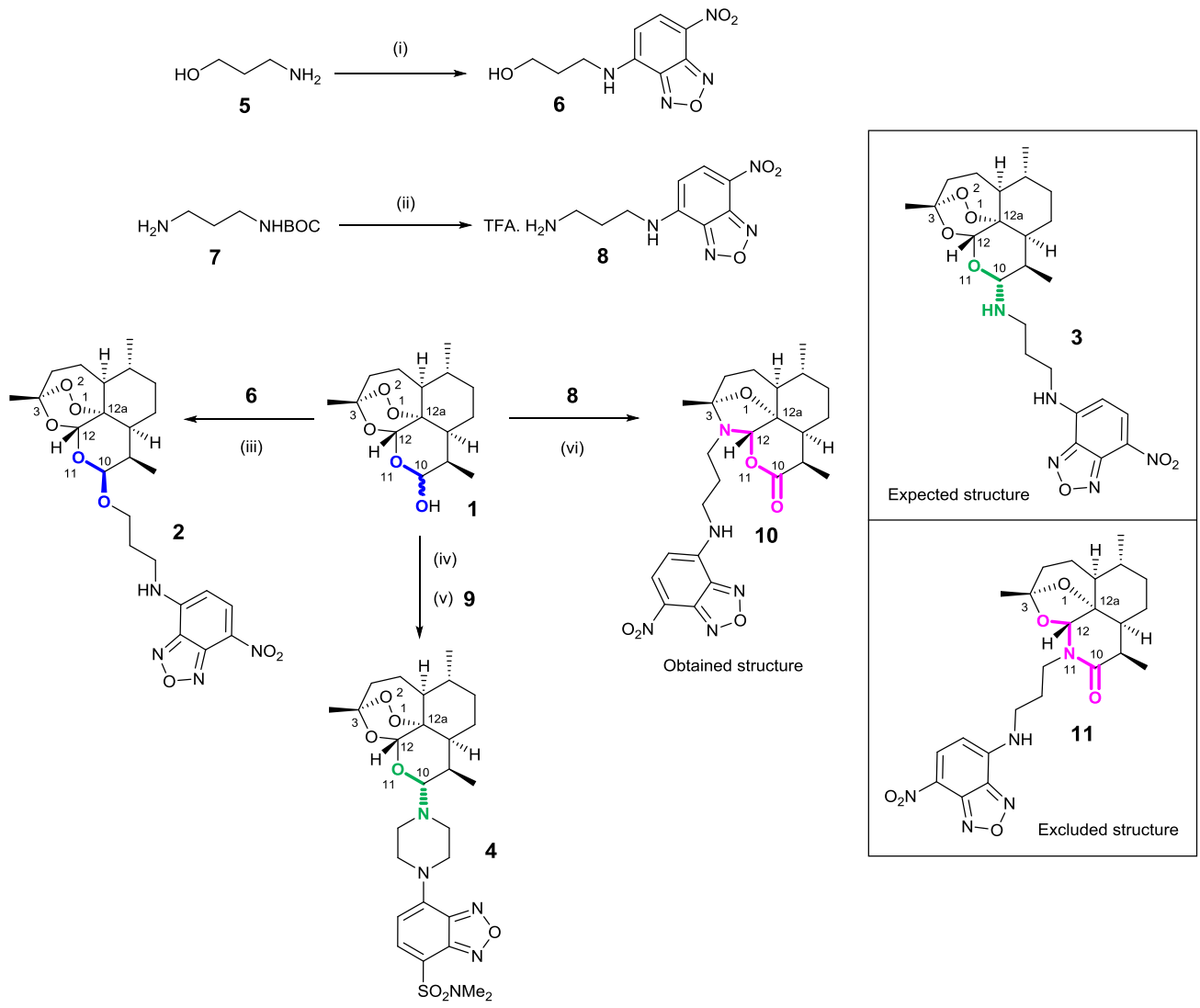


Fig. 2 Synthesis of ARTD-mimicking probes **2**, **4** and **10**. *Reagents and conditions:* (i) NBD-Cl, NEt_3, CH_2Cl_2, 0 °C -> RT (23 %); (ii) NBD-Cl, NEt_3, CH_2Cl_2, 0 °C -> RT then CF_3COOH, 0 °C -> RT (31 %, two steps); (iii) **6**, *p*-TsOH.H_2O, Na_2SO_4, $CHCl_3$, RT (36 %); (iv) NEt_3 then TMS-Cl, CH_2Cl_2, 0 °C (93 %); (v) TMS-Br then *N*-piperazino-SBD **9**, hexafluoropropan-2-ol, CH_2Cl_2, 0 °C -> RT (18 %, two steps); (vi) **8**, NEt_3, $CHCl_3$, 50 °C (34 %).

Formation of **10** could be rationalized by the nucleophilic attack of the amino group of **8** onto the masked aldehyde at C-3 of DHA **1**. Indeed, **1** consists of a tricyclised (“zipped”) endoperoxyde cetal (C-3)-acetal (C-12)-hemiacetal (C-10) sesquiterpene, which can potentially equilibrate (“unzip”) with its keto (C-3) dialdehyde (C-10 and C-12)

hydroperoxide open form **I** in protic medium[33] (Fig. 3). Intermediate **I** is prone to an intramolecular dismutation to 1-desoxy-ART **12** by hydroperoxide reprocessing *via* a Kornblum-DeLaMare rearrangement[33] that would explain the oxidized state of C-10 found in **10**. Accordingly, a small amount of 1-desoxy-ART **12** (6 %) could be isolated in the reaction mixture giving rise to **10**. To investigate the mechanism accounting for the formation of **10**, DHA **1** was submitted to the same reaction conditions (triethylamine / trifluoroacetic acid 10 : 1 mol/mol at 50 °C) in absence or presence of different primary amines. We found that **1** led to various amount of 1-desoxy-ART **12** in these conditions when incubated without any amine (32 % **12**) or with ethylamine.TFA (48 % **12**), *n*-propylamine.TFA (65 % **12**), *n*-pentylamine.TFA (9 % **12**) or *N*-BOC-1,3-propanediamine.TFA (31 % **12**). However, none of the expected *N*-aminated desoxy-ART derivatives **13**-**16** could be detected in these cases, suggesting that the NBD moiety present in **8** possessed a key role in the aminating reaction owing to its acidic catalysis property. To confirm this assumption, the same reactions were conducted in presence of 1 eq. NBD-NHMe **17** or NBD-OH **18**, used as separate NBD components featuring acidic aniline or phenol functions. These were obtained by treating NBD-Cl with methylamine or tetra-*n*-butylammonium hydroxide, leading to **17** and **18** with 65 % and 86 % yields, respectively (Fig. 3). Again, none of the expected *N*-aminated desoxy-ART derivatives **13**-**16** could be detected in these conditions, whereas 1-desoxy-DHA **12** was systematically formed in clean reactions. These experiments demonstrated that the acid N-H proton present in fluorophore **8** was necessary for the transformation of DHA **1** into **10** but only when covalently connected to the nucleophilic primary amine (Fig. 3). Based on these observations, we propose an aminating Kornblum-DeLaMare fragmentation of DHA **1** driven by the intramolecular acidic catalysis by **8** to account for the formation of **10**. Accordingly, **8** would form an imine by reacting with the most electrophilic C-12 carbonyle of intermediate **II**, while intramolecularly acid-catalyse endoperoxyde reprocessing. Following lactonisation at C-12 then aminalization at C-3, *N*-aminated desoxy-ART derivative **10** would be formed. A small amount of aldehyde **III** would escape the amination process and generate 1-desoxy-DHA **12** (Fig. 3). Importantly, **10** was obtained as a unique diastereoisomer consistent with the predicted stereochemical control upon re-cyclisation

("re-zipping") of **I** from C-3 to C-12 to C-10,[33] which is also reminiscent of the biogenesis of (+) ART from dihydroartemisinic acid in absence of enzymatic control.[53]

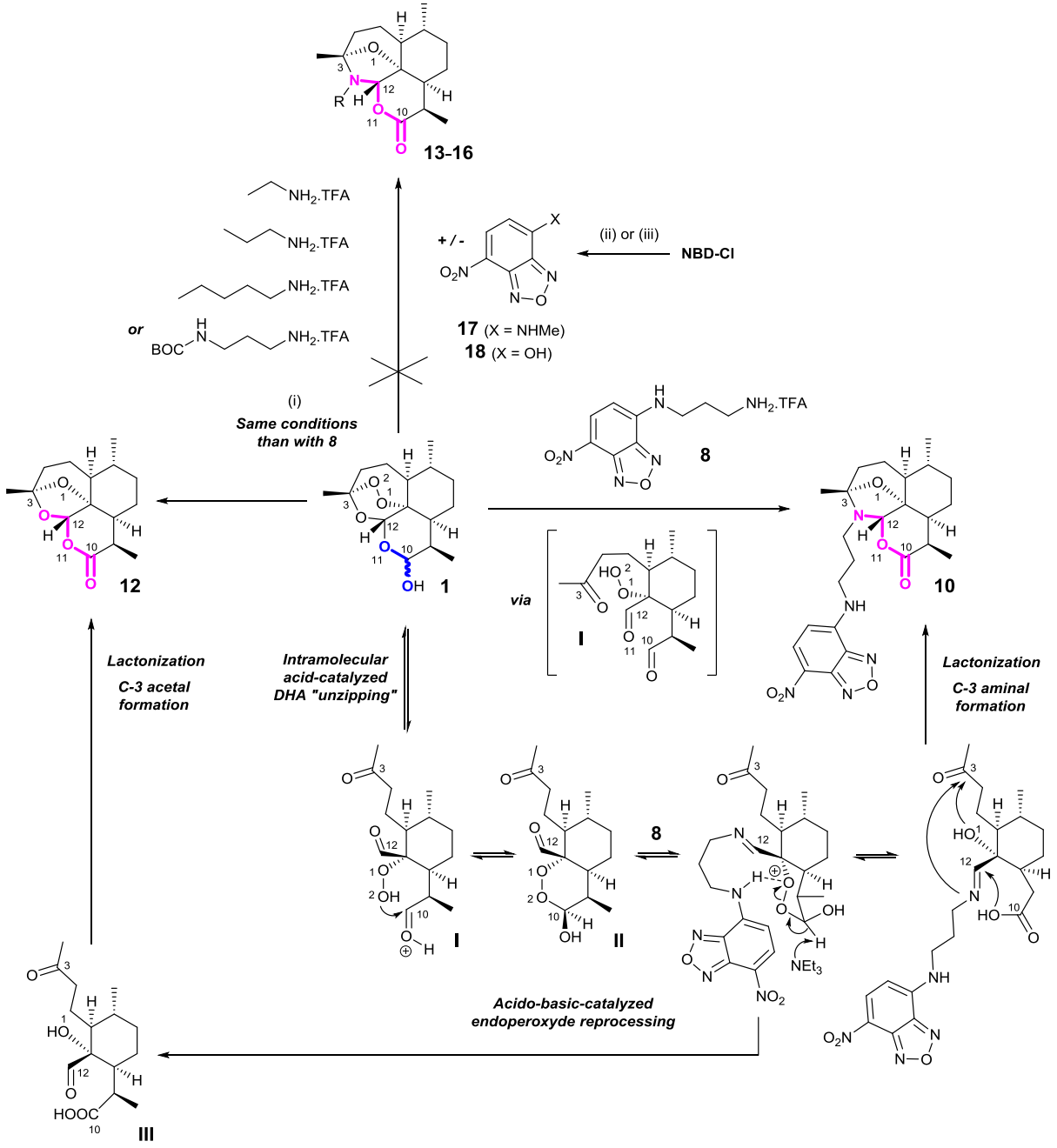


Fig. 3 Selective formation of aminal-lactone **10** from DHA **1** and **8** according to an aminating Kornblum-DeLaMare rearrangement and evidence for intramolecular acidic catalysis by **8**. *Reagents and conditions:* (i) NEt_3, $CHCl_3$, 50 °C (9-65 %); (ii) methylamine, MeOH / EtOH, RT (65 %); (iii) tetra-*n*-butylammonium hydroxide, MeOH, RT (86 %).

Kinetic stability study. We evaluated the hydrolytic stability of the obtained ARTD fluorescent mimics **2**, **4** and **10** over time at 23 °C in three different conditions, in order to select the optimal tracer for subsequent biological validation. These conditions were: (i) PBS buffer pH 5.2 to mimic the acidic pH of the parasite digestive vacuole,[54] wherein ARTDS are believed to be activated, at least partly, into antiplasmodial species;[11,12,43,55] (ii) PBS buffer pH 1 defined as the harshest hydrolytic conditions to detect even low susceptibility to hydrolysis; (iii) fresh cell lysate from asynchronous 3D7 *P. falciparum* parasites at pH 7.5, containing most putative protein targets of ARTDS. This study was performed by LC-DAD-MS monitoring of both the disappearance of native **2**, **4** and **10** and the release of the corresponding fluorophore-spacer moieties **6**, **8** and *N*-piperazino-SBD **9**, respectively. The DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** (Fig. 4, pannels A and B, *red curves*) was very stable at vacuolar pH and expectedly (being an acetal) unstable at pH 1. The profile of sheer disappearance of **2** in the lysate did not correspond to a release of fluorophore **6**, which remained at low concentrations throughout time. This suggested that **2** reacted with proteins from the cell lysate, an effect that was faster for **2** than for the two other ARTDs probes synthesized **4** (Fig. 4, pannels A and C, *blue curves*) and **10** (Fig. 4, pannels A and D, *green curves*). Indeed, while **2** was fully hydrolyzed into fluorophore **6** in PBS at pH 1, the decrease of **2** in the parasite lysate was not accompanied with a corresponding increase of **6** (Fig. 4, pannel B, *red and orange curves*). This was consistent with covalent attachment of **2** to a fraction of the lysate proteins in absence of hydrolysis of the C-10 acetal function, as the protein content of each sample being precipitated with acetonitrile prior to LC-DAD-MS analysis and therefore excluded from quantification. In this case, it appeared that the small amount of free heme present in the *P. falciparum* lysate was sufficient to induce Fe(II)-dependent endoperoxide reductive cleavage and protein alkylation according to the established mechanisms.[13-15] Small amounts of novel fluorescent species distinct from fluorophore **6** were formed over time in the lysate (Fig. 4, pannel B, *clear blue and pink curves*), which could be attributed to soluble small proteins or peptides covalently modified by **2** but not precipitated by acetonitrile. Regarding ARTD probes **4** and **10**, we found that the ARTMS analogue **4** was prone to hydrolysis in every condition, that was especially fast in the cell lysate, and consistently released the *N*-

piperazino-SBD fluorophore **9** (Fig. 4, pannel A and D, *blue and purple curves*). Compound **4** thus behaved as a genuine prodrug of DHA **1**, but its pending fluorophore lability precluded its use as a biological tracer. This result is somewhat contradictory with data showing that ARTMS itself was not releasing free DHA **1** in presence of recombinant CYPs or microsomes *in vitro*[38] nor *in viv*o in an infected mice model.[40] However, several ARTMS analogues do undergo hydrolysis into **1**,[56] suggesting that metabolization kinetics may compensate the otherwise hydrolytic liability in the ARTMS series. On the other hand, **10** was quite stable in every condition (Fig. 4, pannel C) as the result of its C-10 lactone group and lack of endoperoxide bridge, with absence of detectable release of fluorophore **8** in any condition (Fig. 4, pannels A and D, *green and black curves*). At pH 1, some decrease of **10** was observed but mostly in the first 15 min, suggesting that the loss of **10** was rather due to a saturable, thermodynamic process than chemical hydrolysis (see Supporting Information). Altogether, the probe presenting with the best physicochemical profile (stability in physiological conditions but covalent reaction with plasmodial proteins) was the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2**. To our knowledge, stability studies have never been previously conducted with ART-derived fluorescent probes, including some commercial tracers, in spite of their potential liabilities (artelinic acid derivatives).[57-60]

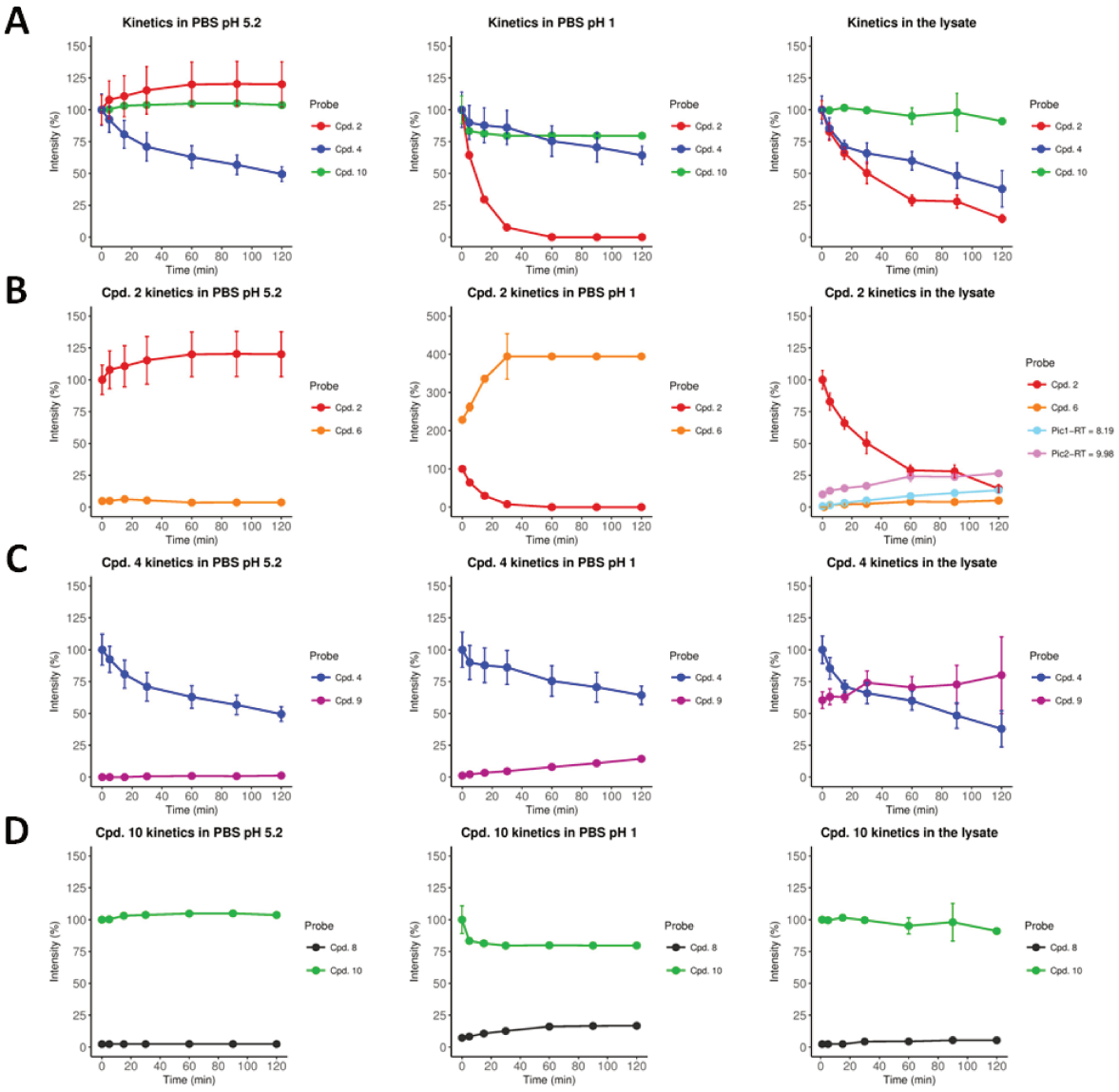


Fig. 4 LC-DAD (455 nm)-monitored stability over time of ARTD mimics **2** (*red curves*), **4** (*blue curves*) and **10** (*green curves*) at 23 °C in various conditions with concomitant detection of their corresponding released (if any) fluorophore **6** (*orange curves*), **8** (*black curves*) and *N*-piperazino-SBD **9** (*purple curves*). Results are expressed as the ratio of absorbance areas of a given species (probe or free fluorophore) at a given time over the probe initial absorbance area. The molar extinction coefficients of each probe and its corresponding free fluorophore have not been measured, therefore areas of these species cannot be compared, but we assumed that they would remain in the same order of magnitude. Standard deviations are systematically shown on the plots but are often

invisible due to their close-to-zero values. Experimental conditions are detailed in the Electronic Supplementary Information.

Evaluation of IC_{50} and RSA values.

The ARTD mimics **2**, **4** and **10** were evaluated *in vitro* against the replicative blood stage of *pfk13* wild type and mutant *P. falciparum* strains using standard growth inhibitory assays and Ring Survival Assay (RSA), in comparison with the clinical ARTDs DHA **1**, ARTMT and ARTS, as well as preclinical ARTMS (Table 1). No marked difference in IC_{50} was found with the growth assay between *pfk13* wild type and mutant isogenic strains ($NF54^{WT}$ and $NF54^{C580Y}$) for any of the compound tested, a result consistent with the inability of this assay to detect ART resistance.[4,61] Some variability in IC_{50} values was observed for some specific drugs across the different strains tested, especially for ARTMT and mimic **4**, which likely could be attributed to variable genetic backgrounds of the parasites. The DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** exhibited mean IC_{50} values ranging from 2.5 to 22.6 nM against the different strains tested, a range very similar to that of ARTMT (1.0 to 16.4 nM) and other ARTDs (0.5 to 16.4 nM) on the same strains. By contrast, the ARTMS mimics **4** displayed antiparasitic activities largely decreased when compared to ARTMS with mean IC_{50} values ranging from 13.5 to > 500 nM. The complete inactivity of compound **10** correlated with the absence of endoperoxide pharmacophore (1-deoxyartemisinin derivative).[12,51,52,62] Based on these results, only the highly potent DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** was further characterized using the RSA.

		IC_{50} (nM)						
Strains	***pfk13* mutation**	**DHA**	**ARTS**	**ARTMS**	**ARTMT**	**Probe 2**	**Probe 4**	**Probe 10**
3D7	-	2.2 ± 0.5	3.3 ± 0.2	0.9 ± 0.1	2.5 ± 0.3	22.6 ± 0.6	348.0 ± 3.31	NA
W2	-	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.4	0.5 ± 0.0	1.0 ± 0.2	9.6 ± 1.2	249.4 ± 35.7	NA
$NF54^{WT}$	-	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.0	10.7 ± 17.9	11.2 ± 1.1	16.4 ± 4.1	NA
$Dd2^{R539T}$	R539T	1.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	16.4 ± 2.5	19.6 ± 2.0	497.0 ± 19.3	NA
$NF54^{C580Y}$	C580Y	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1	14.3 ± 1.8	9.5 ± 2.5	13.5 ± 1.8	NA

Table 1 Antiplasmodial activity of ARTD mimics **2**, **4** and **10** against ART-sensitive (wild-type *k13*, in blue) and ART-resistant (mutated *k13*, in red) *P. falciparum* strains.

Experimental conditions are detailed in the Electronic Supplementary Information. NA: non-active (IC_{50} > 500 nM).

ART resistance is better assessed with the RSA, which measures the percentage of early ring stages (0-3 hours) that survive a 6-hour pulse of 700 nM ARTDs (corresponding to the plasmatic peak concentration of DHA **1** in treated humans) when compared to untreated controls. The RSA thus mimics the situation encountered by parasites in ARTD-treated patients and permits the *in vitro* or *ex vivo* detection of *k13*-dependent ART resistance,[4] thus constituting a critical test to assess probe validity and relevance to the clinical ARTDs. We studied the drug response of the PfK13-edited, ART-resistant $Dd2^{R539T}$ strain and the parental, ART-sensitive Dd2 (Table 2). RSA performed on the ART-sensitive Dd2 strain with the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** at the standard concentration of 700 nM showed that this compound had an excellent survival value of 1.0 % that was superimposable to that of model ARTMT (0.96 %). This value was also similar to that of DHA **1** (0.32 %), all values falling within the 0-1 % interval indicative of ART susceptibility. On the other hand, the survival rate of the ART-resistant $Dd2^{R539T}$ strain exposed to compound **2** was 14.0 %, a value that was similar to that of ARTMT (10.32 %) and DHA **1** (11.55 %), all values being largely above the 1 % threshold associated with ART resistance. These data demonstrated that **2** had retained similar potency than clinically relevant ARTDs in its parasite survival. Overall, the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** exhibited the strongest antiplasmodial activity of the three ARTDs probes obtained, possessing highly similar activity than ARTMT on parasite lines harboring either wild-type or mutated *k13* genes, as well as similar RSA values than the clinical ARTDs. To our knowledge, none of the reported ART-derived probes were previously profiled using the RSA, currently the only *in vitro* assay relevant for clinical ART resistance. Being altogether a successful structural and functional mimic of both DHA **1** and the C-10 acetal ARTDs and a very stable compound in physiological conditions, **2** was selected for further biological evaluation on *P. falciparum* model systems.

	Average survival (%)			
strains	NE	DHA	ARTMT	Probe 2
Dd2	100 ± 0.00	0.32 ± 0.56	0.96 ± 0.96	1.00 ± 0.07
$Dd2^{R539T}$	100 ± 0.00	11.55 ± 5.16	10.32 ± 3.18	14.00 ± 3.41

Table 2 RSA values of the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** (700 nM) against ART-sensitive (wild-type *K13*, in blue) and ART-resistant (mutated *K13*, in red) *P. falciparum* strains. NE: non-exposed.

Characterization of covalent binding to heme. The mechanism of heme alkylation by ART upon cleavage of the endoperoxide ring by its Fe(II)-porphyrin has been extensively described, and is considered to contribute to its antiplasmodial activity by preventing hemozoin crystallization.[16,23,63,64] We assessed the ability of the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** to covalently modify heme under biomimetic condition (buffer-octanol interface at pH 5.2), using heme-Fe(II) produced by the *in situ* reduction of hemin (*syn*. Fe(III)-ferriprotoporphyrin IX) with glutathione.[65,66] **2**-heme covalent adduct could be observed on the HRMS spectrum at *m/z* 1120.3778, along with the rearranged product following loss of an acetate moiety at *m/z* 1060.3586 (Fig. 5 and Electronic Supplementary Information). The covalent adduct showed a MS-MS fragmentation similar to the covalent adduct of ART with heme (see Electronic Supplementary Information), suggesting that the mechanism of action of ART was fully maintained for **2**. However, the slightly easier fragmentation (lower DV_{50} value) observed for the **2**-heme adduct relatively to the ART-heme adduct in collision-induced dissociation MS^{67} (Fig. 6) suggested that the bulky fluorophore moiety in **2** and absent in ART led to a stronger tension on the formed ethyl bond in the **2**-heme adduct.

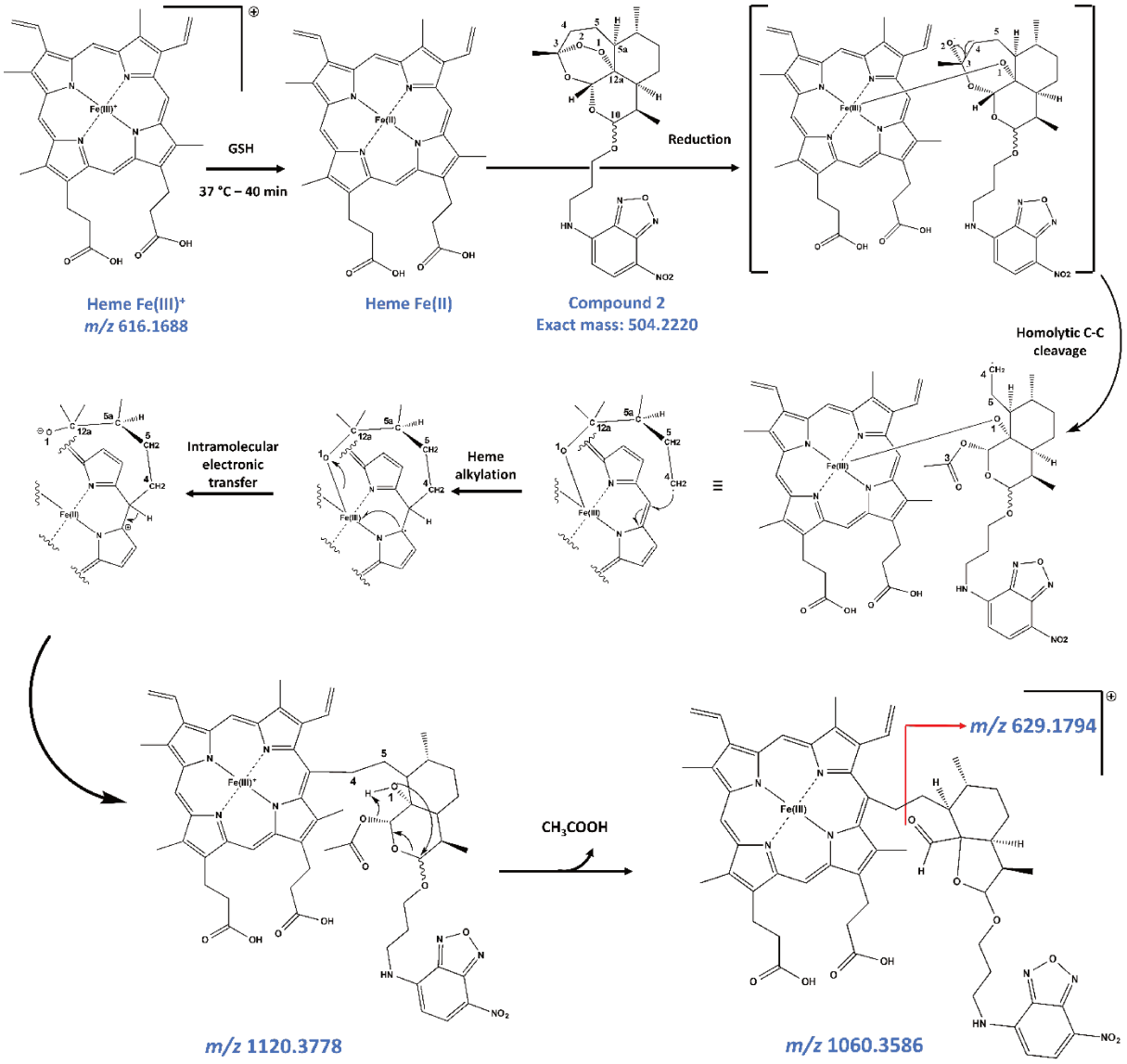


Fig. 5 Alkylation and fragmentation pathway for **2**-heme adduct. GSH = reduced glutathione.

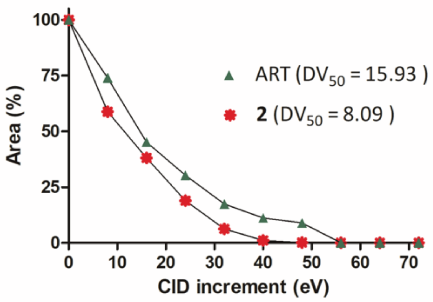


Fig. 6 Decrease of ART-heme or **2**-heme adducts in collision-induced dissociation HRMS.

DV_{50} = value of the voltage applied in collision cell (in eV) corresponding to a 50 % decrease of the adduct area.

Native fluorescent labelling of target proteins in a *P. falciparum* cell lysate. When incubated in fresh parasite lysates from either ART-sensitive ($NF54K13^{WT}$) or ART-resistant ($NF54K13^{C580Y}$) *P. falciparum* strains in presence of artificially-generated heme (Fe(III)-protoporphyrin IX / sodium ascorbate),[11,22] probe **2** at 50 □M induced extensive yellow-fluorescent labelling of parasite proteins from low to high molecular weights (Fig. 7, *lanes 5 and 9*). The observation of strong labelling stable to denaturing conditions (samples were heated with of 1 % SDS and gels runned in presence of 0.1 % SDS) implied the covalent labelling of proteins by **2**, consistent with an heme-dependent bioactivation of the endoperoxide pharmacophore[11,12] and induction of protein alkylation *via* generation of carbon radicals. The labelling profiles were similar between the ART-sensitive and ART-resistant strains (Fig. 7, *lanes 5 vs 9*), constituting a novel strong presumption that ARTDs targets do not significantly differ between these strains. This observation was consistent with the hypothesis that ART resistance arises from deregulated metabolism and /or signaling pathways in the malaria parasite rather than differences in target(s).[5] Within this pleiotropic covalent labelling of the parasite proteome, discrimination of the key clinical targets of ARTDS, if any, remains critically challenging. Indeed, while the labelling of both ART-sensitive and ART-resistant *P. falciparum* strains by **2** was pharmacologically specific, being competitively inhibited by 20-fold excess DHA **1** at constant protein quantity (*lanes 4 vs 5 and 8 vs 9*), we could show that this labelling was chemically non-specific by nature. In this respect, bovine serum albumin (BSA) was also alkylated by **2** when incubated in presence of artificially-generated heme and this labelling was significantly blocked by DHA **1** (Fig. 7, *lanes 13 vs 14*). This suggested that the high reactivity of the radical species generated by ARTDs could induce the spontaneous alkylation of many surrounding proteins, consistent with an antimalarial action of ARTDs resulting from the collapse of misfolded protein homeostasis (*vide infra*). Importantly, probe **2** is the first intrinsically fluorescent ARTD mimic shown by SDS-PAGE to alkylate parasite proteins. The covalent modification of proteins by the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** upon Fe(II)-

mediated endoperoxide cleavage, suggested by our stability study, was thus fully confirmed by SDS-PAGE analysis.

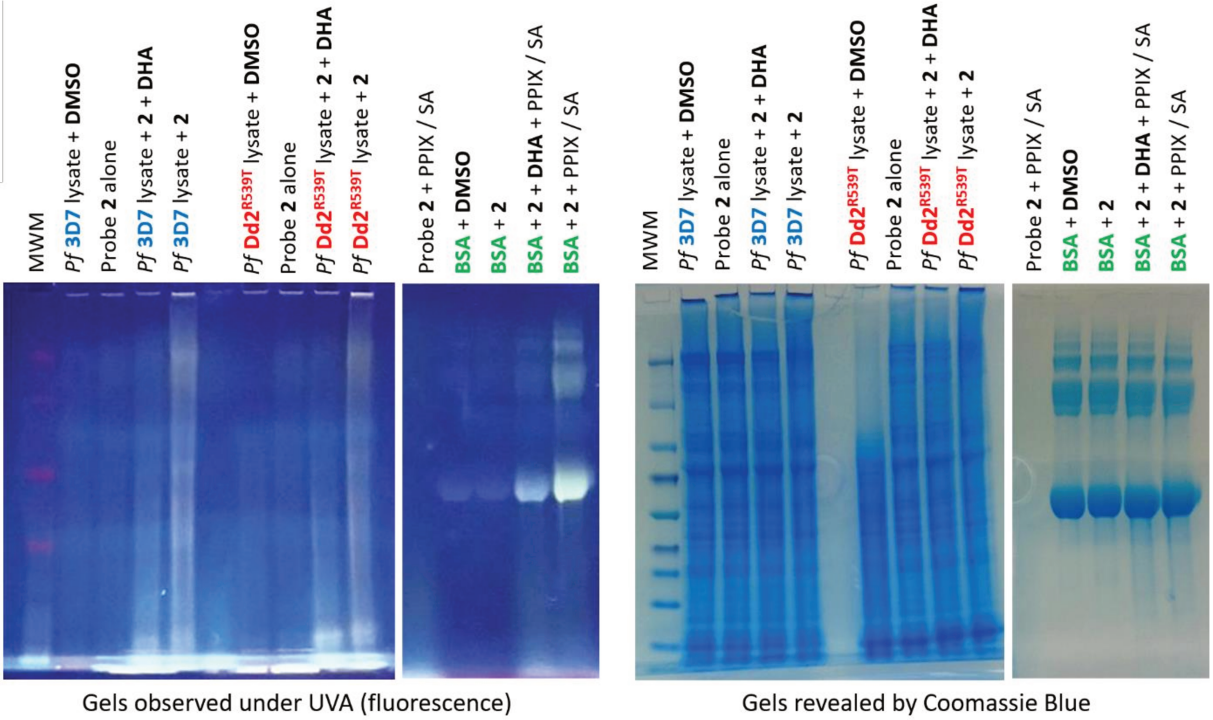


Fig. 7 Irreversible fluorescent labelling of target proteins in both ART-sensitive and ART-resistant *P. falciparum* cell lysates as well as fluorescent labelling of BSA by the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** in presence of artificially-generated heme. *Reagents and conditions:* [cell lysate] = 5 mg / mL; [BSA] = 1 mg / mL; [probe **2**] = 50 □M; [DHA **1**] = 1 mM; [PPIX] = 500 □M; [SA] = 500 □M. Abbreviations used: MWM, molecular weight marker; BSA, bovine serum albumin; PPIX, protoporphyrin IX; SA, sodium ascorbate. Noteworthy, certain proteins within *P. falciparum* lysate, as well as BSA, shows slight blue autofluorescence in absence of **2** (lanes 2, 3, 6, 7, 11 and 12).

Cell imaging and cytofluorimetric quantification.

ART-derived fluorescent tracers for cell imaging are scarce,[18,42,57-60,68] and to our knowledge have only been exceptionally assessed for pharmacological specificity by visual or quantitated competition against parent ARTDs. When this was performed, the fluorescence labelling showed no detectable change, indicating poor specificity of the imaging tracer.[42] In line with this observation, several fluorescent derivatives of ART

differing only by the nature of the appended fluorophores showed strikingly different subcellular localisations (e. g., mitochondria or lysosomes) in human cells, suggesting that the pendant fluorophores were responsible for extensive non-specific binding.[57-59,69] To study the localization of the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** in *P. falciparum* asexual blood stages, infected erythrocytes from the NF54K13^{WT} strain were treated with 1 µM **2** for 30 min at 37 °C and co-stained with the nuclear tracker Hoechst 33342, then imaged using a Leica DMi8 microscope using GFP filters to detect **2** (Fig. 8). At this concentration, that was only 1.4 fold above that of the physiologically-relevant RSA, probe **2** exhibited an heterogenous staining pattern in the cytosol of trophozoïte and schizont stages (Fig. 8C), compared to background signal in the absence of **2** (Fig. 8G). In the same conditions, uninfected red-blood cells were completely unlabeled by **2** (Fig. 8A and C), demonstrating that the accumulation of **2** in live cells was parasite-dependent. Furthermore, probe **2** did not colocalized with Hoechst 33342 and only weakly stained the parasite digestive vacuole, localized by important loads of refractile hemozoin crystals in DIC (Fig. 8A and C,D), and where probe **2** is expected to be chemically and spectrally tractable according to our stability study (Fig. 4 A,B). This observation is not consistent with the established main bioactivation and alkylating action of ART at the level of the food vacuole.[11,12,43,55] On the other hand, it is fully consistent with the fact that other non-vacuolar protein targets (e. g., at the level of the cytosol, cytoskeleton, mitochondrion or plasma membrane) are also covalently-modified by ART.[11,12] In any case, it is possible that only a small portion of probe **2** at 1 □M underwent bioactivation by Fe(II) sources *in cellula*, keeping in mind that the fluorescence of **2** does not allow to discriminate between free **2** and its covalent protein adducts.

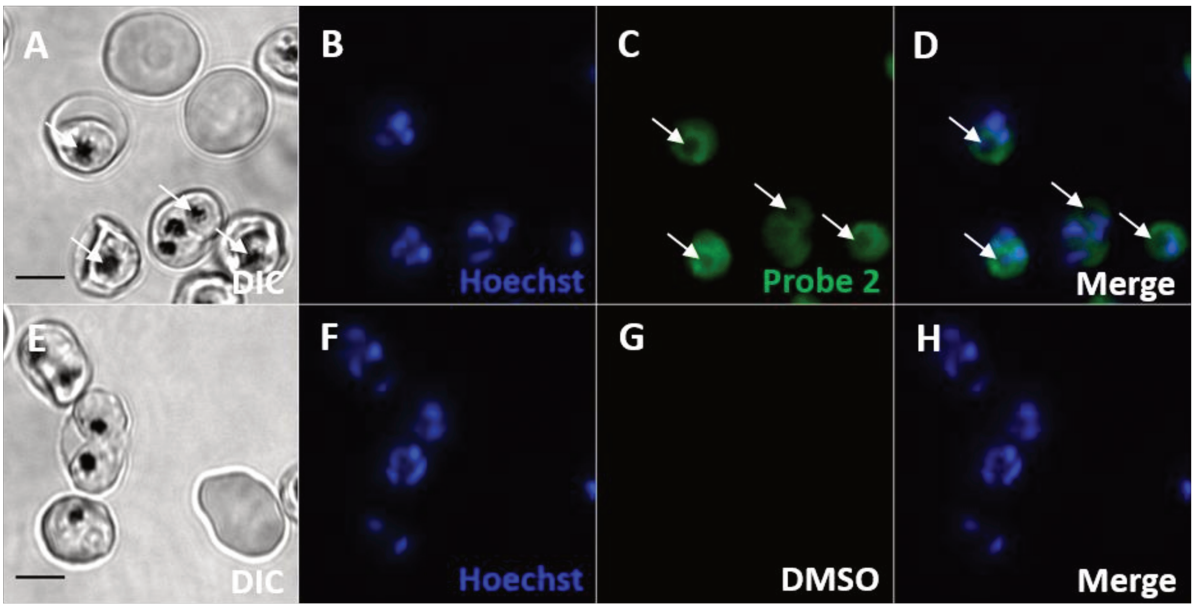


Fig. 8 Fluorescence imaging of NF54K13^{WT} parasites at trophozoïte and schizont stages incubated or not with the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** at 1 □M (green fluorescence). Parasite nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue fluorescence). Pictures were taken under identical exposure conditions. Bars represent 5 µm. Arrows indicate the digestive vacuole.

As to quantify the specific parasite uptake of the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** in asexual *P. falciparum* blood stages, we performed a FACS competition assay in synchronized trophozoites with **2** at 1 □M in absence or presence of DHA **1** at 20 □M. DHA **1** alone and free fluorophore-spacer **6** were used as negative controls. After 30 min incubation, 63.0 % of asexual parasites were positive for **2** detected with GFP filters. A significant decrease in the uptake of **2** down to 21.5 % was observed upon incubation with excess DHA **1**, either by blocking with excess drug or co-incubation of **2** and **1** in the same 1: 20 proportions (Figure 9). DHA **1** alone and **6** elicited negligible uptake in the same conditions. These results indicated a high pharmacological specificity of 66 % for the ARTD mimic **2** relative to native DHA **1** despite the introduction of a bulky pendant under the form of a fluorophore. Noteworthy, this study represents to our knowledge the first quantification of the binding specificity of an ARTD fluorescent mimic in live *P. falciparum* cells.[60]

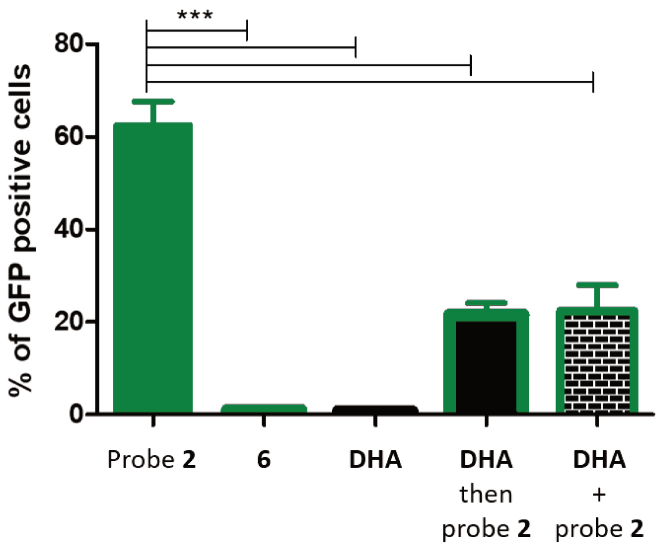


Fig. 9 FACS competition assay between the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** at 1 □M and excess DHA **1** at 20 □M. Quantification of GFP-positive cells by flow cytometry upon treatment with **2** (green bar) and with DHA **1** (black and green bars). DHA **1** alone (black bar) and fluorophore-spacer **6** (white and green bar) were used as controls (n = 3). Error bars denote the standard error of the mean. **p < 0.01.

Conclusion

Three original ARTD-mimicking fluorescent tracers **2**, **4** and **10** were designed and synthesized from DHA **1**. Despite the inactivity of **10** against *P. falciparum* due to the destruction of the endoperoxide pharmacophore, this derivative featured a novel aminal-lactone skeleton arising from an intramolecular acid-catalyzed aminating version of a Kornblum-DeLaMare rearrangement. Albeit the incorporation of nitrogen nucleophiles during the "unzipping" of DHA **1** into reactive aldehyde species could open exciting synthetic directions, we found that this process was uniquely relying on the NBD-substituted primary amine **8**, with no generalisation to primary amines even in the presence of non-nucleophilic NBD catalysts. Among the two remaining ARTD fluorescent probes, the DHA / ARTMT / ARTET mimic **2** showed a combination of excellent physicochemical and biological properties such as: (i) chemical and spectral stability at the parasite digestive vacuole pH of 5.2 as well as in fresh parasite lysate; (ii) high inhibitory potency against asexual blood-stage parasites, that was stronger than that of all

ART-derived probes described so far; (iii) similar RSA values than DHA and ARTMT; (iv) heme alkylation capability in biomimetic conditions; (iv) pharmacologically specific, pleiotropic covalent labelling of ART-sensitive and ART-resistant *P. falciparum* proteomes consistent with a multi-target antiplasmodial action of ARTDs; (v) high cytopermeability and specific labelling of live *P. falciparum* cells. Overall, our study demonstrated that probes mimicking the very structural units of hemiacetal or acetal ARTDs are relevant tools to decipher the intricate mechanisms of action and targets of these frontline, yet threatened, antimalarial drugs. Capitalizing on our results, we are currently evaluating 10-propargyloxy-DHA, designed for “click-chemistry”-based target visualisation and semi-quantitative proteomic profiling, as the ideal DHA / ARTMT / ARTET mimic due to its optimal similarity with these clinical antimalarial drugs.

Acknowledgements.

We thank Dr. Sandrine Cojean (UMR 8076 CNRS BioCIS, Université Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry, France) for the kind gift of artemether and artesunate, and Dr. Gordon Langsley (U 1016 INSERM and UMR 8104 CNRS, Institut Cochin, Paris, France) for the generous gift of artemisone. We also thank Dr. Emmanuel Roulland (UMR 8038 CNRS CiTCoM, Université de Paris, France) and Prof. Erwan Poupon (UMR 8076 CNRS BioCIS, Université Paris-Sud 11, Châtenay-Malabry, France) for constructive critics and suggestions regarding the preparation of this work. Dr. Anaïs Merckx as well as Romain Coppée (UMR 261 IRD MERIT, Université de Paris, France) are acknowledged for their kind assistance regarding the production of parasite lysate and that of Figure 4, respectively.

References.

1. Bhatt, S.*, et al.* The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **526**, 207-+ (2015).
2. Imwong, M.*, et al.* The spread of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infectious Diseases* **17**, 491-497 (2017).
3. Ariey, F.*, et al.* A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. *Nature* **505**, 50-+ (2014).
4. 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).

5. Tilley, L., Straimer, J., Gnadig, N.F., Ralph, S.A. & Fidock, D.A. Artemisinin Action and Resistance in Plasmodium falciparum. *Trends Parasitol* **32**, 682-696 (2016).
6. Suresh, N. & Haldar, K. Mechanisms of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *Curr Opin Pharmacol* **42**, 46-54 (2018).
7. Bridgford, J.L.*, et al.* Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat Commun* **9**, 3801 (2018).
8. Rocamora, F.*, et al.* Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites. *PLoS Pathog* **14**, e1006930 (2018).
9. Haldar, K., Bhattacharjee, S. & Safeukui, I. Drug resistance in Plasmodium. *Nat Rev Microbiol* **16**, 156-170 (2018).
10. Menard, S.*, et al.* Induction of Multidrug Tolerance in Plasmodium falciparum by Extended Artemisinin Pressure. *Emerg Infect Dis* **21**, 1733-1741 (2015).
11. Wang, J.*, et al.* Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in Plasmodium falciparum. *Nat Commun* **6**, 10111 (2015).
12. Ismail, H.M.*, et al.* Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites Plasmodium falciparum 3D7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 2080-2085 (2016).
13. Asawamahasakda, W., Ittarat, I., Pu, Y.M., Ziffer, H. & Meshnick, S.R. Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 1854-1858 (1994).
14. Wu, Y., Yue, Z.Y. & Wu, Y.L. Interaction of Qinghaosu (Artemisinin) with Cysteine Sulfhydryl Mediated by Traces of Non-Heme Iron. *Angew Chem Int Ed Engl* **38**, 2580-2582 (1999).
15. Yang, Y.Z., Little, B. & Meshnick, S.R. Alkylation of proteins by artemisinin. Effects of heme, pH, and drug structure. *Biochem Pharmacol* **48**, 569-573 (1994).
16. Robert, A., Cazelles, J. & Meunier, B. Characterization of the Alkylation Product of Heme by the Antimalarial Drug Artemisinin We are grateful to the CNRS for financial support, and to the French Ministery of Education for a PhD grant to J.C. Dr. Yannick Coppel (LCC-CNRS) is gratefully acknowledged for discussions on NMR data. *Angew Chem Int Ed Engl* **40**, 1954-1957 (2001).
17. Wu, W.M., Chen, Y.L., Zhai, Z., Xiao, S.H. & Wu, Y.L. Study on the mechanism of action of artemether against schistosomes: the identification of cysteine adducts of both carbon-centred free radicals derived from artemether. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 1645-1647 (2003).
18. Stocks, P.A.*, et al.* Evidence for a common non-heme chelatable-iron-dependent activation mechanism for semisynthetic and synthetic endoperoxide antimalarial drugs. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 6278-6283 (2007).
19. Posner, G.H.*, et al.* Further evidence supporting the importance of and the restrictions on a carbon-centered radical for high antimalarial activity of 1,2,4-trioxanes like artemisinin. *J Med Chem* **38**, 2273-2275 (1995).
20. Bousejra-El Garah, F.*, et al.* Comparison of the reactivity of antimalarial 1,2,4,5-tetraoxanes with 1,2,4-trioxolanes in the presence of ferrous iron salts, heme, and ferrous iron salts/phosphatidylcholine. *J Med Chem* **54**, 6443-6455 (2011).
21. Bousejra-El Garah, F., Pitie, M., Vendier, L., Meunier, B. & Robert, A. Alkylating ability of artemisinin after Cu(I)-induced activation. *J Biol Inorg Chem* **14**, 601-610 (2009).
22. Yang, Y.Z., Asawamahasakda, W. & Meshnick, S.R. Alkylation of human albumin by the antimalarial artemisinin. *Biochem Pharmacol* **46**, 336-339 (1993).
23. Robert, A., Benoit-Vical, F., Claparols, C. & Meunier, B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13676-13680 (2005).

24. Meshnick, S.R., Thomas, A., Ranz, A., Xu, C.M. & Pan, H.Z. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemin in its mechanism of antimalarial action. *Mol Biochem Parasitol* **49**, 181-189 (1991).
25. Hong, Y.L., Yang, Y.Z. & Meshnick, S.R. The interaction of artemisinin with malarial hemozoin. *Mol Biochem Parasitol* **63**, 121-128 (1994).
26. O'Neill, P.M. & Posner, G.H. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J Med Chem* **47**, 2945-2964 (2004).
27. Krungkrai, S.R. & Yuthavong, Y. The Antimalarial Action on Plasmodium-Falciparum of Qinghaosu and Artesunate in Combination with Agents Which Modulate Oxidant Stress. *T Roy Soc Trop Med H* **81**, 710-714 (1987).
28. Berman, P.A. & Adams, P.A. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. *Free Radical Bio Med* **22**, 1283-1288 (1997).
29. Meshnick, S.R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol* **32**, 1655-1660 (2002).
30. Gopalakrishnan, A.M. & Kumar, N. Antimalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 317-325 (2015).
31. Wang, J.*, et al.* Artemisinin Directly Targets Malarial Mitochondria through Its Specific Mitochondrial Activation. *Plos One* **5**, A158-A169 (2010).
32. Baker, J.K., McChesney, J.D. & Chi, H.T. Decomposition of arteether in simulated stomach acid yielding compounds retaining antimalarial activity. *Pharm Res* **10**, 662-666 (1993).
33. Haynes, R.K.*, et al.* Artesunate and dihydroartemisinin (DHA): Unusual decomposition products formed under mild conditions and comments an the fitness of DHA as an antimalarial drug. *Chemmedchem* **2**, 1448-1463 (2007).
34. Lindegardh, N.*, et al.* Major pitfalls in the measurement of artemisinin derivatives in plasma in clinical studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **876**, 54-60 (2008).
35. Huang, L.S., Olson, A., Gingrich, D. & Aweeka, F.T. Determination of artemether and dihydroartemisinin in human plasma with a new hydrogen peroxide stabilization method. *Bioanalysis* **5**, 1501-1506 (2013).
36. Grace, J.M., Aguilar, A.J., Trotman, K.M., Peggins, J.O. & Brewer, T.G. Metabolism of beta-arteether to dihydroqinghaosu by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* **26**, 313-317 (1998).
37. Silamut, K.*, et al.* Artemether bioavailability after oral or intramuscular administration in uncomplicated falciparum malaria. *Antimicrob Agents Ch* **47**, 3795-3798 (2003).
38. Haynes, R.K.*, et al.* Artemisone--a highly active antimalarial drug of the artemisinin class. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 2082-2088 (2006).
39. Nagelschmitz, J.*, et al.* First assessment in humans of the safety, tolerability, pharmacokinetics, and ex vivo pharmacodynamic antimalarial activity of the new artemisinin derivative artemisone. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3085-3091 (2008).
40. Golenser, J.*, et al.* Controlled release of artemisone for the treatment of experimental cerebral malaria. *Parasit Vectors* **10**, 117 (2017).
41. Zhou, Y.Q., Li, W.C. & Xiao, Y.L. Profiling of Multiple Targets of Artemisinin Activated by Hemin in Cancer Cell Proteome. *Acs Chem Biol* **11**, 882-888 (2016).
42. Liu, Y.*, et al.* Subcellular localization of a fluorescent artemisinin derivative to endoplasmic reticulum. *Org Lett* **12**, 1420-1423 (2010).
43. Maeno, Y.*, et al.* Morphologic effects of artemisinin in Plasmodium falciparum. *Am J Trop Med Hyg* **49**, 485-491 (1993).
44. Ismail, H.M.*, et al.* A Click Chemistry-Based Proteomic Approach Reveals that 1,2,4-Trioxolane and Artemisinin Antimalarials Share a Common Protein Alkylation Profile. *Angew Chem Int Ed Engl* **55**, 6401-6405 (2016).

45. Luo, X.D., Yeh, H.J.C., Brossi, A., Flippenanderson, J.I. & Gilardi, R. The Chemistry of Drugs .4. Configurations of Antimalarials Derived from Qinghaosu - Dihydroqinghaosu, Artemether, and Artesunic Acid. *Helv Chim Acta* **67**, 1515-1522 (1984).
46. Butler, A.R., Conforti, L., Hulme, P., Renton, L.M. & Rutherford, T.J. NMR and conformational studies of the antimalarial drug arte-ether. *J Chem Soc Perk T 2*, 2089-2092 (1999).
47. Haynes, R.K.*, et al.* C-10 ester and ether derivatives of dihydroartemisinin - 10-alpha artesunate, preparation of authentic 10-beta artesunate, and of other ester and ether derivatives bearing potential aromatic intercalating groups at C-10. *Eur J Org Chem*, 113-132 (2002).
48. Laurent, S.A., Robert, A. & Meunier, B. C10-modified artemisinin derivatives: efficient heme-alkylating agents. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 2060-2063; author reply 2064-2065 (2005).
49. Laurent, S.A.L., Robert, A. & Meunier, B. C10-modified artemisinin derivatives: Efficient heme-alkylating agents. *Angew Chem Int Edit* **44**, 2060-2063 (2005).
50. Galal, A.M., Ahmad, M.S., El-Feraly, F.S. & McPhail, A.T. New products from the reactions of artemisinin with ammonia and amines. *J Nat Prod* **62**, 54-58 (1999).
51. Torok, D.S., Ziffer, H., Meshnick, S.R., Pan, X.Q. & Ager, A. Syntheses and antimalarial activities of N-substituted 11-azaartemisinins. *J Med Chem* **38**, 5045-5050 (1995).
52. Singh, A.S.*, et al.* Amino- and Hydroxy-Functionalized 11-Azaartemisinins and Their Derivatives. *Org Lett* **10**, 5461-5464 (2008).
53. Xie, D.Y., Ma, D.M., Judd, R. & Jones, A.L. Artemisinin biosynthesis in Artemisia annua and metabolic engineering: questions, challenges, and perspectives. *Phytochem Rev* **15**, 1093-1114 (2016).
54. Wunderlich, J., Rohrbach, P. & Dalton, J.P. The malaria digestive vacuole. *Front Biosci (Schol Ed)* **4**, 1424-1448 (2012).
55. Hartwig, C.L.*, et al.* Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of Plasmodium falciparum malaria parasites is endoperoxide-dependent. *Biochemical Pharmacology* **77**, 322-336 (2009).
56. Haynes, R.K.*, et al.* Highly antimalaria-active artemisinin derivatives: biological activity does not correlate with chemical reactivity. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 1381-1385 (2004).
57. Zhang, J.*, et al.* Artesunate-induced mitophagy alters cellular redox status. *Redox Biol* **19**, 263-273 (2018).
58. Li, J.*, et al.* Artemisinins Target GABAA Receptor Signaling and Impair alpha Cell Identity. *Cell* **168**, 86-100 e115 (2017).
59. Yang, N.D.*, et al.* Artesunate Induces Cell Death in Human Cancer Cells via Enhancing Lysosomal Function and Lysosomal Degradation of Ferritin. *J Biol Chem* **289**, 33425-33441 (2014).
60. Eckstein-Ludwig, U.*, et al.* Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature* **424**, 957-961 (2003).
61. Amaratunga, C., Witkowski, B., Khim, N., Menard, D. & Fairhurst, R.M. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum. *Lancet Infect Dis* **14**, 449-450 (2014).
62. Avery, M.A., Gao, F., Chong, W.K., Mehrotra, S. & Milhous, W.K. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 1. Synthesis and comparative molecular field analysis of C-9 analogs of artemisinin and 10-deoxoartemisinin. *J Med Chem* **36**, 4264-4275 (1993).
63. Robert, A. & Meunier, B. Characterization of the first covalent adduct between artemisinin and a heme model. *J Am Chem Soc* **119**, 5968-5969 (1997).
64. Accardo, A.*, et al.* Interaction of iron(II)-heme and artemisinin with a peptide mimic of Plasmodium falciparum HRP-II. *J Inorg Biochem* **101**, 1739-1747 (2007).

65. Olafson, K.N., Ketchum, M.A., Rimer, J.D. & Vekilov, P.G. Mechanisms of hematin crystallization and inhibition by the antimalarial drug chloroquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 4946-4951 (2015).
66. Olafson, K.N., Rimer, J.D. & Vekilov, P.G. Growth of Large Hematin Crystals in Biomimetic Solutions. *Cryst Growth Des* **14**, 2123-2127 (2014).
67. Munoz-Durango, K.*, et al.* Detection, Characterization, and Screening of Heme-Binding Molecules by Mass Spectrometry for Malaria Drug Discovery. *Anal Chem* **84**, 3324-3329 (2012).
68. Jones, M.*, et al.* Antitumour and antimalarial activity of artemisinin-acridine hybrids. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 2033-2037 (2009).
69. Zhang, X.*, et al.* Fluorescent Coumarin-Artemisinin Conjugates as Mitochondria-Targeting Theranostic Probes for Enhanced Anticancer Activities. *Chem-Eur J* **21**, 17415-17421 (2015).

IV. Poster: Deciphering *Plasmodium falciparum* gametocytes interaction with human bone marrow, European School of Hematology, Paris, France, 2018

Deciphering *Plasmodium falciparum* gametocytes interactions with human bone marrow

Gaëlle Neveu[1,2], Florian Dupuy[1,2], Pradeep Annamalai[3], Meriem Ladli[1,2], Daniela Barbieri[1,2], Bernina Naissant[1,2], Cyrielle Richard[1,2], Rafael M. Martins[4], José-Juan Lopez-Rubio[4], Alfred Cortès[5], Dominique Mazier[3], Frédérique Verdier[1,2], Catherine Lavazec[1,2].

[1]Inserm U1016, Institut Cochin, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France [2]Laboratory of Excellence GR-Ex [3]UPMC Faculté de Medecine - INSERM U1135, CNRS ERL 8255, CIMI , Paris, France [4]CNRS5290, IRD224, University Montpellier 1 & 2, MIVEGEC, Montpellier, France [5]ISGlobal, CRESIB, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

INTRODUCTION

Besides their crucial role in normal erythroid development, erythroblastic islands may also play a central role in mechanisms allowing transmission of the deadliest of human malaria parasites, *Plasmodium falciparum*. *P. falciparum* gametocytes, the only parasite stages responsible for transmission from human to mosquitoes, have been recently shown to sequester and develop in the human bone marrow parenchyma, where they are enriched at erythroblastic islands[1]. These observations raise the questions how *P. falciparum* gametocytes interact with the bone marrow microenvironment to complete their development. The presence of gametocytes in this niche may be explained either by **adhesion of gametocyte-infected erythrocytes (GIE) to erythroid cells**, or by **infection of erythroblasts by the parasite** (figure 1).

Here, we have performed **cell-cell adhesion assays** to investigate interactions between immature GIE and human primary erythroblasts or erythroid cell lines. Our results indicate that GIE do not specifically adhere to erythroblasts, even when the parasite adhesins STEVOR are overexpressed at the erythrocyte surface.
Infections experiments show that *P. falciparum* parasites successfully develop within erythroid cells, and all stages of development (asexual and sexual) can be observed. This protocol will allow to characterize erythroblast infection compared to erythrocyte infection, in particular parasite proteins export in infected-erythroblast.

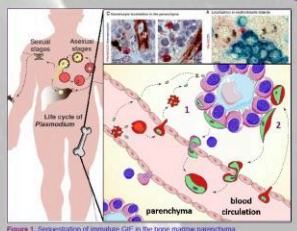


Figure 1. Sequestration of immature GIE in the bone marrow parenchyma.
We propose two hypothesis for gametocyte sequestration:
1. **Erythroblast infection by a merozoite**, then the parasite develops in the nucleated erythroid cell until stage IV gametocytes. Mature gametocytes within reticulocytes may be **released in the blood circulation.**
2. Immature gametocyte-infected erythrocytes sequester in the parenchyma **by cytoadhesion to erythroblasts**.

Addressing GIE adhesive properties to erythroblastic island cells

Validation of the adhesion protocol

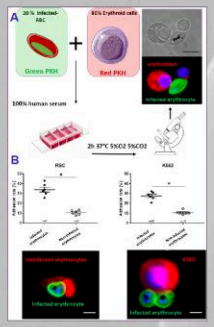


Figure 2. A. 20% of PKH67-stained GIE are mixed with 80% PKH26-stained erythroblasts. Cells are allowed to adhere 2 hours at 37° C, 300 cells per condition are counted at the microscope.
B. With this adhesion protocol, a rosetting parasite line known to adhere to ABO blood group[2] significantly adheres to non infected erythrocytes and to the K562 erythroid cells.

The rosetting-like adhesion hypothesis

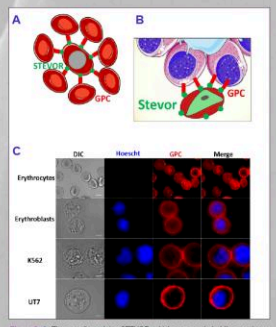


Figure 3. A. The parasite proteins STEVOR, which are exported at the membrane of infected erythrocytes, have adhesive properties in asexual stages. STEVOR bind to Glycophorin C (GPC) on uninfected erythrocytes surface, leading to the formation of rosettes.[3]
B. Since GPC is expressed in erythroblasts, we hypothetize that the STEVOR proteins expressed at the surface of GIE can bind GPC located at the surface of erythroblasts, leading to a cytoadhesion phenotype in the bone marrow parenchyma.
C. Immunofluorescence assays shows that GPC is expressed at the surface of erythrocytes, erythroblasts and 2 erythroid cell lines, K562 cells and UT7 cells.

GIE from different clones do not adhere to erythroid cells

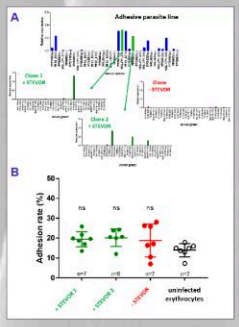


Figure 4. A. To identify *stevor* genes potentially involved in adhesion, a RT-qPCR was performed on a rosetting parasite line [3]. Two clones that express at least one *stevor* gene and one clone that does not express any *stevor* were selected to perform adhesion assay to K562 cells.
B. No significant adhesion to K562 cells was observed for any clones.

GIE from different *stevor* transgenic lines do not adhere to erythroid cells

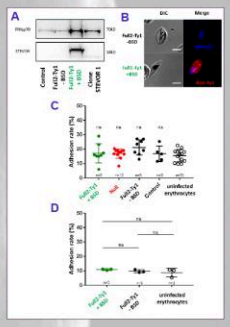


Figure 5. STEVOR protein is overexpressed in the transgenic line Fal07-Tyr1 under BSD treatment (A) and correctly exported at the infected erythrocyte membrane (B).
The overexpression of STEVOR does not allow a significant adhesion to the K562 cells (C) or to human primary erythroblasts (D).

Characterization of erythroblast infection by *P. falciparum*

Erythroblast infection protocol

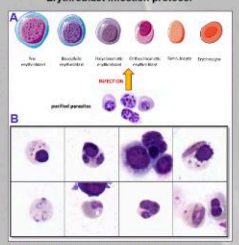


Figure 6. A. Purified trophozoites are added to human primary erythroblasts at the orthochromatic stage. B. Ring stages, trophozoite stages, schizont stages and gametocytes within erythroblasts (upper panel) and reticulocytes (lower panel).

Asexual and sexual parasites can develop within an erythroblast

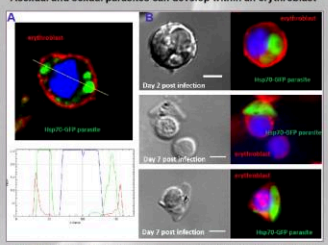


Figure 7. A. Confocal microscopy shows that GFP-parasites are inside the erythroblast, between the erythroblast membrane (PKH-26) and the nucleus (hoescht).
B. GFP-parasites can develop within erythroblasts until stage IV gametocyte.

Ultrastructure of gametocyte-infected erythroblast

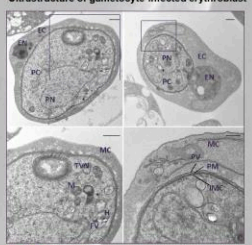


Figure 8. Electronic microscopy shows that gametocytes in infected erythroblasts present classical structures: food vacuole (FV) containing hemozoin (H), mitochondria (M), Maurer's Cleft (MC), a tubulo-vesicular network (TVN), the parasite vacuole (PV), the plasma membrane (PM) and the inner membrane complex (IMC). (EN: Erythroblast nucleus, EC : erythroblast cytosol, PC : parasite cytosol, PN : parasite nucleus)

***P. falciparum* exports proteins to erythroblast cytoplasm and membrane**

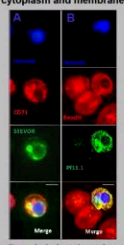


Figure 9. A. Asexual parasites export STEVOR proteins to the erythroblast. B. The gametocyte specific protein PF11.1 colocalizes with Band3 at the infected erythroblast membrane.

CONCLUSION

The first part of this work shows that **GIE are not able to adhere to erythroid cell lines and primary erythroblasts**. Contrary to what has been shown in asexual stages[3], the overexpression of STEVOR in GIE does not allow a rosetting-like adhesion to glycophorin C on erythroid cells. However, recent results showing that GIE adhere to mesenchymal cells in the bone marrow parenchyma[5] suggest that GIE could be effectively retained in the parenchyma by cytoadhesion.
This work also shows that human primary erythroblasts can be efficiently infected by *P. falciparum*. This results suggest that association of immature gametocytes with erythroblastic islands could also be explained by the infection of developing erythroblasts. **Erythroblast infection until stage IV gametocytes** is in line with the hypothesis of sequestration of erythroblasts infected with immature gametocytes and then release of reticulocytes infected with stages V. Moreover, **the parasite can export its own proteins in the infected erythroblast**. Several experiments are ongoing to better characterize erythroblast infection. The export of other parasite proteins to erythroblast, and more specifically at the surface of the infected-cell membrane will be considered. We will also address the sexual conversion in erythroblasts compared to infected-erythrocytes. Single cell approaches will be used to investigate how the parasite modifies the infected-erythroblast : patch clamp to address permeability of the infected-erythroblast and atomic force microscopy to address its deformability and adhesive properties.

References

1. Joice *et al.* *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. Science translational medicine. 2014
2. Vigan-Womas *et al.* An in vivo and in vitro model of Plasmodium falciparum rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. Infection and Immunity. 2008
3. Niang *et al.* STEVOR Is a Plasmodium falciparum Erythrocyte Binding Protein that Mediates Merozoite Invasion and Rosetting. Cell Host & Microbes. 2014
4. Vigan-Womas *et al.* Allelic diversity of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 entails variant-specific red cell surface epitopes. PloS One. 2011
5. Messina *et al.* Gametocytes of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Interact With and Stimulate Bone Marrow Mesenchymal Cells to Secrete Angiogenetic Factors. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2018

V. Poster: Deciphering STEVOR adhesive properties of *Plasmodium falciparum* gametocyte-infected erythrocytes to erythroblastic island cells, Malaria Parasitology Meeting, Woods Hole, USA, 2018

Deciphering STEVOR adhesive properties of Plasmodium falciparum *gametocyte-infected erythrocytes to erythroblastic island cells*

Gaëlle Neveu[1,2], Florian Dupuy[1,2], Meriem Ladli[1,2], Daniela Barbieri[1,2], Bernina Naissant[1,2], Cyrielle Richard[1,2], Rafael M. Martins[3], José-Juan Lopez-Rubio[3], Anna Bachmann[4], Frédérique Verdier[1,2], Catherine Lavazec[1,2].

[1]Inserm U1016, Institut Cochin, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France [2]Laboratory of Excellence GR-Ex [3]CNRS5290, IRD224, University Montpellier 1 & 2, MIVEGEC, Montpellier, France [4]Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany

INTRODUCTION

Plasmodium falciparum gametocytes, the sexual stages responsible for malaria parasite transmission, develop in the human bone marrow parenchyma in contact with erythroblastic islands[1] which consist of a macrophage surrounded by differentiating erythroblasts (Figure 1A). The unveiling of the hidden sites for gametocytes maturation raised the questions how these parasite stages develop and sequester in the bone marrow micro-environment and how they interact with these islands.

The close proximity of immature gametocyte infected-erythrocytes (GIE) with erythroblastic islands suggests that GIE may adhere to erythroid precursors via a mechanism similar to the adhesion of asexual stages-infected erythrocytes to uninfected erythrocytes (rosetting). Glycophorin C (GPC) is one of the key host receptors for rosetting with erythrocytes infected with both *P. falciparum* and *P. vivax* and it as been shown that GPC interacts with the parasite proteins STEVOR in asexual stages[2]. Interestingly, STEVOR proteins are exported to the infected erythrocyte membrane by immature gametocytes and GPC protein expression starts in the early stage of erythropoiesis. Based on these observations, we hypothesized that the adhesion of STEVORs to GPC may contribute to sequestration of immature gametocytes in the bone marrow parenchyma by promoting adhesion of immature GIE to erythroblasts (Figure 1B).

Here, we have performed cell-cell adhesion assays to investigate interactions between immature GIE and human primary erythroblasts or erythroid cell lines. In order to determine the contribution of STEVOR proteins to these interactions, we used clonal lines that express specific *stevor* genes as well as parasite lines that overexpress or down-regulate members of the *stevor* gene family. Our results indicate that GIE overexpressing STEVOR do not specifically adhere to erythroblasts, in agreement with our observation that the STEVOR adhesive domain is not exposed at the surface of GIE.

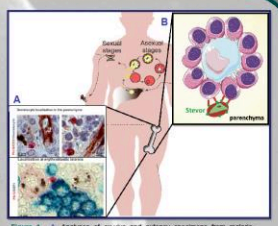


Figure 1. A. Analyses of ex-vivo and autopsy specimens from malaria-infected patients revealed that immature gametocytes are predominantly localized in the bone marrow parenchyma, where they are enriched at erythroblastic islands.
B. We propose that immature gametocyte-infected erythrocytes sequester in the parenchyma by cytoadhesion to erythroblasts.

Validation of the cell-cell adhesion protocol

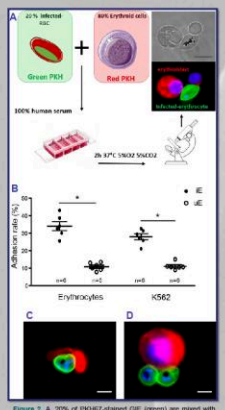


Figure 2. A. 20% of PKH67-stained GIE (green) are mixed with 80% PKH26-stained erythroblasts (red). Cells are allowed to adhere 2 hours at 37°. C, 300 cells per condition are counted at the microscope. With this adhesion protocol, a rosetting parasite line known to adhere to ABO blood group[2] significantly adheres to non infected erythrocytes (B,C) and to the K562 erythroid cells (B,D). iE: infected erythrocytes, uE: uninfected erythrocytes.

NF54 GIE fail to adhere to erythroid cells

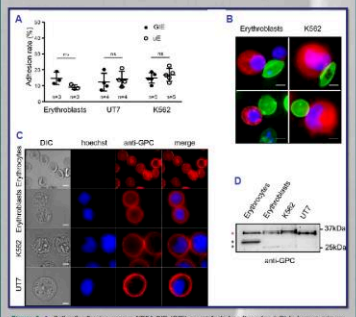


Figure 3. A. Cell-cell adhesion assays NF54 GIE (GIE) or uninfected erythrocytes (uE) to human primary erythroblasts, U17 cells and K562 cells show that NF54 GIE do not specifically adhere to erythroid cells.
B. Live microscopy imaging showing non-specific adhesion of NF54 GIE (upper panel) and uninfected erythrocytes (lower panel) (green) to human primary erythroblasts or K562 (red).
C. Immunofluorescence analysis (IFA) of paraformaldehyde-fixed uninfected erythrocytes, erythroblasts, K562 cells and, showing the presence of GPC (red) at the surface of all erythroid cells.
D. Western blot analysis showing the presence and the size of GPC in erythroid cells. Red star indicates the expected size of fully glycosylated GPC (32 kDa). Black stars indicate degradation products.

Endogenous levels of STEVOR expression do not promote GIE adhesion to erythroid cells

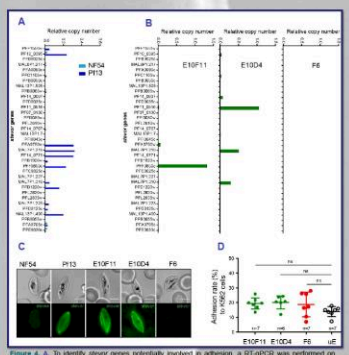


Figure 4. A. To identify *stevor* genes potentially involved in adhesion, a RT-qPCR was performed on trophozoites of the rosetting parasite line 3D7-PI13[2] in comparison with the NF54 line. Seven *stevor* genes were significantly transcribed in the rosetting line. B. Two clones that express at least one of these 7 genes and one clone that does not express any *stevor* were selected to perform adhesion assays to K562 cells. C. IFA of permeabilized GIE showing the expression of STEVOR protein (green) in NF54, 3D7/PI13, E10F11, E10D4 and F6 parasite lines. D. Cell-cell adhesion assays of GIE from NF54 clones or of uninfected erythrocytes (uE) to K562 cells show no significant adhesion.

Overexpression of STEVOR does not promote GIE adhesion to erythroid cells

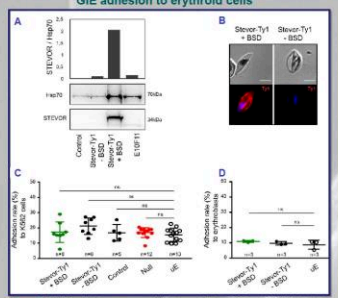


Figure 5. STEVOR protein is overexpressed in the transgenic Stevor-Ty1 line under BSD treatment (A) and correctly exported at the infected erythrocyte membrane (B).
The overexpression of STEVOR does not allow a significant adhesion to the K562 cells (C) or to human primary erythroblasts (D).

STEVOR proteins are not exposed at the GIE surface

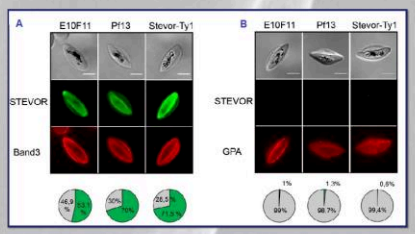


Figure 6. IFA of permeabilized (A) and non-permeabilized (B) immature GIE from the E10F11, 3D7/PI13 and Stevor-Ty1 (+BSD) parasite lines show that STEVOR is not exposed at the GIE surface. Band 3 staining and GPA staining control permeabilization and presence of the erythrocyte membrane, respectively. Pie charts show proportions of GIE positive (green) or negative (grey) for STEVOR staining.

CONCLUSION

In conclusion, this work shows that **GIE are not able to adhere to erythroid cell lines and primary erythroblasts**. Contrary to what has been shown in asexual stages[2], the overexpression of STEVOR in GIE does not allow a rosetting-like adhesion to glycophorin C on erythroid cells. This result may be explained by the **absence of STEVOR adhesive domain at the erythrocyte surface of GIE** which contrasts with data reported for asexual stages[2]. The different topologies in asexual and sexual stages may reflect different functions of the protein and may reveal a strategy that the parasite has evolved to differently modify its host cell to adapt to different microenvironments.

It remains to be clarified how gametocytes sequester in the bone marrow parenchyma. The proposed contribution of infected erythrocyte stiffness to this phenotype is supported by recent data showing that sildenafil citrate, a phosphodiesterase inhibitor known to keep GIE in a rigid state, increases the enrichment of *Plasmodium berghei* gametocytes in the bone marrow of infected mice[5]. It is also possible that immature GIE adhere to non-erythroid bone marrow cells : interestingly, recent work revealed that erythrocytes infected with immature gametocytes or with asexual stages adhere to human bone marrow mesenchymal cells[6]. Furthermore, we cannot exclude that the association of immature gametocytes with erythroblastic islands reflects the infection of erythroblasts by gametocytes.

References

1. Joice et al. *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. Science translational medicine. 2014
2. Niang et al. STEVOR Is a Plasmodium falciparum Erythrocyte Binding Protein that Mediates Merozoite Invasion and Rosetting. Cell Host & Microbes. 2014.
3. Vigan-Womas et al. An in vivo and in vitro model of Plasmodium falciparum rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. Infection and Immunity. 2008
4. Vigan-Womas et al. Allelic diversity of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 entails variant-specific red cell surface epitopes. PloS One. 2011
5. De Niz, M. *et al* Plasmodium gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. Sci Adv. 2018
6. Messaika et al. Gametocytes of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Interact With and Stimulate Bone Marrow Mesenchymal Cells to Secrete Angiogenetic Factors. Frontiers in cellular and infection microbiology 2018

VI. Communication orale: *Plasmodium falciparum* immature gametocytes development in human primary erythroblasts, BioMalPar, Heidelber, Allemagne, 2019

Plasmodium falciparum immature gametocytes development in human primary erythroblasts

Gaëlle Neveu[1,2], Cyrielle Richard[1,2], Fiona Volpe[1,2], Florian Dupuy[1,2], Bernina Naissant[1,2], Pradeep Annamalai[3], Rafael M. Martins[4], Jose-Juan Lopez-Rubio[4], Dominique Mazier[3], Frédérique Verdier[1,2], Catherine Lavazec[1,2].

[1] Inserm U1016, Institut Cochin, CNRS, UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France
[2] Laboratory of Excellence GR-Ex
[3]UPMC Faculté de Medecine - INSERM U1135, CNRS ERL 8255, CIMI, Paris, France
[4]CNRS5290, IRD224, University Montpellier 1 & 2, MIVEGEC, Montpellier, France

Plasmodium falciparum gametocytes, the only stages responsible for malaria parasites transmission from human to mosquitoes, have been shown to sequester and develop in the human bone marrow parenchyma, where they are enriched at erythroblastic islands. These specialized niches, where occurs the terminal erythroid differentiation, consist of a macrophage surrounded by differentiating erythroblasts. The presence of gametocytes in this niche may reflect either adhesion to erythroblastic islands cells or gametocyte development in erythroblasts. These mechanisms may contribute to immature gametocytes sequestration in the bone marrow parenchyma.
Here, we have set up an infection protocol to produce gametocytes in a culture of human primary erythroblasts. By using colorimetric, fluorescent and electronic microscopy we have characterized the complete gametocyte development in these erythroid precursors. Although only late stages erythroblasts support *P. falciparum* infection, a delay in the erythroid maturation process upon infection allows gametocytes to complete their development until stage IV in nucleated cells. Identification of parasite factors inducing the delay in the rate of enucleation is ongoing. Altogether, these results support the hypothesis that immature gametocytes may sequester in the bone marrow parenchyma by infecting late stage erythroblasts and that release of infected reticulocytes in circulation after erythroblasts enucleation may allow mature gametocytes to reach the peripheral blood.

Prix de la meilleure présentation orale.

VII. Communication orale: *Plasmodium falciparum* immature gametocytes development in human primary erythroblasts, Gordon Research Seminar, Les Diablerets, Suisse 2019

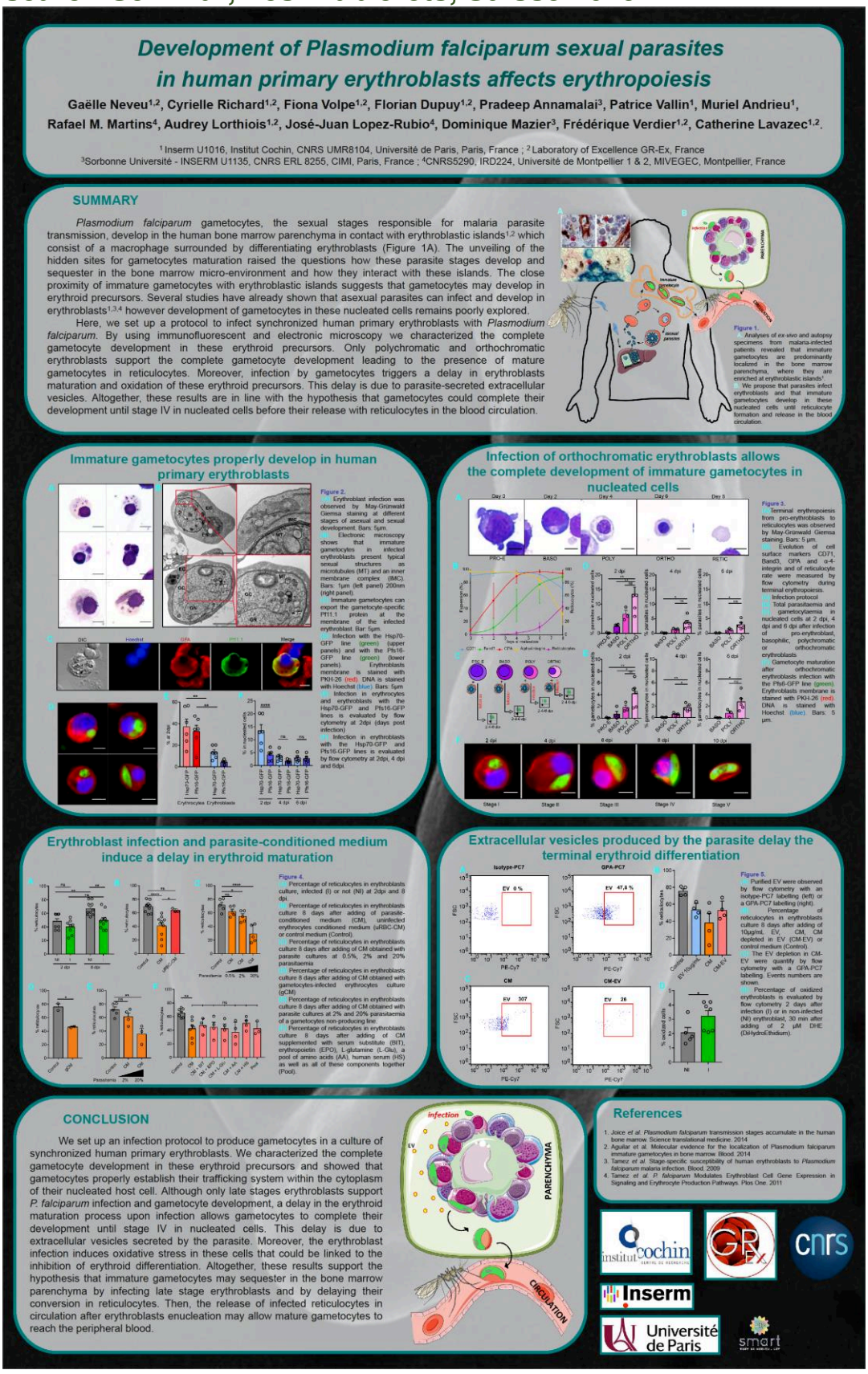
Plasmodium falciparum immature gametocytes development in human primary erythroblasts

Gaëlle Neveu[1,2], Cyrielle Richard[1,2], Fiona Volpe[1,2], Florian Dupuy[1,2], Bernina Naissant[1,2], Pradeep Annamalai[3], Rafael M. Martins[4], Jose-Juan Lopez-Rubio[4], Dominique Mazier[3], Frédérique Verdier[1,2], Catherine Lavazec[1,2].

[1] Inserm U1016, Institut Cochin, CNRS, UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France
[2] Laboratory of Excellence GR-Ex
[3]UPMC Faculté de Medecine - INSERM U1135, CNRS ERL 8255, CIMI, Paris, France
[4]CNRS5290, IRD224, University Montpellier 1 & 2, MIVEGEC, Montpellier, France

Plasmodium falciparum gametocytes, the only stages responsible for malaria parasites transmission from human to mosquitoes, have been shown to sequester and develop in the human bone marrow parenchyma, where they are enriched at erythroblastic islands. These specialized niches, where occurs the terminal erythroid differentiation, consist of a macrophage surrounded by differentiating erythroblasts. The presence of gametocytes in this niche may reflect either adhesion to erythroblastic islands cells or gametocyte development in erythroblasts. These mechanisms may contribute to immature gametocytes sequestration in the bone marrow parenchyma.
Here, we have set up an infection protocol to produce gametocytes in a culture of human primary erythroblasts. By using colorimetric, fluorescent and electronic microscopy we have characterized the complete gametocyte development in these erythroid precursors. Although only late stages erythroblasts support *P. falciparum* infection, a delay in the erythroid maturation process upon infection allows gametocytes to complete their development until stage IV in nucleated cells. Identification of parasite factors inducing the delay in the rate of enucleation is ongoing. Altogether, these results support the hypothesis that immature gametocytes may sequester in the bone marrow parenchyma by infecting late stage erythroblasts and that release of infected reticulocytes in circulation after erythroblasts enucleation may allow mature gametocytes to reach the peripheral blood.

VIII. Poster: Development of *Plasmodium falciparum* sexual parasites in human primary erythroblasts affects erythropoiesis, Gordon Research Seminar, Les Diablerets, Suisse 2019



IX. Communication orale: Development of *Plasmodium falciparum* sexual parasites in human primary erythroblasts affects erythropoiesis, Malaria Parasitology Meeting, Woods Hole, USA, 2019

Plasmodium falciparum immature gametocytes development in human primary erythroblasts

Gaëlle Neveu[1,2], Cyrielle Richard[1,2], Fiona Volpe[1,2], Florian Dupuy[1,2], Patrice Vallin[1], Muriel Andrieu[1], Bernina Naissant[1,2], Pradeep Annamalai[3], Rafael M. Martins[4], Jose-Juan Lopez-Rubio[4], Dominique Mazier[3], Frédérique Verdier[1,2], Catherine Lavazec[1,2].

[1] Inserm U1016, Institut Cochin, CNRS, UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France
[2] Laboratory of Excellence GR-Ex
[3]UPMC Faculté de Medecine - INSERM U1135, CNRS ERL 8255, CIMI, Paris, France
[4]CNRS5290, IRD224, University Montpellier 1 & 2, MIVEGEC, Montpellier, France

Plasmodium falciparum gametocytes, the only stages responsible for malaria parasites transmission from human to mosquitoes, have been shown to sequester and develop in the human bone marrow parenchyma, where they are enriched at erythroblastic islands. These specialized niches, where occurs the terminal erythroid differentiation, consist of a macrophage surrounded by differentiating erythroblasts. The presence of gametocytes in this niche may reflect either adhesion to bone marrow parenchyma cells or gametocyte development in erythroblasts. These mechanisms may contribute to immature gametocytes sequestration in the bone marrow parenchyma.
Here, we have set up an infection protocol to produce gametocytes in a culture of human primary erythroblasts. By using colorimetric, fluorescent and electronic microscopy we have characterized the complete gametocyte development in these erythroid precursors. Although only late stages erythroblasts support *P. falciparum* infection, a delay in the erythroid maturation process upon infection allows gametocytes to complete their development until stage IV in nucleated cells. We have shown that extracellular vesicles produced by parasites are at least one of the factors inducing this delay in the rate of enucleation. Altogether, these results support the hypothesis that immature gametocytes may sequester in the bone marrow parenchyma by infecting late stage erythroblasts and that release of infected reticulocytes in circulation after erythroblasts enucleation may allow mature gametocytes to reach the peripheral blood.

Références bibliographiques

Abdel-Latif, M.S., Khattab, A., Lindenthal, C., Kremsner, P.G., and Klinkert, M.-Q. (2002). Recognition of variant Rifin antigens by human antibodies induced during natural Plasmodium falciparum infections. Infect. Immun. *70*, 7013–7021.

Abdel-Latif, M.S., Dietz, K., Issifou, S., Kremsner, P.G., and Klinkert, M.-Q. (2003). Antibodies to Plasmodium falciparum rifin proteins are associated with rapid parasite clearance and asymptomatic infections. Infect. Immun. *71*, 6229–6233.

Aguilar, R., Magallon-Tejada, A., Achtman, A.H., Moraleda, C., Joice, R., Cisteró, P., Li Wai Suen, C.S.N., Nhabomba, A., Macete, E., Mueller, I., et al. (2014a). Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. Blood *123*, 959–966.

Aguilar, R., Moraleda, C., Achtman, A.H., Mayor, A., Quintó, L., Cisteró, P., Nhabomba, A., Macete, E., Schofield, L., Alonso, P.L., et al. (2014b). Severity of anaemia is associated with bone marrow haemozoin in children exposed to Plasmodium falciparum. Br. J. Haematol. *164*, 877–887.

Aingaran, M., Zhang, R., Law, S.K., Peng, Z., Undisz, A., Meyer, E., Diez-Silva, M., Burke, T.A., Spielmann, T., Lim, C.T., et al. (2012). Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Cell. Microbiol. *14*, 983–993.

Alano, P., Premawansa, S., Bruce, M.C., and Carter, R. (1991). A stage specific gene expressed at the onset of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. *46*, 81–88.

Alano, P., Read, D., Bruce, M., Aikawa, M., Kaido, T., Tegoshi, T., Bhatti, S., Smith, D.K., Luo, C., Hansra, S., et al. (1995). COS cell expression cloning of Pfg377, a Plasmodium falciparum gametocyte antigen associated with osmiophilic bodies. Mol. Biochem. Parasitol. *74*, 143–156.

Aline, F., Bout, D., Amigorena, S., Roingeard, P., and Dimier-Poisson, I. (2004). Toxoplasma gondii antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against T. gondii infection. Infect. Immun. *72*, 4127–4137.

Arora, G., Hart, G.T., Manzella-Lapeira, J., Doritchamou, J.Y., Narum, D.L., Thomas, L.M., Brzostowski, J., Rajagopalan, S., Doumbo, O.K., Traore, B., et al. (2018). NK cells inhibit Plasmodium falciparum growth in red blood cells via antibody-dependent cellular cytotoxicity. eLife *7*.

Aviv, H., Voloch, Z., Bastos, R., and Levy, S. (1976). Biosynthesis and stability of globin mRNA in cultured erythroleukemic Friend cells. Cell *8*, 495–503.

Awandare, G.A., Kempaiah, P., Ochiel, D.O., Piazza, P., Keller, C.C., and Perkins, D.J. (2011). Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. Am. J. Hematol. *86*, 155–162.

Babatunde, K.A., Mbagwu, S., Hernández-Castañeda, M.A., Adapa, S.R., Walch, M., Filgueira, L., Falquet, L., Jiang, R.H.Y., Ghiran, I., and Mantel, P.-Y. (2018). Malaria infected red blood cells release small regulatory RNAs through extracellular vesicles. Sci. Rep. *8*.

Bachmann, A., Petter, M., Tilly, A.-K., Biller, L., Uliczka, K.A., Duffy, M.F., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2012). Temporal expression and localization patterns of variant surface antigens in clinical Plasmodium falciparum isolates during erythrocyte schizogony. PloS One *7*, e49540.

Bachmann, A., Scholz, J.A.M., Janßen, M., Klinkert, M.-Q., Tannich, E., Bruchhaus, I., and Petter, M. (2015). A comparative study of the localization and membrane topology of members of the RIFIN, STEVOR and PfMC-2TM protein families in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Malar. J. *14*, 274.

Bancells, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., Kafsack, B.F.C., and Cortés, A. (2019). Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite Plasmodium falciparum. Nat. Microbiol. *4*, 144–154.

Barbé, E., Huitinga, I., Döpp, E.A., Bauer, J., and Dijkstra, C.D. (1996). A novel bone marrow frozen section assay for studying hematopoietic interactions in situ: the role of stromal bone marrow macrophages in erythroblast binding. J. Cell Sci. *109 (Pt 12)*, 2937–2945.

Barnwell, J.W., Asch, A.S., Nachman, R.L., Yamaya, M., Aikawa, M., and Ingravallo, P. (1989). A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J. Clin. Invest. *84*, 765–772.

Baro, B., Deroost, K., Raiol, T., Brito, M., Almeida, A.C.G., de Menezes-Neto, A., Figueiredo, E.F.G., Alencar, A., Leitão, R., Val, F., et al. (2017). Plasmodium vivax gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile. PLoS Negl. Trop. Dis. *11*, e0005365.

Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldman, M., Taraschi, T.F., and Howard, R.J. (1995). Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. Cell *82*, 77–87.

Beck, J.R., Rodriguez-Fernandez, I.A., de Leon, J.C., Huynh, M.-H., Carruthers, V.B., Morrissette, N.S., and Bradley, P.J. (2010). A novel family of Toxoplasma IMC proteins displays a hierarchical organization and functions in coordinating parasite division. PLoS Pathog. *6*, e1001094.

Bei, A.K., Brugnara, C., and Duraisingh, M.T. (2010). In vitro genetic analysis of an erythrocyte determinant of malaria infection. J. Infect. Dis. *202*, 1722–1727.

Bengtsson, A., Joergensen, L., Rask, T.S., Olsen, R.W., Andersen, M.A., Turner, L., Theander, T.G., Hviid, L., Higgins, M.K., Craig, A., et al. (2013). A novel domain cassette identifies Plasmodium falciparum PfEMP1 proteins binding ICAM-1 and is a target of cross-reactive, adhesion-inhibitory antibodies. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *190*, 240–249.

Berendt, A.R., Simmons, D.L., Tansey, J., Newbold, C.I., and Marsh, K. (1989). Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum. Nature *341*, 57–59.

Bessis, M. (1958). L'ilot erythroblastique. Unite functionelle de la moelle osseuse. Rev Hematol 13:8–11.

Bessis, M.C., and Breton-Gorius, J. (1962). Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: a critical review. Blood *19*, 635–663.

Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F.J., and Schorey, J.S. (2007). Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. Blood *110*, 3234–3244.

Blisnick, T., Morales Betoulle, M.E., Barale, J.C., Uzureau, P., Berry, L., Desroses, S., Fujioka, H., Mattei, D., and Braun Breton, C. (2000). Pfsbp1, a Maurer's cleft Plasmodium falciparum protein, is associated with the erythrocyte skeleton. Mol. Biochem. Parasitol. *111*, 107–121.

Blythe, J.E., Yam, X.Y., Kuss, C., Bozdech, Z., Holder, A.A., Marsh, K., Langhorne, J., and Preiser, P.R. (2008). Plasmodium falciparum STEVOR proteins are highly expressed in patient isolates and located in the surface membranes of infected red blood cells and the apical tips of merozoites. Infect. Immun. *76*, 3329–3336.

Boehm, D., Healy, L., Ring, S., and Bell, A. (2018). Inhibition of ex vivo erythropoiesis by secreted and haemozoin-associated Plasmodium falciparum products. Parasitology *145*, 1865–1875.

Böhme, U., Otto, T.D., Cotton, J.A., Steinbiss, S., Sanders, M., Oyola, S.O., Nicot, A., Gandon, S., Patra, K.P., Herd, C., et al. (2018). Complete avian malaria parasite genomes reveal features associated with lineage-specific evolution in birds and mammals. Genome Res. *28*, 547–560.

Brancucci, N.M., De Niz, M., and Straub (2018). Probing Plasmodium falciparum sexual commitment at the single-cell level. - PubMed - NCBI.

Brancucci, N.M.B., Bertschi, N.L., Zhu, L., Niederwieser, I., Chin, W.H., Wampfler, R., Freymond, C., Rottmann, M., Felger, I., Bozdech, Z., et al. (2014). Heterochromatin

protein 1 secures survival and transmission of malaria parasites. Cell Host Microbe *16*, 165–176.

Brancucci, N.M.B., Goldowitz, I., Buchholz, K., Werling, K., and Marti, M. (2015). An assay to probe Plasmodium falciparum growth, transmission stage formation and early gametocyte development. Nat. Protoc. *10*, 1131–1142.

Brancucci, N.M.B., Gerdt, J.P., Wang, C., De Niz, M., Philip, N., Adapa, S.R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S.D., et al. (2017). Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum. Cell *171*, 1532–1544.e15.

Branemark, P.I. (1959). Vital microscopy of bone marrow in rabbit. Scand. J. Clin. Lab. Invest. *11 Supp 38*, 1–82.

Bruce, M.C., Alano, P., Duthie, S., and Carter, R. (1990). Commitment of the malaria parasite Plasmodium falciparum to sexual and asexual development. Parasitology *100 Pt 2*, 191–200.

Bruce, M.C., Carter, R.N., Nakamura, K., Aikawa, M., and Carter, R. (1994). Cellular location and temporal expression of the Plasmodium falciparum sexual stage antigen Pfs16. Mol. Biochem. Parasitol. *65*, 11–22.

Buckling, A., Ranford-Cartwright, L.C., Miles, A., and Read, A.F. (1999). Chloroquine increases Plasmodium falciparum gametocytogenesis in vitro. Parasitology *118 (Pt 4)*, 339–346.

Burchard, G.D., Radloff, P., Philipps, J., Nkeyi, M., Knobloch, J., and Kremsner, P.G. (1995). Increased erythropoietin production in children with severe malarial anemia. Am. J. Trop. Med. Hyg. *53*, 547–551.

Casals-Pascual, C., Kai, O., Cheung, J.O.P., Williams, S., Lowe, B., Nyanoti, M., Williams, T.N., Maitland, K., Molyneux, M., Newton, C.R.J.C., et al. (2006). Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. Blood *108*, 2569–2577.

Cestari, I., Ansa-Addo, E., Deolindo, P., Inal, J.M., and Ramirez, M.I. (2012). Trypanosoma cruzi immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *188*, 1942–1952.

Chan, J.-A., Fowkes, F.J.I., and Beeson, J.G. (2014). Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *71*, 3633–3657.

Chang, K.-H., and Stevenson, M.M. (2004). Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. Int. J. Parasitol. *34*, 1501–1516.

Chasis, J.A., and Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood *112*, 470–478.

Chasis, J.A., Prenant, M., Leung, A., and Mohandas, N. (1989). Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation. Blood *74*, 1112–1120.

Chen, Q., Barragan, A., Fernandez, V., Sundström, A., Schlichtherle, M., Sahlén, A., Carlson, J., Datta, S., and Wahlgren, M. (1998). Identification of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite P. falciparum. J. Exp. Med. *187*, 15–23.

Chen, Q., Heddini, A., Barragan, A., Fernandez, V., Pearce, S.F., and Wahlgren, M. (2000). The semiconserved head structure of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. J. Exp. Med. *192*, 1–10.

Cheng, Q., Cloonan, N., Fischer, K., Thompson, J., Waine, G., Lanzer, M., and Saul, A. (1998). stevor and rif are Plasmodium falciparum multicopy gene families which potentially encode variant antigens. Mol. Biochem. Parasitol. *97*, 161–176.

Chow, A., Huggins, M., Ahmed, J., Hashimoto, D., Lucas, D., Kunisaki, Y., Pinho, S., Leboeuf, M., Noizat, C., van Rooijen, N., et al. (2013). $CD169^{+}$ macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. Nat. Med. *19*, 429–436.

Coatney, G., Collins, R., Warren, M., and Contacos, P. (1971). The Primate Malarias.

Coleman, B.I., Skillman, K.M., Jiang, R.H.Y., Childs, L.M., Altenhofen, L.M., Ganter, M., Leung, Y., Goldowitz, I., Kafsack, B.F.C., Marti, M., et al. (2014). A Plasmodium falciparum histone deacetylase regulates antigenic variation and gametocyte conversion. Cell Host Microbe *16*, 177–186.

Combes, V., Taylor, T.E., Juhan-Vague, I., Mège, J.-L., Mwenechanya, J., Tembo, M., Grau, G.E., and Molyneux, M.E. (2004). Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe falciparum malaria complicated with coma. JAMA *291*, 2542–2544.

Counihan, N.A., Chisholm, S.A., Bullen, H.E., Srivastava, A., Sanders, P.R., Jonsdottir, T.K., Weiss, G.E., Ghosh, S., Crabb, B.S., Creek, D.J., et al. (2017). Plasmodium falciparum parasites deploy RhopH2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate. eLife *6*.

Cowman, A.F., and Crabb, B.S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell *124*, 755–766.

Craig, A., and Scherf, A. (2001). Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. Mol. Biochem. Parasitol. *115*, 129–143.

Cyrklaff, M., Sanchez, C.P., Kilian, N., Bisseye, C., Simpore, J., Frischknecht, F., and Lanzer, M. (2011). Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Science *334*, 1283–1286.

Dahlbäck, M., Lavstsen, T., Salanti, A., Hviid, L., Arnot, D.E., Theander, T.G., and Nielsen, M.A. (2007). Changes in var gene mRNA levels during erythrocytic development in two phenotypically distinct Plasmodium falciparum parasites. Malar. J. *6*, 78.

Daily, J.P., Le Roch, K.G., Sarr, O., Ndiaye, D., Lukens, A., Zhou, Y., Ndir, O., Mboup, S., Sultan, A., Winzeler, E.A., et al. (2005). In vivo transcriptome of Plasmodium falciparum reveals overexpression of transcripts that encode surface proteins. J. Infect. Dis. *191*, 1196–1203.

Dantzler, K.W., Ma, S., Ngotho, P., Stone, W.J.R., Tao, D., Rijpma, S., De Niz, M., Nilsson Bark, S.K., Jore, M.M., Raaijmakers, T.K., et al. (2019). Naturally acquired immunity against immature Plasmodium falciparum gametocytes. Sci. Transl. Med. *11*.

Day, K.P., Hayward, R.E., Smith, D., and Culvenor, J.G. (1998). CD36-dependent adhesion and knob expression of the transmission stages of Plasmodium falciparum is stage specific. Mol. Biochem. Parasitol. *93*, 167–177.

Dearnley, M., Chu, T., Zhang, Y., Looker, O., Huang, C., Klonis, N., Yeoman, J., Kenny, S., Arora, M., Osborne, J.M., et al. (2016). Reversible host cell remodeling underpins deformability changes in malaria parasite sexual blood stages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, 4800–4805.

Dearnley, M.K., Yeoman, J.A., Hanssen, E., Kenny, S., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Tilley, L., and Dixon, M.W.A. (2012). Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of Plasmodium falciparum gametocytes. J. Cell Sci. *125*, 2053–2063.

De Maria, R., Testa, U., Luchetti, L., Zeuner, A., Stassi, G., Pelosi, E., Riccioni, R., Felli, N., Samoggia, P., and Peschle, C. (1999). Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. Blood *93*, 796–803.

De Niz, M., Meibalan, E., Mejia, P., Ma, S., Brancucci, N.M.B., Agop-Nersesian, C., Mandt, R., Ngotho, P., Hughes, K.R., Waters, A.P., et al. (2018). Plasmodium gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. Sci. Adv. *4*, eaat3775.

Deplaine, G., Safeukui, I., Jeddi, F., Lacoste, F., Brousse, V., Perrot, S., Biligui, S., Guillotte, M., Guitton, C., Dokmak, S., et al. (2011). The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. Blood *117*, e88–e95.

Dern, R.J., Beutler, E., and Alving, A.S. (1954). The hemolytic effect of primaquine. II. The natural course of the hemolytic anemia and the mechanism of its self-limited character. J. Lab. Clin. Med. *44*, 171–176.

Desai, S.A., Bezrukov, S.M., and Zimmerberg, J. (2000). A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. Nature *406*, 1001–1005.

Dinko, B., King, E., Targett, G. a. T., and Sutherland, C.J. (2016). Antibody responses to surface antigens of Plasmodium falciparum gametocyte-infected erythrocytes and their relation to gametocytaemia. Parasite Immunol. *38*, 352–364.

Dixon, M.W.A., Dearnley, M.K., Hanssen, E., Gilberger, T., and Tilley, L. (2012). Shape-shifting gametocytes: how and why does P. falciparum go banana-shaped? Trends Parasitol. *28*, 471–478.

Dondorp, A.M., Angus, B.J., Chotivanich, K., Silamut, K., Ruangveerayuth, R., Hardeman, M.R., Kager, P.A., Vreeken, J., and White, N.J. (1999). Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. *60*, 733–737.

Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., et al. (2009). Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. N. Engl. J. Med. *361*, 455–467.

Duffier, Y., Lorthiois, A., Cisteró, P., Dupuy, F., Jouvion, G., Fiette, L., Mazier, D., Mayor, A., Lavazec, C., and Moreno Sabater, A. (2016). A humanized mouse model for sequestration of Plasmodium falciparum sexual stages and in vivo evaluation of gametocytidal drugs. Sci. Rep. *6*, 35025.

Duraisingh, M.T., Voss, T.S., Marty, A.J., Duffy, M.F., Good, R.T., Thompson, J.K., Freitas-Junior, L.H., Scherf, A., Crabb, B.S., and Cowman, A.F. (2005). Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in Plasmodium falciparum. Cell *121*, 13–24.

Dyer, M., and Day, K.P. (2003). Regulation of the rate of asexual growth and commitment to sexual development by diffusible factors from in vitro cultures of Plasmodium falciparum. Am. J. Trop. Med. Hyg. *68*, 403–409.

Egan, A., Fabucci, M., Saul, A., Kaslow, D., and Miller, L.H. (2002). Aotus New World monkeys: model for studying malaria-induced anemia. - PubMed - NCBI.

Egan, E.S., Jiang, R.H.Y., Moechtar, M.A., Barteneva, N.S., Weekes, M.P., Nobre, L.V., Gygi, S.P., Paulo, J.A., Frantzreb, C., Tani, Y., et al. (2015). Malaria. A forward genetic screen identifies erythrocyte CD55 as essential for Plasmodium falciparum invasion. Science *348*, 711–714.

Eksi, S., Stump, A., Fanning, S.L., Shenouda, M.I., Fujioka, H., and Williamson, K.C. (2002). Targeting and sequestration of truncated Pfs230 in an intraerythrocytic compartment during Plasmodium falciparum gametocytogenesis. Mol. Microbiol. *44*, 1507–1516.

Eksi, S., Morahan, B.J., Haile, Y., Furuya, T., Jiang, H., Ali, O., Xu, H., Kiattibutr, K., Suri, A., Czesny, B., et al. (2012). Plasmodium falciparum gametocyte development 1 (Pfgdv1) and gametocytogenesis early gene identification and commitment to sexual development. PLoS Pathog. *8*, e1002964.

Ekvall, H. (2003). Malaria and anemia. Curr. Opin. Hematol. *10*, 108–114.

Elagib, K.E., Xiao, M., Hussaini, I.M., Delehanty, L.L., Palmer, L.A., Racke, F.K., Birrer, M.J., Ganapathy-Kanniappan, S., Shanmugasundaram, G., McDevitt, M.A., et al. (2004). Jun blockade of erythropoiesis: role for repression of GATA-1 by HERP2. Mol. Cell. Biol. *24*, 7779–7794.

EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X.O., and Wood, M.J.A. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. Nat. Rev. Drug Discov. *12*, 347–357.

Escalante, A.A., and Ayala, F.J. (1994). Phylogeny of the malarial genus Plasmodium, derived from rRNA gene sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 11373–11377.

Farfour, E., Charlotte, F., Settegrana, C., Miyara, M., and Buffet, P. (2012). The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for Plasmodium falciparum gametocyte maturation? Malar. J. *11*, 285.

Felli, N., Pedini, F., Zeuner, A., Petrucci, E., Testa, U., Conticello, C., Biffoni, M., Di Cataldo, A., Winkles, J.A., Peschle, C., et al. (2005). Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *175*, 1464–1472.

Fernandez, V., Hommel, M., Chen, Q., Hagblom, P., and Wahlgren, M. (1999). Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte are encoded by the rif gene family and are the target of human immune responses. J. Exp. Med. *190*, 1393–1404.

Filarsky, M., Fraschka, S.A., Niederwieser, I., Brancucci, N.M.B., Carrington, E., Carrió, E., Moes, S., Jenoe, P., Bártfai, R., and Voss, T.S. (2018). GDV1 induces sexual commitment of malaria parasites by antagonizing HP1-dependent gene silencing. Science *359*, 1259–1263.

Fivelman, Q.L., McRobert, L., Sharp, S., Taylor, C.J., Saeed, M., Swales, C.A., Sutherland, C.J., and Baker, D.A. (2007). Improved synchronous production of Plasmodium falciparum gametocytes in vitro. Mol. Biochem. Parasitol. *154*, 119–123.

Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., et al. (2002). A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle. Nature *419*, 520–526.

Freitas-Junior, L.H., Hernandez-Rivas, R., Ralph, S.A., Montiel-Condado, D., Ruvalcaba-Salazar, O.K., Rojas-Meza, A.P., Mâncio-Silva, L., Leal-Silvestre, R.J.,

Gontijo, A.M., Shorte, S., et al. (2005). Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. Cell *121*, 25–36.

Frénal, K., Polonais, V., Marq, J.-B., Stratmann, R., Limenitakis, J., and Soldati-Favre, D. (2010). Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. Cell Host Microbe *8*, 343–357.

Fried, M., and Duffy, P.E. (1996). Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. Science *272*, 1502–1504.

Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., et al. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature *419*, 498–511.

Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., and Beckers, C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in Toxoplasma gondii. J. Cell Biol. *165*, 383–393.

Gautier, E.-F., Ducamp, S., Leduc, M., Salnot, V., Guillonneau, F., Dussiot, M., Hale, J., Giarratana, M.-C., Raimbault, A., Douay, L., et al. (2016). Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. Cell Rep. *16*, 1470–1484.

Gautret, P., and Motard, A. (1999). Periodic infectivity of Plasmodium gametocytes to the vector. A review. Parasite Paris Fr. *6*, 103–111.

Ghorbal, M., Gorman, M., Macpherson, C.R., Martins, R.M., Scherf, A., and Lopez-Rubio, J.-J. (2014). Genome editing in the human malaria parasite Plasmodium falciparum using the CRISPR-Cas9 system. Nat. Biotechnol. *32*, 819–821.

Gimble, J.M., Robinson, C.E., Wu, X., and Kelly, K.A. (1996). The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. Bone *19*, 421–428.

Ginsburg, H., Krugliak, M., Eidelman, O., and Cabantchik, Z.I. (1983). New permeability pathways induced in membranes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. Mol. Biochem. Parasitol. *8*, 177–190.

Giribaldi, G., Ulliers, D., Schwarzer, E., Roberts, I., Piacibello, W., and Arese, P. (2004). Hemozoin- and 4-hydroxynonenal-mediated inhibition of erythropoiesis. Possible role in malarial dyserythropoiesis and anemia. Haematologica *89*, 492–493.

Glenister, F.K., Coppel, R.L., Cowman, A.F., Mohandas, N., and Cooke, B.M. (2002). Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. Blood *99*, 1060–1063.

Goel, S., Palmkvist, M., Moll, K., Joannin, N., Lara, P., Akhouri, R.R., Moradi, N., Öjemalm, K., Westman, M., Angeletti, D., et al. (2015). RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria. Nat. Med. *21*, 314–317.

Gould, S.B., Tham, W.-H., Cowman, A.F., McFadden, G.I., and Waller, R.F. (2008). Alveolins, a new family of cortical proteins that define the protist infrakingdom Alveolata. Mol. Biol. Evol. *25*, 1219–1230.

Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. Oncogene *24*, 7410–7425.

Greve, B., Lehman, L.G., Lell, B., Luckner, D., Schmidt-Ott, R., and Kremsner, P.G. (1999). High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with Plasmodium falciparum malaria. J. Infect. Dis. *179*, 1584–1586.

Griffiths, M.J., Ndungu, F., Baird, K.L., Muller, D.P., Marsh, K., and Newton, C.R. (2001). Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe Plasmodium falciparum malaria. Br. J. Haematol. *113*, 486–491.

Guillotte, M., Juillerat, A., Igonet, S., Hessel, A., Petres, S., Crublet, E., Le Scanf, C., Lewit-Bentley, A., Bentley, G.A., Vigan-Womas, I., et al. (2015). Immunogenicity of the Plasmodium falciparum PfEMP1-VarO Adhesin: Induction of Surface-Reactive and Rosette-Disrupting Antibodies to VarO Infected Erythrocytes. PloS One *10*, e0134292.

Haeggström, M., Kironde, F., Berzins, K., Chen, Q., Wahlgren, M., and Fernandez, V. (2004). Common trafficking pathway for variant antigens destined for the surface of the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte. Mol. Biochem. Parasitol. *133*, 1–14.

Hanspal, M., and Hanspal, J.S. (1994). The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. Blood *84*, 3494–3504.

Hanspal, M., Smockova, Y., and Uong, Q. (1998). Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. Blood *92*, 2940–2950.

Hanssen, E., Knoechel, C., Dearnley, M., Dixon, M.W.A., Le Gros, M., Larabell, C., and Tilley, L. (2012). Soft X-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of Plasmodium falciparum. J. Struct. Biol. *177*, 224–232.

Hawking, F., Wilson, M.E., and Gammage, K. (1971). Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of Plasmodium falciparum. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. *65*, 549–559.

Heddini, A., Pettersson, F., Kai, O., Shafi, J., Obiero, J., Chen, Q., Barragan, A., Wahlgren, M., and Marsh, K. (2001). Fresh isolates from children with severe Plasmodium falciparum malaria bind to multiple receptors. Infect. Immun. *69*, 5849–5856.

Heiber, A., Kruse, F., Pick, C., Grüring, C., Flemming, S., Oberli, A., Schoeler, H., Retzlaff, S., Mesén-Ramírez, P., Hiss, J.A., et al. (2013). Identification of new PNEPs

indicates a substantial non-PEXEL exportome and underpins common features in Plasmodium falciparum protein export. PLoS Pathog. *9*, e1003546.

Helmby, H., Cavelier, L., Pettersson, U., and Wahlgren, M. (1993). Rosetting Plasmodium falciparum-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface. Infect. Immun. *61*, 284–288.

Hermand, P., Cicéron, L., Pionneau, C., Vaquero, C., Combadière, C., and Deterre, P. (2016). Plasmodium falciparum proteins involved in cytoadherence of infected erythrocytes to chemokine CX3CL1. Sci. Rep. *6*, 33786.

Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estraño, C., and Haldar, K. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. Science *306*, 1934–1937.

Honczarenko, M., Le, Y., Swierkowski, M., Ghiran, I., Glodek, A.M., and Silberstein, L.E. (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. Stem Cells Dayt. Ohio *24*, 1030–1041.

Howard, R.J., Barnwell, J.W., Rock, E.P., Neequaye, J., Ofori-Adjei, D., Maloy, W.L., Lyon, J.A., and Saul, A. (1988). Two approximately 300 kilodalton Plasmodium falciparum proteins at the surface membrane of infected erythrocytes. Mol. Biochem. Parasitol. *27*, 207–223.

Hu, J., Liu, J., Xue, F., Halverson, G., Reid, M., Guo, A., Chen, L., Raza, A., Galili, N., Jaffray, J., et al. (2013). Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. Blood *121*, 3246–3253.

Huang, Y.-S., Delgadillo, L.F., Cyr, K.H., Kingsley, P.D., An, X., McGrath, K.E., Mohandas, N., Conboy, J.G., Waugh, R.E., Wan, J., et al. (2017). Circulating primitive erythroblasts establish a functional, protein 4.1R-dependent cytoskeletal network prior to enucleating. Sci. Rep. *7*, 5164.

Ito, D., Schureck, M.A., and Desai, S.A. (2017). An essential dual-function complex mediates erythrocyte invasion and channel-mediated nutrient uptake in malaria parasites. eLife *6*.

Jaramillo, M., Godbout, M., and Olivier, M. (2005). Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and -independent mechanisms. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 475–484.

Jaramillo, M., Bellemare, M.-J., Martel, C., Shio, M.T., Contreras, A.P., Godbout, M., Roger, M., Gaudreault, E., Gosselin, J., Bohle, D.S., et al. (2009). Synthetic Plasmodium-like hemozoin activates the immune response: a morphology - function study. PloS One *4*, e6957.

Joannin, N., Abhiman, S., Sonnhammer, E.L., and Wahlgren, M. (2008). Sub-grouping and sub-functionalization of the RIFIN multi-copy protein family. BMC Genomics *9*, 19.

Joice, R., Nilsson, S.K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K.B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K.C., et al. (2014). Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. Sci. Transl. Med. *6*, 244re5.

Josling, G.A., and Llinás, M. (2019). Commitment Isn't for Everyone. Trends Parasitol. *35*, 381–383.

Josling, G.A., Williamson, K.C., and Llinás, M. (2018). Regulation of Sexual Commitment and Gametocytogenesis in Malaria Parasites. Annu. Rev. Microbiol. *72*, 501–519.

Kafsack, B.F.C., Rovira-Graells, N., Clark, T.G., Bancells, C., Crowley, V.M., Campino, S.G., Williams, A.E., Drought, L.G., Kwiatkowski, D.P., Baker, D.A., et al. (2014). A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. Nature *507*, 248–252.

Kanjee, U., Grüring, C., Chaand, M., Lin, K.-M., Egan, E., Manzo, J., Jones, P.L., Yu, T., Barker, R., Weekes, M.P., et al. (2017). CRISPR/Cas9 knockouts reveal genetic interaction between strain-transcendent erythrocyte determinants of Plasmodium falciparum invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, E9356–E9365.

Kaviratne, M., Khan, S.M., Jarra, W., and Preiser, P.R. (2002). Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in Plasmodium falciparum-infected red blood cells. Eukaryot. Cell *1*, 926–935.

Kawabata, H. (2019). Transferrin and transferrin receptors update. Free Radic. Biol. Med. *133*, 46–54.

Keller, C.C., Kremsner, P.G., Hittner, J.B., Misukonis, M.A., Weinberg, J.B., and Perkins, D.J. (2004). Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. Infect. Immun. *72*, 4868–4873.

Kent, R.S., Modrzynska, K.K., Cameron, R., Philip, N., Billker, O., and Waters, A.P. (2018). Inducible developmental reprogramming redefines commitment to sexual development in the malaria parasite Plasmodium berghei. Nat. Microbiol. *3*, 1206–1213.

Khattab, A., and Meri, S. (2011). Exposure of the Plasmodium falciparum clonally variant STEVOR proteins on the merozoite surface. Malar. J. *10*, 58.

Khattab, A., Bonow, I., Schreiber, N., Petter, M., Schmetz, C., and Klinkert, M.-Q. (2008). Plasmodium falciparum variant STEVOR antigens are expressed in merozoites and possibly associated with erythrocyte invasion. Malar. J. *7*, 137.

Kingsley, P.D., Malik, J., Fantauzzo, K.A., and Palis, J. (2004). Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. Blood *104*, 19–25.

Knuepfer, E., Napiorkowska, M., van Ooij, C., and Holder, A.A. (2017). Generating conditional gene knockouts in Plasmodium - a toolkit to produce stable DiCre recombinase-expressing parasite lines using CRISPR/Cas9. Sci. Rep. *7*, 3881.

de Koning-Ward, T.F., Olivieri, A., Bertuccini, L., Hood, A., Silvestrini, F., Charvalias, K., Berzosa Díaz, P., Camarda, G., McElwain, T.F., Papenfuss, T., et al. (2008). The role of osmiophilic bodies and Pfg377 expression in female gametocyte emergence and mosquito infectivity in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Mol. Microbiol. *67*, 278–290.

Kriek, N., Tilley, L., Horrocks, P., Pinches, R., Elford, B.C., Ferguson, D.J.P., Lingelbach, K., and Newbold, C.I. (2003). Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes. Mol. Microbiol. *50*, 1215–1227.

Kun, J.F., Schmidt-Ott, R.J., Lehman, L.G., Lell, B., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., and Kremsner, P.G. (1998). Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of Plasmodium falciparum in severe and mild malaria in Lambaréné, Gabon. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. *92*, 110–114.

Kurita, R., Suda, N., Sudo, K., Miharada, K., Hiroyama, T., Miyoshi, H., Tani, K., and Nakamura, Y. (2013). Establishment of Immortalized Human Erythroid Progenitor Cell Lines Able to Produce Enucleated Red Blood Cells. PLoS ONE *8*.

Kurtzhals, J.A., Adabayeri, V., Goka, B.Q., Akanmori, B.D., Oliver-Commey, J.O., Nkrumah, F.K., Behr, C., and Hviid, L. (1998). Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. Lancet Lond. Engl. *351*, 1768–1772.

Kyes, S., Pinches, R., and Newbold, C. (2000). A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. *105*, 311–315.

Kyes, S.A., Rowe, J.A., Kriek, N., and Newbold, C.I. (1999). Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with Plasmodium falciparum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 9333–9338.

Lamikanra, A.A., Theron, M., Kooij, T.W.A., and Roberts, D.J. (2009). Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. PloS One *4*, e8446.

Langreth, S.G., Jensen, J.B., Reese, R.T., and Trager, W. (1978). Fine structure of human malaria in vitro. J. Protozool. *25*, 443–452.

Lasonder, E., Rijpma, S.R., van Schaijk, B.C.L., Hoeijmakers, W.A.M., Kensche, P.R., Gresnigt, M.S., Italiaander, A., Vos, M.W., Woestenenk, R., Bousema, T., et al. (2016). Integrated transcriptomic and proteomic analyses of P. falciparum gametocytes: molecular insight into sex-specific processes and translational repression. Nucleic Acids Res. *44*, 6087–6101.

Lavazec, C., Sanyal, S., and Templeton, T.J. (2006). Hypervariability within the Rifin, Stevor and Pfmc-2TM superfamilies in Plasmodium falciparum. Nucleic Acids Res. *34*, 6696–6707.

Lavazec, C., Sanyal, S., and Templeton, T.J. (2007). Expression switching in the stevor and Pfmc-2TM superfamilies in Plasmodium falciparum. Mol. Microbiol. *64*, 1621–1634.

Lee, G., Lo, A., Short, S.A., Mankelow, T.J., Spring, F., Parsons, S.F., Yazdanbakhsh, K., Mohandas, N., Anstee, D.J., and Chasis, J.A. (2006). Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. Blood *108*, 2064–2071.

Lee, R.S., Waters, A.P., and Brewer, J.M. (2018). A cryptic cycle in haematopoietic niches promotes initiation of malaria transmission and evasion of chemotherapy. Nat. Commun. *9*.

Lee, S.H., Crocker, P.R., Westaby, S., Key, N., Mason, D.Y., Gordon, S., and Weatherall, D.J. (1988). Isolation and immunocytochemical characterization of human bone marrow stromal macrophages in hemopoietic clusters. J. Exp. Med. *168*, 1193–1198.

Li, J., Hale, J., Bhagia, P., Xue, F., Chen, L., Jaffray, J., Yan, H., Lane, J., Gallagher, P.G., Mohandas, N., et al. (2014). Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. Blood *124*, 3636–3645.

Lobo, C.A., Fujioka, H., Aikawa, M., and Kumar, N. (1999). Disruption of the Pfg27 locus by homologous recombination leads to loss of the sexual phenotype in P. falciparum. Mol. Cell *3*, 793–798.

Lopez-Rubio, J.J., Gontijo, A.M., Nunes, M.C., Issar, N., Hernandez Rivas, R., and Scherf, A. (2007). 5' flanking region of var genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites. Mol. Microbiol. *66*, 1296–1305.

Lucchi, N.W., Sarr, D., Owino, S.O., Mwalimu, S.M., Peterson, D.S., and Moore, J.M. (2011). Natural hemozoin stimulates syncytiotrophoblast to secrete chemokines and recruit peripheral blood mononuclear cells. Placenta *32*, 579–585.

Luse, S.A., and Miller, L.H. (1971). Plasmodium falciparum malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. Am. J. Trop. Med. Hyg. *20*, 655–660.

Malleret, B., Xu, F., Mohandas, N., Suwanarusk, R., Chu, C., Leite, J.A., Low, K., Turner, C., Sriprawat, K., Zhang, R., et al. (2013). Significant biochemical, biophysical and metabolic diversity in circulating human cord blood reticulocytes. PloS One *8*, e76062.

Malleret, B., Li, A., Zhang, R., Tan, K.S.W., Suwanarusk, R., Claser, C., Cho, J.S., Koh, E.G.L., Chu, C.S., Pukrittayakamee, S., et al. (2015). Plasmodium vivax: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. Blood *125*, 1314–1324.

Mantel, P.-Y., Hoang, A.N., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., Ghiran, I., Toner, M., Irimia, D., Ivanov, A.R., et al. (2013). Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. Cell Host Microbe *13*, 521–534.

Mantel, P.-Y., Hjelmqvist, D., Walch, M., Kharoubi-Hess, S., Nilsson, S., Ravel, D., Ribeiro, M., Grüring, C., Ma, S., Padmanabhan, P., et al. (2016). Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. Nat. Commun. *7*, 12727.

Marinkovic, D., Zhang, X., Yalcin, S., Luciano, J.P., Brugnara, C., Huber, T., and Ghaffari, S. (2007). Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. J. Clin. Invest. *117*, 2133–2144.

Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E., and Cowman, A.F. (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. Science *306*, 1930–1933.

de Mast, Q., Syafruddin, D., Keijmel, S., Riekerink, T.O., Deky, O., Asih, P.B., Swinkels, D.W., and van der Ven, A.J. (2010). Increased serum hepcidin and alterations in blood iron parameters associated with asymptomatic P. falciparum and P. vivax malaria. Haematologica *95*, 1068–1074.

Matthews, K., Kalanon, M., Chisholm, S.A., Sturm, A., Goodman, C.D., Dixon, M.W.A., Sanders, P.R., Nebl, T., Fraser, F., Haase, S., et al. (2013). The Plasmodium translocon of exported proteins (PTEX) component thioredoxin-2 is important for maintaining normal blood-stage growth. Mol. Microbiol. *89*, 1167–1186.

Maurer (1902). Die malaria perniciosa. Cent. F Bakt 695–719.

Mbagwu, S., Walch, M., Filgueira, L., and Mantel, P.-Y. (2017). Production and Characterization of Extracellular Vesicles in Malaria. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *1660*, 377–388.

McDevitt, M.A., Xie, J., Ganapathy-Kanniappan, S., Shanmugasundaram, G., Griffith, J., Liu, A., McDonald, C., Thuma, P., Gordeuk, V.R., Metz, C.N., et al. (2006). A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. J. Exp. Med. *203*, 1185–1196.

McRobert, L., Preiser, P., Sharp, S., Jarra, W., Kaviratne, M., Taylor, M.C., Renia, L., and Sutherland, C.J. (2004). Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the Plasmodium falciparum life cycle. Infect. Immun. *72*, 6597–6602.

Messina, V., Valtieri, M., Rubio, M., Falchi, M., Mancini, F., Mayor, A., Alano, P., and Silvestrini, F. (2018). Gametocytes of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum Interact With and Stimulate Bone Marrow Mesenchymal Cells to Secrete Angiogenetic Factors. Front. Cell. Infect. Microbiol. *8*, 50.

Miao, J., Li, J., Fan, Q., Li, X., Li, X., and Cui, L. (2010). The Puf-family RNA-binding protein PfPuf2 regulates sexual development and sex differentiation in the malaria parasite Plasmodium falciparum. J. Cell Sci. *123*, 1039–1049.

Miao, J., Chen, Z., Wang, Z., Shrestha, S., Li, X., Li, R., and Cui, L. (2017). Sex-Specific Biology of the Human Malaria Parasite Revealed from the Proteomes of Mature Male and Female Gametocytes. Mol. Cell. Proteomics MCP *16*, 537–551.

Miller, K.L., Silverman, P.H., Kullgren, B., and Mahlmann, L.J. (1989). Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria. Infect. Immun. *57*, 1542–1546.

Miller, L.H., Good, M.F., and Milon, G. (1994). Malaria pathogenesis. Science *264*, 1878–1883.

Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., and Doumbo, O.K. (2002). The pathogenic basis of malaria. Nature *415*, 673–679.

Mills, J.P., Diez-Silva, M., Quinn, D.J., Dao, M., Lang, M.J., Tan, K.S.W., Lim, C.T., Milon, G., David, P.H., Mercereau-Puijalon, O., et al. (2007). 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.

Mons, B., Janse, C.J., Boorsma, E.G., and Van der Kaay, H.J. (1985). Synchronized erythrocytic schizogony and gametocytogenesis of Plasmodium berghei in vivo and in vitro. Parasitology *91 (Pt 3)*, 423–430.

Morris, L., Crocker, P.R., Fraser, I., Hill, M., and Gordon, S. (1991). Expression of a divalent cation-dependent erythroblast adhesion receptor by stromal macrophages from murine bone marrow. J. Cell Sci. *99 (Pt 1)*, 141–147.

Mwakalinga, S.B., Wang, C.W., Bengtsson, D.C., Turner, L., Dinko, B., Lusingu, J.P., Arnot, D.E., Sutherland, C.J., Theander, T.G., and Lavstsen, T. (2012). Expression of a type B RIFIN in Plasmodium falciparum merozoites and gametes. Malar. J. *11*, 429.

Naissant, B., Dupuy, F., Duffier, Y., Lorthiois, A., Duez, J., Scholz, J., Buffet, P., Merckx, A., Bachmann, A., and Lavazec, C. (2016). Plasmodium falciparum STEVOR phosphorylation regulates host erythrocyte deformability enabling malaria parasite transmission. Blood.

Nantakomol, D., Dondorp, A.M., Krudsood, S., Udomsangpetch, R., Pattanapanyasat, K., Combes, V., Grau, G.E., White, N.J., Viriyavejakul, P., Day, N.P.J., et al. (2011). Circulating red cell-derived microparticles in human malaria. J. Infect. Dis. *203*, 700–706.

Nash, G.B., O'Brien, E., Gordon-Smith, E.C., and Dormandy, J.A. (1989). Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by Plasmodium falciparum. Blood *74*, 855–861.

Neveu, G., Dupuy, F., Ladli, M., Barbieri, D., Naissant, B., Richard, C., Martins, R.M., Lopez-Rubio, J.-J., Bachmann, A., Verdier, F., et al. (2018). Plasmodium falciparum gametocyte-infected erythrocytes do not adhere to human primary erythroblasts. Sci. Rep. *8*, 17886.

Nguitragool, W., Bokhari, A.A.B., Pillai, A.D., Rayavara, K., Sharma, P., Turpin, B., Aravind, L., and Desai, S.A. (2011). Malaria parasite clag3 genes determine channel-mediated nutrient uptake by infected red blood cells. Cell *145*, 665–677.

Niang, M., Yan Yam, X., and Preiser, P.R. (2009). The Plasmodium falciparum STEVOR Multigene Family Mediates Antigenic Variation of the Infected Erythrocyte. PLoS Pathog. *5*.

Niang, M., Bei, A.K., Madnani, K.G., Pelly, S., Dankwa, S., Kanjee, U., Gunalan, K., Amaladoss, A., Yeo, K.P., Bob, N.S., et al. (2014). STEVOR is a Plasmodium falciparum erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. Cell Host Microbe *16*, 81–93.

Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O.I., Wilson, G., Kaufmann, K.B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C.F., et al. (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. Science *351*, aab2116.

Obaldia, N., Meibalan, E., Sa, J.M., Ma, S., Clark, M.A., Mejia, P., Moraes Barros, R.R., Otero, W., Ferreira, M.U., Mitchell, J.R., et al. (2018). Bone Marrow Is a Major Parasite Reservoir in Plasmodium vivax Infection. mBio *9*.

Oberli, A., Zurbrügg, L., Rusch, S., Brand, F., Butler, M.E., Day, J.L., Cutts, E.E., Lavstsen, T., Vakonakis, I., and Beck, H.-P. (2016). Plasmodium falciparum Plasmodium helical interspersed subtelomeric proteins contribute to cytoadherence and anchor P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 to the host cell cytoskeleton. Cell. Microbiol. *18*, 1415–1428.

Ockenhouse, C.F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K.E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M., and Lobb, R.R. (1992). Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. J. Exp. Med. *176*, 1183–1189.

van Ooij, C., Tamez, P., Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Harrison, T., Liolios, K., Kooij, T., Ramesar, J., Balu, B., Adams, J., et al. (2008). The malaria secretome: from algorithms to essential function in blood stage infection. PLoS Pathog. *4*, e1000084.

Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. Dev. Camb. Engl. *126*, 5073–5084.

Parish, L.A., Mai, D.W., Jones, M.L., Kitson, E.L., and Rayner, J.C. (2013). A member of the Plasmodium falciparum PHIST family binds to the erythrocyte cytoskeleton component band 4.1. Malar. J. *12*, 160.

Parker, P.D., Tilley, L., and Klonis, N. (2004). Plasmodium falciparum induces reorganization of host membrane proteins during intraerythrocytic growth. Blood *103*, 2404–2406.

Parkyn Schneider, M., Liu, B., Glock, P., Suttie, A., McHugh, E., Andrew, D., Batinovic, S., Williamson, N., Hanssen, E., McMillan, P., et al. (2017). Disrupting assembly of the inner membrane complex blocks Plasmodium falciparum sexual stage development. PLoS Pathog. *13*, e1006659.

Parroche, P., Lauw, F.N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B.G., Visintin, A., Halmen, K.A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D.C., et al. (2007). Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 1919–1924.

Pathak, V., Colah, R., and Ghosh, K. (2018). Plasmodium falciparum malaria skews globin gene expression balance in in-vitro haematopoietic stem cell culture system: Its implications in malaria associated anemia. Exp. Parasitol. *185*, 29–38.

Patrick, D.M., Zhang, C.C., Tao, Y., Yao, H., Qi, X., Schwartz, R.J., Jun-Shen Huang, L., and Olson, E.N. (2010). Defective erythroid differentiation in miR-451 mutant mice mediated by 14-3-3zeta. Genes Dev. *24*, 1614–1619.

Peatey, C.L., Watson, J.A., Trenholme, K.R., Brown, C.L., Nielson, L., Guenther, M., Timmins, N., Watson, G.S., and Gardiner, D.L. (2013). Enhanced gametocyte formation in erythrocyte progenitor cells: a site-specific adaptation by Plasmodium falciparum. J. Infect. Dis. *208*, 1170–1174.

Pei, X., Guo, X., Coppel, R., Bhattacharjee, S., Haldar, K., Gratzer, W., Mohandas, N., and An, X. (2007). The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of Plasmodium falciparum stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion. Blood *110*, 1036–1042.

Pellin, D., Loperfido, M., Baricordi, C., Wolock, S.L., Montepeloso, A., Weinberg, O.K., Biffi, A., Klein, A.M., and Biasco, L. (2019). A comprehensive single cell transcriptional landscape of human hematopoietic progenitors. Nat. Commun. *10*, 2395.

Pérez-Toledo, K., Rojas-Meza, A.P., Mancio-Silva, L., Hernández-Cuevas, N.A., Delgadillo, D.M., Vargas, M., Martínez-Calvillo, S., Scherf, A., and Hernandez-Rivas, R. (2009). Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1 binds to tri-methylated histone 3 lysine 9 and is linked to mutually exclusive expression of var genes. Nucleic Acids Res. *37*, 2596–2606.

Peters, J., Fowler, E., Gatton, M., Chen, N., Saul, A., and Cheng, Q. (2002). High diversity and rapid changeover of expressed var genes during the acute phase of Plasmodium falciparum infections in human volunteers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 10689–10694.

Petter, M., Haeggström, M., Khattab, A., Fernandez, V., Klinkert, M.-Q., and Wahlgren, M. (2007). Variant proteins of the Plasmodium falciparum RIFIN family show distinct subcellular localization and developmental expression patterns. Mol. Biochem. Parasitol. *156*, 51–61.

Petter, M., Bonow, I., and Klinkert, M.-Q. (2008). Diverse expression patterns of subgroups of the rif multigene family during Plasmodium falciparum gametocytogenesis. PloS One *3*, e3779.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science *284*, 143–147.

Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A.D., and Meuwissen, J.H. (1981). Chloroquine sensitivity of isolates of Plasmodium falciparum adapted to in vitro culture. Trop. Geogr. Med. *33*, 50–54.

Poran, A., Nötzel, C., Aly, O., Mencia-Trinchant, N., Harris, C.T., Guzman, M.L., Hassane, D.C., Elemento, O., and Kafsack, B.F.C. (2017). Single-cell RNA sequencing reveals a signature of sexual commitment in malaria parasites. Nature *551*, 95–99.

Price, R.N., Simpson, J.A., Nosten, F., Luxemburger, C., Hkirjaroen, L., ter Kuile, F., Chongsuphajaisiddhi, T., and White, N.J. (2001). Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. *65*, 614–622.

Ramdani, G., Naissant, B., Thompson, E., Breil, F., Lorthiois, A., Dupuy, F., Cummings, R., Duffier, Y., Corbett, Y., Mercereau-Puijalon, O., et al. (2015). cAMP-Signalling Regulates Gametocyte-Infected Erythrocyte Deformability Required for Malaria Parasite Transmission. PLoS Pathog. *11*, e1004815.

Rea, E., Le Roch, K.G., and Tewari, R. (2018). Sex in Plasmodium falciparum: Silence Play between GDV1 and HP1. Trends Parasitol. *34*, 450–452.

Regev-Rudzki, N., Wilson, D.W., Carvalho, T.G., Sisquella, X., Coleman, B.M., Rug, M., Bursac, D., Angrisano, F., Gee, M., Hill, A.F., et al. (2013). Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. Cell *153*, 1120–1133.

Rhodes, M.M., Kopsombut, P., Bondurant, M.C., Price, J.O., and Koury, M.J. (2008). Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. Blood *111*, 1700–1708.

Roberts, D.D., Sherwood, J.A., Spitalnik, S.L., Panton, L.J., Howard, R.J., Dixit, V.M., Frazier, W.A., Miller, L.H., and Ginsburg, V. (1985). Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. Nature *318*, 64–66.

Roberts, D.J., Craig, A.G., Berendt, A.R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K., and Newbold, C.I. (1992). Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. Nature *357*, 689–692.

Rogers, N.J., Daramola, O., Targett, G.A., and Hall, B.S. (1996). CD36 and intercellular adhesion molecule 1 mediate adhesion of developing Plasmodium falciparum gametocytes. Infect. Immun. *64*, 1480–1483.

Rogers, N.J., Hall, B.S., Obiero, J., Targett, G.A., and Sutherland, C.J. (2000). A model for sequestration of the transmission stages of Plasmodium falciparum: adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. Infect. Immun. *68*, 3455–3462.

Rowe, J.A., Moulds, J.M., Newbold, C.I., and Miller, L.H. (1997). P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. Nature *388*, 292–295.

Ru, Y.-X., Mao, B.-Y., Zhang, F., Pang, T., Zhao, S., Liu, J., and Wickramasinghe, S.N. (2009). Invasion of erythroblasts by Pasmodium vivax: A new mechanism contributing to malarial anemia. Ultrastruct. Pathol. *33*, 236–242.

Rusten, L.S., Dybedal, I., Blomhoff, H.K., Blomhoff, R., Smeland, E.B., and Jacobsen, S.E. (1996). The RAR-RXR as well as the RXR-RXR pathway is involved in signaling growth inhibition of human CD34+ erythroid progenitor cells. Blood *87*, 1728–1736.

Sadahira, Y., Yoshino, T., and Monobe, Y. (1995). Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. J. Exp. Med. *181*, 411–415.

Saeed, M., Roeffen, W., Alexander, N., Drakeley, C.J., Targett, G.A.T., and Sutherland, C.J. (2008). Plasmodium falciparum antigens on the surface of the gametocyte-infected erythrocyte. PloS One *3*, e2280.

Saito, F., Hirayasu, K., Satoh, T., Wang, C.W., Lusingu, J., Arimori, T., Shida, K., Palacpac, N.M.Q., Itagaki, S., Iwanaga, S., et al. (2017). Immune evasion of Plasmodium falciparum by RIFIN via inhibitory receptors. Nature *552*, 101–105.

Sanyal, S., Egée, S., Bouyer, G., Perrot, S., Safeukui, I., Bischoff, E., Buffet, P., Deitsch, K.W., Mercereau-Puijalon, O., David, P.H., et al. (2012). Plasmodium falciparum STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties. Blood *119*, e1–e8.

Sargeant, T.J., Marti, M., Caler, E., Carlton, J.M., Simpson, K., Speed, T.P., and Cowman, A.F. (2006). Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. Genome Biol. *7*, R12.

Saul, A., Graves, P., and Edser, L. (1990). Refractoriness of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum gametocytes to lysis by sorbitol. Int. J. Parasitol. *20*, 1095–1097.

van Schaijk, B.C.L., van Dijk, M.R., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G.-J., van Dooren, M.W., Eksi, S., Roeffen, W.F.G., Janse, C.J., Waters, A.P., and Sauerwein, R.W. (2006). Pfs47, paralog of the male fertility factor Pfs48/45, is a female specific surface protein in Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. *149*, 216–222.

Scherf, A., Carter, R., Petersen, C., Alano, P., Nelson, R., Aikawa, M., Mattei, D., Pereira da Silva, L., and Leech, J. (1992a). Gene inactivation of Pf11-1 of Plasmodium falciparum by chromosome breakage and healing: identification of a gametocyte-specific protein with a potential role in gametogenesis. EMBO J. *11*, 2293–2301.

Scherf, A., Petersen, C., Carter, R., Alano, P., Nelson, R., Aikawa, M., Mattei, D., da Silva, L.P., and Leech, J. (1992b). Characterization of a Plasmodium falciparium mutant that has deleted the majority of the gametocyte-specific Pf11-1 locus. Mem. Inst. Oswaldo Cruz *87 Suppl 3*, 91–94.

Schieck, E., Pfahler, J.M., Sanchez, C.P., and Lanzer, M. (2007). Nuclear run-on analysis of var gene expression in Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. *153*, 207–212.

Schorey, J.S., Cheng, Y., Singh, P.P., and Smith, V.L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. EMBO Rep. *16*, 24–43.

Schwarzer, E., Kuhn, H., Valente, E., and Arese, P. (2003). Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. Blood *101*, 722–728.

Scully, E.J., Shabani, E., Rangel, G.W., Grüring, C., Kanjee, U., Clark, M.A., Chaand, M., Kurita, R., Nakamura, Y., Ferreira, M.U., et al. (2019). Generation of an immortalized erythroid progenitor cell line from peripheral blood: A model system for the functional analysis of Plasmodium spp. invasion. Am. J. Hematol.

von Seidlein, L. (2019). The Advanced Development Pathway of the RTS,S/AS01 Vaccine. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *2013*, 177–187.

Sharp, S., Lavstsen, T., Fivelman, Q.L., Saeed, M., McRobert, L., Templeton, T.J., Jensen, A.T.R., Baker, D.A., Theander, T.G., and Sutherland, C.J. (2006). Programmed

transcription of the var gene family, but not of stevor, in Plasmodium falciparum gametocytes. Eukaryot. Cell *5*, 1206–1214.

Sherling, E.S., Knuepfer, E., Brzostowski, J.A., Miller, L.H., Blackman, M.J., and van Ooij, C. (2017). The Plasmodium falciparum rhoptry protein RhopH3 plays essential roles in host cell invasion and nutrient uptake. eLife *6*.

Shi, H., Liu, Z., Li, A., Yin, J., Chong, A.G.L., Tan, K.S.W., Zhang, Y., and Lim, C.T. (2013). Life cycle-dependent cytoskeletal modifications in Plasmodium falciparum infected erythrocytes. PloS One *8*, e61170.

Silva, L.S., Pinheiro, A.S., Teixeira, D.E., Silva-Aguiar, R.P., Peruchetti, D.B., Scharfstein, J., Caruso-Neves, C., and Pinheiro, A.A.S. (2019). Kinins Released by Erythrocytic Stages of Plasmodium falciparum Enhance Adhesion of Infected Erythrocytes to Endothelial Cells and Increase Blood Brain Barrier Permeability via Activation of Bradykinin Receptors. Front. Med. *6*, 75.

Silverman, J.M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A.Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M.A., McMaster, W.R., Foster, L.J., Levings, M.K., et al. (2010). Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 5011–5022.

Silvestrini, F., Lasonder, E., Olivieri, A., Camarda, G., Schaijk, B. van, Sanchez, M., Younis Younis, S., Sauerwein, R., and Alano, P. (2010). Protein export marks the early phase of gametocytogenesis of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. - PubMed - NCBI.

Silvestrini, F., Tibúrcio, M., Bertuccini, L., and Alano, P. (2012). Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of Plasmodium falciparum on human endothelial cells are tissue independent. PloS One *7*, e31567.

Sinden, R.E. (1982). Gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in vitro: an electron microscopic study. Parasitology *84*, 1–11.

Sinden, R.E. (1983a). Sexual development of malarial parasites. Adv. Parasitol. *22*, 153–216.

Sinden, R.E. (1983b). The cell biology of sexual development in plasmodium. Parasitology *86 (Pt 4)*, 7–28.

Sinden, R.E., Canning, E.U., Bray, R.S., and Smalley, M.E. (1978). Gametocyte and gamete development in Plasmodium falciparum. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. *201*, 375–399.

Singh, H., Madnani, K., Lim, Y.B., Cao, J., Preiser, P.R., and Lim, C.T. (2017). Expression dynamics and physiologically relevant functional study of STEVOR in asexual stages of Plasmodium falciparum infection. Cell. Microbiol. *19*.

Sinha, A., Hughes, K.R., Modrzynska, K.K., Otto, T.D., Pfander, C., Dickens, N.J., Religa, A.A., Bushell, E., Graham, A.L., Cameron, R., et al. (2014). A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in Plasmodium. Nature *507*, 253–257.

Skorokhod, O.A., Caione, L., Marrocco, T., Migliardi, G., Barrera, V., Arese, P., Piacibello, W., and Schwarzer, E. (2010). Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia: role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal. Blood *116*, 4328–4337.

Smalley, M.E., Abdalla, S., and Brown, J. (1981). The distribution of Plasmodium falciparum in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. *75*, 103–105.

Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.-M., Menard, R., and Heussler, V.T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. Science *313*, 1287–1290.

Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, D.S., Ravetch, J.A., and Wellems, T.E. (1995). The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Cell *82*, 89–100.

Suaréz-Cortés, P., Silvestrini, F., and Alano, P. (2014). A fast, non-invasive, quantitative staining protocol provides insights in Plasmodium falciparum gamete egress and in the role of osmiophilic bodies. Malar. J. *13*, 389.

Suárez-Cortés, P., Sharma, V., Bertuccini, L., Costa, G., Bannerman, N.-L., Sannella, A.R., Williamson, K., Klemba, M., Levashina, E.A., Lasonder, E., et al. (2016). Comparative Proteomics and Functional Analysis Reveal a Role of Plasmodium falciparum Osmiophilic Bodies in Malaria Parasite Transmission. Mol. Cell. Proteomics MCP *15*, 3243–3255.

Tamez, P.A., Liu, H., Fernandez-Pol, S., Haldar, K., and Wickrema, A. (2009). Stage-specific susceptibility of human erythroblasts to Plasmodium falciparum malaria infection. Blood *114*, 3652–3655.

Tamez, P.A., Liu, H., Wickrema, A., and Haldar, K. (2011). P. falciparum modulates erythroblast cell gene expression in signaling and erythrocyte production pathways. PloS One *6*, e19307.

Tanno, T., Noel, P., and Miller, J.L. (2010). Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. Curr. Opin. Hematol. *17*, 184–190.

Thomson, J.G., and Robertson, A. (1935). The structure and development of Plasmodium falciparum gametocytes in the internal organs and peripheral circulation. Trans R Soc Trop Med Hyg.

Tiberti, N., Latham, S.L., Bush, S., Cohen, A., Opoka, R.O., John, C.C., Juillard, A., Grau, G.E., and Combes, V. (2016). Exploring experimental cerebral malaria pathogenesis through the characterisation of host-derived plasma microparticle protein content. Sci. Rep. *6*, 37871.

Tibúrcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P.A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P.H., et al. (2012). A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. Blood *119*, e172–e180.

Tibúrcio, M., Silvestrini, F., Bertuccini, L., Sander, A.F., Turner, L., Lavstsen, T., and Alano, P. (2013). Early gametocytes of the malaria parasite Plasmodium falciparum specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. Cell. Microbiol. *15*, 647–659.

Tonkin, C.J., Carret, C.K., Duraisingh, M.T., Voss, T.S., Ralph, S.A., Hommel, M., Duffy, M.F., Silva, L.M. da, Scherf, A., Ivens, A., et al. (2009). Sir2 paralogues cooperate to regulate virulence genes and antigenic variation in Plasmodium falciparum. PLoS Biol. *7*, e84.

Tonwong, N., Sattabongkot, J., Tsuboi, T., Iriko, H., Takeo, S., Sirichaisinthop, J., and Udomsangpetch, R. (2012). Natural infection of Plasmodium falciparum induces inhibitory antibodies against gametocyte development in human hosts. Jpn. J. Infect. Dis. *65*, 152–156.

Trager, W., and Gill, G.S. (1992). Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by Plasmodium falciparum in vitro. J. Protozool. *39*, 429–432.

Trager, W., and Jensen, J.B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. Science *193*, 673–675.

Trager, W., Gill, G.S., Lawrence, C., and Nagel, R.L. (1999). Plasmodium falciparum: enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. Exp. Parasitol. *91*, 115–118.

Trakarnsanga, K., Griffiths, R.E., Wilson, M.C., Blair, A., Satchwell, T.J., Meinders, M., Cogan, N., Kupzig, S., Kurita, R., Nakamura, Y., et al. (2017). An immortalized adult human erythroid line facilitates sustainable and scalable generation of functional red cells. Nat. Commun. *8*, 14750.

Travlos, G.S. (2006). Normal structure, function, and histology of the bone marrow. Toxicol. Pathol. *34*, 548–565.

Tu, Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. Nat. Med. *17*, 1217–1220.

Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G.C., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., and Johnson, P.J. (2013). Trichomonas vaginalis exosomes deliver cargo to host cells and mediate host:parasite interactions. PLoS Pathog. *9*, e1003482.

Vermeulen, A.N., van Deursen, J., Brakenhoff, R.H., Lensen, T.H., Ponnudurai, T., and Meuwissen, J.H. (1986). Characterization of Plasmodium falciparum sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures. Mol. Biochem. Parasitol. *20*, 155–163.

Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Le Scanf, C., Igonet, S., Petres, S., Juillerat, A., Badaut, C., Nato, F., Schneider, A., Lavergne, A., et al. (2008). An in vivo and in vitro model of Plasmodium falciparum rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. Infect. Immun. *76*, 5565–5580.

Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Juillerat, A., Hessel, A., Raynal, B., England, P., Cohen, J.H., Bertrand, O., Peyrard, T., Bentley, G.A., et al. (2012). Structural basis for the ABO blood-group dependence of Plasmodium falciparum rosetting. PLoS Pathog. *8*, e1002781.

Vyas, A., Kim, S.-K., Giacomini, N., Boothroyd, J.C., and Sapolsky, R.M. (2007). Behavioral changes induced by Toxoplasma infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 6442–6447.

Wang, C.W., Mwakalinga, S.B., Sutherland, C.J., Schwank, S., Sharp, S., Hermsen, C.C., Sauerwein, R.W., Theander, T.G., and Lavstsen, T. (2010). Identification of a major rif transcript common to gametocytes and sporozoites of Plasmodium falciparum. Malar. J. *9*, 147.

Wang, L.-S., Li, L., Li, L., Chu, S., Shiang, K.-D., Li, M., Sun, H.-Y., Xu, J., Xiao, F.-J., Sun, G., et al. (2015). MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors. Blood *125*, 1302–1313.

Waugh, R.E. (1991). Reticulocyte rigidity and passage through endothelial-like pores. Blood *78*, 3037–3042.

Weber, J.L. (1988). Interspersed repetitive DNA from Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. *29*, 117–124.

White, N.J. (2018). Anaemia and malaria. Malar. J. *17*, 371.

Wichers, S., Scholz, J.A.., Strauss, J., Witt, S., Lill, A., Neupert, N., Liffner, B., Luehken, R., Petter, M., Lorenzen, S., et al. (2019). Dissecting the gene expression, localization, membrane topology and function of the P. falciparum STEVOR protein family. mBio.

Wickramasinghe, S.N., and Abdalla, S.H. (2000). Blood and bone marrow changes in malaria. Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol. *13*, 277–299.

Wickramasinghe, S.N., Phillips, R.E., Looareesuwan, S., Warrell, D.A., and Hughes, M. (1987). The bone marrow in human cerebral malaria: parasite sequestration within sinusoids. Br. J. Haematol. *66*, 295–306.

Wickramasinghe, S.N., Looareesuwan, S., Nagachinta, B., and White, N.J. (1989). Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in Plasmodium vivax malaria. Br. J. Haematol. *72*, 91–99.

Williams, J.L. (1999). Stimulation of Plasmodium falciparum gametocytogenesis by conditioned medium from parasite cultures. Am. J. Trop. Med. Hyg. *60*, 7–13.

Wilson, N.O., Huang, M.-B., Anderson, W., Bond, V., Powell, M., Thompson, W.E., Armah, H.B., Adjei, A.A., Gyasi, R., Tettey, Y., et al. (2008). Soluble factors from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce apoptosis in human brain vascular endothelial and neuroglia cells. Mol. Biochem. Parasitol. *162*, 172–176.

Word Malaria Report (2018). World Malaria Report.

Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K.L., Ema, H., and Nakauchi, H. (2013). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. Cell *154*, 1112–1126.

Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J. Extracell. Vesicles *4*, 27066.

Yap, G.S., and Stevenson, M.M. (1994). Inhibition of in vitro erythropoiesis by soluble mediators in Plasmodium chabaudi AS malaria: lack of a major role for interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon. Infect. Immun. *62*, 357–362.

Ye, W., Chew, M., Hou, J., Lai, F., Leopold, S.J., Loo, H.L., Ghose, A., Dutta, A.K., Chen, Q., Ooi, E.E., et al. (2018). Microvesicles from malaria-infected red blood cells activate natural killer cells via MDA5 pathway. PLoS Pathog. *14*, e1007298.

Yokoyama, T., Etoh, T., Kitagawa, H., Tsukahara, S., and Kannan, Y. (2003). Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. J. Vet. Med. Sci. *65*, 449–452.

Yuda, M., and Ishino, T. (2004). Liver invasion by malarial parasites--how do malarial parasites break through the host barrier? Cell. Microbiol. *6*, 1119–1125.

Zanghì, G., Vembar, S.S., Baumgarten, S., Ding, S., Guizetti, J., Bryant, J.M., Mattei, D., Jensen, A.T.R., Rénia, L., Goh, Y.S., et al. (2018). A Specific PfEMP1 Is Expressed in P. falciparum Sporozoites and Plays a Role in Hepatocyte Infection. Cell Rep. *22*, 2951–2963.

Zhang, D.-L., Ghosh, M.C., Ollivierre, H., Li, Y., and Rouault, T.A. (2018). Ferroportin deficiency in erythroid cells causes serum iron deficiency and promotes hemolysis due to oxidative stress. Blood *132*, 2078–2087.

Zhao, B., Mei, Y., Yang, J., and Ji, P. (2016). Erythropoietin-regulated oxidative stress negatively affects enucleation during terminal erythropoiesis. Exp. Hematol. *44*, 975–981.

Zhou, A.E., Berry, A.A., Bailey, J.A., Pike, A., Dara, A., Agrawal, S., Stucke, E.M., Ouattara, A., Coulibaly, D., Lyke, K.E., et al. (2019). Antibodies to Peptides in Semiconserved Domains of RIFINs and STEVORs Correlate with Malaria Exposure. mSphere *4*.

Zhu, J., Heyworth, C.M., Glasow, A., Huang, Q.H., Petrie, K., Lanotte, M., Benoit, G., Gallagher, R., Waxman, S., Enver, T., et al. (2001). Lineage restriction of the RARalpha gene expression in myeloid differentiation. Blood *98*, 2563–2567.

Les gamétocytes de *Plasmodium falciparum,* responsables de sa transmission de l'Homme au moustique, sont localisés au niveau des îlots érythroblastiques dans le parenchyme de la moelle osseuse. Ces niches hématopoïétiques sont constituées d'un macrophage central entouré d'érythroblastes. Les mécanismes par lesquels les gamétocytes immatures sont séquestrés dans la moelle osseuse sont encore inconnus. Ce projet de thèse consiste à étudier deux hypothèses qui pourraient expliquer la nature des interactions entre les gamétocytes et les îlots érythroblastiques. La première hypothèse soutient que les érythrocytes infectés par des gamétocytes (EIG) peuvent adhérer aux érythroblastes via des interactions entre ligands et récepteurs. La seconde hypothèse propose que les parasites envahissent les érythroblastes et que les gamétocytes s'y développent jusqu'à maturité. Chacun de ces deux mécanismes pourrait permettre aux parasites sexués d'être séquestrés dans le parenchyme de la moelle osseuse.

Afin d'étudier la première hypothèse, nous avons mis au point un protocole d'adhérence de cellules en suspension et nous avons pu montrer que les EIG immatures n'adhèrent ni aux lignées érythroïdes ni aux érythroblastes primaires. Nous en avons conclu que la séquestration des gamétocytes immatures dans la moelle osseuse n'est probablement pas due à l'adhérence aux érythroblastes.

Pour étudier la seconde hypothèse nous avons développé un protocole d'infection des érythroblastes primaires humains par *P. falciparum* grâce auquel nous avons pu observer et quantifier le développement des gamétocytes dans des érythroblastes. Alors que le développement des érythroblastes tardifs est habituellement beaucoup plus court que la maturation des gamétocytes, nous avons montré que le parasite retarde la différenciation érythropoïétique afin de finir sa maturation au sein d'une cellule nucléée. Les vésicules extracellulaires sécrétées par le parasite contribuent à ce retard érythropoïétique.

Cette étude suggère que les gamétocytes immatures pourraient être séquestrés dans le parenchyme de la moelle osseuse en infectant les stades tardifs d'érythroblastes et en retardant leur différenciation par sécrétion de vésicules extracellulaires. Une fois matures, les gamétocytes au sein des réticulocytes pourraient sortir dans la circulation sanguine et être disponibles pour la transmission au moustique.