THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie de la Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche MIVEGEC

Détermination des facteurs associés à l'engagement sexuel chez *Plasmodium falciparum*

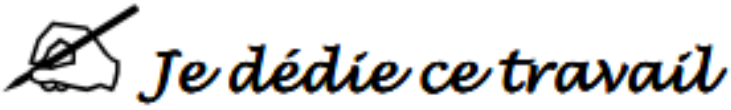
Présentée par Christelle NGOU MAFFO
Le 23 Septembre 2022

Sous la direction des Drs Isabelle MORLAIS et Arthur TALMAN

Devant le jury composé de

Mr Antoine BERRY, Pr, PU-PH, UMR INFINITY	**Président du jury**
Mr Antoine CLAESSENS, DR, INSERM, LPHI-UM	**Membre du jury**
Mme Catherine LAVAZEC, DR, CNRS, Institut Cochin	**Rapporteure**
Mme Florence MIGOT-NABIAS, DR, IRD, UMR MERIT	**Rapporteure**
Mme Isabelle MORLAIS, DR, IRD, UMR MIVEGEC	**Directrice de thèse**
Mr Arthur TALMAN, CR, IRD, UMR MIVEGEC	**Co-directeur de thèse**

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER



Au Seigneur DIEU tout puissant créateur du ciel et de la terre et à son fils JESUS-CHRIST

A mon père, M Raphael Ngou Nguetemo

Que ce travail représente un couronnement de plus pour tous les efforts auxquels tu as consenti et que tu continues de faire dans ma vie. Ton soutien m'a permis de ne pas faillir. Ta rigueur, ton souci du travail bien fait resteront toujours un repère pour moi. Reçois toute ma reconnaissance.

A ma mère, Mme Angèle Meguedong

Tes multiples sacrifices consentis en mon endroit n'ont pas de prix. Merci pour ton dévouement et ton amour. Ce travail est le fruit de tes prodigieux conseils, de tes sacrifices. Reçois toute mon affection Maman chérie.

REMERCIEMENTS

Je voudrais dire merci à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont apporté une aide tant durant mon cycle d'étude que pendant la rédaction de cette thèse:

Au Dr Isabelle Morlais

Les mots me manquent pour t'exprimer toute la reconnaissance que je te porte. Tu m'as accueillie à bras ouverts au sein de ton équipe il y'a de cela 7 ans avec beaucoup de gentillesse. Je te remercie pour la confiance, pour toutes les opportunités que tu m'as offertes de découvrir de nouveaux endroits, que ce soit sur le terrain (au Cameroun) ou dans les colloques et formations (Portugal, Cambodge). Je te remercie du fond du cœur Isa.

Au Dr Arthur Talman

Je tenais à exprimer ma profonde gratitude à mon co-directeur de thèse, le Dr Arthur Talman pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et m'avoir épaulé au cours de ces années. Merci infiniment Arthur de m'avoir ouvert les portes de votre équipe Albatros et de m'avoir permis de présenter mes travaux de thèse à la conférence Biomalpar à Heidelberg. Merci infiniment pour votre disponibilité, pour votre confiance, pour votre soutien intellectuel et pour la liberté qui m'a été offerte durant mes travaux de thèse.

Au Pr Antoine Berry

C'est un réel plaisir d'avoir contribué à la réalisation de plusieurs de vos projets. Votre convivialité et votre sens élevé du travail bien fait m'inspireront toujours. Votre disponibilité, votre courtoisie et votre sens élevé du devoir font de vous un grand chercheur, recevez toute ma gratitude.

Aux Membres du jury

Je remercie le Professeur Antoine Berry et le Docteur Antoine Claessens pour avoir accepté de juger mon travail en plus de leurs activités respectives. Je remercie les Docteurs Florence Migot-Nabias et Catherine Lavazec qui ont aimablement accepté de se rendre disponibles pour examiner cette thèse.

Au Dr Fréderic Simard, Directeur MIVEGEC

Je tenais à vous exprimer ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre unité. Merci infiniment Fred, c'est un immense honneur pour moi d'avoir travaillé dans cette unité. Je vous remercie beaucoup pour tous les échanges et prodigieux conseils.

Au Dr Elisabeth Carniel, ancienne Directrice du CPC du Cameroun

Je tenais à vous remercier pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux de thèse au sein de votre établissement. Recevez toute ma reconnaissance.

Au Dr Lawrence Ayong, chef de Service du LRP au CPC

Je vous adresse un profond remerciement pour l'attention que vous m'avez toujours portée, l'accueil chaleureux au sein de votre unité et vos multiples conseils.

Au Pr Sandrine Nsango

Toujours à l'écoute et surtout disponible tant sur le plan professionnel que personnel, malgré vos multiples occupations. Les discussions fructueuses que nous avons eues au cours de ces 7 dernières années m'ont permis de m'enrichir et de m'améliorer dans mon travail. Vous avez éveillé ma motivation de faire la recherche à travers des activités de terrain et de laboratoire que j'ai menées à vos côtés. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Au Dr Alejandro Marin-Menendez

Merci Alex pour ta contribution dans ce projet via la culture des parasites. Merci de m'avoir initiée à la cytométrie en flux. Reçois toute ma reconnaissance pour ta disponibilité et les échanges autour de ce projet de thèse.

A M. Luc Abate

Merci beaucoup pour ton soutien inestimable durant ces années. Tu sais déjà ce que je pense de toi, tu es quelqu'un de spécial, tu as toujours été là pour moi je tiens à t'adresser mes sincères remerciements. Reçois toute ma reconnaissance Luc.

A toute l'équipe Albatros

Je voudrais dire un grand merci à toute l'équipe : Celia, Cécile, Emilie, Quentin, Irène et Ange, que de bons souvenirs à commémorer. Merci pour l'hospitalité et la bienveillance à mon égard.

A M. Pedro Verge-Depré

Un grand merci pour vos encouragements à mon égard, vous avez toujours cru en moi. Recevez toute ma reconnaissance.

A tous les membres d'ESV et TRIAD

Merci pour les conseils professionnels et surtout pour les bons moments passés ensemble. Merci à toi Anne Poinsignon pour ta disponibilité et ta contribution dans les analyses de mes données.

A Katia Grucker, Julie PLA, Audrey Ravat et Valérie Delplanque

Merci pour toute l'assistance administrative et tous ces moments agréables passés et partagés avec vous au sein de l'IRD.

A la représentation de l'IRD au Cameroun

Je tiens également à remercier le représentant de l'IRD au Cameroun Jean-Marc Hougard, pour les différentes interventions qu'il a effectué auprès de l'Ambassade de France au Cameroun pour faciliter le processus d'obtention des visas. Je voudrais également remercier Colette Essono et Mohamed Elomo pour leurs assistances.

A Mme Gaëlle Brulé

Merci pour l'aide administrative que vous m'avez apportée en tant que responsable du programme ARTS.

Au Dr Dorothée Missé

Merci beaucoup Dorothée pour ton soutien, le partage d'idées autour de la science et les encouragements à mon égard.

Au Dr Parfait Awono-Ambene, Chef de service du LRP à l'OCEAC

Je vous remercie beaucoup pour votre disponibilité chaque fois que le besoin se faisait sentir. Vous avez toujours manifesté à mon égard une profonde considération. Recevez ici ma profonde satisfaction.

Au Dr Majoline Tchioffo

Un grand merci à toi Majo, tu m'as toute de suite adoptée dès l'instant où j'ai fait ta connaissance et jusqu'à présent tu es toujours disponible pour moi. A travers ce manuscrit je tiens à t'exprimer ma profonde reconnaissance.

Au Pr Carole Else EBOUMBOU

Merci pour votre disponibilité permanente et toutes vos réflexions scientifiques qui m'ont permis de m'améliorer.

A Mme Evelyne Ntsama epse Moret

Merci beaucoup « mama Eve », tu as toujours joué le rôle d'une grande sœur depuis notre première rencontre au dispensaire de Nkol-eton. Je tiens à t'exprimer ma reconnaissance.

A mes collègues et amis du CPC/IRD/OCEAC/UCAC/CREMER

Je voudrais vous dire un grand merci pour tous ces moments d'échanges et de joie: Simplice Kambou, Nadine Lamare, Balotin Fongang, Sarah-Matio, Lionel Feufack-Donfack, Estelle Essangui, Claude Kapya, Gwladys Cheuteug , Armando Njiyou, Bernard Melingui, Antoine Nkuba, Melaine Dahoui, Yannick Bitome, Michele Bengue, Christiane Donkeu, Albert Ngano, Marie Abite , Gaelle Bouopda, Moussa Sondo, Darius, Francis Essengue, Dowbiss, Sayouba, Ekoko, Belisse, Franca, Ghislain Aka, Zamble, Lemonde Bouafou, Illich, Judicael, Celestin, Amidou Ngouhouo, Onana Etienne, Jean Pierre Agbor, Serge Soppo, Sylvie Kemleu, Rodrigue

Kemoue, Noella Efange, Tina, Belinda, Ibrahima, Ginette…, ce fut un plaisir de travailler avec vous.

A mes collègues de bureau à l'IRD

Dr Hacène Medkour, Dr Rodrigue Poueme, Florian, Inès, Arthur, Quentin, Lauryne, Felix, Idalba, Rachid, Idriss merci pour tous ces moments.

A la grande Famille Tegni Chretien et Tegni Kembo

Merci beaucoup pour les encouragements, le soutien et la bienveillance à mon égard. Recevez toute ma reconnaissance et mon affection.

Aux enfants des écoles publiques et villages de Mfou

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce projet, sans vous ce travail n'aurait pas été possible.

A la grande famille Ngou

Je voudrais vous remercier pour votre apport permanent tout au long de ce parcours, pour les encouragements et les conseils que vous m'apportez sans cesse, quelle joie de vous avoir auprès de moi chaque jour. Vous avez toujours eu confiance en moi, les mots me manquent pour vous dire à quel point je vous aime.

SOMMAIRE

Remerciements ii
Sommaire vi
Listes des figures x
Liste des tableaux xi
Liste des abréviations xii
Résumé xiv
Abstract xv
Chapitre 1: Introduction Générale 1
1.1 Epidémiologie 2
1.1.1 Epidémiologie sur le paludisme dans le monde 2
1.1.2 Epidémiologie du paludisme au Cameroun 3
1.2 Les Anophèles 6
1.2.1 Systématique 6
1.2.2 Cycle de développement des anophèles 7
1.2.2.1 Phase aquatique 7
1.2.2.2 Phase aérienne 7
1.3 Le parasite 8
1.3.1 Systématique 8
1.3.2 Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* 10
1.3.2.1 Chez l'Homme 10
1.3.2.2 Chez l'anophèle femelle 11
1.4 Lutte contre le paludisme 12
1.4.1 Traitement 12
1.4.2 Prévention 12
1.4.2.1 La chimioprophylaxie 12
1.4.2.2 La lutte anti-vectorielle 13
1.4.2.3 Le vaccin RTS, S 13
1.4.2.4 Stratégies basées sur le blocage de la transmission 14
1.5 Variabilité génétique et immunité protectrice contre le paludisme 14
1.5.1 Variabilité génétique et protection contre le paludisme 15
1.5.1.1 Trait drépanocytaire et protection contre le paludisme 15

1.5.1.2 Mécanismes protecteurs du trait drépanocytaire contre le paludisme 16
.1.5.1.3 Trait drépanocytaire et co-portage avec d'autres facteurs génétiques d'hôte contre le paludisme 18
1.5.2 Immunité acquise protectrice contre le paludisme..... 19
1.6 Rôle du réservoir asymptomatique dans la transmission..... 19
1.7 Biologie de l'invasion et préférence de la cellule hôte..... 21
1.7.1 Les mérozoïtes du *P. falciparum* envahissent les globules rouges 21
1.7.2 Séquestration de *P. falciparum* 31
1.7.3 Préférence de la cellule hôte par *Plasmodium* 35
1.8 Biologie de la transmission..... 37
1.8.1 Protéine contenant le domaine Apicomplexe AP2 (ApiAP2) chez *Plasmodium falciparum* 37
1.8.2 Engagement de *P. falciparum* vers la voie sexuée..... 38
1.8.2.1 Mécanisme épigénétique impliqué dans l'engagement sexuel 39
1.8.2.2 Facteurs influençant l'engagement sexuel 41
1.8.3 Infectivité de gamétocyte de *P. falciparum* 43
1.8.3.1 Facteurs de l'hôte 44
1.8.3.2 Facteurs liés au parasite 45
1.8.3.3 Facteurs liés au vecteur 46
Chapitre 2: Objectifs de thèse et description des chapitres de l'étude..... 48
2.1 Contexte de l'étude 49
2.2 Objectifs de l'étude..... 50
2.3 Description des différents chapitres de l'étude..... 50
2.4 Déroulement de ma thèse 51
Chapitre 3: Méthodologie générale 53
3.1 Méthodologie commune aux deux articles 54
3.1.1 Approbation éthique et consentement à participer à l'étude 54
3.1.2 Site d'étude et justification du lieu d'étude 54
3.1.3 Population d'étude 55
3.1.4 Collecte de sang chez les enfants asymptomatiques et porteurs de gamétocytes – 2017 (Article 1)..... 56
3.1.5 Collecte de sang chez les enfants asymptomatiques porteurs des stades asexués – 2020 - (Article 2) 58
3.1.6 Identification du statut hémoglobinique par la PCR –RFLP 59
3.1.6.1 Extraction de l'ADN 59
3.1.6.2 Amplification de l'ADN (PCR) et digestion enzymatique 59

3.2 Méthodologie utilisée pour montrer l'impact du trait drépanocytaire sur la transmission (Article 1) 62
3.2.1 Identification des espèces plasmodiales 62
3.2.2 Polymorphisme à *P. falciparum* 63
3.2.2.1 Filtration des gamétocytes 63
3.2.2.2 Extraction de l'ADN 64
3.2.2.3 Génotypage à l'aide des marqueurs Microsatellites 64
3.2.3 Infections expérimentales à partir du sang des porteurs de gamétocytes (MFA) 66
3.2.3.1 Elevage de la souche Ngousso au laboratoire 66
3.2.3.2 Description du dispositif de gorgement 68
3.2.3.3 Gorgement des moustiques 69
3.2.3.4 Dissection des moustiques et comptage d'oocystes 71
3.2.4 Analyse de données 71
3.3 Méthodologie utilisées pour étudier la relation entre l'âge des érythrocytes et l'invasion de *P. falciparum* dans des conditions naturelles (Article 2) 72
3.3.1 Extraction de l'ADN 72
3.3.2 Polymorphisme de *P. falciparum* (*msp1* et *msp2*) 72
3.3.3 Expression d'AP2G par RTqPCR 74
3.3.3.1 Extraction d'ARN au Trizol 74
3.3.3.2 Transcription inverse (RT) 75
3.3.3.3 Quantification par qPCR 75
3.3.4 Détermination de la réticulocytémie et préférence de la cellule hôte sur les échantillons de terrain 76
3.3.4.1 Préparation des échantillons sur le terrain 76
3.3.4.2 Préparation de la suspension cellulaire 76
3.3.4.3 Phase d'acquisition cellulaire 77
3.3.5 Confirmation de l'invasion de *P. falciparum* dans les réticulocytes 78
3.3.5.1 Culture de parasites *in vitro (*souche GB4 et 3D7) 78
3.3.5.2 Essais de l'invasion et de la préférence réticulocytaire 79
3.3.6 Séquençage de l'ARN en cellule unique (ScRNAseq) 79
3.3.6.1 Technique 10X chromium 80
3.3.6.1.1 Préparation de la suspension cellulaire et tri cellulaire 80
3.3.6.1.2 Principe de la technique 10X Chromium 81
3.3.6.2 Technique Smart-Seq2 83
3.3.6.2.1 Préparation de la suspension cellulaire et Tri cellulaire 83
3.3.6.2.2 Principe de la technique Smart-Seq2 83

3.3.7 Analyse de données 84
3.3.7.1 Analyse de données de la population (140 échantillons) 84
3.3.7.2 Analyse de données transcriptomiques 85
3.3.7.2.1 Analyses de données 10X chromium 85
3.3.7.2.2 Analyses de données Smart-Seq2 85
Chapitre 4: Influence of sickle cell trait on Plasmodium falciparum transmission in naturally infected gametocyte carriers 87
4.1 Contexte de l'étude 88
4.2 Description de l'étude 88
Chapitre 5: Preference des cellules hôtes et hétérogénéité des parasites circulants dans les infections naturelles à Plasmodium falciparum 126
Discussion générale et perspectives 167
Conclusion générale 180
References bibliographiques 181
Annexe 231
Liste des présentations 231
Liste des publications sur la période de la thèse 232

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Situation du paludisme dans le monde en 2020 2
Figure 2: Faciès épidémiologique du paludisme au Cameroun 3
Figure 3: Intensité de la transmission du paludisme dans différents faciès épidémiologiques . 5
Figure 4: Cycle biologique des anophèles 8
Figure 5: Cycle de développement de *P. falciparum* chez l'Homme et l'anophèle 10
Figure 6: Schéma descriptif de la membrane du globule rouge 23
Figure 7: Processus de formation du globule rouge (érythropoïèse terminale) 25
Figure 8: Invasion de mérozoïtes de *P. falciparum* dans la cellule hôte 31
Figure 9: Séquestration des stades asexués (trophozoites et schizontes) dans les capillaires de plusieurs organes. 33
Figure 10: Permissivité des cellules sanguines à *P.vivax.* 36
Figure 11: Régulation de l'engagement sexuel et de la gamétogénèse 38
Figure 12: Voies empruntées par le parasite pour sa différenciation sexuelle. 39
Figure 13: Régulation épigénétique de l'engagement sexuel de *P. falciparum.* 41
Figure 14: Contrôle du taux d'engagement sexuel par la compétition métabolique entre la phosphoethanolamine methyltransférase (PMT) et la méthylation H3K9. 43
Figure 15: Représentation de la localité de Mfou 55
Figure 16: Différents villages et écoles du district de santé de Mfou 56
Figure 17: Sélection des porteurs de gamétocytes dans les écoles de Mfou 58
Figure 18: Principe de digestion enzymatique avec l'enzyme Bsu 36I 61
Figure 19: Prélèvement veineux et dispositif de filtration de gamétocytes 64
Figure 20: Elévage de la souche Ngousso à l'OCEAC au Cameroun 67
Figure 21: Schéma récapitulatif du processus d'élevage de la souche Ngousso 68
Figure 22: Dispositif d'infection expérimentale 69
Figure 23: Protocole d'alimentation des moustiques 70
Figure 24: Gorgement des femelles d'An coluzzii sur membrane 70
Figure 25: Estomacs d'un moustique femelle d'An coluzzii infectés par les oocystes 71
Figure 26: Phase d'aquisition d'un échantillon sur 500000 évènements 78
Figure 27: Principe du 10X chromium 82
Figure 28: Principe du Smart-Seq2 84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques des loci de microsatellites utilisés pour la variabilité génétique de P.falciparum 66
Tableau 2: Amorces utilisées pour la première PCR (MSP1 et MSP2) 73
Tableau 3: Amorces utilisées pour la deuxième PCR (famille allélique) 74

LISTE DES ABREVIATIONS

ACTs	Artemisinin-based combination therapies
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIC	Critère d'information d'Akaike
AL	Artéméther-Luméfantrine
ARN	Acide ribonucléique
AS-AQ	Artesunate-amodiaquine
BSG	Basigine
CPC	Centre Pasteur du Cameroun
CPS	Chimio-Prévention Saisonnière
CR1	Récepteur du complément 1
CT	Cycle threshold
DHA-PPQ	Dihydroartémisinine-Pipéraquine
DMFA	Direct Membrane Feeding Assay
EBA	Erythrocyte binding antigen
EBL	Protéines de liaison aux érythrocytes
EPO	Erythropoïétine
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
G6PD	Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase
GDP	Glycophorine D
GLUT1	Transporteur de glucose 1
GPA	Glycophorine A
GPC	Glycophorine C
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HLA	Human leucocyte antigen
IDC	Intraerythrocytic development cycle
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
LAL	Lutte Anti-Larvaire
MILDA	Moustiquaires Imprégnées à Longue Durée d'Action

MINSANTE	Ministère de la santé
MSP1	Merozoite surface protein 1
MSP2	Merozoite surface protein 2
OCEAC	Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies en Afrique Centrale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PfEMP1	*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1
PID	Pulvérisation intra-Domiciliaire
PNLP	Programme National de lutte contre le paludisme
PSLP	Plan Stratégique de lutte contre le paludisme
RON	Rhoptry Neck Proteins
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTqPCR	Reverse Transcription quantitative real-time PCR
scRNAseq	Séquençage de l'ARN en cellule unique
Shelph	*Schewanella* -like phosphatase
TBV	Transmission Blocking Vaccine
TDR	Tests de Diagnostic Rapide
TPI	Traitement préventif intermittent
UMI	Identifiant moléculaire unique
VIH	Virus immunodéficience humaine
VSA	Variant surface antigen
WHO	World Health Organization

RESUME

Au cours de son cycle intra-érythrocytaire chez l'Homme, *Plasmodium falciparum*, l'agent pathogène responsable du paludisme se réplique dans les érythrocytes. Le parasite peut envahir des érythrocytes à différentes étapes de leur maturation et il peut aussi se retrouver chez des hôtes porteurs d'anomalies de l'hémoglobine qui modifient les propriétés de l'érythrocyte. L'impact de cette hétérogénéité des globules rouges sur le développement des stades sexués, seuls stades infectieux pour le vecteur, est particulièrement inexploré.

Dans cette thèse, nous avons cherché à caractériser l'effet de l'hétérogénéité de l'environnement érythrocytaire sur l'engagement sexuel du parasite et sur la transmission chez le moustique. Nous avons développé des approches basées sur de nouvelles technologies, dont la transcriptomique en cellule unique, pour rechercher des facteurs associés à l'engagement sexuel à partir d'échantillons de terrain prélevés au Cameroun chez des porteurs asymptomatiques. Au Cameroun, nous avons réalisé des gorgements de moustiques sur sang contenant des gamétocytes issus de porteurs du trait drépanocytaire ou d'une hémoglobine normale pour la mesure de l'infection selon le génotype de l'hôte.

Dans un premier temps, nous avons montré que les gamétocytes circulant chez des porteurs du trait drépanocytaire sont plus infectieux pour le vecteur. La prévalence et la charge oocystique des moustiques femelles gorgés sur sang d'individus HbAS sont significativement plus élevées que celles obtenues pour des femelles nourries sur sujets HbAA. Les sujets drépanocytaires contribueraient alors de manière accrue à la transmission du paludisme et ces résultats doivent être pris en compte dans les interventions de prévention afin de mieux protéger ces populations plus à risque de propager le parasite.

Dans un second temps, nous avons observé que *P. falciparum* envahit préférentiellement les érythrocytes jeunes et que la biomasse parasitaire est plus élevée dans les réticulocytes infectés. Nous avons aussi montré que les parasites évoluent plus souvent vers des stades sexuellement engagés dans des érythrocytes plus jeunes, ce qui suggère que la cellule hôte est un des déterminants clés de l'engagement sexuel.

Ce travail de thèse apporte des résultats importants pour notre compréhension de la transmission et particulièrement sur les mécanismes mis en jeu par le parasite pour optimiser sa transmission selon l'environnement dans lequel il se développe. Nos résultats vont apporter de nouvelles voies pour le développement de stratégies bloquant la transmission.

Mots clés : Engagement sexuel, trait drépanocytaire, préférence des cellules hôtes, réticulocyte, gamétocyte, paludisme

ABSTRACT

Malaria parasite can encounter heterogenous hosts and different type of host cells. In particular during the intra-erythrocytic cycle the parasite replicates inside an erythrocyte and can encounter different erythrocytes in term of maturation stage or in host carrying haemoglobin variants modifying the red blood cell environment. The impact of this heterogeneity on mosquito-transmissible stages is particularly unexplored. Characterising their effects on both sexual commitment and transmission to mosquitoes is of paramount importance in the fight against malaria. Here we leveraged new technologies including single cell transcriptomics as well as samples collected in naturally infected carriers to understand the impact of RBC heterogeneity on transmission phenotypes.

Firstly, we find that sickle cell trait carriers have an enhanced mosquito transmission through both an increase in prevalence of transmission stages and are more infectious to mosquitoes, suggesting they excessively contribute to malaria transmission and should be taken into account in our understanding of the spread of malaria.

Secondly, we find that *P. falciparum* preferentially invades younger erythrocytes and that the biomass of infected reticulocyte is important within an infection. We further show that parasites preferentially commit to sex within younger erythrocytes, suggesting that the host cell is one of the key determinants in environmentally-induced sexual fate determination.

Our data show cases the power of combining cutting edge methods with parasites in their natural environment as a source for identifying new and exciting parasite biology. This work has important implication for our understanding of how parasites maximise their transmission in response to a carrying environment and therefore on the spread of malaria and how it may be targeted in transmission blocking interventions.

Key words: Sexual commitment, sickle cell trait, host cell preference, reticulocyte, gametocyte, malaria

CHAPITRE 1:

INTRODUCTION GENERALE

1.1 Epidémiologie

1.1.1 Epidémiologie sur le paludisme dans le monde



Figure 1: Situation du paludisme dans le monde en 2020 (WHO, 2021)

Le paludisme, aussi appelé « malaria », avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et la tuberculose fait partie des maladies les plus meurtrières que le monde a connues depuis des décennies. Dans les régions tropicales, elle est le plus souvent endémique et constitue la première cause de mortalité infantile en Afrique, la maladie touchant particulièrement les enfants de moins de 5 ans. Malgré les efforts entrepris par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour son éradication, elle demeure toujours un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne, en Asie et en Amérique du sud. Selon les dernières estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) une augmentation du poids de la maladie a été signalé en 2020, le nombre de cas de paludisme est passé de 229 millions en 2019 à 241 millions en 2020, soit une augmentation de 5,24% suite à la pandémie COVID-19 **(Figure 1)**. Le nombre de décès quant à lui a augmenté de 53,30%, passant de 409 000 décès enregistrés en 2019 à 627 000 en 2020. Les enfants de moins de 5 ans payent le plus lourd tribu avec 77% de décès en 2020 (WHO, 2020; WHO, 2021). Cependant, on peut observer une élimination progressive du poids de la maladie dans certains pays, notamment la République Islamique d'Iran et la Malaisie ont rapporté zéro cas de paludisme indigène pour la troisième année consécutive, de même l'Azerbaïdjan et le Tadjikistan ont déposé une demande formelle de certification d'élimination. Le nombre de cas de paludisme autochtone à *P. falciparum* a chuté de 93 % de 2000 à 2020

dans la région du Grand Mékong (Cambodge, province du Yunnan en Chine, Laos, le Myanmar, Thaïlande et Viêt Nam) (WHO, 2019). Mais l'Afrique subsaharienne continue de supporter une part importante de la charge mondiale du paludisme, comptant 94 % de la mortalité palustre, et 67 % des décès touchant les enfants de moins de 5 ans (WHO, 2019). Six pays d'Afrique subsaharienne ont enregistré près de la moitié des décès en 2020, à savoir le Nigéria (27%), la République Démocratique du Congo (12%), l'Ouganda (5%), le Mozambique (4%), l'Angola (3%) et le Burkina Faso (3%) (WHO, 2021).

1.1.2 Epidémiologie du paludisme au Cameroun

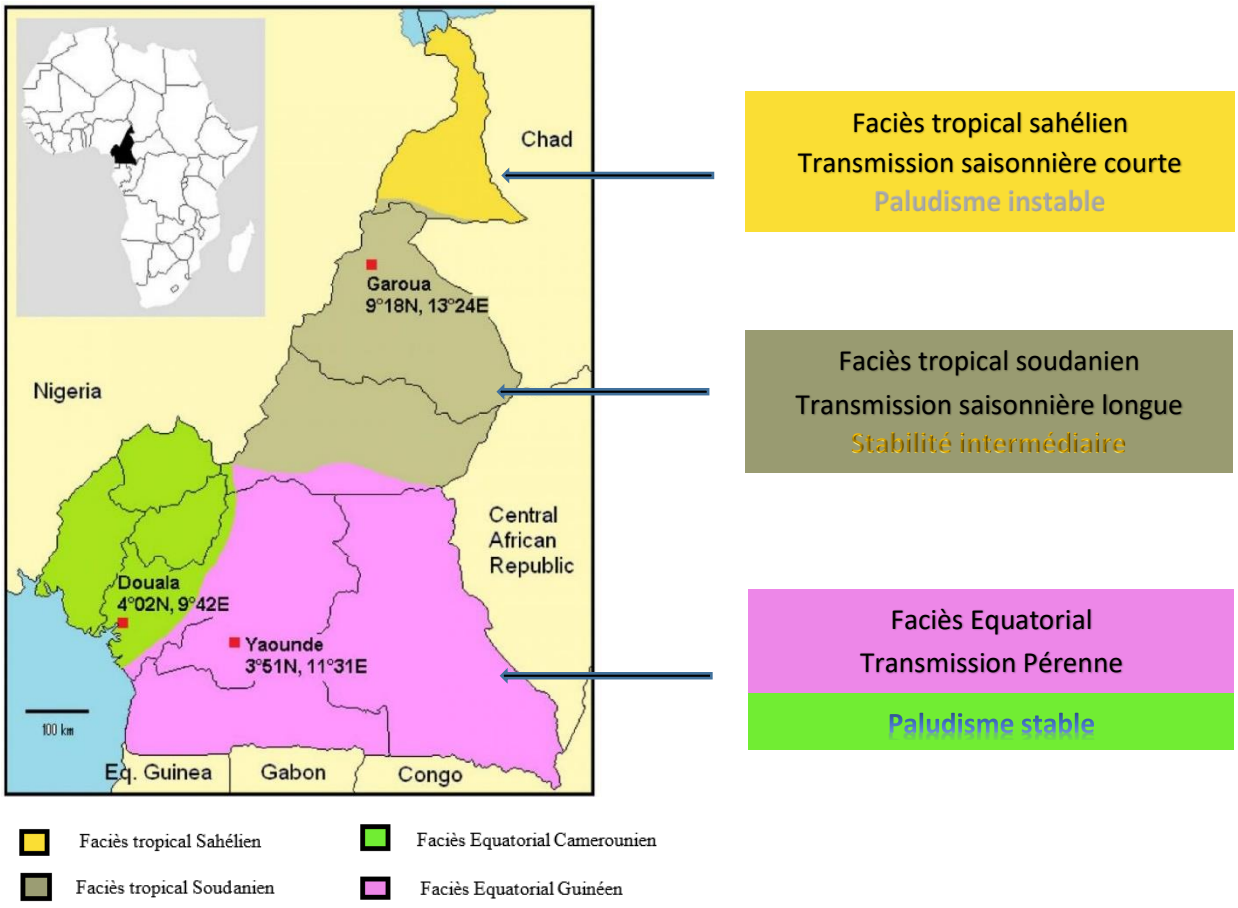


Figure 2: Faciès épidémiologique du paludisme au Cameroun adapté de (Djeutchouang Sayang, 2010) *https://fr.maps-cameroon.com/cameroun-carte-climatique.*

Considéré comme une « Afrique en miniature » du fait de sa grande diversité naturelle associée à sa situation géographique, le Cameroun est situé dans le Golfe de Guinée. Le pays se caractérise par un climat équatorial de type guinéen et camerounien dans le sud et le sud-ouest et par un climat tropical de type soudanien et sahélien dans la partie septentrionale. Cette

variation climatique est caractérisée dans le sud forestier (régions du Centre, Est, Littoral, Sud et Sud-ouest) par une végétation de forêt dense, un vaste réseau hydrographique, et une végétation de mangroves avec une pluviométrie abondante. Dans les hauts plateaux de l'ouest, on retrouve une végétation moins dense et un climat frais, tandis que le nord du pays se caractérise par des savanes et steppes. Cette diversité conditionne la distribution des vecteurs et des parasites, et permet ainsi de distinguer les différents faciès épidémiologiques du paludisme **(Figure 2)**.

Le faciès tropical sahélien à l'extrême Nord : il se caractérise par un temps chaud et sec. C'est une zone hyper-endémique où la transmission est saisonnière (1 à 3 mois) allant de 1 à 100 piqûres infectantes par homme par an et sujette à des épidémies de paludisme pendant la saison des pluies affectant toutes les tranches d'âge (Atangana et al., 2012; Tabue et al., 2017). Le principal vecteur impliqué dans la transmission est *Anopheles arabiensis* (Barbazan et al., 1998; Antonio-Nkondjio et al., 2019)

Le faciès tropical soudanien du plateau de l'Adamaoua : il se caractérise par une savane humide avec une saison des pluies (6 mois) et une saison sèche (6 mois). La transmission est saisonnière et beaucoup plus longue pendant la saison des pluies avec une intensité de piqûre allant de 100 à 200 piqûres infectantes par homme par an (PNLP, 2020). Les principaux vecteurs impliqués dans la transmission sont: *An gambiae*, *An arabiensis* et *An funestus* (Carnevale et al., 1987).

Le faciès équatorial appartenant au domaine forestier: il se caractérise par quatre saisons (2 saisons sèches et 2 saisons pluvieuses). La transmission est pérenne et élevée avec une pluviométrie abondante et varie de 100 à 400 piqûres infectantes par homme par an (PNLP, 2020). Les espèces vectrices les plus retrouvées sont : *An. coluzzii*, *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti* , *An. leesoni*, *An. ziemanni* et *An. marshallii* (Antonio-Nkondjio & Simard, 2013; Antonio-Nkondjio et al., 2019; Djamouko-Djonkam et al., 2019; L et al., 2020).

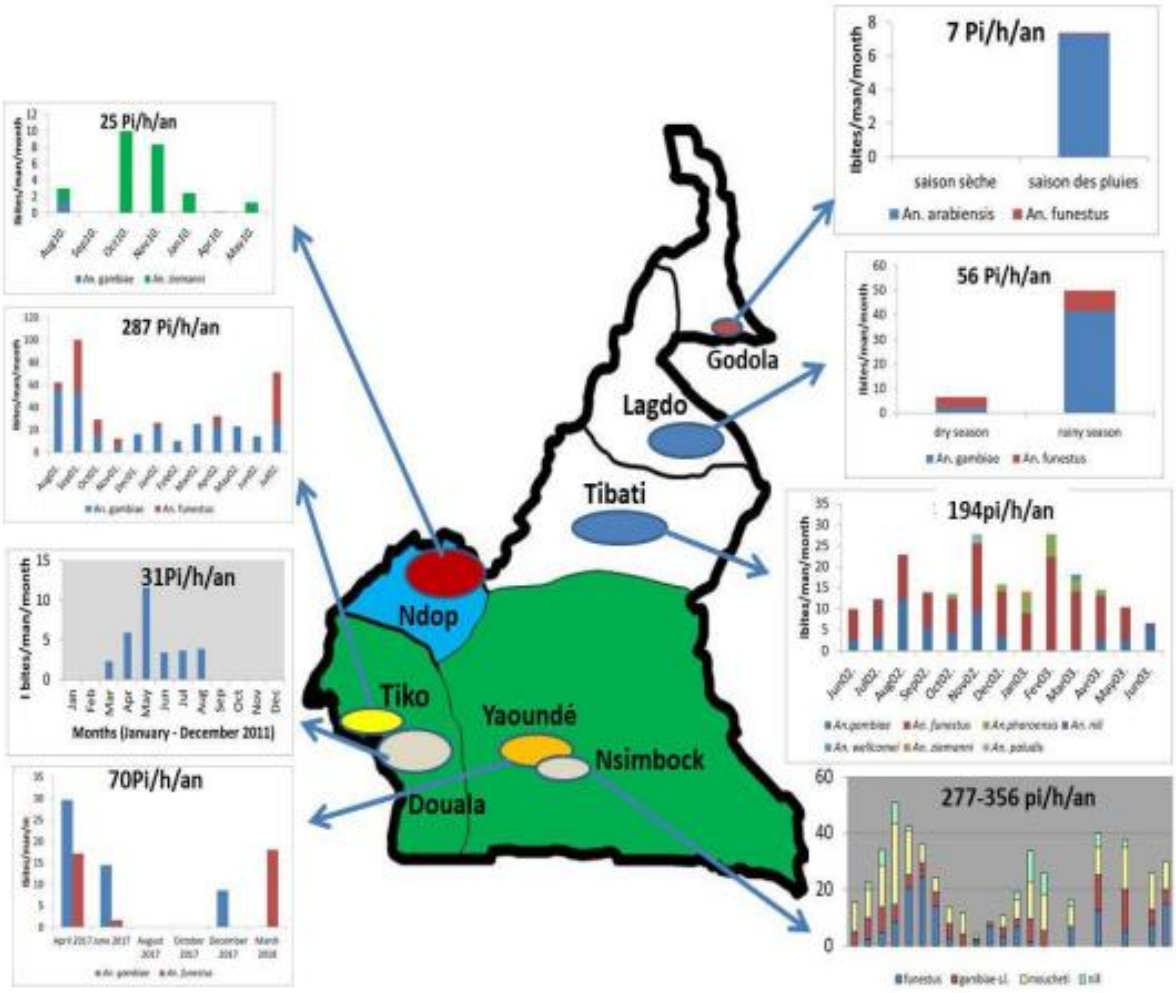


Figure 3: Intensité de la transmission du paludisme dans différents faciès épidémiologiques (PNLP, 2020)

Le paludisme est toujours considéré comme un problème majeur de santé publique au Cameroun (PNLP, 2020). Selon les dernières estimations du Programme National de Lutte contre le Paludisme au Cameroun (PNLP) en 2021, la maladie a été considérée comme l'une des principales causes d'absentéisme dans les écoles et les lieux de travail avec une prévalence estimée à 24% (PNLP, 2021). Elle représentait 30% des motifs de consultation, 70% des hospitalisations et 3782 décès ont été enregistrés parmi les 2,7 millions de cas de paludisme dans les formations sanitaires en 2020 (PNLP, 2021). La morbidité palustre est passée de 41% en 2008 à 25,8 % en 2018 et la mortalité quant à elle est passée de 43% en 2008 à 8,5 % en 2018 **(Figure 3)**. On note également une diminution du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans, avec une morbidité qui est passée de 69,7% en 2015 à 36,3% en 2019 (PSLP, 2019). Entre 2013 et 2017 une baisse de 27% de la mortalité proportionnelle (hospitalière) du

paludisme a été observée, passant de 4351 à 3195 décès (MINSANTE & OMS, 2019; PNLP, 2019). Cette diminution serait le résultat des actions menées par le gouvernement en matière de lutte et de prévention à travers: l'introduction des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACTs) pour le traitement du paludisme simple et la prise en charge gratuite des cas de paludisme grave chez les enfants de moins de 5 ans; la gratuité du Traitement Préventif Intermittent chez les femmes enceintes (TPI), la distribution en masse des Moustiquaires Imprégnées à Longue Durée d'Action (MILDA), l'utilisation des tests de diagnostic rapide (TDR) pour le dépistage rapide, la pulvérisation intra-Domiciliaire (PID) et la lutte Anti-Larvaire (LAL) (PNLP, 2016; PNLP, 2019) .

1.2 Les Anophèles

1.2.1 Systématique

Les vecteurs du paludisme humain appartiennent au genre *Anopheles* (Meigen, 1918). Environ 3500 espèces de moustiques ont été recensées et décrites parmi lesquelles, 450 espèces du genre *Anopheles* sont dénombrées dans le monde, et seules 70 à 80 peuvent être vectrices du paludisme (Mouchet et al., 2004). Au Cameroun, sur les 52 espèces anophéliennes officiellement recensées, seules 17 sont capables de transmettre le paludisme à l'Homme (Antonio-Nkondjio et al., 2006 ; Wondji et al., 2005; PSLP, 2019). Six espèces sont considérées comme vecteurs majeurs du paludisme: *An. gambiae s.s, An coluzzii, An. arabiensis, An. funestus, An. nili* et *An. moucheti* (Fontenille & Simard, 2004; Coetzee et al., 2013 ; Antonio-Nkondjio et al., 2019) et 11 comme vecteurs secondaires à l'instar de: *An. ovengensis, An. paludis, An. pharoensis, An. hancocki, An. carnevalesi, An. wellcomei et An.marshallu.* D'autres espèces comme *An. rufipes, An, leesoni , An ziemanni* sont considérées comme des vecteurs d'importance locale (Tabue et al., 2017; PSLP, 2019). Chacune de ces espèces a des exigences écologiques particulières et exploite une variété de collections d'eau pour son développement larvaire: *An. gambiae* se développe dans de petites flaques d'eaux claires, ensoleillées et sans végétation; *An. arabiensis* peuple les environnements plus secs jusqu'en bordure du Sahara (Coetzee et al., 2000; Wondji et al., 2005). *An. funestus* colonise les marais à végétation dressée; *An. nili* se trouve sur les bords des rivières à courant rapide, et *An. moucheti* préfère les fleuves à courant lent, dans le bloc forestier d'Afrique Centrale (Antonio-Nkondjio et al., 2002; Fontenille et al., 2003).

1.2.2 Cycle de développement des anophèles

Le cycle de développement de l'anophèle **(Figure 4)** se caractérise par une phase aquatique ou pré-imaginale allant des œufs à la nymphe via les larves et une phase aérienne constituée du stade adulte ou l'imago.

1.2.2.1 Phase aquatique

Au cours de cette phase, la femelle pond des œufs (40 à 100 de 0,5 mm de long) séparément à la surface de l'eau, qui éclosent au bout de 24 à 72 heures selon la température et la source nutritive. Chaque œuf va donner naissance à une larve qui se nourrit en surface, grossit et subit quatre mues successives (L1, L2, L3, L4) pour donner une nymphe mobile qui ne se nourrit plus. Le stade nymphal dure en général moins de 48 heures et est le siège de profonds remaniements morphologiques, métamorphoses, aboutissant à l'imago qui émerge et gagne le milieu aérien. Cette phase dure 6 à 9 jours selon les conditions de température.

1.2.2.2 Phase aérienne

Après émergence, l'adulte ou imago se repose sur un support émergé pendant 10 à 24 heures permettant ainsi le durcissement de sa cuticule, le déploiement de ses ailes et la maturation des organes reproducteurs. Trois jours environ après l'émergence, les mâles et femelles s'accouplent en vol pendant un essaimage. Les mâles s'accouplent plusieurs fois dans leur vie mais les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois et dans le cas où plusieurs accouplements auraient lieu chez la femelle, seul le premier assure le transfert de spermatozoïdes vers la spermathèque (Carnevale & Robert, 2009). La femelle s'alimente de jus sucrés qui lui procurent de l'énergie pour le vol et de repas de sang pour le développement de ses ovaires. Elle prélève un repas de sang tous les deux ou trois jours sur un hôte vertébré. La durée moyenne de vie des adultes varie selon les espèces et les conditions climatiques. Elle est de trois à quatre semaines pour *An. gambiae* et *An. funestus* en Afrique tropicale, mais pourrait atteindre six mois en zone tempérée (Mouchet & Carnevale, 1991).

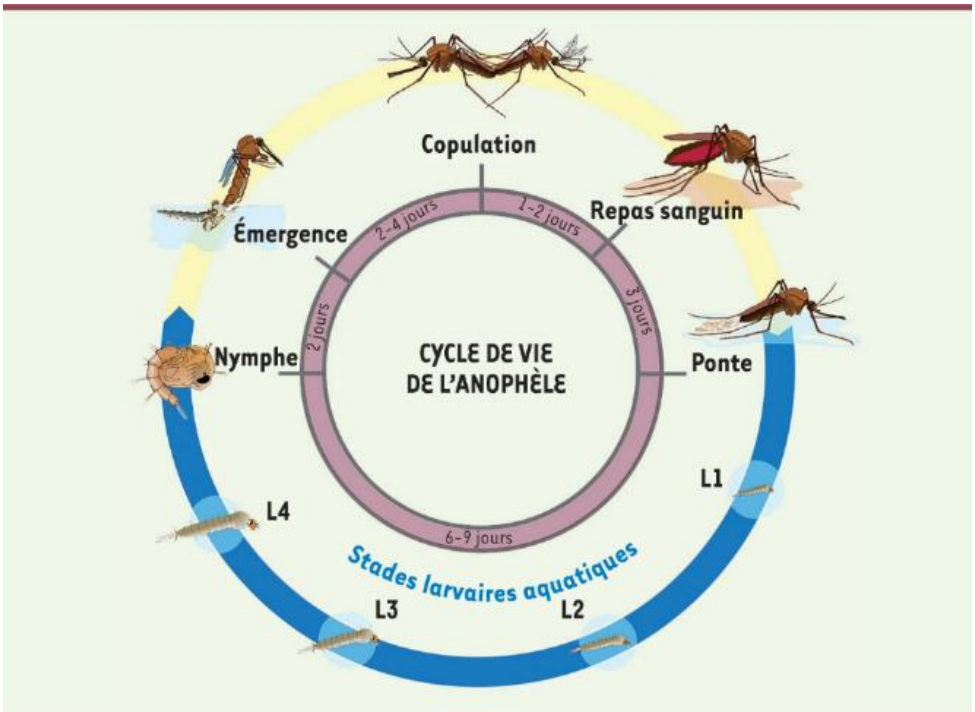


Figure 4: Cycle biologique des anophèles (Bourgouin & Paul, 2021)

1.3 Le parasite

1.3.1 Systématique

Le parasite responsable du paludisme est un protozoaire hématophage appartenant au phylum des Apicomplexa, à la classe des Sporozoaires, au sous-ordre des *Haemosporidae*, à la famille des *Plasmodidae* et au genre *Plasmodium* (Laveran, 1880). Sur les 80 espèces de *Plasmodium* décrites, seules six sont impliquées dans la pathologie humaine (Mouchet et al., 2004; Singh et al., 2004; Ta et al., 2014). Au Cameroun, de nombreuses études parasitologiques menées ont montré que les espèces qui y circulent sont : *P. falciparum* espèce prédominante, secondée par *P. malariae* et *P. ovale. P. vivax* a été plus récemment décrite, à faible prévalence (Moyou, 1977 ; Fondjo, 1996 ; Fru-Cho et al., 2014 ; Mbenda & Das, 2014; Ngassa Mbenda et al., 2016; Russo et al., 2017).

- ***P. falciparum*** (Welch, 1897), est l'espèce la plus redoutable et responsable de 99,7% des cas de morbidité palustre en Afrique subsaharienne (WHO, 2019). Elle se répand dans les zones chaudes intertropicales telles que l'Amérique centrale et du Sud, en Asie tropicale et Afrique subsaharienne. Au Cameroun, elle représente plus de 95% des cas d'infection palustre.
- ***P. vivax*** (Grassi &Feletti, 1890) autrefois responsable de la fièvre bénigne, est maintenant associé à un paludisme compliqué (Bhattacharjee et al., 2013). Une incidence élevée de *P.*

vivax est observée en Asie et en Amérique du Sud. Les populations du groupe sanguin Duffy négatif étant considérées comme protégées contre l'infection par *P. vivax,* on a longtemps pensé que cela expliquait l'absence de *P. vivax* chez les Africains. Cependant, des cas d'infections ont été mis en évidence chez les sujets Duffy-négatifs en Angola (Mendes et al., 2011), au Bénin (Poirier et al., 2016), en Guinée équatoriale (Mendes et al., 2011) , au Mali (Niangaly et al., 2017), au Sénégal (Niang et al., 2015), en Ethiopie (Lo et al., 2015; Gunalan et al., 2016), au Soudan (Abdelraheem et al., 2016), en Ouganda et au Cameroun (Ngassa Mbenda et al., 2016; Russo et al., 2017) etc... L'infection est à un niveau faible et parfois difficile à identifier en absence d'une réaction en chaîne par polymérase (PCR) à *P. vivax* (Gunalan et al., 2018).

- ***P. malariae*** (Laveran, 1881), est une espèce plasmodiale essentiellement présente en Afrique et en Asie et rarement représentée en Amérique. Sa particularité repose sur un rythme de fièvre quarte, avec un cycle érythrocytaire de 72h et surtout par sa capacité à entraîner des recrudescences tardives (WHO, 2016). Au Cameroun, elle représente jusqu'à 17% des cas d'infection palustre (Antonio-Nkondjio et al., 2019).
- ***P. ovale*** **(Stephens, 1922)** est l'agent de la fièvre tierce bénigne comme *P. vivax*. Cette espèce est à l'origine d'un paludisme caractérisé par la reviviscence des accès pouvant survenir plus d'un an après l'infestation, ceci dû à l'existence des hypnozoïtes, formes latentes du parasite au niveau hépatique.

  Deux autres espèces naturellement parasites de singes ont été identifiées chez l'Homme, *P. knowlesi* (Singh et al., 2004) et *P. cynomolgi* (Ta et al., 2014).
- ***P. knowlesi*** **(Singh *et al,* 2004)** est une espèce découverte récemment chez l'Homme et habituellement parasite de singes. Bien que très proche morphologiquement de *P. malariae,* il a aussi une relation phylogénétique avec *P.vivax* (Carlton et al., 2008). *P. knowlesi* présente un cycle érythrocytaire quotidien, les fièvres survenant toutes les 24 h. Les premiers cas de paludisme à *P. knowlesi* ont été décrits en 1965 en Malaisie (Chin et al., 1965).
- ***P. cynomolgi*** est un hématozoaire du singe Macacairus de Malaisie, décrit en 1959 par Garnham (Garnhám, 1959). Deux cas de contamination humaine furent signalés l'année suivante par Eyles (Eyles, 1960) ce qui rappelle la réceptivité de l'homme à cet hématozoaire (Druilhe et al., 1980). Tout récemment un nouveau cas a été découvert en Malaisie (Ta et al., 2014).

1.3.2 Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*

Ce cycle se déroule successivement chez deux hôtes obligatoires (**Figure 5**):

- L'Homme, hôte vertébré intermédiaire chez lequel a lieu la multiplication asexuée du parasite;
- L'anophèle femelle, hôte invertébré définitif chez lequel a lieu la reproduction sexuée du parasite.

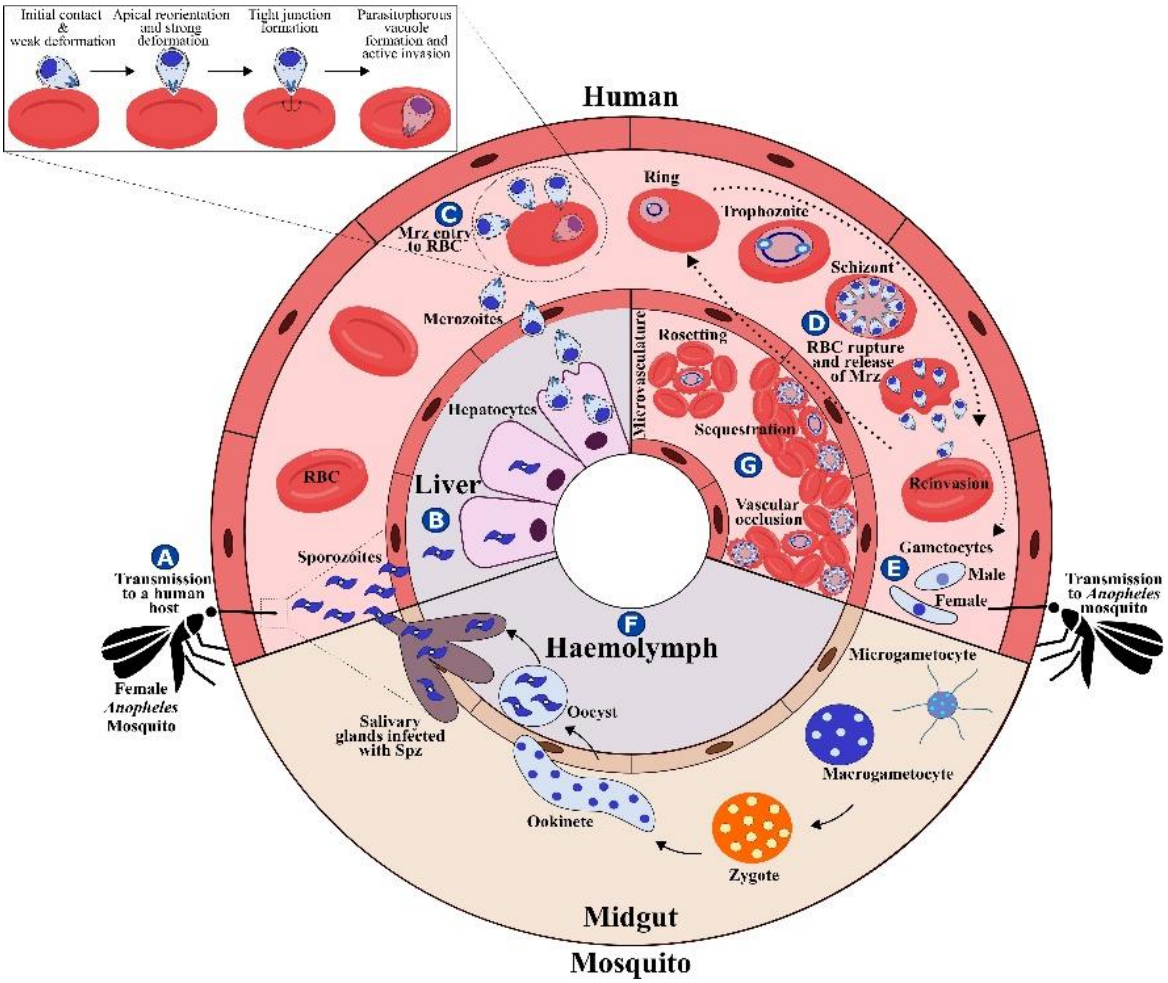


Figure 5: Cycle de développement de *P. falciparum* chez l'Homme et l'anophèle (Molina-Franky et al., 2022)

1.3.2.1 Chez l'Homme

- **Phase exo-érythrocytaire**

A l'occasion d'une piqûre pour son repas de sang, l'anophèle femelle infectée inocule à l'Homme des sporozoïtes qui transitent dans la circulation sanguine pour gagner les hépatocytes **(Figure 5, A).** Dans les hépatocytes, le noyau de chaque sporozoïte subit des divisions multiples et le parasite devient une volumineuse masse cellulaire plurinucléée appelée schizonte. A maturité le schizonte se divise en milliers de mérozoïtes : c'est la schizogonie

hépatique **(Figure 5, B).** Les hépatocytes infectés éclatent et libèrent ces mérozoïtes dans le sang et ceux-ci envahissent les érythrocytes amorçant le stade asexué du cycle **(Figure 5, C).**

❖ **Phase intra-érythrocytaire**

Les mérozoïtes pénètrent dans les érythrocytes et se différencient en trophozoïtes. Les trophozoïtes subissent des divisions asexuées multiples aboutissant à la formation de schizontes intra-érythrocytaires ou corps en rosace : c'est la schizogonie érythrocytaire. A maturité, les érythrocytes infectés sont lysés par le parasite et libèrent une nouvelle génération de mérozoïtes (8 à 32) **(Figure 5, D)**. La durée d'un cycle de schizogonie érythrocytaire chez *P. falciparum* est de 48 heures. La répétition de ce cycle érythrocytaire induit progressivement une augmentation de la charge parasitaire. Certains de ces parasites asexués peuvent se différencier en stades érythrocytaires sexués ou gamétocytes mâles et femelles, seuls responsables de la transmission aux moustiques **(Figure 5, E)**.

1.3.2.2 Chez l'anophèle femelle

La reproduction sexuée ou sporogonie débute à la suite de l'ingestion des gamétocytes mâles et femelles lors de la prise du repas de sang par la femelle anophèle **(Figure 5, E)**. L'anophèle femelle peut ingérer aussi bien les stades asexués que sexués, mais seuls les stades sexués pourront poursuivre le cycle de développement dans l'estomac du moustique. Les gamétocytes mâles subissent une succession de 3 divisions mitotiques (exflagellation) qui s'achèvent par la production de 8 gamètes mâles flagellés ou microgamètes. Les gamétocytes femelles évoluent en un macrogamète. La fécondation entre un microgamète mâle et un macrogamète femelle s'ensuit et le zygote formé est transformé en oocinète mobile et allongé 24h à 48h après la prise du repas de sang. Lorsque l'oocinète traverse la membrane péritrophique et l'épithélium intestinal du moustique, il parvient à la face basale de l'intestin moyen où il se transforme en oocyste. Après maturation, l'oocyste éclate et libère des sporozoïtes dans l'hémocoele. Les sporozoïtes migrent jusqu'aux glandes salivaires du moustique et les envahissent, ils sont prêts à démarrer un nouveau cycle au prochain repas sanguin **(Figure 5, F)**. La durée du cycle sporogonique varie en fonction de l'espèce *plasmodiale* et de la température. A 25°C il dure de 9 à 21 jours, le cycle de *P. falciparum* est de 13 jours et de 10 jours chez *P. vivax.* La durée d'un cycle se prolonge au fur et à mesure que la température diminue. A 20°C, le cycle de *P. falciparum* dure 30 jours et il n'est plus réalisé au-dessous de 19°C et 16°C pour *P. vivax* (Mouchet et al., 2004; Organisation mondiale de la Santé, 2015)

1.4 Lutte contre le paludisme

Le paludisme, bien qu'elle soit une maladie mortelle, peut être prévenue, traitée et contrôlée.

1.4.1 Traitement

L'objectif premier du traitement contre la malaria est de garantir l'élimination rapide et complète des plasmodies dans le sang du patient pour éviter qu'un paludisme non compliqué n'évolue vers une forme grave potentiellement mortelle ou vers une infection chronique provoquant une anémie. Du point de vue de la santé publique, le traitement est destiné à réduire la transmission de l'infection en diminuant le réservoir infectieux, et à éviter l'apparition et la propagation d'une résistance aux antipaludiques (WHO, 2016). L'OMS recommande depuis 2004 des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACTs), dont les plus recommandées contre les infections à *P. falciparum* en Afrique sont à base d'arthémether-luméfantrine (AL), d'artésunate-amodiaquine (AS-AQ) et de dihydroartémisinine-pipéraquine (DHA-PPQ) (WHO, 2021). Au Cameroun, les ACTs sont couramment utilisés dans les formations sanitaires avec comme traitement de première intention de l'ASAQ et en deuxième ligne l'AL (PNLP, 2020). Cependant, en cas d'échec thérapeutique ou pour la prise en charge du paludisme grave, l'artésunate ou la quinine sont recommandées par voie intraveineuse (PNLP, 2020).

1.4.2 Prévention

La prévention du paludisme chez les personnes vivant dans des zones endémiques repose sur la chimioprophylaxie et la lutte anti-vectorielle. Suite à la résistance accrue du parasite aux antipaludiques et du vecteur aux insecticides entravant le contrôle du paludisme, de nouveaux outils sont développés notamment. Le vaccin RTS, S vient tout juste d'obtenir l'approbation de l'OMS pour son déploiement et d'autres stratégies visant à bloquer la transmission sont en développement.

1.4.2.1 La chimioprophylaxie

Elle est réservée essentiellement aux groupes de population à risque, notamment les immigrants en zone d'endémie, les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. Au Cameroun, une chimio-prévention saisonnière (CPS) dans le Nord du pays est recommandée chez les enfants de moins de 5 ans (MINSANTE & OMS, 2019; Antonio-Nkondjio et al., 2019b; PNLP, 2020) et la sulfadoxine-pyriméthamine est recommandée comme traitement préventif intermittent (TPI) chez la femme enceinte.

1.4.2.2 La lutte anti-vectorielle

La lutte anti-vectorielle permet de prévenir et de réduire la transmission du paludisme. Si la couverture par les interventions de lutte anti-vectorielle est suffisamment élevée dans une région donnée, l'ensemble de la communauté sera protégé. Pour les régions d'Afrique subsaharienne, l'OMS préconise les méthodes de lutte anti-vectorielle physico-chimiques efficaces pour la prévention en masse des populations notamment l'utilisation des MILDA et la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations et en extra-domiciliaire pour la destruction des gîtes larvaires (WHO, 2016; PNLP, 2020; WHO, 2021). Cependant, il existe aussi d'autres méthodes complémentaires de lutte individuelle ou collective telles que: 1) l'aménagement de l'environnement par assèchement des marais, élimination des gîtes larvaires et drainage des eaux ; 2) la lutte biologique avec l'utilisation des prédateurs de larves d'anophèles dans les gîtes permanents comme le genre *Gambusia* (poisson larvivore), l'ensemencement artificiel des gîtes par les bactéries (*Bacillus thuringensis*), les champignons (*Aspergillus*) ou les protozoaires du genre *Nosema* (Hougard et al., 1983; PNLP, 2020); et 3) la lutte génétique qui repose sur la technique de l'insecte stérile , méthode consistant en des lâchers de mâles stériles dans l'environnement afin qu'ils s'accouplent avec les femelles naturelles qui ainsi ne donneront pas de descendance (Bouyer & Lefrançois, 2014).

1.4.2.3 Le vaccin RTS, S

Les recherches pour la mise au point d'un vaccin antipaludique efficace sont longues et difficiles. Tout récemment, en octobre 2021, un vaccin contre le paludisme à *P. falciparum* a été autorisé par l'OMS, il est recommandé chez les enfants vivant dans les régions à forte transmission, en complément des mesures de prévention: c'est le vaccin antipaludique RTS, S/AS01ou Mosquirix (WHO, 2021). Ce vaccin est développé depuis les années 1980, il vise la phase hépatique du cycle du parasite en empêchant la pénétration ou le développement des sporozoïtes dans les hépatocytes avant la phase sanguine (Foquet et al., 2014). Le vaccin induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire contre la protéine circumsporozoïte présente à la surface des sporozoïtes (The RTS,S Clinical Trials Partnership (2014), 2014). Cependant, bien que ce vaccin réduise de manière significative le paludisme grave, le niveau d'immunité protectrice et la durée de protection restent encore à améliorer puisqu'il faut administrer jusqu'à quatre doses pour réduire la charge de la maladie. Des recherches pour le développement de vaccins nouvelles générations, utilisant de l'ARN messager (ARNm), sont en cours et pourraient permettre plus rapidement d'obtenir un vaccin plus efficace.

1.4.2.4 Stratégies basées sur le blocage de la transmission

L'idée d'un vaccin qui permettrait de bloquer la transmission de l'Homme au moustique a émergé il y a une 50e d'années, lorsqu'il a été montré que le développement sporogonique était bloqué en présence d'anticorps anti-gamètes (Huff et al., 1958; Carter & Chen, 1976). Ces vaccins consisteraient à bloquer la chaîne de transmission homme-moustique, en induisant des anticorps qui iraient empêcher la maturation des stades sexués du parasite chez le moustique. Ces vaccins aideraient donc à réduire la transmission du paludisme en zone d'endémie mais n'empêcheraient pas la maladie. Ces vaccins altruistes peuvent cibler soit des antigènes des stades sexués, soit des antigènes du moustique. Plusieurs candidats ont déjà été étudiés : les vaccins dirigés contre des antigènes parasitaires tels Pfs48/45 et Pfs230 qui sont exprimés à la surface des gamètes, Pfs25 et Pfs28 qui sont exprimés à la surface des zygotes et des ookinètes, ou encore les vaccins «anti-moustique» ciblant des protéines exprimées à la surface de l'épithélium intestinal du moustique telles que le carboxypeptidase B (CPBAg1) et l'aminopeptidase (AnAPN1) (Bonnet et al., 2002; Bousema et al., 2007; Dinglasan et al., 2007; Lavazec et al., 2007; Wu et al., 2008; Miura et al., 2013; Armistead et al., 2014; Atkinson et al., 2015). Plus récemment, deux nouveaux candidats ont encore été décrits, les antigènes Pf77 et Pf MDV-1 exprimés respectivement chez les stades sexués femelles et mâles (Tripathi et al., 2021). Ils permettent d'induire des anticorps capables de réduire la charge oocystique chez les anophèles. Entre les 2 types de vaccins bloquant la transmission, l'avantage de vaccins utilisant des anticorps dirigés contre un antigène de moustique, est dû au fait que les protéines recombinantes seraient plus facile à produire dans ce cas, que les anticorps seraient efficaces sur différentes souches de parasites, et qu'ils pourraient aussi affecter la survie et la fécondité des moustiques (Lavazec & Bourgouin, 2008).

Au-delà des vaccins, des molécules pouvant bloquer la transmission sont en cours d'essais cliniques. C'est le cas de l'ivermectine, utilisée depuis longtemps contre l'onchocercose. L'ivermectine distribuée en traitement de masse permettrait d'interrompre la transmission en réduisant la longévité des moustiques, les femelles âgées n'atteignant plus le stade infectieux (Chaccour et al., 2010; Ouédraogo et al., 2015; Slater et al., 2020).

1.5 Variabilité génétique et immunité protectrice contre le paludisme

Chez l'Homme, le succès de l'infection à *Plasmodium* dépend de l'espèce parasitaire , de ses caractéristiques phénotypiques et génotypiques, ainsi que de la susceptibilité génétique et du statut immunitaire de l'hôte (Diakite, 2015). Il a été très tôt constaté que les sujets porteurs

d'hémoglobinopathies étaient protégés contre le paludisme (Beet 1949), ce qui a fait de la drépanocytose le plus bel exemple de sélection positive chez l'Homme.

1.5.1 Variabilité génétique et protection contre le paludisme

Le paludisme a exercé une forte pression de sélection sur le génome humain depuis des siècles et des variants génétiques associés à une résistance au paludisme ont été sélectionnés (Haldane, 1949; Kwiatkowski, 2005). Différents polymorphismes génétiques ont été associés avec une protection naturelle contre le paludisme. Parmi ces polymorphismes, nous pouvons citer: le déficit en Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase (G6PD) qui assure une protection contre le paludisme simple (Luzzatto, 1979; Allison & Clyde, 1961) ; les polymorphismes non érythrocytaires dont le groupe HLA (antigène leucocytaire humain)(Hill et al., 1991) (quoique des études récentes ont identifié deux allèles HLA de classe I qui pourraient favoriser l'infection à *P. falciparum* (Digitale et al., 2021)) ; le groupe sanguin Duffy négatif (Miller et al., 1976) qui confère une protection contre *P. vivax*; les thalassémies (Allen et al., 1997; Haldane, 1949) et les hémoglobinopathies S, C, E (HbS, HbC, HbE) (Allison, 1954; Beet, 1949; Pauling & Itano, 1949). Seule l'hémoglobines S sera considérée ici et plus précisément le trait drépanocytaire.

1.5.1.1 Trait drépanocytaire et protection contre le paludisme

La drépanocytose est une maladie autosomale récessive due à une mutation ponctuelle sur le 6e codon du gène Bêta (β) globine situé sur le chromosome 11, qui provoque le remplacement de l'acide glutamique par une valine (G**A**G=>G**T**G). Le gène muté code alors pour une protéine anormale, l'hémoglobine S (HbS). La mutation altère la polymérisation des chaînes de l'hémoglobine, les hématies prennent une forme en faucille, elle entraîne la rigidification et la déformation du globule rouge en condition d'hypoxie et provoque une irrégularité du flux sanguin et une anémie sévère (Rihet, 2012). A l'état homozygote, HbSS, les sujets souffrent de la drépanocytose. La maladie entraîne un retard du développement chez l'enfant, des crises vaso-occlusives, une prédisposition aux infections bactériennes et une anémie hémolytique. L'espérance de vie est fortement diminuée, même si la prise en charge s'est fortement améliorée, elle ne dépasse pas 40 ans. Il est estimé que 300 000 enfants naissent chaque année avec la drépanocytose et la majorité se situe en Afrique (Piel et al., 2017). Le « trait drépanocytaire » est l'état hétérozygote, HbAS. Il est particulièrement répandu dans les populations noires, avec des prévalences allant de 8-9% en Amérique du Nord jusqu'à 20-30 % en Afrique Centrale (World SCD 2021, 2021). Concernant le Cameroun, une étude menée

au CPC en 2015 a démontré que la prévalence de la drépanocytose est de 2% et la prévalence varie entre 25-30% pour le trait drépanocytaire dans la population de Yaoundé (Fankam, 2015).

La compréhension du lien entre la drépanocytose et le paludisme date de 1949 (Beet, 1949); Beet en Rhodésie (actuel Zimbabwe), a constaté une survie préférentielle des individus hétérozygotes (AS) qui de surcroît avaient un fort niveau de protection contre les formes sévères du paludisme, alors que la majorité des individus drépanocytaires (SS) décédaient de manière précoce. Haldane, la même année, émit l'hypothèse que la drépanocytose résulterait de la pression de sélection induite par le paludisme (Haldane, 1949). Le maintien du gène muté à forte fréquence dans la population serait lié à l'avantage de l'état hétérozygote en zone de paludisme, les hétérozygotes HbAS sont asymptomatiques et protégés contre les formes graves alors que les homozygotes HbSS restent très vulnérables aux accès palustres et ont un taux de mortalité élevé. Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la protection du trait drépanocytaire contre le paludisme ont alors été recherchés et plusieurs mécanismes ont été proposés à savoir: le portage du génotype HbAS entraînerait une phagocytose précoce des globules rouges (GR) infectés par *P. falciparum*, une réduction de la cytoadhérence des GR parasités en raison du remodelage du cytosquelette et une tolérance à l'infection due à une sur-expression de l'hème-oxygénase (Archer et al., 2018; Cholera et al., 2008; Ferreira et al., 2011; Pamplona et al., 2007; Roth et al., 1978; Luzzatto et al., 1970). Plus récemment, Saelens et collaborateurs ont comparé les changements transcriptionnels qui se produisent chez *P.falciparum* entre des hématies de génotype HbAS et HbAA, et ils rapportent que *P. falciparum* s'adapterait à l'HbAS en modifiant sa protéine chaperone la cyclophiline 19B (cyp19B), ses réponses au stress oxydatif et son mécanisme d'exportation de protéines (Saelens et al., 2021). Par ailleurs, les mécanismes de protection sont complexes et peuvent varier selon le contexte épidémiologique et le génotype du parasite (Gong et al., 2013; Hill et al., 1991; Mpimbaza et al., 2018; Band et al., 2022). En effet, une récente étude a montré que la protection conférée par HbS contre le paludisme grave chez les enfants est associée à des polymorphismes au niveau de 3 loci du génome de *P. falciparum* et que le niveau de protection varie selon la combinaison des variants génétiques à ces loci (Band et al., 2022).

1.5.1.2 Mécanismes protecteurs du trait drépanocytaire contre le paludisme

L'effet protecteur du trait drépanocytaire sur les formes graves de paludisme est largement documenté, mais quelques études ont aussi révélé une protection contre les formes non compliquées de paludisme (Aidoo et al., 2002; Kreuels et al., 2010; Lell et al., 1999; Williams et al., 2005). Des études de suivi de cohortes ont également montré que, chez des

individus asymptomatiques, le portage du trait drépanocytaire allonge la période d'apparition des premiers symptômes de paludisme ainsi que la ré-apparition de la parasitémie après traitement (Crompton et al., 2008; Gong et al., 2012; Lell et al., 2018; Migot-Nabias et al., 2006).

On pense que le trait drépanocytaire influe sur la virulence du parasite et quelques mécanismes ont été évoqués. Le trait drépanocytaire entraîne un developpement intraérythrocytaire altéré, une cytoadhérence réduite et/ou une modulation des réponses immunitaires de l'hôte. Quelques études ont aussi évoqué un taux de multiplication réduit de *P. falciparum* dans les érythrocytes HbAS (Friedman, 1978; Glushakova et al, 2014; Pasvol et al; 1978). Le parasite génère un réseau d'actine à l'intérieur du cytoplasme érythrocytaire lors de son cycle intra-érythrocytaire. Ce réseau est d'une importance capitale pour l'exportation des protéines parasitaires. Cependant des études montrent qu'au sein des globules rouges HbAS, le remodelage aberrant de l'actine de l'hôte par le parasite affecte les protéines parasitaires qui migrent vers la surface des érythrocytes (Cyrklaff et al, 2011; Kilian et al, 2015). L'expression accrue de certains microARN (miR-451 et miR-23) de l'hôte enrichis dans un globule rouge d'HbSS et AS peuvent transloquer dans le parasite pour inhiber la traduction des ARNm affectant ainsi la croissance du parasite (Lamonte et al, 2012). Des études antérieures ont montré que l'HbS contrôle la réponse inflammatoire associée au paludisme cérébral en contrôlant le taux d'hème libre lors de l'infection à *P. falciparum*. Les érythrocytes contenant de l'HbS libèrent plus d'hème dans le plasma que les érythrocytes HbAA, ce qui stimule la synthèse d'hème oxygénase 1 (HO-1) par les cellules hématopoïétiques. En effet, l'hème oxygénase 1 catalyse la dégradation de l'hème favorisant ainsi la production d'un gaz transmetteur, le monoxyde de carbone, qui à son tour joue un rôle dans la modulation des réactions inflammatoires induites par le paludisme cérébral et dans d'autres organes vitaux (Ferreira et al, 2011). L'HbS génère aussi un stress oxydatif se matérialisant par une déstructuration des fentes de Maurer (aspect amorphe et mouvement aberrants), une altération de la présentation de PfEMP1 et une dimunition de la cytoadhérence des hématies parasitées entraînant un développement anormal de *P. falciparum* dans un érythrocyte HbAS (Cyrklaff et al, 2016). L'HbS offre une résistance à *P. falciparum* en modifiant les propriétés de surface cellulaire des GR infectés entraînant ainsi une abérration du ligand de cytoadherence PfEMP1, une diminution de la cytoadhérence aux cellules endothéliales, une altération des formes rosettes, et une réduction de l'hémagglutination (Cholera et al, 2008; Taylor et al, 2012). Pour finir, une étude a montré que la réponse transcriptionnelle de l'infection à *P. falciparum* dans les GR HbAS, peut mettre en évidence les

multiples voies par lesquelles cette protection est conférée par le génotype AS (Saelens et al, 2021).

1.5.1.3 Trait drépanocytaire et co-portage avec d'autres facteurs génétiques d'hôte contre le paludisme

Comme nous l'avons montré plus haut, en dehors de l'HbS d'autres variations génétiques confèrent une protection contre les formes graves du paludisme: cas du déficit en G6PD et de la thalassémie. En effet les globules rouges déficients en G6PD présentent un stress oxydatif défavorable au developpement du parasite (Tishkoff et al., 2001) . La G6PD est une enzyme qui catalyse la première étape de la voie des pentoses phosphates et permet ainsi la production du glutathion réduit (2GSH). Ce glutathion réduit est utilisé par la cellule pour lutter contre un stress oxydatif (Mura et al, 2009). Lors d'un stress oxydatif, il y a une production abondante de peroxyde d'hydrogène (H2O2) qui est toxique pour la cellule. Le glutathion réduit permet donc de détoxifier le H2O2 en le réduisant en 2 molécules d'H2O. Le déficit en G6PD quant à lui est une affection liée au chromosome X associée aux dommages des globules rouges en réponse à une infection ou à l'exposition à certains médicaments ou produits chimiques (Beutler et al, 1991; Cappellini et al, 2008). Une étude menée au Mali a montré que le trait drépanocytaire couplé à un déficit en G6PD (A-) n'offrait pas une protection accrue chez les enfants atteints d'un paludisme grave (Guindo et al., 2011). De même l'étude de Balgir en 2012, a montré que lorsque la fréquence de l'allèle HbS diminuait dans une sous-région de l'Inde, celle de l'allèle de déficience en G6PD augmentait également et vice versa (Balgir, 2012). Cet aspect pourrait relayer une information capitale et un excellent point de départ pour les analyses moléculaires afin de déterminer les signatures de sélection lorsque les deux mutations se produisent dans une même région.

En ce qui concerne les mutations de l'hémoglobine alpha et la bêta-thalassémie, la protection contre le paludisme réside dans une meilleure clairance immunitaire, une diminution de la survie du parasite dans un globule rouge et de sa capacité à envahir les globules rouges. Une étude menée en Papouasie-Nouvelle Guinée chez les enfants atteints d'alpha-thalassémie a montré que ces derniers disposaient d'un avantage contre l'infection palustre (Fowkes et al, 2008). Cependant, une étude a montré que le co-portage du trait dépanocytaire et de l'alpha-thalassémie contrebalançait l'effet protecteur contre le paludisme. En effet, ils ont trouvé que les globules rouges parasités provenant des sujets portant les deux mutations présentaient le même niveau de cytoadhésion, de formation de rosettes et d'expression de PfEMP1 que les globules rouges normaux parasités (Opi et al, 2014). Ce résultat peut s'expliquer par des

variations spécifiques des propriétés d'adhésion des globules parasités par *P. falciparum* qui contribuent à la séquestration et la pathogénèse de la maladie.

1.5.2 Immunité acquise protectrice contre le paludisme

L'immunité acquise contre le paludisme se met en place après une exposition répétée avec le parasite durant plusieurs années et elle a été qualifiée de « prémunition » par les frères Sergent (Sergent & Sergent, 1952; Schofield & Mueller, 2006; Stanisic et al., 2015). Ainsi, les sujets résidents en zone de transmission faible vont développer une immunité plus lentement que ceux vivant en zone de transmission intense ou pérenne. Cette immunité acquise permet aux individus d'avoir un meilleur contrôle de la densité parasitaire, et de la maintenir en dessous du seuil de pathogénicité (Langhorne et al., 2008; Beavogui, 2010). Les composants clés de l'immunité contre le paludisme reposent sur les anticorps. Ces anticorps ciblent deux classes d'antigènes exprimés au cours du cycle de développement intra-érythrocytaire: les antigènes de surface variants (VSA) présents à la surface de la membrane plasmique des érythrocytes infectés et les antigènes sécrétés par les mérozoïtes lors de l'invasion des globules rouges. Les anticorps dirigés contre les antigènes variants de surface (PfEMP1) favorisent la clairance des globules rouges parasités par la rate. Les anticorps dirigés contre les antigènes localisés à la surface des mérozoïtes, tels que MSP1, MSP2, MSP3, GLURP et AMA1, quant à eux vont empêcher l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes ou encore leur multiplication, à travers plusieurs mécanismes effecteurs tels que la neutralisation, la phagocytose et enfin l'activation du complément (Gonzales et al., 2020; Adamou et al., 2019). La protection des plus jeunes enfants résulte de la réponse anticorps dirigée contre les variants de PfEMP1 qui se développe tôt au cours de la vie humaine. Chez les enfants plus âgés, elle s'obtient une fois que les anticorps dirigés contre les antigènes mérozoïtes atteignent des niveaux suffisamment élevés (Gonzales et al., 2020).

1.6 Rôle du réservoir asymptomatique dans la transmission

Le paludisme asymptomatique est défini comme le portage « sain » du parasite en l'absence de symptômes (Lindblade et al., 2013; Chaumeau, 2017; Imwong et al., 2015; Mensah et al., 2021). Même s'il n'y a pas de définition « standard » pour le paludisme asymptomatique, il se caractérise par l'absence d'hyperthermie dans les 48h précedant le dépistage (température < 38°C), l'absence de prise de médicaments anti-malariques dans les deux semaines précédant le prélèvement et enfin par la présence des formes asexuées et/ou sexuées dans le sang d'un individu (Mosnier et al., 2017). Il survient à la suite d'une exposition continue aux infections paludéennes, entraînant par la suite l'acquisition d'une immunité

partielle contre les formes graves du paludisme (Bousema et al., 2004). L'infection asymptomatique peut persister chez un individu pendant de longues périodes aussi bien dans les zones à faible et forte transmission (Laishram et al., 2012; Ashley et al., 2014; Bousema et al., 2014 ; Chen et al., 2016; Fogang et al., 2021). En zone d'endémie, le taux de prévalence des infections asymptomatiques est généralement élevé, il peut dépasser 80% (Fogang et al., 2021). Des études ont montré que l'infection asymptomatique est plus fréquente chez les enfants de moins de 5 ans et les enfants d'âge scolaire (5 à 15 ans) (Noor et al., 2014; Walldorf et al., 2015; Akindeh et al., 2021; Mensah et al., 2021).

La survenue de fièvre palustre est multi-factorielle mais elle est souvent associée à la parasitémie et aux seuils pyrogéniques, établis parfois à partir des données parasitologiques et cliniques (Rogier et al., 1996; Miller, 1958). En zone de forte endémicité, le seuil pyrogénique est estimé à 10 000 parasites/µl (Chaumeau, 2017). En zone de faible endémicité, l'infection asymptomatique est le plus souvent submicroscopique car les parasites circulants sont en dessous du seuil de détection microscopique (50 parasites/µl de sang) et le diagnostic s'effectue alors par une PCR ultrasensible (Imwong et al., 2015; Imwong et al., 2016). Les individus asymptomatiques infectés par *P. falciparum* et résidant en zone endémique présentent une plus forte prévalence en gamétocytes et une gamétocytémie plus élevée que les patients symptomatiques (Gouagna et al., 2004; Zhou et al., 2016; Lennon et al., 2016; Rovira-Vallbona et al., 2017; Sumari et al., 2017; Tadesse et al., 2018; Oduma et al., 2021). Aussi, des essais de gorgement de moustiques ont montré que les sujets asymptomatiques sont plus infectieux pour les moustiques, et que les anophèles gorgées sur du sang de porteurs asymptomatiques présentent des niveaux d'infection élevés, aussi bien en terme de prévalence que de charges oocystiques (Gouagna et al., 2004; Barry et al., 2021). L'infectivité des porteurs asymptomatiques de *P. falciparum* dépend de facteurs immuns de l'hôte et du moustique, de la charge en gamétocytes, mais aussi de la complexité de l'infection et des génotypes de parasites (Barry et al., 2021; Bradley et al., 2018; Dantzler et al., 2019; Mitri et al., 2009; Morlais et al., 2015; Nsango et al., 2012; Stone et al., 2018).

Les infections asymptomatiques constituent donc un réservoir important de parasites et elles ont un rôle crucial dans la transmission (Slater et al., 2019; Lindblade et al., 2013; Chen et al., 2016). Malheureusement, le plus souvent, ces infections chroniques ne sont ni détectées, ni traitées. Dans les zones de paludisme saisonnier où des programmes de chimio-prévention sont mis en place pour les enfants de moins de 5 ans, ces mesures devraient permettre de réduire, en partie, le réservoir de gamétocytes et ainsi abaisser la transmission. L'administration de

masse de médicaments comme mesure de prévention n'est pas recommandée par l'OMS dans les zones de forte transmission, la mesure n'ayant pas montré son efficacité (Chaumeau et al., 2019; WHO, 2021) .

1.7 Biologie de l'invasion et préférence de la cellule hôte

Au cours de la phase exo-érythrocytaire, chaque sporozoïte se développe en dizaines de milliers de formes de mérozoïtes avant d'être libérés dans la circulation sanguine pour envahir les globules rouges grâce à des interactions spécifiques entre les ligands du parasite *Plasmodium* et les récepteurs des globules rouges (Weiss et al., 2016). Cette partie s'intéresse à la compréhension de la phase intra-érythrocytaire de l'infection à *P. falciparum*.

1.7.1 Les mérozoïtes du *P. falciparum* envahissent les globules rouges

1.7.1.1 Globule rouge non infecté

Les globules rouges dérivent des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Après plusieurs étapes de maturation, dirigées majoritairement par l'hormone érythropoïétine (Epo), les globules rouges s'énucléent et pénètrent dans le système circulatoire. Dans la circulation sanguine, les globules rouges riches en hémoglobine, sont essentiels à l'apport d'oxygène jusqu'aux organes et ils doivent être capables de circuler dans les vaisseaux sanguins étroits sans être détruits (Peter Klinken, 2002; Depond et al., 2020). Dans le but de maintenir son intégrité structurelle et de s'adapter aux capillaires étroits de microvascularisation, le globule rouge a besoin de changer de forme sous contrainte mécanique. Cette déformation mécanique serait due à une association entre la membrane plasmique et le squelette protéique qui procure aux érythrocytes une flexibilité, une élasticité et une viscosité membranaire. La capacité de déformation dépend de la concentration ou de l'état des ions intracellulaires et de l'hémoglobine, et enfin du rapport surface cellulaire/volume (Mohandas & An, 2012; Lavazec, 2017; Molina-Franky et al., 2022). Au cours d'une infection palustre, l'équilibre entre ces différents paramètres est perturbé notamment par l'invasion et le développement de *P. falciparum* (Lavazec, 2017).

1.7.1.1.1 Composition de la membrane du globule rouge

La membrane du globule rouge est constituée d'une membrane plasmique où s'intercalent des protéines dans une bicouche lipidique qui est constituée de cholestérols et de phospholipides lesquels confèrent à la membrane la capacité (fluidité et élasticité dynamique) de survivre pendant 120 jours dans la circulation (Diez-Silva et al., 2010; Stevens-Hernandez & Bruce, 2022). Plusieurs protéines membranaires sont présentes dans le globule rouge dont

environ 20 sont majoritairement exprimées et 850 faiblement exprimées (Pesciotta et al., 2012). L'analyse protéomique de la surface du globule rouge a révélé qu'environ 75% de protéines sont constituées de l'échangeur d'anion 1 (bande 3), du transporteur de glucose 1 (GLUT1), et de la glycophorine A et C (Ravenhill et al., 2019). La plupart d'entre elles portent les antigènes des différents groupes sanguins (XK, Kell, Duffy) et se regroupent selon les différentes fonctions qu'elles occupent (transporteur, molécule d'adhésion et de récepteurs de signalisation pour les interactions extracellulaires) (Mohandas & Gallagher, 2008). L'association entre ces protéines peut aussi s'effectuer par deux complexes macromoléculaires qui maintiennent l'intégrité de la structure de la membrane en ancrant la bicouche lipidique au cytosquelette membranaire (**Figure 6**). Le complexe ankyrine résulte de l'association de l'ankyrine d'une part avec la bande tétramérique 3, la glycoprotéine associée au Rh (RhAG), les glycophorines A et B, le transporteur de glucose 1 (GLUT1), et d'autre part avec la spectrine qui sera stabilisée via la protéine 4.2 (Lux, 2016; Stevens-Hernandez & Bruce, 2022). Le complexe jonctionnel de protéine quant à lui, se lie à la glycophorine C (GPC), à la protéine membranaire palmitoylée (p55), aux groupes sanguins Duffy, XK et Kell via la protéine 4.1 (Salomao et al., 2008; Lux, 2016; Stevens-Hernandez & Bruce, 2022). Tout récemment, il a été démontré que la GPA, la bande 3 associée à l'adducine, le GLUT 1 associé à la stomatine et la dématine et de nombreuses protéines liées à l'actine peuvent aussi se trouver dans le complexe jonctionnel (Lux, 2016; Stevens-Hernandez & Bruce, 2022). Suite à des perturbations, le globule rouge peut se déformer, mais pour qu'il puisse conserver son élasticité, la spectrine doit avoir la capacité à se dissocier et se réassocier. La capacité de la membrane à retrouver sa forme biconcave après déformation repose sur les interactions latérales du cytosquelette. Le squelette membranaire est formé d'un réseau d'alpha-spectrine et bêta-spectrine qui par un complexe jonctionnel constitué d'actine, de protéine 4.1R, de tropomyosine, de dématine, d'adducine et de tropomoduline peuvent se relier entre eux (Mohandas & Gallagher, 2008).

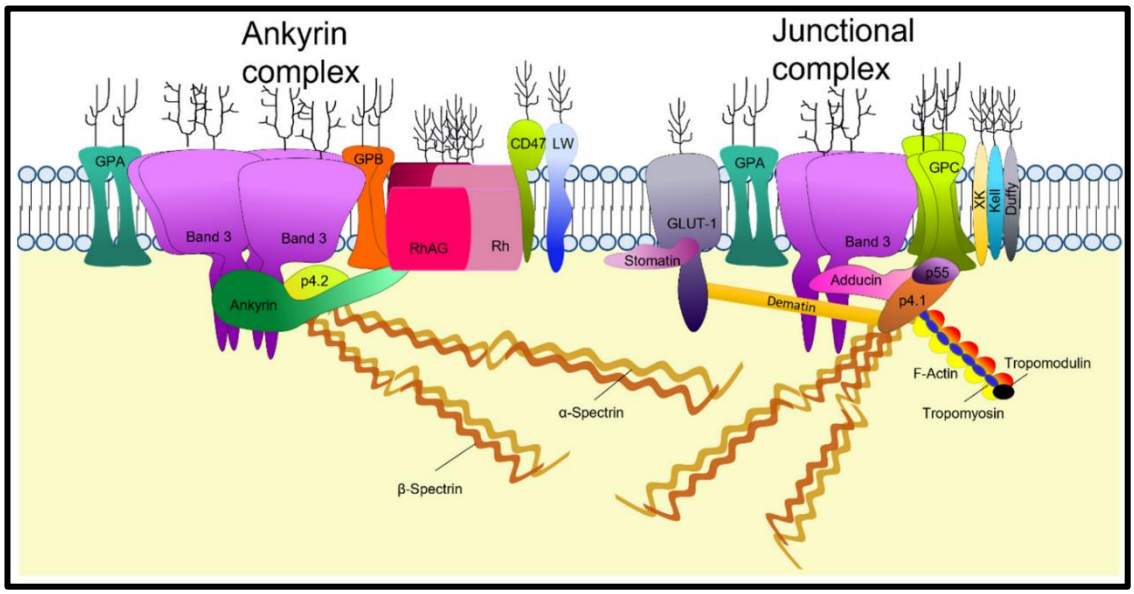


Figure 6: Schéma descriptif de la membrane du globule rouge (Stevens-Hernandez & Bruce, 2022). **Ankyrine** : relie la β-spectrine et le squelette membranaire à la bande 3 et à la protéine 4.2 ; **Bande 3 (SLC4A1) :** Canal d'échange d'anions (notamment le bicarbonate (HCO_3 - et l'ion chlorure (Cl-)), aide à la formation des complexes membranaires (GPA, GPB, Rh, Glut1) **; RhAG :** Glycophorine associée au Rh permet la liaison de CD47, LW et GPB au complexe de la bande 3 liée à l'ankyrine. ; **CD 47** : Cluster of differenciation 47 empêche la phagocytose et se lie à la protéine 4.2 et au complexe trimère Rh (RhAG/RhD/RhCE) au sein du complexe de la bande 3 liée à l'ankyrine; **GPA et GPB:** Glycophorine A et Glycophorine B se lie à la bande 3 liée à l'ankyrine, et facilite le transfert de la bande 3 vers la membrane ; **GPC :** Glycophorine C, permet la liaison du complexe jonctionnel d'actine à la membrane via des interactions avec la protéine 4.1R, p55 et la bande 3; **p4.1 :** Protéine érythrocytaire 4.1 renforce l'interaction spectrine-actine **; p4.2 :** Protéine érythrocytaire 4.2 permet la liaison de CD47 et la bande 3 dans le complexe ankyrine **; Groupe sanguin (XK :** Système XK réside dans le complexe de la bande 3 liée à l'actine **; Kell :** Système Kell réside dans le complexe de la bande 3 liée à l'actine; **Duffy :** système Duffy recepteur de chimiokine et de P.vivax ; **GLUT-1 :** Transporteur de glucose-1, permet la liaison de l'actine à la membrane via des interactions avec la dématine, l'adducine et la bande 3 ; **LW :** Glycophorine LW, réside dans le complexe de la bande 3 liée à l'ankyrine et interagit avec le trimère RhAG/RhD/RhCE; **Tropomyosine :** régule la longueur des filaments d'actine**; Tropomoduline :** favorisent le coiffage des filaments d'actine et la tropomyosine ; **Dématine :** aide à fixer l'actine à la membrane via Glut1, facilite la liaison spectrine-actine et enfin permet de regrouper les filaments d'actine ; **Actine :** permet la jonction moléculaire dans le squelette membranaire et se lie à la spectrine via la protéine 4.1R; **p55 :** protéine membranaire palmitoyle permet la liaison du complexe jonctionnel d'actine à la membrane via la protéine 4.1R et les glycophorines GPC et D ; **α-Spectrine and β-Spectrine :** sont des réticules de filaments d'actine **(Lux, 2016) .**

1.7.1.2. Formation d'un réticulocyte

Les réticulocytes sont des globules rouges immatures qui prennent naissance dans la moelle osseuse après l'énucléation et sont libérés dans la circulation sanguine où ils se transformeront en érythrocytes matures sur une période d'un à deux jours (Rai et al., 2022). Ils subissent plusieurs modifications structurelles durant leur processus de maturation (**Figure 7)**. Dans la moelle osseuse, l'érythroblaste subit une condensation de la chromatine et du noyau qui permet une énucléation en interagissant avec les macrophages, formant un réticulocyte.

L'interaction macrophage-érythroblaste dans la moelle osseuse est essentielle car les macrophages fournissent ainsi du fer aux érythroblastes mais phagocytent aussi les noyaux expulsés par les érythroblastes via la protéine DNase II (de Back et al., 2014). Le réticulocyte est constitué du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, de l'acide ribonucléique (ARN), des lysosomes, de la mitochondrie et des ribosomes (Lee et al., 2014; Rai et al., 2022). Au cours de son processus de maturation, la dégradation et l'expulsion des organites commencent dans la moelle osseuse, et s'achèvent lorsque le réticulocyte entre dans la circulation sanguine. Une fois dans la circulation sanguine, les ribonucléases facilitent la dégradation de l'ARNm (Moras et al., 2017). Il faut noter que les ARNm dans le réticulocyte jouent un rôle essentiel dans le transport, le métabolisme et la transduction du signal pour atteindre le stade érythrocytaire mature (Lee et al., 2014). Durant ce processus de maturation, le réticulocyte doit perdre 20% de sa membrane plasmique et subira un remodelage intracellulaire important, qui se caractérise par une perte de volume cellulaire via les exosomes, l'élimination sélective des protéines cytoplasmiques et membranaires, les pertes des organites cellulaires internes (ribosomes, réticulum endoplasmiques, l'appareil de Golgi) et enfin un réarrangement du cytosquelette d'actine (Liu et al., 2010; Moras et al., 2017; Moura, 2020). Toutes ces modifications sont accompagnées de changements au niveau de l'expression des marqueurs de surface. En effet,. le CD44 est l'un des meilleurs marqueurs de surface cellulaire qui discrimine mieux les érythroblastes aux différents stades de maturation (Chen et al., 2009). Au cours de l'érythropoïèse terminale, en passant du proérythroblaste à l'érythroblaste orthochromatique, la présence de CD44 à la surface des cellules diminue de manière progressive. Le récepteur de la Transferrine (CD71) quant à lui, est fortement exprimé dans les érythroblastes à tous les stades de développement, mais est absent du globule rouge mature (normocyte) (Pan & Johnstone, 1983; Malleret et al., 2015; Thomson-Luque et al., 2018).

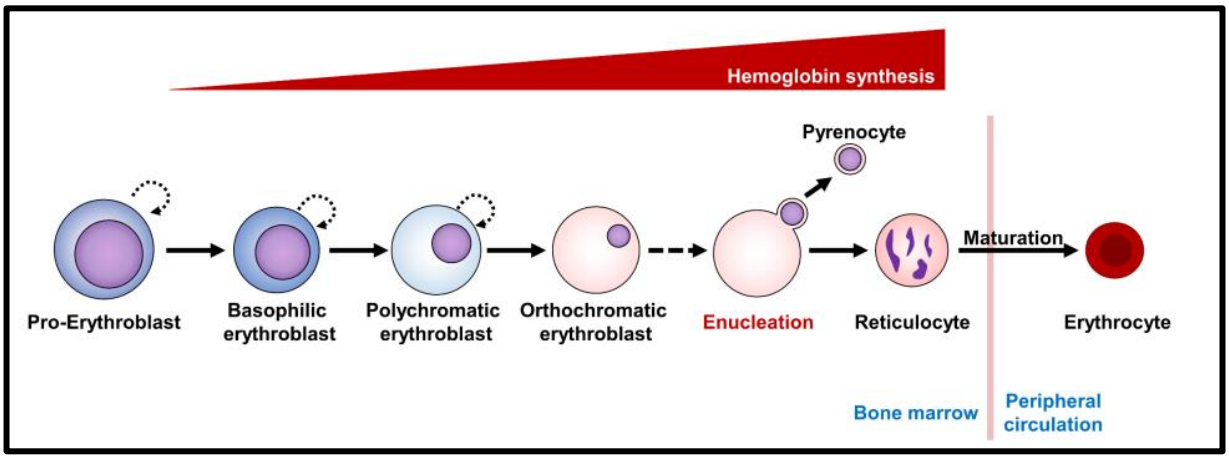


Figure 7: Processus de formation du globule rouge (érythropoïèse terminale) (Moura, 2020) adapté de (**Ji et al., 2011**). Les précurseurs érythroïdes subissent plusieurs changements morphologiques au cours de leur processus de maturation qui se caractérisent par une accumulation progressive de l'hémoglobine, une diminution progressive de la taille cellulaire et par la condensation de la chromatine aboutissant à l'énucléation (perte du noyau). Le proérythroblaste (**Pro-E**) va subir 3 à 4 mitoses avant de générer un réticulocyte. Ce proérythroblaste contient un cytoplasme légèrement basophile avec une chromatine finement granulaire, il donne naissance aux érythroblastes basophiles (**Baso-E**) avec une chromatine plus condensée, un noyau plus arrondi et un contenu cytoplasmique riche en ribosome. L'érythroblaste basophile va se différencier en érythroblaste polychromatophile (**poly-E**) avec une chromatine encore plus condensée, mais cette fois ci avec un noyau plus petit et un contenu cytoplasmique riche en ribosomes basophiles et en hémoglobine acidophile nouvellement synthétisée. Il va ensuite donner naissance à un érythroblaste orthochromatophile (**Ortho-E**) qui va subir une énucléation en perdant son cytoplasme basophile. Cette énucléation se caractérise par une activité transcriptionnelle de la globine alpha et bêta (Wrong et al, 2011), de la condensation de la chromatine et de la diminution d'1/10 ieme de son noyau par rapport au volume d'origine (Ji et al, 2011). Une fois le noyau expulsé, le **réticulocyte** (cellule anucléée immature) donnera naissance au **globule rouge mature** (Chen et al., 2009; Grigorakaki, 2018).

1.7.1.2. Comparaison de la membrane d'un réticulocyte à celle d'un normocyte

Par rapport à un normocyte, les réticulocytes ont un volume plus important, une teneur en hémoglobine plus élevée et une concentration en hémoglobine plus faible. Ils synthétisent l'hémoglobine seulement dans la moelle osseuse (Piva et al., 2015). L'analyse du protéome des réticulocytes a identifié 1658 protéines avec une expression similaire ou supérieure par rapport aux normocytes. Parmi ces protéines, 654 étaient spécifiques aux réticulocytes et étaient éliminées au fur et à mesure que les réticulocytes devenaient matures (Gautier et al., 2018). Les protéines les plus actives dans les réticulocytes mais réduites ou absentes dans les normocytes sont impliquées dans la traduction, la régulation et la liaison des acides nucléiques. Cependant, le contenu des normocytes est riche en protéines impliquées dans la liaison entre les lipides et l'oxygène (Chu et al., 2018; Gautier et al., 2018). Les protéines qui servent de point d'ancrage entre la membrane et le cytosquelette (la bande 3, Rh, RHAG, GPC et XK) semblent augmenter après la maturation des réticulocytes et elles sont absentes des vésicules dérivées de réticulocytes en cours de maturation (Wilson et al., 2016). Cette augmentation peut s'expliquer par la relocalisation de ces protéines du cytosol vers la membrane, par la perte du cholestérol pendant la maturation des réticulocytes, et enfin par l'attachement de ces protéines au cytosquelette qui empêche leur élimination durant la maturation (Carayon et al., 2011; Wilson et al., 2016). Ces différences de profils protéiques entre la membrane des réticulocytes et celle

des normocytes peuvent apporter une meilleure compréhension sur la stabilité des globules rouges matures par rapport aux réticulocytes (Stevens-Hernandez & Bruce, 2022). La stabilité de la membrane du globule rouge mature empêche sa fragmentation comme c'est le cas des réticulocytes immatures et permet ainsi le retour à sa forme d'origine biconcave (Malleret et al., 2013).

1.7.1.2 Globule rouge infecté

L'invasion des globules rouges est un évènement indispensable dans le cycle de vie du *Plasmodium*. Au cours de cet évènement, le mérozoïte se fixe à la surface du globule rouge non infecté. Il se caractérise par la présence de micronèmes et de rhoptries, qui sont des organites situés près de leurs extrémités apicales à l'origine des facteurs d'invasion soit à la surface du parasite, soit dans le globule rouge (Paul et al., 2015). L'invasion est orchestrée par une interaction entre les ligands du mérozoite et les protéines de surface du globule rouge dans une période relativement courte de 30 à 90 secondes (Gilson & Crabb, 2009; Weiss et al., 2015). Le parasite a la capacité d'envahir la cellule hôte à travers plusieurs voies et en exprimant plusieurs ligands. Seuls 50 ligands parasitaires ont été caractérisés et 10 récepteurs membranaires dont la bande 3, la glycophorine A (GPA), glycophorine B (GPB), et de glycophorine C (GPC) ; la bande 4.1 constituée du récepteur du complément 1 (CR1), de la basigine (BSG), de semaphorine-7A, de l'héparine et les récepteurs putatifs "W", "Z" et "Y (Molina-Franky et al., 2022). Plus en détails, le processus commence par une pré-invasion qui se caractérise par le contact initial entre le mérozoïte de *P. falciparum* et la membrane plasmique du globule rouge d'une part, puis par la réorientation apicale du mérozoïte et la formation des jonctions serrées. Elle se termine par la phase d'invasion proprement dite où le mérozoïte pénètre dans le globule rouge **(Figure 8)**.

1.7.1.2.1 Contact initial

Le contact initial est orchestré par les protéines de surface du mérozoite allant de 1 à 10 (MSP-1 à MSP-10), avec des régions conservées essentielles pour établir des interactions initiales avec les cellules hôtes. Les protéines de surface du mérozoïte MSP (1,2, 4,8 et 10) se lient à la membrane du mérozoïte par des ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI) et seuls ces fragments GPI pénètrent le globule rouge (Sanders et al., 2006). MSP-1 est la protéine de surface du mérozoïte la plus abondante et impliquée dans le contact initial avec la cellule hôte.

1.7.1.2.2 Réorientation apicale

Les mérozoïtes se réorientent en amenant leurs pôles apicaux en contact avec la membrane érythrocytaire, entraînant une forte déformation de la membrane du globule rouge. Cette déformation est due aux interactions spécifiques à haute affinité de liaison médiées par des ligands du parasite de la famille des protéines de liaison aux érythrocytes (EBL : EBA-175, EBA-140, EBA-181), le ligand de liaison aux érythrocytes 1 (EBL-1) ou des homologues de la protéine de liaison aux réticulocytes (*Pf* Rh : *Pf*Rh1, *Pf* Rh 2a/b, *Pf* Rh 4 et *Pf* Rh 5) aux récepteurs de l'hôte (Weiss et al., 2016; Molina-Franky et al., 2022). Il a été prouvé que, les anticorps ciblant la région de liaison aux érythrocytes pouvaient empêcher l'invasion des mérozoïtes (Gao et al., 2008) .

La famille des protéines de liaison aux érythrocytes (EBL) regroupe des protéines transmembranaires situées dans les micronèmes du pôle apical du mérozoïte, et comprennent majoritairement des antigènes de liaison aux érythrocytes EBA175, EBA140 et EBA181 et EBL-1 (Tham et al., 2012). Ces protéines se lient à la cellule hôte de manière dépendante de l'acide sialique (Cowman et al., 2017). Tout récemment il a été démontré que le traitement à la neuraminidase (NM) élimine l'acide sialique des glycoprotéines des globules rouges et réduit ainsi l'invasion des mérozoïtes (Weiss et al., 2015). L'Homme exprime une forme particulière d'acide sialique, le N-acide acétylneuraminique (Neu5Ac), en raison d'une mutation inactivatrice de l'enzyme cytidine monophosphate *N* -acétylneuraminique acide hydroxylase (CMAH), qui convertit le N-acide acétylneuraminique en acide *N* -glycolylneuraminique (Neu5Gc) (Hayakawa et al., 2001).

L'EBA-175 se lie à la glycophorine A (GPA). Il a été démontré que la GPA est le premier récepteur des globules rouges identifié comme ligand d'invasion de *P. falciparum* , dont la liaison à l'EBA-175 restaure les niveaux de base de calcium cytoplasmique du mérozoïte et déclenche ainsi la libération de la protéine rhoptrie (Singh et al., 2010).

L'EBA-140 se lie à la glycophorine C (GPC) qui joue un rôle essentiel dans le maintien de la forme des globules rouges et à la régulation des composantes de la membrane cellulaire par interaction avec la protéine 4.1 (Satchwell, 2016). Des études ont montré que certaines variantes de l'EBA-140 ne peuvent se lier qu'aux globules rouges qui ont été traités à la neuraminidase montrant ainsi que la glycophorine C n'est pas essentielle pour l'invasion des mérozoïtes dans les globules rouges (Maier et al., 2009) et de plus elle ne s'exprime pas dans toutes les souches de *P. falciparum* (Lobo et al., 2003).

L'EBA-181 constitué de 1567 acides aminés, est situé dans les micronèmes et co-exprime avec l'EBA-175 (Gilberger et al., 2003). Il se lie au récepteur « W » potentiel qui est sensible au traitement par la neuraminidase et la chymotrypsine et joue ainsi un rôle essentiel à la membrane du globule rouge en fournissant une résistance mécanique par une interaction verticale avec la glycophorine C et la glycophorine D (GPD) et par une interaction horizontale avec la spectrine et l'actine (Lanzillotti & Coetzer, 2006).

EBL-1 a été identifié comme deuxième membre de la famille des protéines de liaison aux érythrocytes (Peterson & Wellems, 2000). Il contient deux domaines , dont le domaine riche en Cys de la région N-terminale (D2), qui comprend à son tour deux sous-domaines F1 et F2 (Peterson & Wellems, 2000). C'est la région F2 qui se lie aux globules rouges à travers la glycophorine B indiquant qu'il s'agit d'un épitope glycane de l'acide sialique. Des études antérieures ont montré que la glycophorine B serait apparue à la suite d'une pression sélective afin d'entraver la principale voie d'invasion, puisque les globules rouges dépourvus de glycophorine B étaient résistants de 40% à 79% à l'invasion de *P. falciparum* et une résistance presque complète après traitement des globules rouges à la trypsine (Maier et al., 2009; Molina-Franky et al., 2022) . La GPB a aussi révélé sa sensibilité après traitement des globules rouges avec de la chymotrypsine et de la neuraminidase (Li et al., 2012).

La famille des homologues de la protéine de liaison aux réticulocytes (RH) comprend *Pf* RH1, *Pf* RH2a, *Pf* RH2b, *Pf* RH3, *Pf* RH4 et *Pf* RH5. *Pf* RH1 est constitué de 2971 acides aminés et est situé dans les rhoptries. Il se lie aux globules rouges à travers un fragment de 333 acides aminés avec un récepteur potentiel appelé « Y » qui est sensible à la neuraminidase et résistant au traitement trypsine-chymotrypsine. *Pf* RH1 joue un rôle primordial dans la déformation de la membrane du globule rouge dépendante de l'actine en agissant en amont sur les ligands de la voie alternative en induisant une libération d'EBA-175 dépendante du Ca^{2+} suivie de celle d'autres ligands de la rhoptrie et de micronème (Gao et al., 2013; Molina-Franky et al., 2022).

Pf RH2a et *Pf* RH2 b de poids moléculaires respectifs de 370 kDa et de 383 kDa sont situés dans le col de la rhoptrie et sont codés par deux gènes du chromosome 13 (Dvorin et al., 2010). La région N-terminale de *Pf* RH2a est clivée en fragments de 270 kDa qui à leur tour sont clivés en fragments de 130 kDa et 140 kDa qui seront ensuite transportés vers la jonction serrée afin de faciliter l'entrée du mérozoïte dans le globule rouge (Gunalan et al., 2011). *Pf* RH2b quant à lui joue un rôle important dans l'invasion des érythrocytes, en s'associant à *Pf* RH1, *Pf* RH4 et *Pf* RH5 dans la formation de la jonction serrée. Il se lie aux globules rouges via le récepteur

potentiel « Z » qui est sensible à la chymotrypsine et résistant au traitement à la trypsine et à la neuraminidase (Duraisingh et al., 2003). Cependant, il a été démontré qu'en perturbant les gènes *Pf* RH2a et *Pf* RH2b, l'invasion n'était pas entravée, suggérant qu'ils n'occupent pas une fonction essentielle et de plus ils peuvent être compensés par d'autres ligands parasitaires (Duraisingh et al., 2003). Mais en absence de EBA-175 et EBA-140, *Pf* Rh2a pouvait montrer son efficacité (Lopaticki et al., 2011).

Pf RH4 constitué de 1716 acides aminés, interagit avec le récepteur du complément 1 (CR1) lors de l'invasion du mérozoïte dans le globule rouge. Le récepteur du complément 1 est une protéine immuno-régulatrice présente sur la membrane des globules rouges et des leucocytes. Elle joue un rôle dans l'activation du système du complément et l'élimination des complexes immuns (Tham et al., 2010).

Pf RH5, localisé dans la rhoptrie, est une protéine constituée de 526 acides aminés (Baum et al., 2009). Il se lie au récepteur de type 2 de la basigine (CD_{147}) et agit en aval dans la déformation de la membrane du globule rouge via l'extrémité C-terminale (Volz et al., 2016). La basigine (BSG) constituée de 385 acides aminés, est une glycoprotéine transmembranaire qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines (Crosnier et al., 2011). L'interaction *Pf* RH5-BSG déclenche la libération des protéines de la rhoptrie dans les globules rouges grâce au flux de Ca^{2+}et produit ainsi la phosphorylation des protéines du squelette membranaire telles que la spectrine ou la bande 3. Après phosphorylation, la bande 3 va se dissocier de l'ankyrine et de la spectrine, et se séparer par la suite de la membrane en raison de l'affaiblissement du cytosquelette (Ferru et al., 2011).

1.7.1.2.3 Formation des jonctions serrées

Après la réorientation apicale, le mérozoïte crée une jonction serrée qui lui servira de point d'appui pour une entrée efficace dans la cellule hôte. Elle se produit en aval de l'engagement de *Pf*RH5, au cours de laquelle le moteur actine-myosine permet au mérozoïte de traverser la jonction serrée avant de pénétrer le globule rouge (Cowman et al., 2017). La formation de la jonction serrée entre le mérozoïte et le globule rouge est orchestrée via une interaction entre AMA1-RON2 (Srinivasan et al., 2011; Lamarque et al., 2011). En effet, l'antigène membranaire apical 1(AMA1) est un ligand d'invasion parasitaire d'une très grande importance. C'est une protéine de faible abondance transmembranaire de type I située dans les micronèmes et à la jonction mobile lors de l'invasion (Wright & Rayner, 2014; Molina-Franky et al., 2022). Sa fonction n'est pas très claire au cours de l'invasion des érythrocytes, néanmoins

elle peut agir dans la réorientation des mérozoïtes (Mitchell et al., 2004), peut se lier au érythrocytes, être efficace à l'invasion (Giovannini et al., 2011) et permet la survie du parasite (Triglia et al., 2000). La protéine RON2 (protéine du col de la Rhoptrie 2), qui est un membre du complexe RON (RON2,4,5, et 8), est sécrétée par la rhoptrie. Elle présente une boucle exposée en surface qui agit comme site de liaison à AMA1, fournissant ainsi un complexe récepteur-ligand pour l'invasion (Wright & Rayner, 2014). L'interaction entre AMA1 et RON2 est d'une importance capitale, puisque des études ont montré qu'en bloquant l'interaction AMA1-RON2 une échinocytose érythrocytaire s'ensuit inhibant ainsi la formation des jonctions serrées (Weiss et al., 2015). De même, le peptide synthétique R1 (Harris et al., 2009) et un peptide dérivé de la boucle exposée de RON2 peuvent entrer en compétition avec le sillon qui interagit dans AMA1-RON2 et empêcher ainsi la liaison native de RON2 et prévenir l'invasion (Tonkin et al., 2011; Lamarque et al., 2011).

1.7.1.2.4 Invasion active

Le parasite pénètre le globule rouge via une jonction mobile et une fois à l'intérieur du globule rouge, il s'encapsule dans la vacuole parasitophore. Cette vacuole lui permet de s'isoler du cytoplasme de la cellule hôte et de continuer ainsi son développement dans un environnement propice (Weiss et al., 2016). Au stade mérozoïte extracellulaire, la phosphatase *Pf*Shelph2 qui est un produit génique de *P. falciparum* appartenant à la sous famille de la phosphatase de type *Shewanella* (Shelph) se localise dans des vésicules différentes de celles de rhoptrie, des granules ou des micronèmes (Fernandez-Pol et al., 2013). Cette phosphatase se libère dès que le mérozoïte envahit le globule rouge, car elle déphosphoryle la bande 3 via un mécanisme catalytique dépendant des cations métalliques divalents provoquant ainsi la restauration du cytosquelette érythrocytaire et permettant d'initier la maturation du parasite dans les cellules hôtes (Fernandez-Pol et al., 2013; Molina-Franky et al., 2022). Pour survivre et assurer son développement au sein du globule rouge, le parasite va exporter un certain nombre de protéines qui lui permettront d'acquérir des nutriments, de remodeler la cellule hôte infectée et d'échapper au système immunitaire (Jonsdottir et al., 2021). Ces protéines seront transportées du cytoplasme vers la membrane du globule rouge infecté par de nouvelles structures membranaires dérivées du parasite. Ces structures (le réseau tubo-vésiculaire, les fentes de Maurer, les points K, les points J et les vésicules de type exosomes) agissent comme un point de tri à partir duquel les protéines du parasite sont déposées dans la membrane du globule rouge infecté (Molina-Franky et al., 2022).

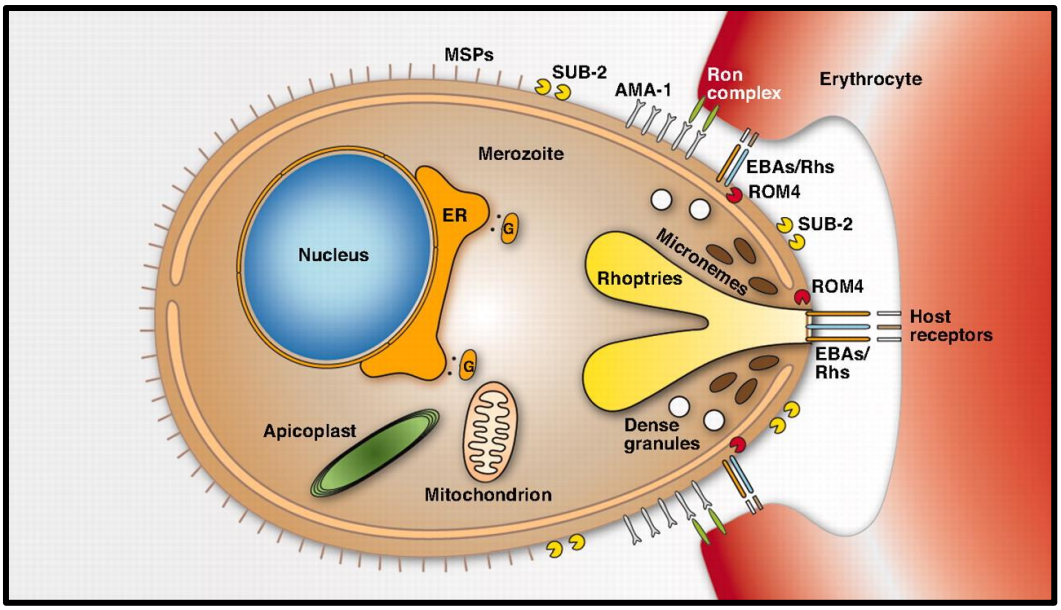


Figure 8: Invasion de mérozoïtes de *P. falciparum* dans la cellule hôte (Kappe et al., 2010). Le mérozoïte interagit avec le globule rouge à l'extrémité apicale à travers des ligands du parasite (EBL et Pf Rh). Il va se lier aux récepteurs de l'hôte et activer le processus d'invasion et la formation de la jonction serrée qui va à son tour faciliter la liaison du parasite à la surface des érythrocytes. Les interactions ligand-récepteur sont libérées au cours du processus d'invasion grâce à la rhomboïde 4 (ROM4) qui va cliver les ligands du parasite. La subtilisine 2 (SUB-2) quant à elle va également permettre l'élimination des protéines à la surface du mérozoïte au cours de l'invasion.

1.7.2 Séquestration de *P. falciparum*

1.7.2.1 Séquestration vasculaire

Après l'invasion du mérozoïte dans les globules rouges, les globules rouges infectés commencent à perdre leur forme biconcave et deviennent progressivement sphériques. Ensuite, les propriétés adhésives du globule rouge infecté vont favoriser une cytoadhérence à l'endothélium microvasculaire et une séquestration du globule rouge infecté dans divers organes. Cette stratégie mise en place par le parasite va lui permettre d'échapper à la clairance splénique (Li et al., 2018). Seuls les trophozoïtes et les schizontes entraînent la cytoadhérence et la séquestration des hématies, tandis que les stades anneaux restent en circulation (Venugopal et al., 2020). La grande famille de protéines variantes appelées protéine membranaire érythrocytaire 1 de *P. falciparum* (PfEMP-1) exprimée à la surface des globules rouges infectés a été identifiée comme principal déterminant de la cytoadhérence et de la virulence de *P. falciparum* (Su et al., 1995; Miller et al., 2013; Lee et al., 2019). PfEMP-1 peut se lier à plusieurs récepteurs de l'hôte et sur différentes cellules hôtes, ce qui explique son implication dans l'évasion immunitaire (Gomes et al., 2016) et la modulation immunitaire (Sampaio et al., 2017). La présence des Knobs propulse PfEMP1 au niveau du récepteur du globule rouge, facilitant les interactions entre le PfEMP1 et les récepteurs endothéliaux provoquant ainsi

l’adhésion et la séquestration des globules rouges infectés dans les organes profonds et leur retrait de la circulation (**Figure 9**). Comme récepteurs endothéliaux, nous pouvons citer le CD36, la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM1), la molécule d'adhésion plaquettaire et des cellules endothéliales 1 (PECAM1), le sulfate de chondroïtine A (CSA) et le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR). En effet, la séquestration du parasite au niveau du cerveau à l’origine d’un paludisme cérébral est la résultante de la liaison de PfEMP1 au récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) et de la molécule d’adhésion ICAM1 (Turner et al., 2013; Smith et al., 2000). Dans le cadre d’un paludisme placentaire, les interactions entre le ligand PfEMP1, le CSA et les IgG sont nécessaires pour la séquestration du parasite dans le placenta de la femme enceinte (Salanti et al., 2004; Flick et al., 2001). Cependant deux autres protéines sont aussi impliqués dans la cytoadhérence: les protéines du cadre de lecture ouvert variable subtélomérique (STEVOR) et les protéines répétitives de la famille intercalée (RIFIN) (Niang et al., 2014; Goel et al., 2015). Ces ligands diffèrent de PfEMP1 au niveau de l'expression temporelle; en effet, PfEMP1 s’exprime plus tôt car la transcription commence aux stades anneaux et son expression se produit lorsque les parasites mûrissent en trophozoïtes, et il est suivi de RIFIN, puis STEVOR (Bachmann et al., 2012). Il a été démontré que les RIFIN sont impliqués dans la formation des rosettes qui est un mécanisme de cytoadhérence dans lequel les globules rouges infectés par les stades parasitaires tardifs se lient aux globules rouges non infectés pour former des grappes qui empêchent la fluidité sanguine dans la microvasculature (Goel et al., 2015). Ils peuvent aussi interagir avec le récepteur leucocytaire de type immunoglobine B1 (LILRB1), en empêchant l’activation des cellules B et des natural killers (NK) d’où leur rôle dans l’évasion immunitaire (Saito et al., 2017). De même, les protéines STEVOR ont montré leurs implications dans l’évasion immunitaire, la formation de rosette et l’invasion des mérozoïtes (Niang et al., 2014).

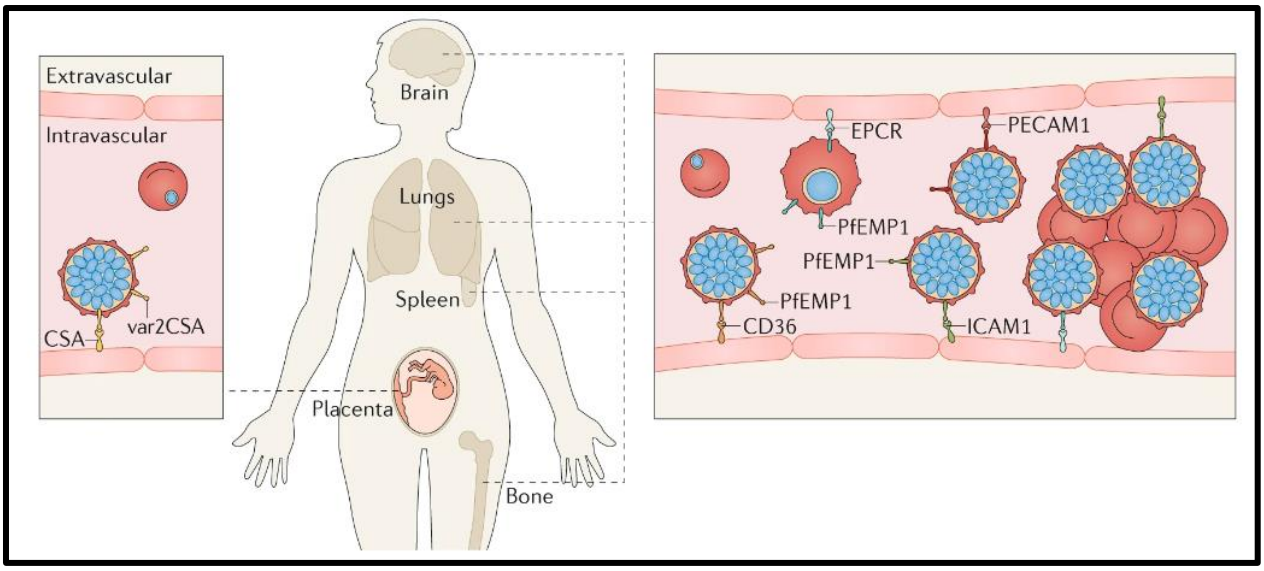


Figure 9: Séquestration des stades asexués (trophozoites et schizontes) dans les capillaires de plusieurs organes (Venugopal et al., 2020). Les stades tardifs (bleu) se séquestrent dans les capillaires du cerveau, poumons, rate, placenta et moelle osseuse. La cytoadhérence des globules rouges infectés (rouge) aux cellules endothéliales et aux globules rouges non infectés (rosetting) facilite la séquestration. La protéine 1 de la membrane érythrocytaire de P. falciparum (PfEMP1) qui est le principal ligand du parasite, est exposée à la surface des globules rouges infectés par des structures en forme de knobs (bouton). Les variantes de PfEMP1 interagissent avec divers récepteurs de cellules endothéliales.

1.7.2.2 Séquestration dans la moelle osseuse

Aux stades asexué et sexué, le parasite *P. falciparum* a besoin de se séquestrer pour échapper à la clairance phagocytaire par la rate (Joice et al., 2014). Des études menées chez les enfants décédés du paludisme ont montré que les stades asexués de *P. falciparum* se séquestrent aussi dans les vaisseaux sanguins, les sinusoïdes et surtout le parenchyme de la moelle osseuse (De Niz et al., 2018). Cependant chez les rongeurs, il a été suggéré que la moelle osseuse, y compris le compartiment extravasculaire, est le lieu de localisation des hématies non infectées et de celles infectées (De Niz et al., 2018). Un réservoir extravasculaire de parasites asexués peut soutenir la réplication du parasite et favoriser ainsi la formation de gamétocytes car une étude a prouvé que les gamétocytes précoces de stade 1 peuvent soit se former dans les cellules de l'îlot érythroblastique, soit se loger dans la moelle osseuse sous forme de mérozoïtes ou dans les réticulocytes (Joice et al., 2014; Neveu et al., 2020; Venugopal et al., 2020). Cependant les mécanismes de séquestration dans la moelle osseuse ne sont pas aussi bien détaillés comme dans la séquestration vasculaire. En effet, contrairement aux stades asexués, les gamétocytes expriment faiblement PfEMP1, et donc la séquestration par cytoadhésion des globules rouges infectés via l'interaction de PfEMP1 avec les récepteurs endothéliaux de la moelle osseuse n'est

pas possible (Silvestrini et al., 2012; Tibúrcio et al., 2013). Néanmoins quelques hypothèses ont été soulignées:

La séquestration des gamétocytes dans la moelle osseuse peut se faire, soit par la cytoadhésion des globules rouges immatures infectés aux cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse (Messina et al., 2018), soit par rétention mécanique de globules rouges immatures infectés par les gamétocytes (Aingaran et al., 2012; Dearnley et al., 2012; Tibúrcio et al., 2012). Lavazec et collaborateurs, ont suggéré que la rigidité des globules rouges infectés par les gamétocytes précoces peut aussi contribuer à la séquestration du parasite dans le parenchyme de la moelle osseuse par rétention mécanique (Lavazec, 2017). En effet, la rigidité de la membrane résulte des interactions entre les protéines STEVOR et les composants du complexe ankyrine. Ces interactions pourraient ainsi augmenter les contraintes verticales entre le squelette et la bicouche lipidique (Lavazec, 2017). Une nouvelle hypothèse a été émise par Neveu et collaborateurs, leurs travaux ont montré à partir d'un frottis de la moelle osseuse d'une patiente infectée par *P. falciparum*, que les érythroblastes liés aux macrophages peuvent être le lieu de maturation des gamétocytes (Neveu et al., 2020). Pour que les gamétocytes immatures puissent terminer leur différenciation complète dans les cellules immatures énucléées, le parasite empêche l'énucléation des érythroblastes primaires. La maturation s'achèvera ainsi au sein des réticulocytes, où les gamétocytes matures (stade V) pourront alors quitter le microenvironnement et rejoindre la circulation sanguine pour assurer la transmission aux moustiques.

De Niz et collaborateurs ont regardé si le fait que le parasite se localise dans la niche extravasculaire dépend des interactions spécifiques entre parasite-hôte dans un modèle de rongeur (*P. berghei*). Pour cela ils ont bloqué les récepteurs endothéliaux en utilisant des anticorps dirigés contre la P-sélectine, la E-sélectine, l'ICAM-1 et la molécule d'adhésion vasculaire et cellulaire 1(VCAM-1). Leurs résultats ont montré une diminution de la parasitémie dans la moelle osseuse lorsque les récepteurs spécifiques étaient bloqués, mais les parasites circulants n'ont pas été affectés. Fait intéressant, lorsque la P-sélectine était bloquée ils ont observé une perte d'environ 60% de gamétocytes précoces dans la moelle osseuse par rapport au contrôle (De Niz et al., 2018). Ceci confirme ainsi le rôle des interactions récepteur-ligand spécifiques dans la séquestration du parasite dans la moelle osseuse.

Les gamétocytes de *P. falciparum* ont aussi la capacité de remodeler les propriétés structurelles et mécaniques de la membrane de la cellule hôte pour faciliter ainsi la déformation et la perméabilité des globules rouges infectés, caractéristiques clés pour la persistance des

gamétocytes en circulation (Bouyer et al., 2020; Tibúrcio et al., 2012). Ces différentes modifications résultent de l'exportation par le parasite de plusieurs protéines qui favorisent ainsi sa survie, sa chimiosensibilté et sa reconnaissance par le système immunitaire (Neveu & Lavazec, 2019).

1.7.3 Préférence de la cellule hôte par *Plasmodium*

La préférence pour la cellule hôte par le parasite au cours de la phase d'invasion a été évoquée pour la première fois dans le cadre du paludisme aviaire. En effet, Ben-Harel aurait constaté que les parasites d'oiseaux, avaient la capacité d'envahir aussi bien les globules rouges immatures et matures (Ben-harel, 1923). Plus tard, plusieurs études réalisées chez les parasites infectant l'homme ont confirmé l'observation de Ben-harel (Eaton, 1934). Aucours de la phase d'invasion du mérozoïte dans la cellule hôte, le parasite a le choix d'envahir les réticulocytes ou les normocytes. *P. vivax* et les parasites de rongeurs (*P. berghei* et *P. yoelii*) ont une préférence restreinte pour les globules rouges immatures (Cromer et al., 2006; Hentzschel et al., 2022; Vigário et al., 2001). En Afrique Centrale et Occidentale les individus sont résistants à l'invasion de *P.vivax* du fait de l'absence du récepteur de l'antigène Duffy pour les chimiokines (DARC) à la surface des globules rouges (Miller et al., 1976). Des études récentes réfutent cette hypothèse, démontrant que les individus DARC négatifs sont aussi infectés par *P.vivax* (Ménard et al., 2010; Ngassa Mbenda et al., 2016; Russo et al., 2017). C'est dire que l'interaction entre le récepteur DARC et la protéine de liaison Duffy de *P. vivax* (PvDBP) n'est pas le seul moyen pour le parasite *P.vivax* d'envahir les réticulocytes sachant que le DARC se présente aussi bien sur les normocytes (Malleret et al., 2013). D'autres protéines de liaison de *P. vivax* aux réticulocytes on fait l'objet d'étude, notamment le récepteur 1 de la transferrine (TfR1 ou CD71) qui assure le transport du fer dans les cellules (Gruszczyk et al., 2018). Il s'exprime uniquement sur les globules rouges immatures (réticulocytes) et diminue progressivement de la membrane au fur et à mesure que le globule rouge devient mature (Harding et al., 1983; Pan & Johnstone, 1983) **(Figure 10)**. La protéine de liaison 2b de *P. vivax* aux réticulocytes (PvRBP2b) a aussi montré son efficacité dans l'invasion de *P. vivax* dans les réticulocytes lorsqu'elle se lie au récepteur de la transferrine. En effet, Gruszczyk et collaborateurs ont montré que les Ac anti-PvRBP2b en même temps qu'ils sont capables de bloquer la liaison aux réticulocytes, empêchent également l'invasion de *P. vivax* dans les réticulocytes humains. De même en présence de cellules mutantes CD71, l'invasion de *P. vivax*

est significativement inhibée. L'interaction de PvRBP2b-TfR1 joue ainsi un rôle très important pour l'invasion de *P. vivax* dans le réticulocyte.

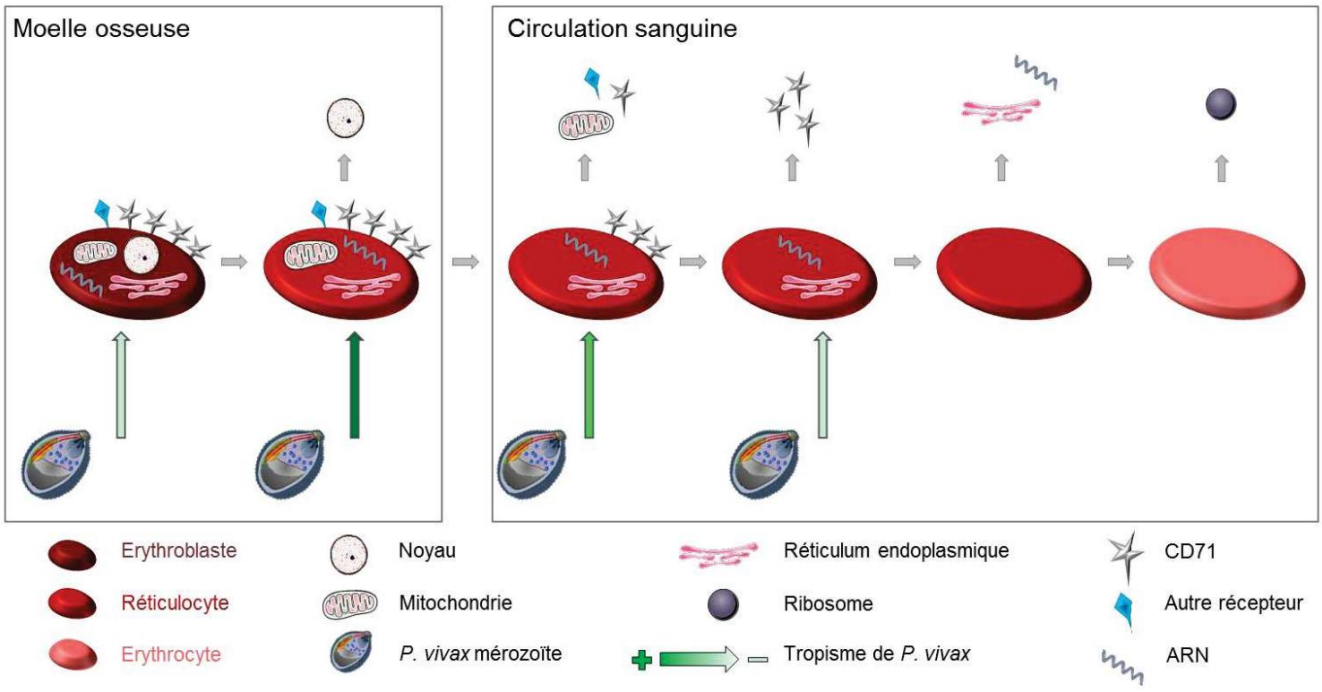


Figure 10: Permissivité des cellules sanguines à *P.vivax* (Roesch, 2020) adapté de **(Thomson-Luque et al., 2019).** La formation du globule rouge a lieu dans la moelle osseuse, ensuite les réticulocytes migrent dans la circulation sanguine. Perte du récepteur CD71 dans les cellules matures et impossibilité du parasite d'envahir les normocytes.

Chez *P. berghei*, Cromer et al, ont montré que les globules rouges immatures fraîchement sortis de la moelle osseuse sont des cibles potentielles du parasite. En effet, une production accrue de réticulocytes favorise la croissance du parasite à cause de leur sensibilité (Cromer et al., 2006). Cette observation a été également obtenue dans les études antérieures, dans lesquelles une réduction de la production de réticulocytes avait entraîné un retard à la perméabilité et une réduction de la densité parasitaire (Ladda & Lalli, 1966; Singer, 1953; Zuckerman, 1957). Un phénomène similaire a également été observé dans l'infection chez la souris infectée par *P. yoelii* (Vigário et al., 2001). Tout récemment, Hentzschel et collaborateurs ont également identifié le CD71 comme un récepteur hôte pour l'invasion de *P. berghei* dans les réticulocytes (Hentzschel et al., 2022) .

En 1948, Chwatt a montré que *P. falciparum* peut envahir sans discernement aussi bien les réticulocytes comme les normocytes, et la présence des parasites dans les réticulocytes peut être due à une distribution hasardeuse (Chwatt, 1948). Quelques auteurs montreront plus tard que les globules rouges immatures sont plus sensibles à l'invasion de *P. falciparum* par rapport

aux globules rouges matures (Pasvol et al., 1980; R. J. M. Wilson et al., 1977). Tout récemment, pour la première fois la préférence pour la cellule hôte chez *P. falciparum* a été observée *in vitro.* Les auteurs ont démontré que *P. falciparum* infecte les réticulocytes humains avec une plus grande affinité. De plus il est capable de s'adapter à l'environnement de l'hôte en modifiant l'expression des gènes nécessaires au remodelage de la cellule hôte (Naidu et al., 2019).

1.8 Biologie de la transmission

La transmission de *P. falciparum* de l'hôte vertébré au moustique vecteur nécessite une différenciation des formes asexuées du parasite par gamétocytogenèse pour donner naissance aux formes sexuées, les gamétocytes. Bien que par le passé, il a été démontré que cette différenciation des formes asexuées en formes sexuées seraient orchestrés suite à des conditions stressantes de l'environnement du parasite dans l'hôte humain (Baker, 2010; T. Bousema et al., 2011), les mécanismes moléculaires impliqués dans l'engagement sexuel étaient restés inconnus. Depuis, plusieurs études ont identifié une protéine de liaison à l'ADN *Pf* AP2-G appartenant à la famille de facteurs de transcription spécifiques des Apicomplexes Apetela 2 (ApiAP2) comme le régulateur principal qui orchestre l'engagement sexuel chez *Plasmodium* (Kafsack et al., 2014; Sinha et al., 2014).

1.8.1 Protéine contenant le domaine Apicomplexe AP2 (ApiAP2) chez *Plasmodium falciparum*

La famille ApiAP2 semble être impliquée dans la régulation de l'expression des gènes à tous les stades de développement du parasite (Balaji et al., 2005; Painter et al., 2011). Plusieurs études ont mis en lumière les fonctions de certaines protéines ApiAP2 au cours de la croissance intra-érythrocytaire et la différenciation sexuelle. Les facteurs de transcription ApiAP2 comprennent 1 à 4 domaines dont les tailles varient d'environ 200 à plusieurs milliers d'acides aminés avec des régions fonctionnelles supplémentaires (Balaji et al., 2005; Jeninga et al., 2019). En dehors du domaine AP2, d'autres domaines protéiques sont présents dans quelques APiAP2 de *Plasmodium spp*: un domaine de liaison à l'ADN appelé AT-hook qui facilite les changements dans la structure de l'ADN en tant que polypeptide ou en tant que partie d'une protéine multidomaine (Aravind & Landsman, 1998); un domaine en doigt de zinc impliqué dans la régulation transcriptionnelle, la prolifération et la différenciation cellulaire (Cassandri et al., 2017; Ngwa et al., 2021;J. K. Singh & van Attikum, 2021) ; un domaine Acyl-CoA-N-acetyltransférase, un domaine pentapeptide-repeat-like et un domaine ACDC (domaine coïncidant principalement avec l'extrémité C-terminale d'AP2) avec un motif conservé et de fonction inconnue (Oehring et al., 2012). Des études antérieures ont révélé l'implication des

protéines de liaison à l'ADN ApiAP2 dans la modulation de la régulation des gènes spécifiques au stade et de l'intégrité de la chromatine. Le facteur de transcription AP2-G ne contient qu'un seul domaine AP2. Il est essentiel à la conversion sexuelle et contrôle l'expression des gènes essentiels à la gamétocytogenèse précoce (Josling et al., 2020). Il s'exprime tôt dans les cellules sexuellement engagées et dans les gamétocytes de stade I (Josling et al., 2019).

1.8.2 Engagement de *P. falciparum* vers la voie sexuée

Au cours de chaque cycle de réplication asexuée, un petit sous-groupe de parasites asexués (<10%) se détourne du cycle de développement et s'engage vers un nouveau destin cellulaire donnant naissance aux formes sexuées et ce changement de trajectoire par le parasite serait dû en partie à l'exposition du parasite à divers facteurs environnementaux (Josling & Llinás, 2015; Llorà-Batlle et al., 2020). En effet, les parasites qui n'expriment pas ce facteur de transcription *Pf*AP2G continueront leur cycle de réplication asexuée, tandis que ceux qui l'exprimeront s'engageront vers la différenciation sexuelle (**Figure 11**) (Kafsack et al., 2014; Sinha et al., 2014). Fait intéressant, une surexpression d'AP2G chez *P. berghei* et *P. falciparum* a montré une augmentation rapide de la production de gamétocytes (Kent et al., 2018; Llorà-Batlle et al., 2020).

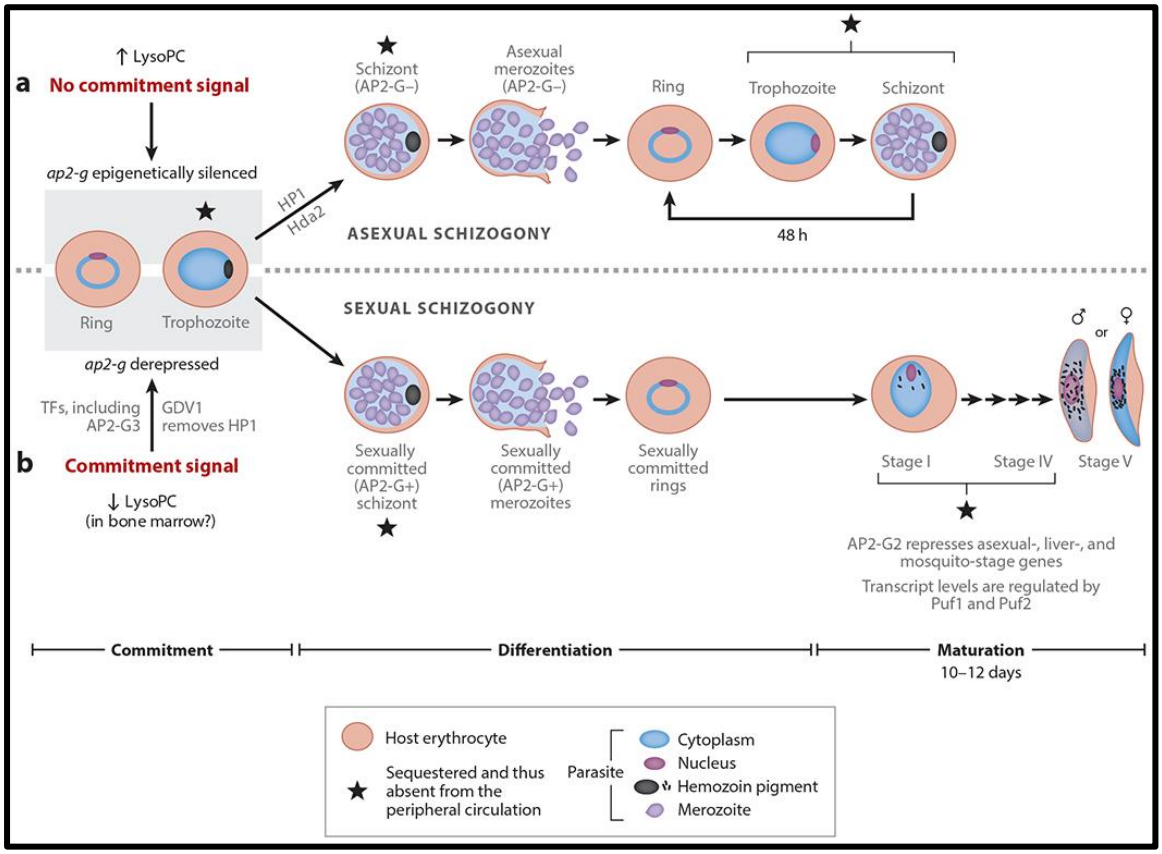


Figure 11: Régulation de l'engagement sexuel et de la gamétogénèse (Josling et al., 2018)

Cependant, des études récentes proposent que deux voies orchestrent cette décision pour le parasite de s'engager dans cette voie de différenciation (**Figure 12**): la première stipule que les parasites engagés au stade schizonte ont besoin d'un cycle réplicatif supplémentaire avant de se différencier en gamétocyte (Next Cycle Conversion (NCC)) et la deuxième stipule que l'engagement sexué peut avoir lieu dans le même cycle au stade anneau (descendant de schizontes PfAP2G négatifs) sans avoir besoin d'un cycle réplicatif supplémentaire pour se différencier en gamétocyte (Same Cycle Conversion (SCC)) (Bancells et al., 2019). Au stade précoce de l'anneau (moins de 12 h post invasion chez *P. berghei*, ou moins de 20 h post invasion chez *P. falciparum*) (Kent et al., 2018; Bancells et al., 2019), le niveau d'expression d'AP2G atteint un seuil suffisant pour déclencher le programme transcriptionnel sexuel avant le début de la division nucléaire, inhibant ainsi le cycle réplicatif asexué et favorisant l'expression précoce des marqueurs de gamétocytes (Bancells et al., 2019; Kent et al., 2018). Cependant, au stade schizontes, les parasites (trophozoïtes et schizontes) complètent le cycle de réplication sous formes sexuellement engagées. Après réinvasion, les nouveaux anneaux sexuels ont un locus *Pf*ap2-g hérité et déjà activé épigénétiquement lors du cycle précédent, facilitant ainsi son expression (Cortés & Deitsch, 2017; Bancells et al., 2019). Au cours des infections naturelles les voies empruntées par le parasite pour sa différenciation sexuelle (SCC et NCC) ne sont pas élucidées.

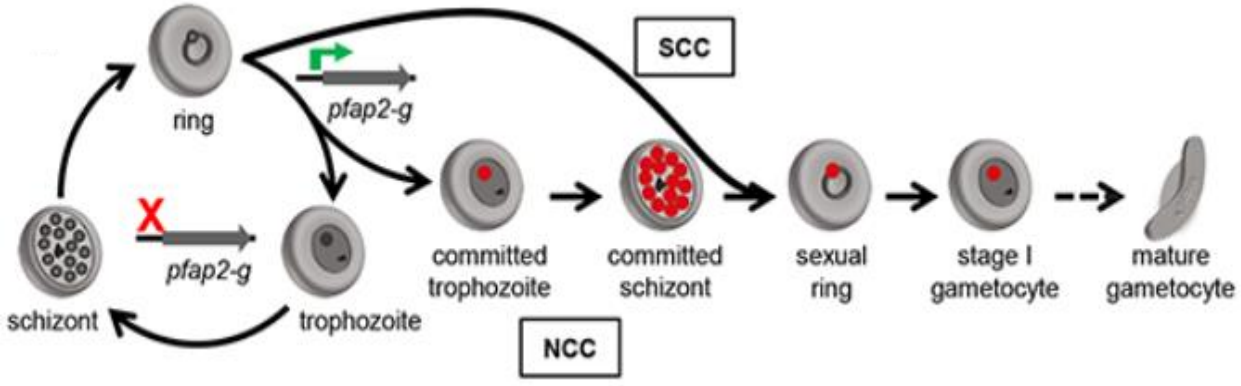


Figure 12:Voies empruntées par le parasite pour sa différenciation sexuelle (Bancells et al., 2019). Les cercles rouges indiquent l'expression nucléaire d'AP2G. La différenciation sexuelle des gamétocytes s'effectue soit sans réplication supplémentaire lorsque AP2G s'exprime tôt au stade anneau (SCC), soit lorsque les parasites âgés passent par un cycle réplicatif supplémentaire sous forme engagée lorsque AP2G s'exprime tardivement (NCC).

1.8.2.1 Mécanisme épigénétique impliqué dans l'engagement sexuel

Dans la famille *Pf* ApiAP2, seul le locus *ap2-g* est réduit au silence épigénétiquement par les effets de la protéine de l'hétérochromatine 1 (HP1) et de l'histone désacetylase (Hda2), ce qui amène ces cellules à se développer de manière asexuée (**Figure 13**) (Brancucci et al.,

2014; Coleman et al., 2014; Filarsky et al., 2018). Chez *P. falciparum*, la protéine de l'hétérochromatine 1 interagit avec l'histone H3-triméthylée sur la lysine 9 (H3K9me3) afin de maintenir le gène de l'hétérochromatine au silence (Ngwa et al., 2016). Cette association entraîne une expression unique des gènes *var* et empêche l'induction des gamétocytes. La protéine de l'hétérochromatine 1 chez *P. falciparum*, joue ainsi un rôle très important dans le blocage de l'engagement sexuel, puisqu'il a été démontré que la déplétion conditionnelle de *Pf*HP1 entraine une hyper-induction des gamétocytes et une dérépression du gène *ap2-g* (Flueck et al., 2009). L'élimination de l'hétérochromatine du locus AP2G s'effectue par un activateur en amont de l'engagement sexuel, la protéine de développement des gamétocytes (GDV1) (Eksi et al., 2012; Filarsky et al., 2018). En effet, la protéine de développement des gamétocytes 1 (GDV1) est une protéine périnucléaire qui joue un rôle dans l'engagement sexuel et dans la gamétocytogenèse précoce dont l'expression est contrôlée par un ARN anti-sens de GDV1 non codant (asgdv1) qui agit comme un régulateur négatif de l'expression de GDV1 (Eksi et al., 2012; Filarsky et al., 2018). En 2018, Filarsky et collaborateurs, ont montré qu'elle agit chez *P. falciparum* en expulsant la protéine hétérochromatine 1 (HP1) des sites H3K9me3 dans le génome du parasite déréprimant ainsi le gène *ap2-g* suivie d'une induction de l'engagement sexuel, confirmant l'implication de GDV1 dans le contrôle de l'engagement sexuel (Filarsky et al., 2018).

En ce qui concerne les histones désacétylases (HDAC), il a été démontré qu'elles sont impliquées dans la formation de l'hétérochromatine (Grewal & Jia, 2007), d'où leur implication dans la régulation transcriptionnelle de *Pfap2-g*. L'étude de Coleman et collaborateurs a fait l'objet d'une grande découverte grâce à la bio-informatique. En effet ils ont identifié une histone désacétylase putative de classe II chez *P. falciparum* (PfHda2), et ont montré qu'elle avait une localisation périnucléaire et un chevauchement spatial avec *Pf*HP1. L'inactivation du gène *PfHda2* a entraîné une surexpression des gènes associés à la conversion sexuelle et une dérepression transcriptionnelle de gène *var,* provoquant ainsi une production accrue de gamétocytes (Coleman et al., 2014; Bechtsi & Waters, 2017). Cette observation amène à conclure que *PfHda2* joue un rôle dans la voie de commutation de la gamétocytogénèse dépendante de *Pf*HP1 (Bechtsi & Waters, 2017).

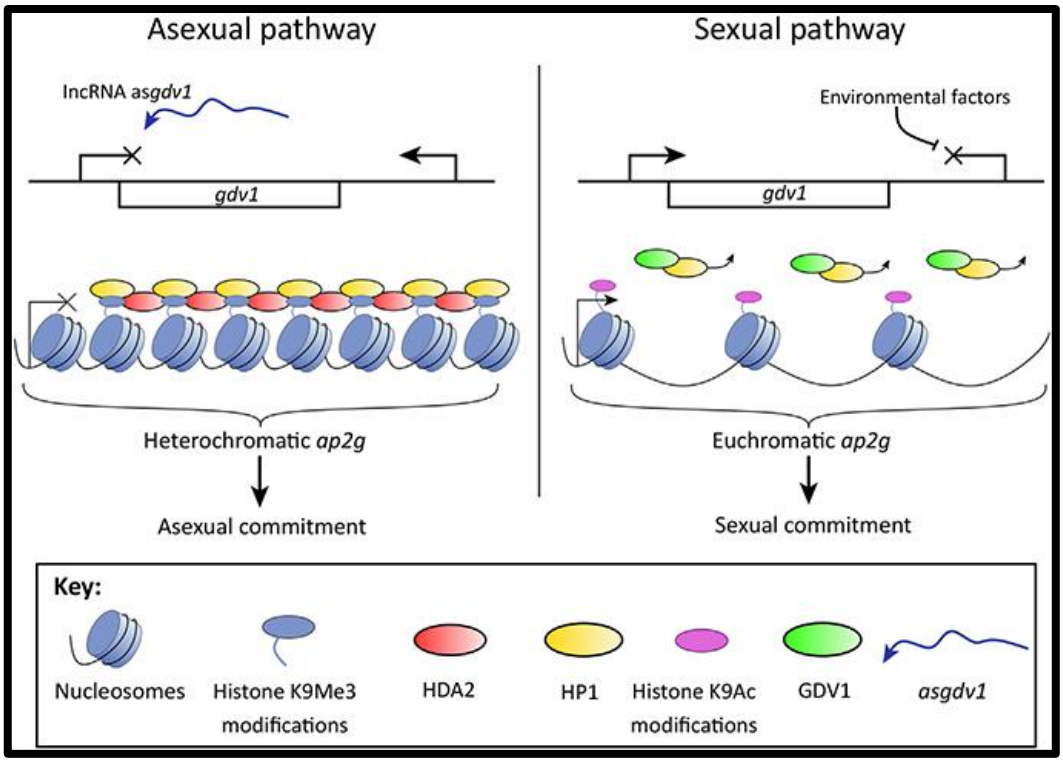


Figure 13: Régulation épigénétique de l'engagement sexuel de *P. falciparum* (Rea et al., 2018). L'ARN anti-sens gdv1 long non codant (asgdv1) va agir comme un régulateur négatif de l'expression de GDV1 chez les parasites en voie de développement asexuée. HP1 et HDA2 sont dans un état de chromatine réprimé par la méthylation et la désacetylation de H3K9 à de nombreux loci (AP2G) en absence de GDV1. Cet état empêche l'expression d'AP2G, permettant ainsi aux parasites de continuer à se développer de manière asexuée. Asgdv1 va s'inactiver dans un sous-groupe de parasite soit de manière hasardeuse, soit suite à la transduction de divers facteurs environnementaux permettant ainsi l'expression de GDV1 et donc l'expulsion de HP1du loci AP2G. En absence de HP1 pour maintenir la méthylation de H3K9, la chromatine reste dans un état euchromatique se traduisant par l'expression d'AP2G et donc à l'engagement vers la gamétocytogénèse.

1.8.2.2 Facteurs influençant l'engagement sexuel

Le plus souvent, suite à l'exposition des parasites à divers facteurs environnementaux l'engagement sexuel peut être déclenché. Plusieurs facteurs ont été identifiés montrant leur implication dans l'engagement sexuel notamment: une parasitémie élevée, une prise de médicaments antipaludiques, la présence de réticulocytes dans le sang, les toxines cholériques et un faible taux de lysophosphatidylcholine (LysoPC) dans le plasma (Trager & Gill, 1992; Meibalan & Marti, 2017; Brancucci et al., 2017; Farid et al., 2017; Josling et al., 2020; Prajapati et al., 2020; Usui et al., 2019). De tous ces facteurs, la LysoPC et la choline précurseurs de la phosphocholine (P-cho) ont été identifiés comme de puissants antagonistes de l'engagement sexuel (Brancucci et al., 2017). En effet , le locus AP2G est réduit au silence épigénétique (dépendant de l'hétérochromatine) en présence d'un taux élevé de LysoPC, mais avec un niveau plus faible de LysoPC les parasites sont plus susceptibles de s'engager dans la gamétocytogénèse (Brancucci et al., 2017). Dans la moelle osseuse, le taux de LysoPC est faible, expliquant ainsi pourquoi elle est considérée comme le site majeur de la

gamétocytogenèse chez *P. falciparum* (Joice et al., 2014; Brancucci et al., 2017). Cependant, notre compréhension sur les mécanismes moléculaires permettant cette différenciation sexuelle en réponse à ces métabolites reste incomplète. Tout récemment Harris et collaborateurs, ont montré que la présence des précurseurs de la phosphocholine (LysoPC et choline) en quantité suffisante assure le maintien de l'hétérochromatine H3K9me3 pendant la schizogonie entraînant ainsi un faible taux d'engagement sexuel (**Figure 14 A**). Lorsque ces précurseurs sont rares, l'augmentation de la synthèse *de novo de* la phosphocholine par la *phosphoethanolamine methyltransferase* (PMT) entraîne une réduction de la *S-adénosyl méthionine* (SAM) intracellulaire et une augmentation de la *S-adénosylhomocystéine* (SAH) (**Figure 14 B**). Les changements orchestrés par la SAM et la SAH vont entraîner des modifications de la méthylation des histones notamment le silence de H3K9me3. En effet, les auteurs ont montré que l'occupation de H3K9me3 au locus *Pf*ap2-g sur le chromosome 12 était suffisamment réduite dans les conditions de SAM faible, démontrant ainsi sa dépendance aux changements du SAM. La dérépression du locus *Pf*ap2-g entraîne une activation de la boucle de rétroaction transcriptionnelle favorisant ainsi l'engagement des parasites dans la différenciation sexuelle chez *P. falciparum* (Harris et al., 2022).

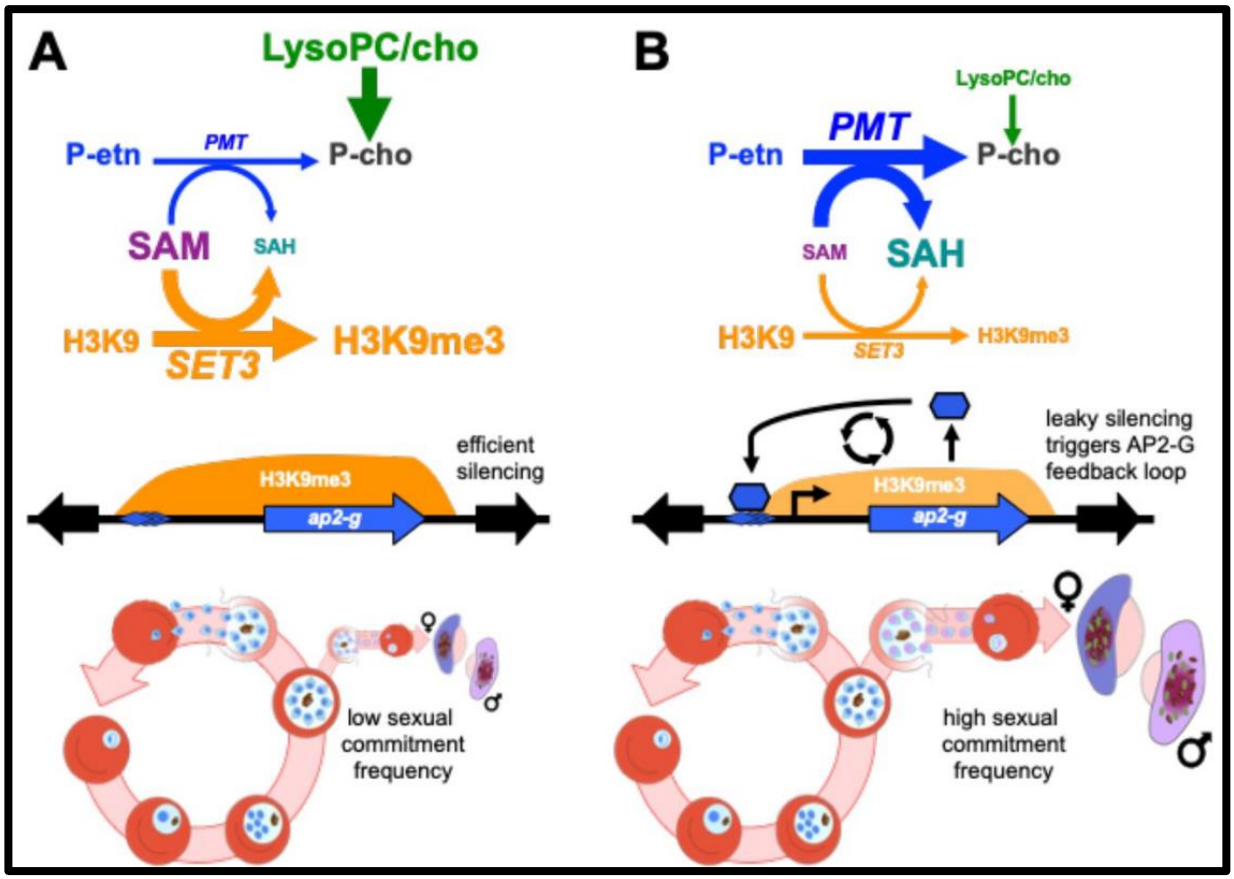


Figure 14: Contrôle du taux d'engagement sexuel par la compétition métabolique entre la phosphoethanolamine methyltransférase (PMT) et la méthylation H3K9 (Harris et al., 2022). **A)** Faible taux d'engagement sexuel lorsque les précurseurs de la phosphocholine sont élevés. **B)** Taux d'engagement sexuel élevé lorsque les précurseurs de la phosphocholine sont réduits**.**

1.8.3 Infectivité de gamétocyte de *P. falciparum*

Au cours de leur maturation, les gamétocytes subissent cinq stades de développement (I-V) morphologiquement distincts et la durée de la période de maturation des gamétocytes est estimée de 8 à 12 jours (Kapulu et al., 2015; Kengne-Ouafo et al., 2019; de Jong et al., 2020). Les stades précoces (I à IV) sont absents de la circulation sanguine, mais ils séquestrent dans les tissus profonds de la moelle osseuse en se liant aux cellules mésenchymateuses. Lors de la transition du stade IV immature au stade V mature, les érythrocytes infectés subissent une modification de leur déformabilité et ils peuvent alors quitter le microenvironnement de la moelle osseuse pour gagner la circulation sanguine (Tibúrcio et al., 2012). Les gamétocytes de stade V sont donc les seuls circulants dans le sang et pouvant être absorbés par les moustiques lors de leur repas de sang. Malgré tout, tous les porteurs de gamétocytes ne sont pas infectants pour les moustiques. L'infectivité des gamétocytes relève de nombreux facteurs de l'hôte, du parasite et du vecteur.

1.8.3.1 Facteurs de l'hôte

Parmi les facteurs de l'hôte, il a été montré que l'âge des porteurs de gamétocytes, l'immunité ou encore des facteurs génétiques influencent la transmission chez le moustique vecteur (Stone et al., 2015 ; Bousema & Drakeley, 2011; de Jong et al., 2020). La contribution de l'âge au réservoir infectieux est très importante. Des études réalisées en Afrique sub-saharienne montrent une variation de la prévalence de l'infection des moustiques en fonction de la tranche d'âge des sujets porteurs de gamétocytes, et les enfants de moins de 5 ans sont plus infectants pour les moustiques (Stone et al., 2015).

L'infection par les stades sexués chez l'hôte humain élicite des anticorps qui modulent l'infectivité des gamétocytes. L'activité bloquant la transmission a été démontrée dans des essais de gorgement de moustiques sur membrane, en comparant les niveaux d'infection entre des moustiques gorgés sur du sang total avec ceux gorgés sur du sang déplété des facteurs immuns, en remplaçant le sérum par un sérum non-immun (Boudin et al., 2004). Un panel d'antigènes associés à la réponse anticorps anti-gamétocytes a été identifié et plusieurs candidats ont montré un effet sur la transmission lors d'infections artificielles de moustiques, notamment Pfs48/45 et Pfs230 (Dantzler et al., 2019; Stone et al., 2018). Les réponses immunes contre les stades sexués sont naturellement acquises après des expositions répétées (Dantzler et al., 2019) et la durée du portage des infections est un paramètre important pour l'acquisition de cette immunité (Rodriguez-Barraquer et al., 2018; Amoah et al., 2019).

Le trait drépanocytaire est soupçonné d'avoir une importance dans la transmission chez le moustique, même si le sujet est bien moins documenté. Deux études réalisées au Burkina Faso, où les mutations HbS et HbC du gène de l'hémoglobine prévalent, ont cherché une association entre le portage des mutations de l'hémoglobine et la transmission chez le moustique (Gouagna et al., 2010; Gonçalves et al., 2017). Ces travaux ont montré que les individus porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* ayant la mutation HbC avaient une capacité accrue à infecter les anophèles. Bien que l'étude de Gonçalves et al., 2017 ne rapporte pas de résultats d'infections de moustiques avec des individus HbAS, les auteurs notent que le portage du trait drépanocytaire est associé à une prévalence d'infection par des gamétocytes plus élévée. Dans l'étude de (Gouagna et al., 2010), des gorgements *ex vivo* de moustiques sur sang de porteurs de gamétocytes montrent que les individus porteurs des allèles HbC et HbS ont un risque de 2 à 4 fois supérieur d'infecter les moustiques. Par contre, les résultats des dissections de moustiques collectés directement dans les habitations et gorgés sur des individus de génotype connu n'ont pas montré de différence, ni en terme de prévalence d'infection, ni en terme de charge oocystique, entre les repas de sang pris sur des porteurs HbAS et HbAA. Dans cette

étude, la plus forte infectivité des gamétocytes des sujets porteurs du trait drépanocytaire en condition expérimentale, n'est pas liée à la densité en gamétocytes. Déjà, auparavant, une étude réalisée au Cameroun entre 1990 et 1993 chez des individus présentant des symptômes de paludisme avait montré que les sujets HbAS infectaient 2 fois plus de moustiques que les sujets HbAA, mais que les charges oocystiques et les gamétocytémies ne différaient pas entre les 2 groupes (Robert et al., 1996). Les mécanismes qui pourraient expliquer la plus forte infectivité des gamétocytes des porteurs HbAS pour les moustiques restent encore à élucider. L'hémoglobine S pourrait avoir un effet sur la gamétocytogenèse durant la maturation des stades sexués dans la moelle osseuse (stade I à IV) (Trager & Gill, 1992) ou encore la durée plus longue des infections palustres chez les HbAS laisserait plus de chance aux sujets HbAS de porter des gamétocytes de stade V infectieux pour les anophèles (Gonçalves et al., 2017). Néanmoins, les études comparant les données parasitologiques chez des individus porteurs du trait drépanocytaire ou non sont contradictoires: les résultats des prévalences et densités en stades asexués ou sexués varient selon le statut clinique, la classe d'âge, la saison, l'appartenance ethnique ou le type d'hémoglobine (Robert et al., 1996; Aidoo et al., 2002; Crompton et al., 2008; Gouagna et al., 2010; Gonçalves et al., 2017).

1.8.3.2 Facteurs liés au parasite

En ce qui concerne les facteurs du parasite, il a été montré que le succès d'une infection est conditionné par la présence de gamétocytes matures et qu'elle est fortement liée à la densité gamétocytaire (Churcher et al., 2013, Da et al., 2015). A partir d'un certain seuil de gamétocytémie (environ 100 gamétocytes/µl), le nombre d'oocystes par moustique infecté est proportionnel à la densité gamétocytaire. Cependant, les individus asymptomatiques ont souvent des gamétocytémies faibles, parfois indétectables par microscopie, mais ils sont capables d'infecter les moustiques (Bousema et al., 2014; Slater et al., 2015; Ouédraogo et al., 2016). Les prévalences d'infection et les charges oocystiques sont dans ce cas faibles.

Le sex-ratio des gamétocytes chez l'hôte humain influence le niveau de transmission chez le moustique (Reece et al., 2008; Paul et al., 2002; Bradley et al., 2018) . Le sex-ratio est biaisé en faveur des femelles, un fait qui compense biologiquement la production de 8 microgamètes à partir d'un gamétocyte mâle. Il a été évalué qu'il faut en général 3 à 6 fois plus de gamètes femelles que de mâles pour atteindre des taux de transmission optimaux (Talman et al., 2004; Mitri et al., 2009). Le sex ratio varie selon les infections et même au cours d'une infection (R. E. Paul et al., 2000; Robert & Boudin, 2003). Il peut varier en fonction du statut hématologique de l'hôte: il croît avec l'anémie (Paul et al., 2000), ou en fonction de la composition génétique de l'infection ; il devient moins biaisé vers les femelles lorsque le nombre de clones dans une

infection augmente (Reece et al., 2008). Il a été montré que *Plasmodium* est capable d'ajuster son sex-ratio pour optimiser sa transmission, ce qui pourrait permettre d'assurer la transmission de génotypes minoritaires (Barry et al., 2021; Reece et al., 2008).

Enfin la multiplicité de l'infection (MOI) dans la population de gamétocytes, qui représente le nombre minimal de clones différents de gamétocytes co-infectant l'hôte humain, influence également l'infectivité des parasites. Une forte multi-clonalité dans les isolats de *P. falciparum* (formes sexuées et asexuées) est observée dans les zones de forte endémicité, en raison d'une exposition répétée aux piqûres de moustiques (super-infection) et du fait que la recombinaison génétique lors de la fertilisation des gamètes chez le moustique génère de la diversité (co-transmission) (Anderson et al., 2000; Das et al., 2017; Nkhoma et al., 2020; Sandeu et al., 2017; Vafa et al., 2008; Bashey, 2015). Au Cameroun, il a été observé, en condition expérimentale, que l'intensité de l'infection est plus élevée chez les moustiques gorgés sur des isolats de gamétocytes mono-infectés, mais la proportion de moustiques infectés variait peu avec la MOI (Morlais et al., 2015; Nsango et al., 2012). Dans les infections complexes, les densités en gamétocytes étaient plus faibles que dans les infections monoclonales et il a été suggéré que la complexité de l'infection pourrait être une stratégie montée par les parasites pour échapper à la réponse immunitaire du moustique. Cette hypothèse est confortée par des études fonctionnelles qui ont montré que *TEP1,* le premier facteur antiparasitaire identifié chez l'anophèle, n'exerce son activité anti-parasitaire que dans le cas d'infections simples (MOI ≤ 2) (Nsango et al., 2012). Une autre étude réalisée au Burkina Faso a plutôt observé une association positive entre la complexité de l'infection et le taux d'infection des moustiques (Barry et al., 2021). De nouvelles études sont nécessaires pour corréler l'infectivité des gamétocytes à d'autres facteurs, tels que le sex-ratio ou les génotypes des parasites, puisqu'il a été montré que les infections multiples chez l'Homme résultent majoritairement de parasites co-transmis par une même piqûre de moustique (Nkhoma et al., 2020).

1.8.3.3 Facteurs liés au vecteur

Les moustiques femelles du genre *Anopheles*, ne sont pas tous aptes à transmettre le paludisme. De part sa compétence vectorielle et sa capacité vectorielle, *An. gambiae* a été identifié comme le vecteur le plus efficace dans la transmission de paludisme en Afrique subsaharienne (Fontenille et al., 2003; Fontenille & Simard, 2004). En effet, aucours de son developpement chez le moustique, le *Plasmodium* se heurte aux barrières physiques et aux mécanismes de défense humorale ou cellulaire. Grâce à son système inné efficace le moustique est capable de combattre les infections bactériennes et parasitaires auxquelles il est confronté (Dimopoulos et

al., 1997). Comme exemple de barrière physique, nous avons la membrane périthrophique composée de glycoprotéines et de chitine qui se forme lors de la prise de repas de sang. Elle protège les cellules épithéliales de l'intestin contre les enzymes digestives et les pathogènes. Comme autre moyen de défense nous avons la réponse immunitaire humorale qui repose sur l'activation de cascades protéolytiques et conduit à la coagulation, la mélanisation ainsi qu'à la production de peptides antimicrobiens et de molécules antiparasitaires) (Hoffmann & Reichhart, 2002) . La réponse cellulaire quant à elle est impliquée dans la phagocytose, l'encapsulation et la mélanisation des parasites à travers les hémocytes (Collins et al., 1986; Paskewitz et al., 1989; Paskewitz & Riehle, 1998).

En somme, le système de défense mis en place par le moustique affecte considérablement le rendement parasitaire du cycle sporogonique entrainant ainsi la chute du nombre de parasites observée lors de la transition oocinète-oocyste.

CHAPITRE 2:

OBJECTIFS DE THESE ET DESCRIPTION DES CHAPITRES DE L'ETUDE

2.1 Contexte de l'étude

Les interventions conventionnelles de prise en charge du paludisme reposent sur le diagnostic et le traitement des sujets symptomatiques, elles négligent ainsi les porteurs asymptomatiques alors qu'ils représentent un réservoir important de parasites. En effet, les porteurs asymptomatiques sont aussi à risque d'être infectés par des gamétocytes et d'assurer la transmission. L'efficacité de la transmission repose sur de multiples facteurs et tous ne sont pas encore bien compris. L'effet de l'hétérogénéité des globules rouges tant du point de vue de la variation génétique des hôtes (groupe sanguin, hémoglobinopathies) que des stades de développement de l'érythrocyte (normocytes vs réticulocytes) a été peu exploré alors que cette hétérogénéité pourrait avoir un impact sur l'engagement sexuel et la production des stades de transmission pour les moustiques. Le rôle de facteurs génétiques tels que le trait drépanocytaire ou les thalassémies, a été démontré dans le développement des parasites asexués chez l'Homme, leur importance dans la transmission chez le moustique est bien moins documentée. D'autre part, il a été montré que le développement sexué est possible dans des cellules érythroides immatures (Neveu et al., 2020). Une étude récente a trouvé un engagement sexuel accru dans les réticulocytes dans un modèle de rongeur, suggérant ainsi qu'un sang riche en réticulocytes favoriserait l'engagement sexuel chez *P. berghei* (Hentzschel et al., 2022). Sachant que *P. falciparum* peut envahir aussi bien les normocytes que les réticulocytes, cette préférence a reçu peu d'attention dans les infections naturelles. La contribution de l'invasion des réticulocytes à la biomasse parasitaire globale et la question de savoir si les parasites asexués et sexués ont une préférence différente pour les cellules hôtes dans les infections naturelles à *P. falciparum* restent inconnues. **Dans cette étude, nous avons décidé d'explorer les paramètres du globule rouge qui peuvent influencer les traits d'histoire de vie du parasite**. Nous avons réalisé ce travail dans des infections naturelles, à partir de populations de parasites prélevées chez des enfants asymptomatiques résidant dans la localité de Mfou. Notre approche a été d'adapter des outils de pointe et de les appliquer sur ces populations naturelles de parasites pour comprendre en quoi l'hétérogénéité des globules rouges peut influencer la multiplication et la transmission de *P. falciparum.*

2.2 Objectifs de l'étude

1) **Déterminer l'influence du trait drépanocytaire sur la transmission de *P. falciparum***

Nous avons choisi d'évaluer comment le trait drépanocytaire peut influencer la transmission de *P. falciparum* en conditions naturelles au Cameroun. Nous avons comparé l'effet du portage du trait drépanocytaire sur la prévalence et la charge en parasites chez des enfants asymptomatiques puis sur l'infectivité des moustiques *An. coluzzii* après gorgement sur sang des porteurs de gamétocytes de génotype HbAA et HbAS par MFA. Cette partie a fait l'objet d'un article scientifique qui est en cours de révision à BMC ID (BMC Infectious Diseases).

2) **Etudier la relation entre l'âge des érythrocytes, l'invasion et l'engagement sexuel de *P. falciparum* dans des conditions naturelles**

Ici, nous avons déterminé les facteurs environnementaux associés à l'engagement sexuel chez *P. falciparum* en condition naturelle d'infection. Sachant qu'il n'existe pas de référence transcriptomique des rings sexuellement engagés, nous avons différencié transcriptionnellement les rings sexuellement engagés en condition de terrain en utilisant du séquençage en cellule unique (10X chromium). Sachant que peu d'études se sont intéressées à la préférence de la cellule hôte chez *P. falciparum*, nous avons déterminé la préférence de la cellule hôte pour *P. falciparum* en condition *in vivo* et *in vitro* d'une part à l'aide de la cytométrie en flux, et d'autre part nous avons déterminé si les parasites sexuellement engagés ont une préférence spécifique pour la cellule hôte à l'aide du séquençage en cellule unique (Smart-Seq2). Enfin nous avons montré que l'hétérogénéité des parasites circulants est un paramètre clé de l'infection pour la réplication et la transmission du parasite. Cette partie a également fait l'objet d'un article scientifique qui est en cours de soumission dans Science Advances.

2.3 Description des différents chapitres de l'étude

Ce manuscrit de thèse est articulé sous forme de cinq chapitres, suivis d'une discussion générale et de perspectives.

Le premier chapitre d'introduction générale, ou revue de littérature, décrit la situation du paludisme dans le monde et plus particulièrement au Cameroun, il donne des généralités sur le cycle de développement du parasite chez l'homme et le vecteur, et des moyens de lutte

actuellement mis en place pour traiter et prévenir le paludisme. Il rappelle également l'état de nos connaissances sur l'invasion de *P. falciparum* dans la cellule hôte et la préférence réticulocytaire pour le *Plasmodium* et sur la biologie de la transmission des stades sexués.

Le chapitre 2 décrit le contexte de l'étude, définit l'objectif général de l'étude et les objectifs spécifiques et enfin décrit les différents chapitres de l'étude.

Le chapitre 3 décrit la méthodologie générale de l'étude. Dans un premier temps, il décrit la méthodologie commune aux deux objectifs de thèse, ensuite il décrit la méthodologie spécifique utilisée pour atteindre chaque objectif spécifique.

Le chapitre 4 décrit l'impact du trait drépanocytaire sur la transmission de *P. falciparum,* il présente l'article intitulé: **« Influence of sickle cell trait on *Plasmodium falciparum* transmission in naturally infected gametocyte carriers ».**

Le chapitre 5 décrit la préférence réticulocytaire chez *P. falciparum* en condition *in vivo* et *in vitro* et sur les stades anneaux sexuellement engagés. Il a fait l'objet d'un article intitulé: **« *Plasmodium falciparum* preferentially invades and commits to sex in younger erythrocytes ».**

Enfin le manuscrit de thèse se conclut par une discussion générale qui permet d'aborder des perspectives de cette étude.

2.4 Déroulement de ma thèse

Au cours de ma thèse, j'ai coordonné les deux projets sur le terrain, depuis l'obtention de la clairance éthique jusqu'à la collecte des échantillons sous la supervision de Sandrine Nsango. J'ai effectué la sélection des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* pour réaliser les MFAs et comparer l'infectivité des gamétocytes pour les moustiques entre des sujets asymptomatiques HbAS et HbAA (chapitre 4).

J'ai aussi sélectionné les sujets asymptomatiques porteurs de fortes charges parasitaires à *P. falciparum* (stades asexués) pour constituer ma banque d'échantillons biologiques nécessaire à la réalisation des analyses transcriptomiques des anneaux sexuellement engagés et déterminer la préférence de la cellule hôte pour *P. falciparum* en conditions naturelles (chapitre 5).

A cause des alternances entre la France et le Cameroun, j'ai rencontré quelques difficultés durant ma thèse qui ont fait que je n'ai pas pu réaliser toutes les analyses de laboratoire. Le confinement de 2020 a aussi raccourci mon séjour en France et prolongé celui du Cameroun.

Toutefois pour être dans les délais, j'ai pu bénéficier de l'aide et du soutien de plusieurs membres du projet. La détermination du polymorphisme à *P. falciparum* à partir des marqueurs microsatellites a été réalisée par Luc Abate. La confirmation de la préférence réticulocytaire en condition *in vitro* a été réalisée par Alejandro Marin-Menendez, chercheur dans l'équipe et le scRNAseq avec la méthode Smart-Seq2 a été réalisé par Arthur Talman. La modélisation a été faite en collaboration avec Olesula S. Makinde du département statistique de l'université de technologie fédérale du Nigéria qui est spécialiste dans les modèles à inflation zéro.

CHAPITRE 3:

METHODOLOGIE GENERALE

3.1 Méthodologie commune aux deux articles

3.1.1 Approbation éthique et consentement à participer à l'étude

Pour ces différentes enquêtes nécessaires aux travaux réalisés dans cette thèse, nous avons reçu l'approbation du Comité National d'Ethique de la Recherche pour la Santé Humaine (CNERSH) respectivement N°: 2017/06/922/CE/CNERSH/SP et N°: 2020/07/1259/CE/CNERSH/SP. Une autorisation administrative de recherche et l'approbation du médecin chef de l'Hôpital de district de Mfou (SSD) respectivement N° 032/ L/ MINSANTE/ SG/ DRSPC/ SSD/ MFOU et N°002/L/MSP/SG/DRSPC/DSM ont également été obtenus préalablement aux enquêtes. Tous les patients ont été recrutés comme volontaires après qu'ils ou leurs parents aient signé un formulaire de consentement éclairé. Tous les échantillons de sang collectés ont été rendus anonymes**.**

3.1.2 Site d'étude et justification du lieu d'étude

Notre étude s'est déroulée dans le chef-lieu du Département de la Mefou et Afamba, Région du Centre au Cameroun, plus précisément dans la localité de Mfou. Distante d'environ 30 km de Yaoundé, la localité est limitée par les villages Nsimalen au Nord, Kamba au Sud, Nkolafamba à l'Est et Ngoumodou à l'Ouest (Zeukeng *et al*, 2014). Mfou est située à une altitude comprise entre 500 et 700 m, avec une superficie estimée à 3338 km^2pour une population estimée à 71373 habitants **(Figure 15)**. Le climat qui y règne est du type équatorial guinéen, caractérisé par deux saisons de pluies durant lesquelles l'intensité de la transmission est plus élevée (Août à Octobre et Avril à Juin) et deux saisons sèches (Novembre à Avril et Juin à Juillet). Le paludisme est hyper-endémique dans cette zone et la transmission est pérenne. Trois vecteurs majeurs circulent dans cette zone à savoir: *An coluzzii*, *An gambiae*, *An funestus*. La prévalence de l'infection palustre dans cette localité est estimée à plus de 50% (Mendes et al., 2008; Sandeu et al., 2017; Tuedom et al., 2021). Cependant avant ce projet, aucune étude n'avait estimé la prévalence du trait drépanocytaire dans cette localité, seule celle de la ville de Yaoundé est connue et estimée entre 25-30% (Fankam, 2015).

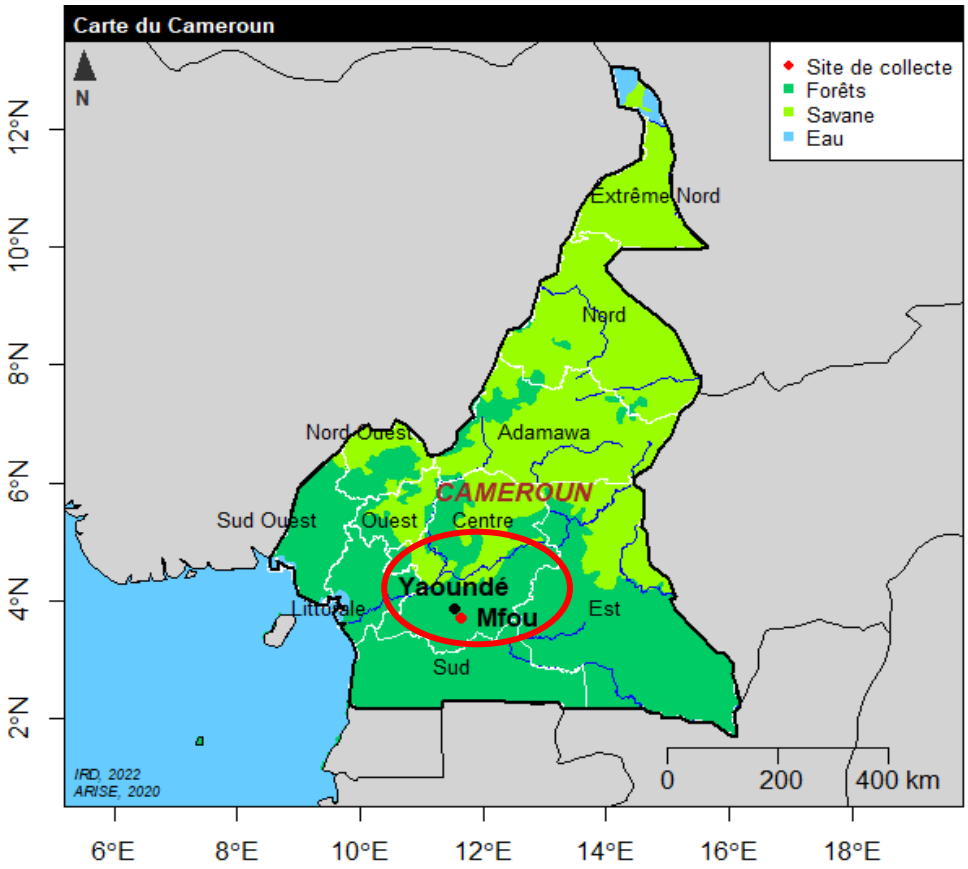


Figure 15: **Représentation de la localité de Mfou**

3.1.3 Population d'étude

Notre étude ciblait les enfants asymptomatiques, ils étaient âgés de 1 à 16 ans dans la première étude et de 4 à 14 ans dans la seconde. Ces tranches d'âge sont particulièrement sujettes aux infections palustres. La collecte des échantillons biologiques s'est déroulée de Mai 2015 à Octobre 2019 et de Juillet à Décembre 2020 durant les périodes de transmission. Elle s'est déroulée aussi bien dans les villages que dans les écoles du district de santé de Mfou, ils sont représentés sur la **Figure 16.**

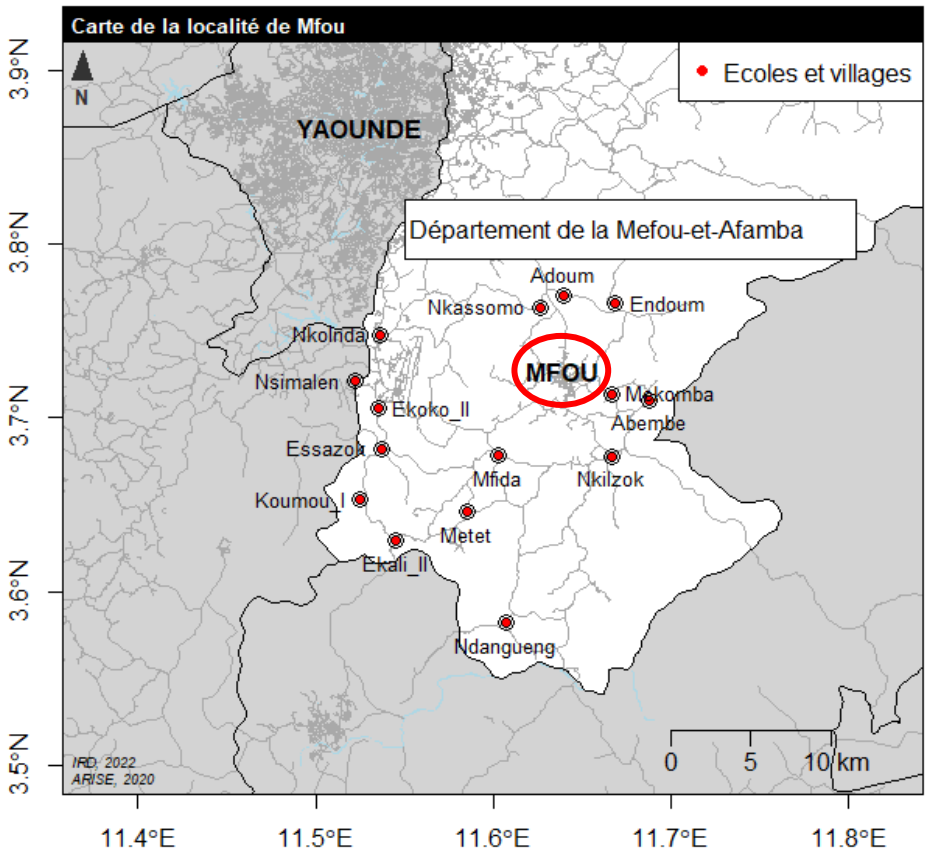


Figure 16: Différents villages et écoles du district de santé de Mfou

3.1.4 Collecte de sang chez les enfants asymptomatiques et porteurs de gamétocytes – 2017 (Article 1)

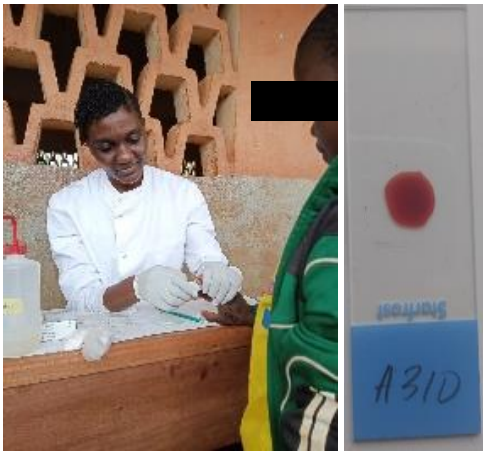
Avant les prélèvements, une note d'information portant le calendrier de passage dans les différents villages a été adressée aux différents chefs de village ainsi qu'aux parents des enfants afin de leur présenter et expliquer les objectifs de l'étude. Cette note nous a permis par la même occasion, de recevoir les consentements parentaux pour les prélèvements sanguins. Seuls les enfants ayant présenté le consentement parental dûment signé et répondant aux critères d'inclusion ont été inclus dans notre enquête (âgés de 1 à 16 ans ; absence de symptômes liés au paludisme). Les prélèvements sanguins (piqûre digitale et ponction veineuse pour les porteurs de gamétocytes) ont été réalisés par un personnel médical qualifié. Afin d'assurer l'anonymat des patients, les noms des patients ont été remplacés par des codes, et les données recueillies ont été strictement utilisées dans le cadre des objectifs définis dans ce travail. Les participants ont tous été diagnostiqués gratuitement aussi bien pour la malaria que pour le trait drépanocytaire. Les patients positifs à *Plasmodium sp* et présentant un paludisme simple ont été pris en charge gratuitement et traités avec un dérivé de l'artémisinine (ACTs), l'Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) comme le recommande le Programme National de Lutte contre le

Paludisme au Cameroun (PNLP). Les porteurs de gamétocytes quant à eux ont bénéficié gratuitement d'une moustiquaire imprégnée à longue durée d'action (MILDA).

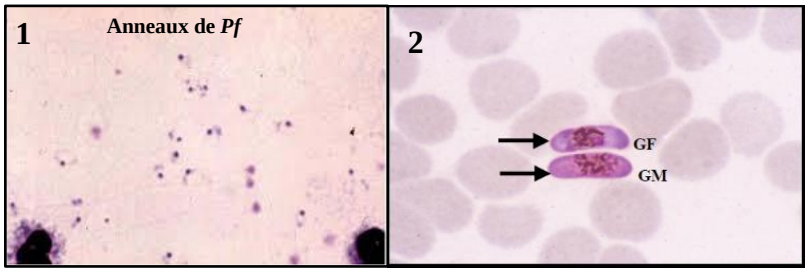
Le diagnostic biologique a été réalisé par la technique de goutte épaisse pour identifier les porteurs de trophozoïtes et de gamétocytes de *Plasmodium*. Les lames confectionnées sur le terrain ont été séchées à température ambiante et conservées dans des boîtes de rangement puis ramenées au Laboratoire de Recherche sur le Paludisme (LRP) de l'OCEAC. Une fois au laboratoire, les lames ont été immédiatement colorées au Giemsa dilué au 1/10ième dans de l'eau tamponnée pendant 20 minutes. Après rinçage, les lames ont été lues au microscope optique dans une goutte d'huile à immersion à l'objectif X100 **(Figure 17).** La lecture rapide semi-quantitative nous a permis de diagnostiquer les individus positifs à *Plasmodium* pour une prise en charge thérapeutique rapide des patients sur le terrain, et les résultats ont été notés sous forme de croix comme suit (Chouvalova, E., 1984) :

- 0 : absence d'anneaux /traversée (0 anneau/µl)
- + : 1- 10 anneaux /traversée (1 à 50 anneaux/µl)
- ++ : 10- 20 anneaux /traversée (51 à 500 anneaux/µl)
- +++ : 1- 10 anneaux /champ (501 à 5000 anneaux/µl)
- ++++ : 11- 100 anneaux /champ (5 001 à 50 000 anneaux/µl)
- +++++ : > 100 anneaux /champ (> 50 000 anneaux/µl)

La lecture quantitative a été effectuée au Laboratoire de Recherche sur le Paludisme (LRP) de l'OCEAC avec l'assistance d'autres techniciens microscopistes qualifiés. Elle a permis d'estimer les densités parasitaires (stades anneaux et gamétocytes) par comptage des parasites par rapport à 1000 globules blancs. En estimant que la leucocytémie moyenne est de 8000 globules blancs (GB)/µl de sang, on a pu estimer les charges parasitaires par microlitre de sang ((Nombre de parasites comptés/1000GB) x 8000GB). Les porteurs de gamétocytes ont ainsi été sélectionnés pour le gorgement direct sur membrane des moustiques. Les gorgements ont été réalisés à partir du sang veineux prélevé au pli du coude en tube vacutainer.



A : Confection des gouttes épaisses



B: Identification microscopique des stades de *Pf*.

GF= Gamétocyte femelle **; GM =** Gamétocyte mâle

Figure 17: **Sélection des porteurs de gamétocytes dans les écoles de Mfou**

A et B2 : Image prise au LRP **B1 :** Image du papier de (Duong & Richard-Lenoble, 2008)

Simultanément aux gouttes épaisses confectionnées, 3 à 4 gouttes de sang ont été recueillies sur papiers buvards de type *Whatman FTA Elute et* grade 17, respectivement pour l'identification des différentes espèces de *Plasmodium* et la détermination du statut hémoglobinique de chacun des participants. Les papiers préalablement codifiés ont été séchés pendant au moins 8h à température ambiante puis à l'étuve au laboratoire (37°C), à l'abri de la poussière et de l'humidité, et conservés hermétiquement à température ambiante dans un bocal contenant du silicagel.

3.1.5 Collecte de sang chez les enfants asymptomatiques porteurs des stades asexués – 2020 - (Article 2)

Avant de commencer le screening dans une école ou un village, une note de sensibilisation était envoyée aux autorités administratives du village (chef de village) et des écoles (directeur) afin de prévenir la population que nous viendrons la semaine d'après nous pour prélever les enfants âgés de 4-15 ans. Le premier jour, nous confectionnons des gouttes épaisses chez tous les enfants pour lesquels nous avons obtenu le consentement éclairé de leur parent ou de leur tuteur. Les lames étaient ensuite ramenées au laboratoire du Centre Pasteur du Cameroun (CPC) pour une lecture microscopique. Nous avons quantifié les charges parasitaires, en estimant la leucocytémie moyenne de chaque individu à 8000GB/µl de sang. Après quantification de ces lames sur 200 GB, les sujets présentant une parasitémie supérieure à 5000 anneaux de *P. falciparum*/µl de sang étaient enrôlés pour la suite de l'étude. Le lendemain du screening, nous retournons sur le terrain d'une part pour sélectionner les sujets répondant à nos critères d'inclusion (parasitémie supérieure à 5000tropho/µl de sang; ne pas avoir pris un ACT dans les deux semaines précèdant l'étude, résider dans la zone d'étude; être âgé de 4 à 15 ans, ne présenter aucun signe clinique du paludisme et avoir reçu le consentement

éclairé signé du tuteur ou parent), et d'autre part pour administrer un traitement ACT à tous les enfants infectés par *Plasmodium*.

Un prélèvement veineux sur tube EDTA (Ethylène diamine tétra-acétique) a été effectué à chaque sujet enrôlé dans l'étude, soit environ 8 ml (deux tubes de 4 ml de sang). Les tubes ont été rapidement acheminés au laboratoire du CPC. Un tube EDTA a été centrifugé à 2200 g pendant 15 min, afin de recueillir le plasma pour les analyses protéomiques. Le culot restant a été aliquoté dans un tube *Eppendorf* pour le diagnostic d'espèce plasmodiale. Le deuxième tube EDTA nous a permis de confectionner à partir du sang total, des lames de contrôle à J0, d'effectuer des aliquots de sang pour l'extraction d'ARN et enfin de préparer des échantillons pour le séquençage de l'ARN en cellule unique (ScRNAseq).

3.1.6 Identification du statut hémoglobinique par la PCR –RFLP

3.1.6.1 Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait au Chelex 100 (Biorad) à partir du papier *Whatman grade 17* en adaptant le protocole de Plowe, 1995. Le protocole consiste à plonger 12 mm de punch de papier buvard imbibé de sang dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant une solution de PBS 1X/0,25g de saponine, ce qui va permettre la lyse de la membrane cellulaire. Ensuite nous avons homogénéisé par inversion 2 à 3 fois les tubes avant de les incuber toute une nuit à 4°C. Le lendemain, le surnageant a été retiré, le papier lavé avec 1 ml de PBS puis incubé pendant 30 minutes à 4°C. Parallèlement, nous avons préparé dans un autre tube Eppendorf, 200 µl d'une solution contenant 50 µl de Chelex 100 diluée à 20% et de 150 µl d'eau distillée. Après incubation, chaque papier buvard a été transféré dans la solution de Chelex, vortexé 30 secondes et chauffé pendant 20 minutes à 100°C sur une plaque chauffante. Après refroidissement jusqu'à 75°C, les échantillons ont été vortexés 30s, suivi d'une centrifugation à 10000 g pendant 2 minutes, et le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube puis conservé à – 20°C pour la détermination du statut hémoglobinique.

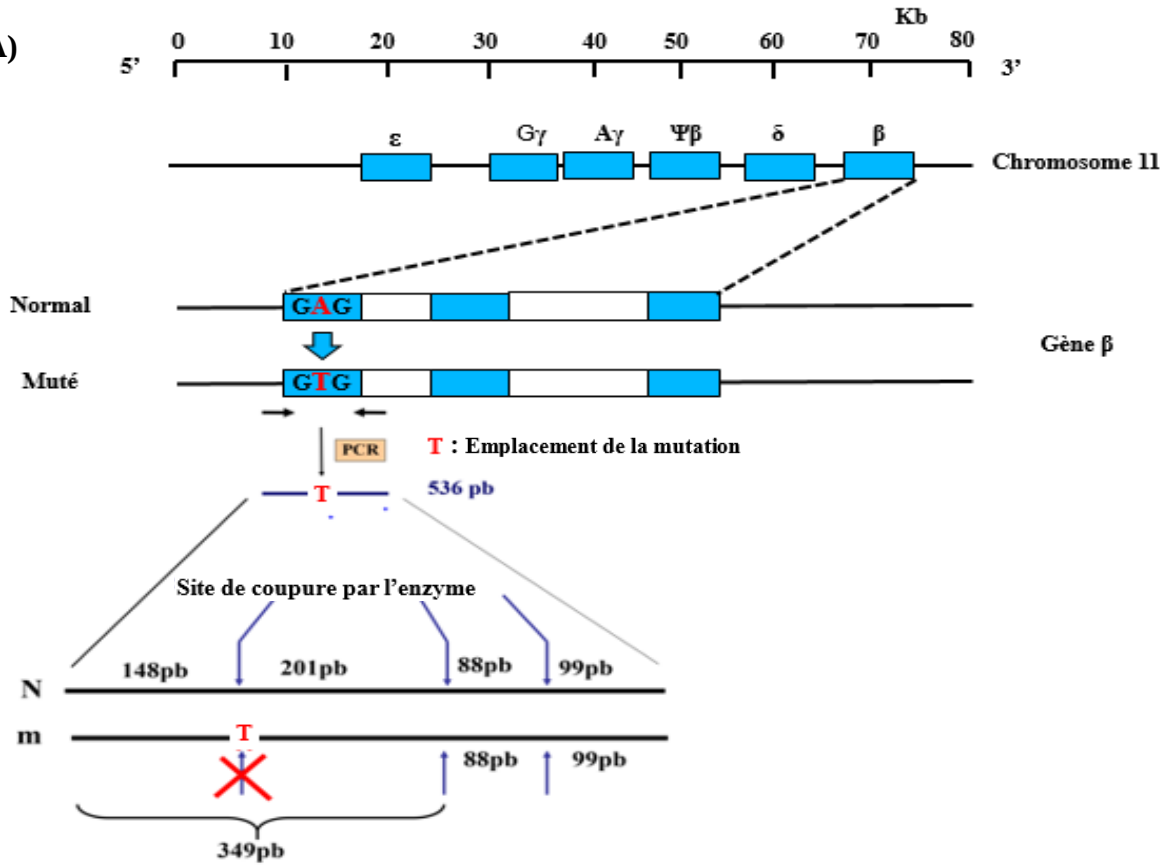
3.1.6.2 Amplification de l'ADN (PCR) et digestion enzymatique

La méthode d'analyse utilisée est la PCR-RFLP. Après l'extraction d'ADNg elle s'est déroulée en deux étapes successives dont la première consistait à amplifier les séquences cibles par PCR, et la deuxième à la digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction spécifique Eco81l (Bsu36I) qui reconnait de manière spécifique la mutation GAG-GTG sur le codon 6 du gène codant l'hémoglobine, suivie d'une révélation par électrophorèse sur gel d'agarose étalonné avec un marqueur de poids moléculaire.

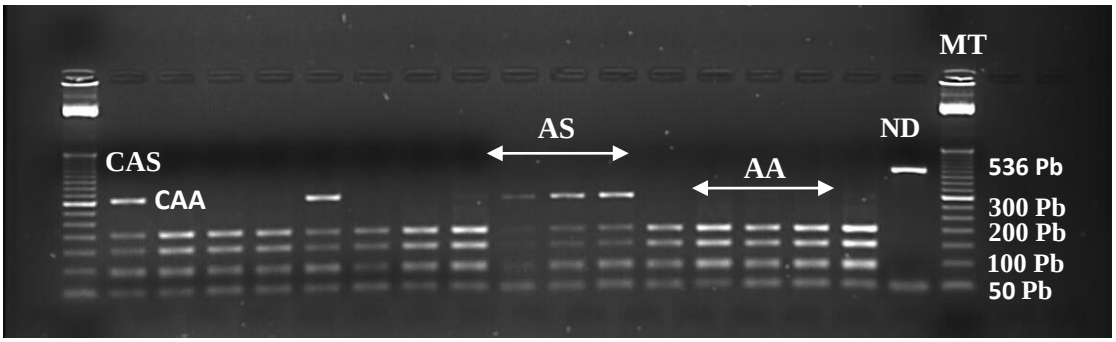
Le génotypage de la mutation au niveau de la chaîne bêta de l'hémoglobine a été adapté du protocole de Saiki et al., 1988.Un volume de 2 µl d'ADN de chaque échantillon a été amplifié dans un volume final de 25µl de milieu réactionnel . La préparation du mélange réactionnel s'est effectuée à l'ai de du kit 2X Hot-start PCR Master Mix (biotechrabbit) et de 0.4µM de chaque amorce spécifique (F: 5'GGTTGGCCAATCTACTCCCAG 3'; R: 5' ACACAACTGTGTTCACTAGC 3'). Les conditions d'amplification étaient les suivantes : une pré-dénaturation de 5 min à 94°C, 40 cycles comprenant 30s de dénaturation à 94°C, 30s d'hybridation à 58°C et 30s d'élongation à 72°C, et enfin d'une élongation terminale de 5 min à 72°C. Après amplification, nous avons procédé à la révélation par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% à l'aide du Gelred et la lecture du gel a été faite sur un transilluminateur (Biocapt).

L'amplicon (536bp) a été digéré avec l'enzyme Eco81l (Bsu36I) (Thermo Fisher). Un mélange réactionnel de 15 µl contenant 8 µl d'amplicon, 1,5µl tampon 1X et 0,5µl d'enzyme de restriction Eco 81I à 0,5U et 5µl d'eau pure a été incubé toute la nuit à 37°C. Le lendemain, les échantillons ont été migrés sur un gel d'agarose à 2%. Les produits de disgestion ont été visualisés à l'aide d'un transilluminateur sous lumière UV. Le gène HBB normal (AA) contient 3 sites de restriction et on obtient ainsi 4 fragments de tailles respectives 201, 148, 99 et 88 pb. La mutation (SS) survient sur l'un des sites de restriction et l'enzyme ne coupe le fragment qu'au niveau des 2 autres sites de restriction pour obtenir ainsi 3 bandes de tailles 349, 99 et 88 pb. Si l'individu est hétérozygote (AS), le clivage va générer 5 fragments de tailles 349, 201, 148, 99 et 88 pb (**Figure 18**).

A)



B)



MT: Marqueur de taille **CAS:** Contrôle AS **CAA:** Contrôle AA **ND:** Non digéré

Figure 18: Principe de digestion enzymatique avec l'enzyme Bsu 36I adapté de (Buziarsist et al., 2007) **(A)** et profils de digestion sur gel d'agarose des différents génotypes hémoglobiniques **(B)**

3.2 Méthodologie utilisée pour montrer l'impact du trait drépanocytaire sur la transmission (Article 1)

3.2.1 Identification des espèces plasmodiales

3.2.1.1 Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait à partir du papier buvard *FTA Elute* suivant le protocole de Song *et al*, 2013 (Song et al., 2013). La carte *FTA Elute* est imprégnée d'une chimie brevetée qui lyse les cellules, dénature les protéines et permet une meilleure protection des acides nucléiques dans les fibres du papier. Le protocole est décrit ainsi : un punch de 6 mm de papier buvard *FTA* Elute imbibé de sang a été introduit au fond d'un tube *Eppendorf* stérile d'environ 1,5 ml. Le punch de sang a ensuite été lavé avec 500 µl d'eau distillée stérile en vortexant 3 fois pendant 5 secondes. A l'aide d'une pince fine stérile, chaque punch a été retiré de l'eau de lavage et transféré dans un nouveau tube de 1,5 ml où 100 µl d'eau distillée ont été ajoutés. Les tubes ont été centrifugés à 2000 tr/min pendant 5 secondes puis incubés au bain-marie pendant 30 min à 95°C. Après incubation, chaque tube a été vortexé 60 fois, puis centrifugé 30 secondes à 2000 tr/min. L'extrait d'ADN a été récupéré et conservé à – 20°C pour l'identification des espèces de *Plasmodium.*

3.2.1.2 Amplification de l'ADN par PCR multiplex

L'amplification de l'ADN a été réalisée par PCR multiplex, qui permet d'identifier les quatre espèces plasmodiales en une seule réaction. Elle cible les séquences spécifiques de l'espèce dans les gènes de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal. Le protocole a été établi par Padley *et al*, (Padley et al., 2003). La séquence de l'amorce reverse que nous avons utilisé était spécifique aux quatre espèces de *Plasmodium* (5'- GTA TCT GAT CGT CTT CAC TCC C-3') et les séquences des amorces forwards étaient spécifiques à chaque espèce: *P. falciparum* (-5' AAC AGA CGG GTA GTC ATG ATT GAG- 3'), *P. ovale* (- 5' CTG TTC TTT GCA TTC CTT ATG- 3'), *P. malariae* (- 5' CGT TAA GAA TAA ACG CCA AGC G -3'), *P. vivax* (-5' CGG CTT GGA AGT CCT TGT -3'). La préparation du mélange réactionnel s'est effectuée à l'aide du kit commercial Platinum^{TM} Hot Start PCR 2X Master Mix (Invitrogen), qui contient un tampon, 1,5mM de MgCl2, 0.2mM de chaque dNTP et une HotStart Taq DNA polymerase. Pour préparer le mélange réactionnel nous avons utilisé 15 pmol d'amorce reverse, 15 pmol d'amorce de *P. falciparum*, 17.5 pmol d'amorce de *P. ovale* et de *P. malariae*, 7.5 pmol d'amorce de *P. vivax* et 5 µl d'extrait d'ADN dans un volume final de 25µl. Le programme d'amplification commençait par une pré-dénaturation pour activer la HotStart Taq DNA polymerase (95°C – 15 min), suivie d'une dénaturation proprement dite (95°C – 45 s), d'une

hybridation (60°C- 1 min 30s) pendant 43 cycles et enfin d'une élongation (72°C – 5 min). La révélation s'est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% à l'aide du Bromure d'éthidium (EtBr). Les tailles attendues étaient de 276 bp pour *P. falciparum*, 300 bp pour *P. vivax*, 375 bp pour *P. ovale* et 412 bp pour *P. malariae*.

3.2.2 Polymorphisme à *P. falciparum*

3.2.2.1 Filtration des gamétocytes

Dans le but d'isoler les gamétocytes de *P. falciparum*, nous avons filtré le sang des porteurs de gamétocytes selon le protocole établit par Ribaut *et al*, 2008 (Ribaut et al., 2008). La filtration a été réalisée à l'aide du système MACS (Miltenyi Biotec) sur colonne LD constituée de billes magnétiques. Ces colonnes ont la particularité de faciliter l'adsorption des gamétocytes, contenant de l'hémozoïne, sous un champ magnétique. Lors de la filtration, les trophozoïtes dépourvus de pigment malarique seront lavés et les gamétocytes seront récupérés par élution après avoir décroché la colonne LD du support aimanté.

Avant de commencer la filtration proprement dite, il y a une étape de préparation de la colonne qui consiste à fixer la colonne LD au niveau de la base aimantée du système MACS, puis l'équilibrer avec 2 ml de PBS 1X à pH= 7.4. Parallèlement, 3 ml de sang du porteur de gamétocytes sont prélevés dans un tube EDTA, puis centrifugés à 2000 tr/min pendant 3 min, et le plasma est délicatement retiré à l'aide d'une pipette. Les 2 ml de culot globulaire ainsi obtenu sont lavés avec 2 ml de PBS 1X, puis mélangés par inversion et centrifugé de nouveau à 2000 tr/min pendant 3min. Après centrifugation, le surnageant est retiré et le culot est repris dans 2 ml de PBS 1X. Le mélange est enfin transféré dans la colonne, avant la fin du lavage au PBS afin d'éviter la présence des bulles d'air dans la colonne. Dès l'apparition d'une coloration rose à la sortie de la colonne, un tube de 6 ml est placé sous la colonne afin de récupérer la fraction contenant les trophozoïtes (**Figure 19)**. Une fois que la colonne est vidée, le tube est retiré et la colonne est lavée avec du PBS 1X jusqu'à ce que le liquide devienne transparent à la sortie. La colonne est ensuite décrochée du support aimanté et placée au-dessus d'un nouveau tube de 6 ml, 4 ml de PBS 1X sont ajoutés afin d'éluer les gamétocytes. La colonne est alors purgée délicatement avec un piston afin de récupérer la totalité des gamétocytes. Après centrifugation à 2000 tr/min pendant 5min, le surnageant est retiré à l'aide d'une pipette, et le culot contenant les gamétocytes est repris dans 50 µl de PBS 1X et conservé à -20°C pour une extraction d'ADN au kit Qiagen.

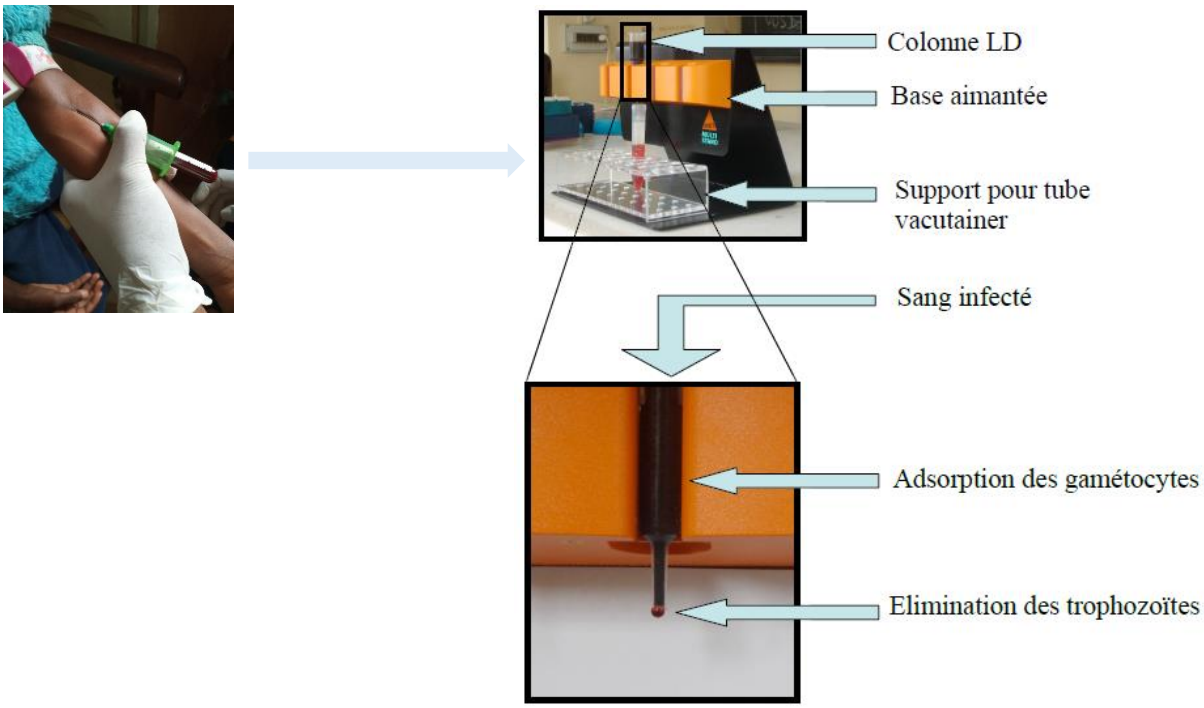


Figure 19: Prélèvement veineux et dispositif de filtration de gamétocytes (LRP,OCEAC)

3.2.2.2 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des gamétocytes précédemment purifiés a été réalisée à l'aide du kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) au laboratoire MIVEGEC-IRD de Montpellier. L'ADN purifié a été élué dans un volume de 100 µl et les extraits obtenus ont été conservés à -20°C.

3.2.2.3 Génotypage à l'aide des marqueurs Microsatellites

Cette partie a été réalisée par Luc Abate à MIVEGEC, Montpellier durant un de mes séjours au Cameroun.

Sept marqueurs microsatellites ont été utilisés (**Tableau 1**) (Anderson et al., 2000; Annan et al., 2007) pour le génotypage. Pour chaque locus, l'ADN du parasite a été amplifié par une PCR nichée au moyen de deux couples différents d'amorces. La première PCR était réalisée avec des amorces non marquées. Le mélange réactionnel s'est effectué dans un volume final de 15 µl avec un tampon 1X, 1Mm Mgcl2, 0.2 mM dNTP, 1.5 pmole de chaque amorce F et R1 (**Tableau 1**), 1U de la Taq 5' et 2 µl d'ADN. Le programme d'amplification commençait par une pré-dénaturation (94°C – 3 min), suivie d'une dénaturation proprement dite (94°C – 30 s), de deux étapes d'hybridation (42°C-30s et 40°C-30 s), d'une élongation (68°C-40 s) pendant 25 cycles et enfin d'une élongation terminale (68°C – 2 min). La deuxième PCR s'est effectuée

avec une amorce marquée par un fluorochrome. Le mélange réactionnel s'est effectué dans un volume final de 15 µl avec un tampon 1X, 0.7 Mm Mgcl2, 0.2 mM dNTP, 4 pmoles de l'amorce F et 2 pmoles de l'amorce marquée R2 (**Tableau 1**), 1U de la Taq 5' et 1.5 µl d'ADN. Le programme d'amplification commençait par une pré-dénaturation (94°C – 3 min), suivie d'une dénaturation proprement dite (94°C – 30 s), une étape d'hybridation (45°C-20s), d'une élongation (68°C-40 s) pendant 27 cycles et enfin d'une élongation terminale (68°C – 2 min). Après la PCR nichée, les produits de PCR sont regroupés en 2 mélanges (A et B), à savoir les marqueurs P20, 22, 24 et 25 d'une part pour le pool A et P21, 23 et 26 d'autre part pour le pool B (selon les couleurs des fluorochromes). Pour la constitution de ces pools, une dilution au 1/100ieme des produits de PCR est effectuée soit, 1 µl de chaque marqueur plus 96 µl d'eau pour le pool A et 97 µl d'eau pour le pool B. Un volume de 13,9µl de dénaturant (Hi-di formamide) est introduit dans chaque puit des plaques de séquençage, puis 0,1 µl du marqueur de taille (GS Liz 500) et 1 µl de produit PCR mélangés (mélange A et B séparément). Une étape de dénaturation s'est effectuée à 95°C pendant 3 minutes et la plaque a été conservée sur glace pendant 5minutes. Les plaques ont été passées sur séquenceur 16 capillaires ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems). Les résultats sont ensuite analysés grâce au logiciel GeneMapper (Applied Biosystems). La taille des fragments est déterminée par rapport à un standard de taille (GeneScan Liz-500). Les différents génotypes contenus dans un échantillon sont identifiés selon la taille des fragments pour chaque locus microsatellite. Les gamétocytes étant des stades haploïdes, chaque allèle correspond à un génotype. La multiplicité d'infection est déterminée par le nombre maximum d'allèles au locus le plus polymorphe.

Tableau 1: Caractéristiques des loci de microsatellites utilisés pour la variabilité génétique de *P.falciparum*

Marqueurs (Localisation)	Amorces	Séquences des amorces 5' →3' et couleur de fluorochrome	Taille de bandes	Pool et fluorochrome
Poly (Chromosome4)	P20 F	AAA ATA TAG ACG AAC AGA	130-186	*a* FAM - bleu
	P20 R1	ATC AGA TAA TTG TTG GTA		
	P20 R2 (fluo)	**GAA ATT ATA ACT CTA CCA**		
TAA60 (Chromosome13)	P21 F1	CTC AAA GAA AAA TAA TTC	70-88	*b* FAM- bleu
	P21 R	AAA AAG GAG GAT AAA TAC AT		
	P21 F2 (fluo)	**TAG TAA CGA TGT TGA CAA**		
ARA2 (Chromosome11)	P22 F1	GTA CAT ATG AAT CAC CAA	57-84	*a* VIC - vert
	P22 R	GCT TTG AGT ATT ATT AAT A		
	P22 F2 (fluo)	**GAA TAA ACA AAG TAT TGC T**		
Pf377 (Chromosome12)	P23 F	GAT CTC AAC GGA AAT TAT	92-104	*b* NED - jaune
	P23 R1	TTA TGT TGG TAC CGT GTA		
	P23 R2 (fluo)	**TTA TCC CTA CGA TTA ACA**		
PfPK2 (Chromosome12)	P24 F	CTT TCA TCG ATA CTA CGA	160-207	*a* NED- jaune
	P24 R1	CCT CAG ACT GAA ATG CAT		
	P24 R2 (fluo)	**AAA GAA GGA ACA AGC AGA**		
TAA87 (Chromosome 6)	P25 F1	ATG GGT TAA ATG ACG TAG A	89-119	*a* PET- rouge
	P25 R	ACA TGT TCA TAT TAC TCA C		
	P25 F2 (fluo)	**AAT GGC AAC ACC ATT CAA C**		
TAA109 (Chromosome 6)	P26 F1	TAG GGA ACA TCA TAA GGA T	151-194	*b* VIC- vert
	P26 R	CCT ATA CCA AAC ATG CTA AA		
	P26 F2 (fluo)	**GGT TAA ATC AGG ACA ACA T**		

Fluo = Fluorochrome utilise pour la deuxième PCR; **a and b** = pool A et pool B pour la constitution des mélanges

3.2.3 Infections expérimentales à partir du sang des porteurs de gamétocytes (MFA)

Les infections expérimentales ont été réalisées par gorgement de moustiques femelles sur sang de porteurs de gamétocytes à travers une membrane de Parafilm Membrane Feeding Assay (MFA) (Rutledge et al., 1964).

3.2.3.1 Elevage de la souche Ngousso au laboratoire

La souche Ngousso (*An coluzzii*) est maintenue depuis 2006 à l'insectarium de l'OCEAC. L'élevage des adultes au quotidien s'effectue dans les cages et celle des larves dans les bacs en plastique contenant une eau de source du quartier Simbock à Yaoundé (schéma récapitulatif de l'élévage à la **Figure 21**). Les femelles adultes maintenues dans les cages sont nourries tous les 3 jours sur lapin **(Figure 20, C**). Le troisième jour après avoir gorgé les

femelles, nous introduisons un pondoir (boite de pétri contenant le coton imbibé d'eau et du papier filtre) dans la cage des femelles. Le lendemain nous retirons juste le papier filtre contenant les pontes que nous conservons dans une nouvelle boite de pétri, ensuite nous ajoutons un nouveau papier filtre dans la boite de pétri qui est dans la cage car les moustiques pondent successivement sur deux jours (**Figure 20, A)**. Le jour suivant, nous effectuons une mise en eau des pontes, ce qui consiste à mettre les papiers filtres imbibés des œufs à éclore dans un bac à larve rempli de l'eau de source **(Figure 20, B)**. Le bac est ensuite étiqueté (date de mise en ponte) et une quantité fine de TetraMin Baby® (poudre alimentaire constituée de protéines (46%), matières grasses (11%), cellulose (2%), vitamine et sels minéraux) est ajoutée afin de nourrir les larves. Le lendemain, nous avons divisé les larves dans environ 20 bacs contenant 2litres d'eau de source et ajouté une quantité de TetraMin en s'assurant que les conditions d'élevage sont respectées (température, 27°C±2 ; Humidité, 85%±5). Les larves évoluent progressivement par mue en larves de stade II, III puis pour donner des larves de stade IV au bout de 8 jours environ. Dès l'apparition des premières nymphes issues des larves de stade IV, elles sont triées et réparties dans des pots de 50 ml remplis d'environ 40 ml d'eau de source. Ces pots sont mis dans des cages de 30cm de côté, recouvertes de tulle moustiquaire à mailles fines. L'émergence survient 24 à 48 heures plus tard et les adultes émergents sont maintenus à l'insectarium à une température comprise entre 27-28°C et une hygrométrie comprise entre 80-90%. Ces moustiques s'alimentent sur un coton imbibé de glucose à 5% déposé dans les cages jusqu'au jour précédent le gorgement expérimental **(Figure 20)**.

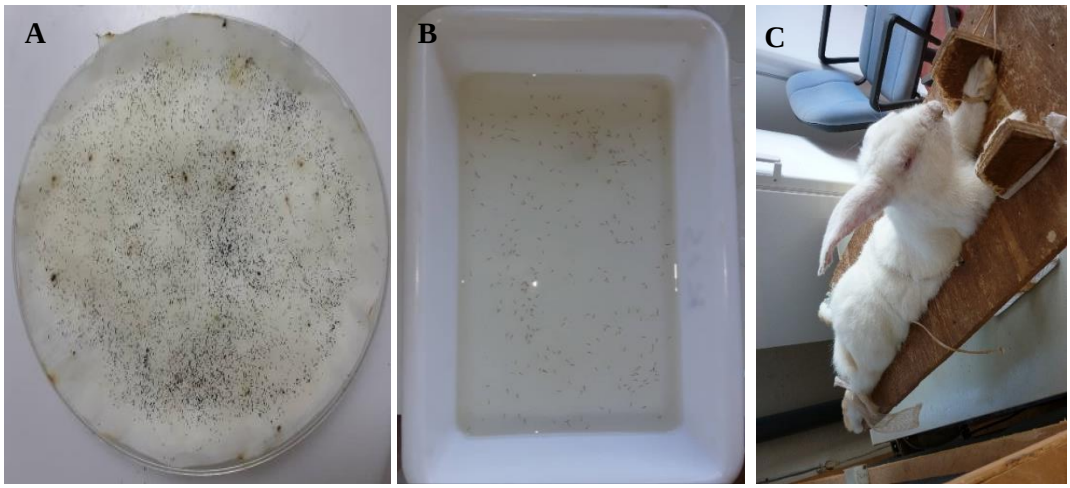


Figure 20: Elévage de la souche Ngousso à l'OCEAC au Cameroun

A = Œufs d'anophèles pondus dans une boite de Pétri contenant du coton humide recouvert du papier filtre; **B =** Larves dans un bac d'élevage ; **C =** Gorgement des femelles sur lapin pour assurer la production.

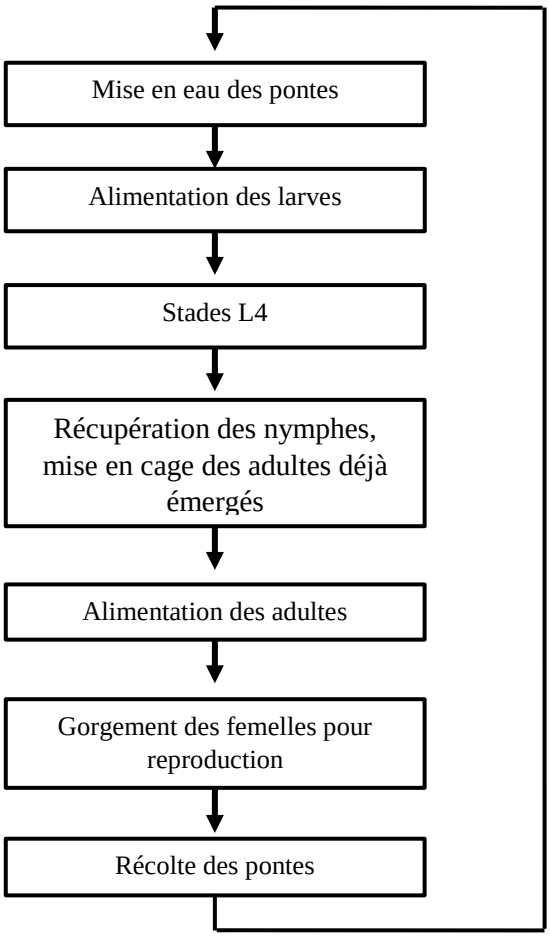


Figure 21: Schéma récapitulatif du processus d'élevage de la souche Ngousso (adapté du manuel du LRP,OCEAC/IRD)

3.2.3.2 Description du dispositif de gorgement

Le dispositif utilisé était celui décrit par Rutledge *et al.*, 1964 et adapté par Ponnudurai et *al.*,1989 (Rutledge et al., 1964; Ponnudurai et al., 1989) . Ce dispositif est constitué de cellules de gorgement en verre fixées sur une tige métallique (**Figure 22**). Cette tige permet d'ajuster la hauteur des cellules par rapport aux pots de gorgement. Chaque cellule de gorgement comprend deux circuits : un circuit externe pour l'introduction du sang et un circuit interne de régulation thermique. Ce dispositif est maintenu à une température de 37°C par un courant d'eau chaude en provenance d'un bain-marie. La partie basale de chaque cellule de gorgement est recouverte par une membrane Parafilm® tendue au maximum. Le dispositif est mis en marche 30 mn avant le début de l'expérience. La veille, les cotons imbibés de jus sucrés sont retirés des cages de moustiques afin d'affamer les femelles et d'augmenter ainsi le taux de gorgement.

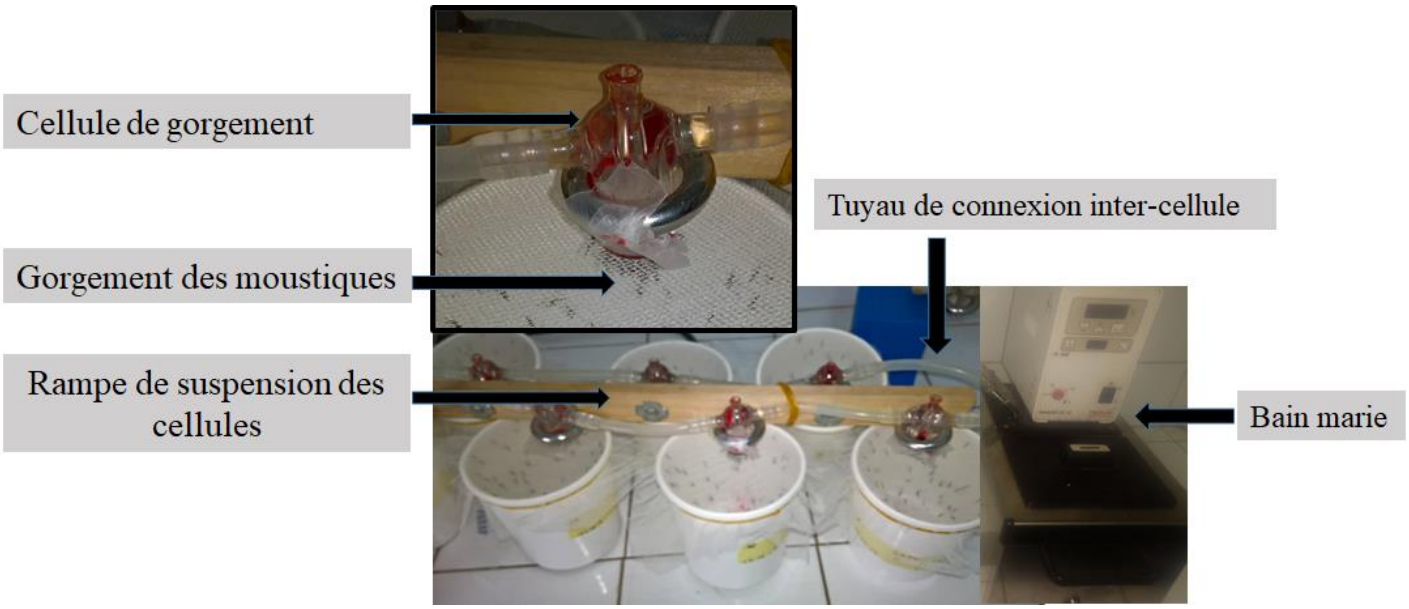


Figure 22: Dispositif d'infection expérimentale

3.2.3.3 Gorgement des moustiques

Les femelles adultes sont sélectionnées le troisième ou le quatrième jour après l'émergence pour les infections expérimentales. Elles sont réparties par lots de 80 à 100 dans des gobelets en carton de 250 ml recouverts de tulle moustiquaire. Pour la comparaison de l'infectivité des porteurs de gamétocytes entre individus HbAA et HbAS, nous avons gorgé les moustiques selon trois conditions (sang total ; sang autologue et sang reconstitué avec du plasma naïf AB). A partir d'un volume de 3ml de sang prélevé en un tube hépariné au pli du coude chez le porteur de gamétocytes, nous avons gorgé les moustiques selon 3 conditions (**Figure 23)** :

- **Sang total (ST):** 400 µl de sang, directement introduit dans une cellule de gorgement après le prélèvement.
- **Sang autologue (OWN) :** ici, le tube de sang a été centrifugé à 37°C pendant 5 mn à 2000 trs/mn pour séparer le plasma du culot globulaire. Des volumes égaux (200 µl) de culot globulaire et plasma ont ensuite été mélangés pour reconstituer le sang. Cette condition sert de contrôle pour le sang AB, elle sert à vérifier que la centrifugation n'a pas déclenché une exflagellation des gamétocytes.
- **Sang reconstitué AB :** Ici, aux 200 µl de culot globulaire une quantité équivalente de sérum témoin (200 µl) non immun de groupe sanguin AB provenant du centre de transfusion sanguine de Montpellier. Cette condition permet de mesurer l'infectivité des gamétocytes en s'affranchissant des facteurs immuns contenus dans le plasma du donneur de gamétocytes, facteurs immuns pouvant bloquer le développement sporogonique du parasite chez le moustique (Boudin et al., 2005).

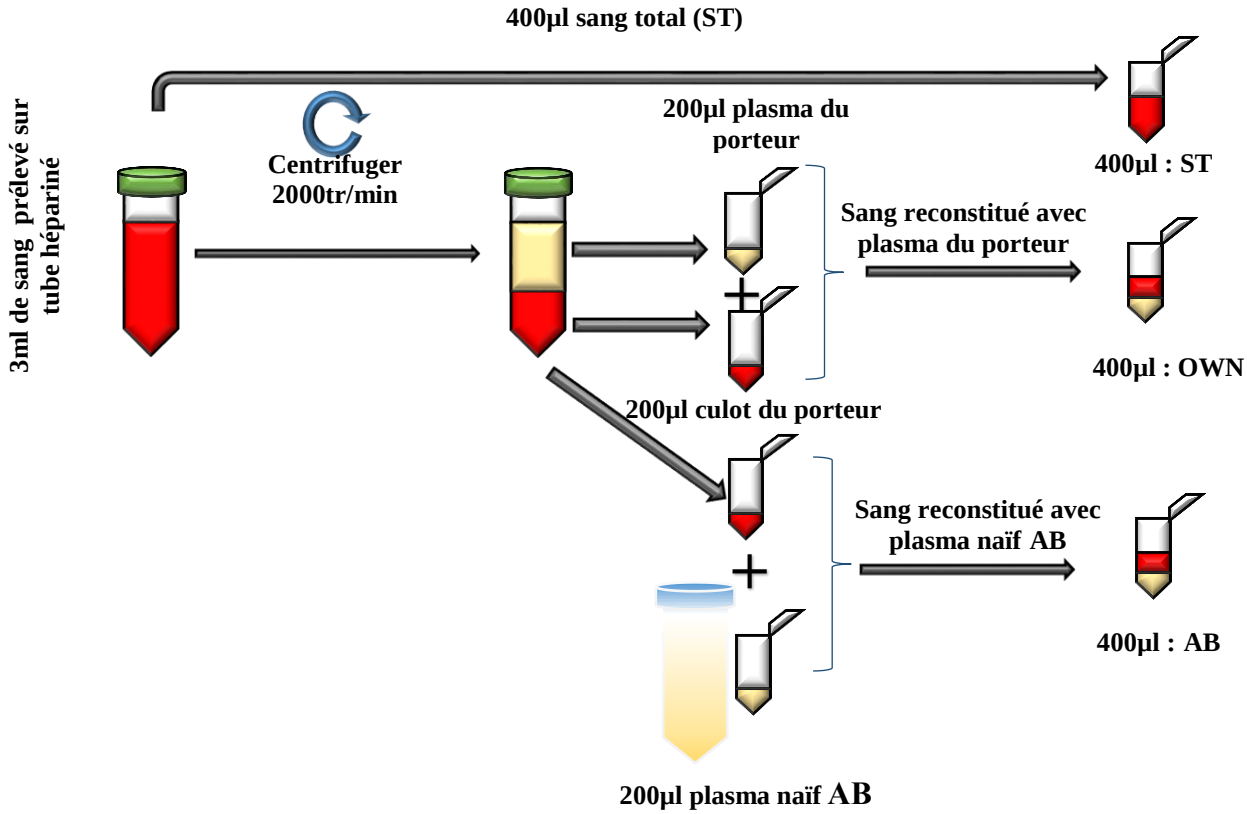


Figure 23: Protocole d'alimentation des moustiques

Un volume de 400 µl de sang a été distribué dans chaque cellule de gorgement. Les cellules sont maintenues à 37°C pendant toute la durée de l'expérience. Les gobelets contenant les femelles de moustique ont été disposés en dessous des cellules de gorgement et les femelles se sont gorgées pendant 30 min dans l'obscurité (**Figure 24**). A la fin du repas, les moustiques gorgés ont été triés à l'aide d'un aspirateur à bouche et transférés dans de nouvelles boîtes. Les femelles gorgées ont été maintenues à l'insectarium dans les conditions standard de température et d'humidité, et elles ont été nourries quotidiennement avec une solution de glucose à 5%.



Figure 24: Gorgement des femelles d'*An coluzzii* sur membrane

3.2.3.4 Dissection des moustiques et comptage d'oocystes

Le comptage des oocystes a été effectué par la dissection des moustiques 7 jours après la prise du repas sanguin infectieux sous une loupe binoculaire. Pour ce faire, les femelles survivantes sont anesthésiées au chloroforme pendant environ 1 min, disséquées à l'aide de deux pinces fines sur lame porte-objet, dans une goutte de mercurochrome diluée à 0,4 % avec un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline). Une fois isolé, l'estomac est recouvert d'une lamelle et placé sous un microscope (LEICA DML) à l'objectif x20 pour l'identification et le dénombrement des oocystes (**Figure 25**). Nous avons par la suite pu déterminer la prévalence (proportion de moustiques avec au moins 1 oocyste) et l'intensité de l'infection (nombre moyen d'oocystes par moustique infecté).

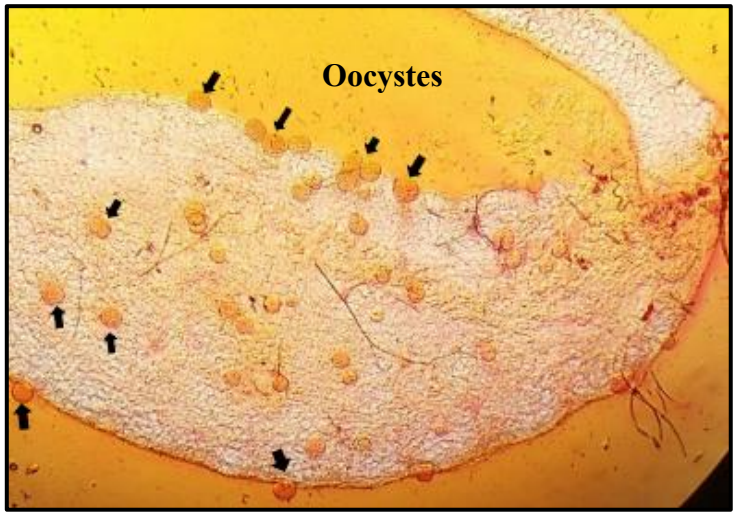


Figure 25: Estomac d'un moustique femelle d'*An coluzzii* infecté par les oocystes (flèches noires)

3.2.4 Analyse de données

Le logiciel R version 4.1 a été utilisé pour des analyses statistiques. Nos données ne suivant pas une distribution normale, nous avons utilisé le test de Wilcoxon pour comparer la prévalence et la densité parasitaire chez les formes asexuées et sexuées en fonction du génotype HbAA et HbAS. Chez le moustique vecteur, nous avons comparé l'infectivité des gamétocytes entre génotypes HbAA et HbAS selon la densité gamétocytaire, la multiplicité d'infection, et la présence de facteurs immuns. Sachant que les oocystes ne sont pas normalement distribués chez le moustique et que les données de comptage comportent des excès de zéro, nous avons appliqué les modèles ZINB et Hurdle. Les valeurs d'AIC ont montré que les modèles Hurdle s'appliquent mieux à nos données et ce modèle a été utilisé. Seules les valeurs ayant un $P < 0,05$ ont été considérées comme significatives dans l'ensemble des analyses.

3.3 Méthodologie utilisées pour étudier la relation entre l'âge des érythrocytes et l'invasion de *P. falciparum* dans des conditions naturelles (Article 2)

3.3.1 Extraction de l'ADN

L'ADN génomique total de chaque échantillon a été isolé avec le kit MACHEREY-NAGEL Nucleospin Tissue, Mini kit for DNA from cells and tissue suivant les recommandations du fabricant à partir de 200 µl de culot de sang que nous avons précédemment conservé à -20°C. Dans un tube *Eppendorf*, 25 µl de protéinase K ont été ajoutés aux 200µl de culot afin de digérer les protéines et de retirer les contaminants qui pourraient endommager les acides nucléiques. Après ajout d'un tampon de lyse (200 µl) suivi d'une incubation à 70°C pendant 15 min, 200 µl d'éthanol 96-100% ont été ajoutés au mélange afin de précipiter l'ADN. Le mélange a été transféré dans une colonne *Nucleospin* et centrifugé à 11000 g pendant 1 min. L'ADN s'étant lié à la silice, nous avons placé la colonne dans un nouveau tube de collecte et lavé avec le tampon de lavage (350 µl). Après avoir préchauffé le tampon d'élution à 70°C, l'ADN a été élué dans 30 µl de tampon d'élution. La densité optique a été mesurée pour chaque échantillon, ensuite l'extrait a été conservé à -20°C.

3.3.2 Polymorphisme de *P. falciparum* (*msp1* et *msp2*)

Afin de déterminer la diversité génétique des infections à *P. falciparum* sur nos échantillons de terrain, nous avons caractérisé les populations parasitaires de Mfou en amplifiant le block 2 du gène *msp1*(merozoïte surface protein 1) et la région variable centrale (block 3) du gène *msp2* (merozoïte surface protein 2) selon le protocole de Metoh et al., 2020 (Metoh et al., 2020) . Une PCR nichée a été réalisée à l'aide du kit Diamond Taq® DNA Polymerase – Eurogentec. Des amorces spécifiques des différentes familles alléliques (K1, MAD20 et RO33 pour *msp1*), et (3D7 et FC27 pour *msp2*) nous a permis de distinguer les différents allèles des gènes *msp1* et *msp2* (**Tableau 2**). Pour cela, 2 µl d'extrait d'ADN servant de matrice d'ADN ont été utilisés pour initier le premier cycle de PCR dans un mélange réactionnel constitué du tampon 1X, 2.5 Mm Mgcl2, 0.2 mM dNTP, 0.27 µM de chaque amorce, 1U d'enzyme Taq et de l'eau sans nucléase. Le programme d'amplification était constitué d'une pré-dénaturation (94°C-5 min), d'une pré-hybridation (58°C-2 min) et d'une pré-élongation (72°C-2 min) dans un cycle; suivie d'une dénaturation (94°C-1 min), d'une hybridation (61°C-1 min) et d'une élongation (72°C-1 min) pendant 35 cycles et de deux élongations terminales (58°C-2 min et 72°C-10 min). Dans un volume total de 15 µl, 2 µl du produit PCR du premier cycle de PCR a été utilisé comme matrice d'ADN pour lancer le 2e cycle de la PCR nichée pour *msp1* (K1, MAD20 et RO33) et *msp2* (3D7 et FC27) à l'aide

d'amorces spécifiques à la famille allélique (**Tableau 3**). Le programme d'amplification était constitué d'une pré-dénaturation (94°C-10 min), suivie d'une dénaturation (94°C-30 s), d'une hybridation (61°C-30 s) et d'une élongation (72°C-1 min) pendant 35 cycles et enfin d'une élongation terminale (72°C-10 min). Les tailles attendues ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% coloré au GelRed sur un générateur de courant réglé à 135 volts pendant 45 min à 1h. Les gels ont été visualisés sur un transilluminateur ultraviolet et la taille de bande a été déterminée à l'aide du logiciel Bio Capt. La MOI a été définie comme le nombre de génotypes distincts de parasites co-infectant un seul hôte au sein d'une infection donnée, sur la base du génotypage du gène *msp1* (K1, MAD20 et RO33) et du gène *msp2* (3D7 et FC27) selon Sondo et al., 2020. Le calcul de la MOI pour chaque échantillon a été le nombre de fragments de PCR obtenus à partir des gels (K1+MAD20+RO33) pour le gène *msp1*, tandis que la MOI pour *msp2* a représenté le nombre de fragments PCR obtenus à partir des gels (3D7 + FC27). La MOI finale a représenté la valeur maximale de la MOI pour les loci MSP1 et MSP2. Par exemple, si le génotypage de *msp1* a révélé 2 bandes (MAD20) + 1bande (K1) + 0 bande(RO33) = 3 variants génétiques ; le génotypage de *msp2* a révélé 3 bandes (3D7) +1 bande (FC27) = 4 variants génétiques. La valeur finale de la MOI pour chaque isolat de terrain a représenté la valeur maximale de la MOI pour les loci msp1 et msp2, c'est-à-dire MOI = 4 si MOI msp1 = 3 et MOI msp2 =4.

Tableau 2: Amorces utilisées pour la première PCR (MSP1 et MSP2)

Gènes	**Amorces**	**Séquences des amorces 5' →3'**	**Taille des fragments**
MSP1	M1-OF	CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG	1091 Pb
	M1-OR	CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA	
MSP2	M2-OF	ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATA	703 Pb
	M2-OR	CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT	

Tableau 3: Amorces utilisées pour la deuxième PCR (famille allélique)

Gènes	Famille alléliques	Amorces	Séquences des amorces 5' →3'	Taille des fragments
MSP1	K1	M1-KF	AAATGAAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC	153-335 Pb
		M1-KR	GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA	
	MAD20	M1-MAF	AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC	175-205 Pb
		M1-MAR	ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC	
	RO33	M1-ROF	TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG	155
		M1-ROR	CATTTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGATC	
MSP2	3D7/IC	M2-ICF	AGAAGTATGGCAGAAAGTAAKCCTYCTACT	200-568 Pb
		M2-ICR	GATTGTAATTCGGGGGATTCAGTTTGTTCG	
	FC27	M2-FCF	ATATTAAGAGTGTAGGTGCARATGCTCCA	140-387
		M2-FCR	TTTTATTTGGTGCATTGCCAGAACTTGAAC	

3.3.3 Expression d'AP2G par RTqPCR

Sur le terrain, nous avons aliquoté trois tubes contenant 100µl de sang total des sujets infectés à *Plasmodium* plus 100µl de trizol que nous avons conservé à -80°C. L'analyse a été effectuée à Montpellier.

3.3.3.1 Extraction d'ARN au Trizol

L'extraction d'ARN a été réalisée sur deux réplicats et en cas de discordance entre les deux réplicats, le troisième réplicat était effectué. Il faut noter que nous effectuons une série de 8 échantillons, de peur d'avoir des biais entre le premier échantillon et les derniers échantillons. Après décongélation des échantillons, ils ont été mélangés avec 800 µl de Trizol Reagent, puis homogénéisés à l'aide d'une micropipette et incubés pendant 5 min sous la hotte. Ensuite 220 µl de chloroforme ont été ajoutés au mélange afin d'isoler les ARN totaux, un mélange par inversion a été réalisé et laissé 2 min à température ambiante, puis centrifugé à 4°C pendant 15 min à vitesse maximale (16000 g). La phase supérieure contenant les ARN totaux a été récupérée (environ 500 µl) dans de nouveaux tubes contenant 500 µl d'isopropanol, puis 1µl de glycoblue (Life Sciences) a été ajouté afin de conférer une couleur bleue au culot pendant la phase de précipitation. Un mélange par inversion s'est effectué suivi d'une incubation pendant 10min à température ambiante sous la hotte. Le mélange a été centrifugé à 4°C pendant 10 min à 12000 g pour la précipitation de l'ARN. Le culot a été lavé en y ajoutant 1ml d'éthanol 75%, vortexé et centrifugé une fois de plus à 4°C pendant 5 min à 7500 g. Après centrifugation, le culot a été séché à température ambiante sous la hotte pendant 10 min et resuspendu dans 30 µl d'H20 (RNAse free water), puis incubé à 55°C pendant 10min sur un bloc chauffant.

Afin d'éliminer les restes d'ADN présents dans nos échantillons, nous avons procédé à la digestion de l'ADN en utilisant le kit Turbo DNA-free constitué du tampon 1X Turbo™ DNase (8167), 2 U de l'enzyme Turbo™ DNase (2238) et de l'enzyme d'inactivation (8174G). Chaque réactif a été ajouté individuellement dans chaque tube contenant les 30 µl d'ARN précédemment extrait, puis mélangé et incubé sur bloc chauffant pendant 30 min à 37°C. Après incubation, 1/10ième du volume total du réactif d'inactivation a été ajouté soit 3,5 µl et incubé à température ambiante pendant 2 min tout en homogénéisant toutes les 30s. Enfin, une centrifugation pendant 1 min 30s a été réalisée et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube (environ 25 µl). Un volume de 13,2 µl a été utilisé pour la transcription inverse et 11,8 µl a été conservé à -80°C.

3.3.3.2 Transcription inverse (RT)

L'ARN résultant de la RT a été transcrit à l'aide du kit de transcription inverse d'ADNc (Applied Biosystems) suivant les directives du fabricant dans un volume total de 20 µl. Le mélange réactionnel était composé d'un tampon de transcription 1X, 4 mM de dNTP (Applied Biosystems), 1X de randoms hexamers (Applied Biosystems), 50 U de l'enzyme Reverse Transcriptase (Multiscribe RT Applied Biosystems), 1.25 µM des oligo DTs (Invitrogen, AM5730G) et 10 U de la superRNAsin (Invitrogen, AM2696). La PCR a été réalisée selon le programme d'amplification suivant : 10 min à 25°C, 120 min à 37°C, 5 min à 85°C, 4°C à l'infini.

3.3.3.3 Quantification par qPCR

L'amplification a été réalisée dans le but de quantifier les niveaux de transcription du gène *Pf*AP2G qui est notre gène d'intérêt et du gène *Pf*18srRNA qui est notre contrôle endogène. Les amorces de notre gène d'intérêt (F : 5'CCT GTA TAC CCT TCT TCG AAA GC 3' ; R : 5'TCA AAA GTG CTC TCC TTT CGT G 3') et du contrôle endogène (F : 5' GCT GAC TAC GTC CCT GCC C 3' ; R : 5' ACA ATT CAT CAT CAT ATC TTT CAA TCG GTA 3') ont été précédemment utilisées dans le papier de Prajapati et al, 2020 (Prajapati et al., 2020). Le milieu réactionnel a été réalisé avec le Power up™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) constitué d'un tampon 1X et de 0.4 µM de chaque amorce. Le programme d'amplification a été adapté de l'article de Prajapati et al, 2020 dans les conditions suivantes : une phase de pré-incubation 95°C 20s, suivie de deux étapes d'amplification de 44 cycles de 95°C 10 sec, 60°C 20 sec. Une étape supplémentaire en fin d'amplification constitué d'un cycle d'amplification à 95°C pendant 10 s, 65°C pendant 60 s et 97°C pendant 1 s a été ajoutée au programme afin d'obtenir une courbe de dissociation (ou de fusion) pour confirmer

la spécificité des amplicons PCR. Tous les échantillons ont été analysés en duplicat et testés sur la même plaque (gène d'intérêt *Pf* AP2G et le gène contrôle *Pf18s* ARNr*).* Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel LightCycler^{R}96.

La validation biologique de nos résultats était basée sur la valeur seuil (Cycle Treshold (CT)). Un CT<36 cycles était considéré comme positif et tout échantillon avec un CT>36 cycles était considéré comme négatif. La quantité relative ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) pour chaque gène a été calculée en utilisant l'ARN du parasite de la souche NF54 comme calibrateur. Nous avons utilisé la méthode de (Livak & Schmittgen, 2001) pour déterminer le niveau d'expression d'AP2G dans chaque échantillon. Les résultats ont été obtenus à partir de deux replicats biologiques et en cas de divergence entre les deux replicats, un troisième replicat a été réalisé et chacun avec deux replicats techniques.

3.3.4 Détermination de la réticulocytémie et préférence de la cellule hôte sur les échantillons de terrain

3.3.4.1 Préparation des échantillons sur le terrain

Nous avons introduit 1,5 ml de sang total prélevé dans un tube EDTA dans un Falcon de 15 ml puis centrifugé à 500 g pendant 3 min à 4°C. Après centrifugation, le culot a été lavé avec 10 ml de PBS 1X puis centrifugé de nouveau à la même vitesse. Après avoir retiré le surnageant, nous avons resuspendu le culot dans 2 ml de PBS 1X et transféré la moitié (1ml) de la suspension dans un tube *Eppendorf* de 1,5 ml. Par la suite, une nouvelle centrifugation est réalisée à 800 g pendant 5 min (accélération 9 (acc), décélération 3 (dec)), et 2 aliquots de 200 µl de culot ont été réalisés auxquels 400 µl de glycérolyte ont été ajoutés goutte à goutte. Après 5 min d'attente les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à leurs analyses.

3.3.4.2 Préparation de la suspension cellulaire

Ici, il était question de marquer les cellules à l'aide d'un colorant Vybrant Green (qui marque l'ADN du parasite) et d'un anticorps monoclonal spécifique du récepteur de la transferrine l'anti-CD71 (spécifique aux globules rouges immatures). Après avoir décongelé les échantillons conservés dans du glycérolyte dans un bain marie à bille, ils ont été transférés dans un tube Falcon de 15 ml. Afin d'éviter l'hémolyse des globules rouges, nous avons ajouté goutte à goutte 100 µl de la solution NaCl à 12% en homogénéisant progressivement, puis incubé à température ambiante pendant 5 min. Pour obtenir une meilleure viabilité des globules rouges, nous avons ajouté 4 à 5 ml de solution NaCl à 1,6% au mélange. Après 5 min d'incubation, le mélange a été centrifugé à 500 g pendant 5min à 4°C (acc 9 et dec 4). Ensuite

le mélange a été lavé avec 5 ml de PBS 1X et centrifugé à 500 g pendant 5min à 4°C (acc 9 et dec 4). Après avoir retiré le surnageant, nous avons resuspendu le culot dans 1ml de RPMI et séparé la suspension en deux: 800 µl ont été conservés dans une plaque de culture (pour une analyse ultérieure) et 200 µl dans 2 tubes *Eppendorf* dont chacun contenait 100 µl du mélange. Chaque tube *Eppendorf* a été centrifugé à 500 g pendant 5min à 4°C, pendant la centrifugation, la dilution des colorants a été préparée sous la hotte à l'abri de la lumière. Par exemple pour 10 échantillons en duplicat dans un volume final de 2ml, nous avons préparé une solution contenant 2 µl de Vybrant Green (1:1000) +20 µl de l'anti-CD71 (1:100) +1978 µl de PBS 1X. Après avoir homogénéisé la solution préparée, 50 µl ont été ajoutés dans chaque tube *Eppendorf* précédemment centrifugé, ils ont été incubés pendant 45 min -1h de temps sous la glace à l'abri de la lumière. Après 1 h d'incubation, les tubes ont été centrifugés pendant 2min à 4°C et lavés avec 200 µl de PBS 1X. Après avoir retiré le surnageant, le culot a été resuspendu dans 200 µl de PBS 1X à froid. Les tubes ont ensuite été transférés dans des tubes à hémolyse pour faciliter l'acquisition en cytométrie en flux, et conservés sous glace.

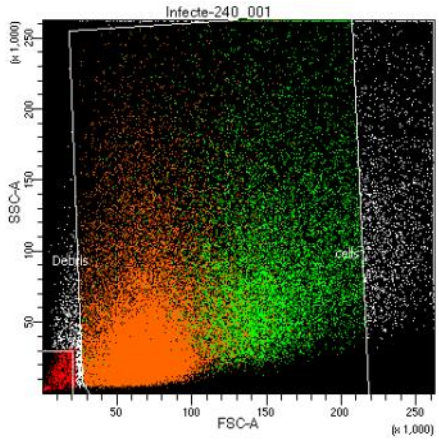
3.3.4.3 Phase d'acquisition cellulaire

L'acquisition cellulaire a été effectuée sur la plateforme MRI de Montpellier par Christophe Duperray**.**

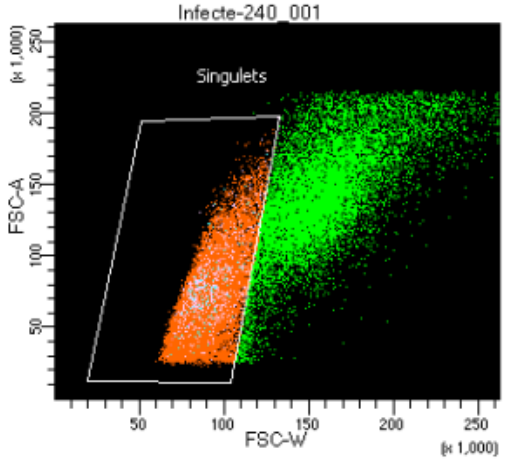
La cytométrie en flux permet de mesurer sur une suspension cellulaire, la taille, la forme et la complexité d'un composant fluorescent. Les suspensions cellulaires passent une à une devant un ou plusieurs faisceaux laser et les signaux émis par chaque cellule sont captés par des détecteurs qui vont renseigner sur la taille des cellules (Forward Scatter_FSC) d'une part, et sur la forme, la granularité des cellules d'autre part (Side Scatter_SSC). La fluorescence est émise par un anticorps couplé à un fluorochrome qui se lie spécifiquement à la cellule d'une part, soit par la cellule elle-même d'autre part. Dans notre étude, nous avons utilisé un cytomètre en flux trieur de cellules FACSAria III Becton Dickinson doté d'une combinaison de 3 lasers : rouge (638 nm), bleu (488 nm) et jaune-vert (561nm). Nous avons atteint jusqu'à 500 000 évènements vu la faible représentation des réticulocytes dans la cellule hôte, qui nous a permis d'effectuer l'analyse des sous-populations cellulaires présentes dans notre échantillon. Les données recueillies se présentent sous forme graphique. Comme exemple, nous avons le cas de l'échantillon 240. La première étape consistait à définir la population cellulaire grâce à la taille et à la morphologie, en éliminant les agrégats cellulaires. La deuxième étape consistait à sélectionner les cellules uniques. Enfin, la troisième étape a permis de définir les régions d'intérêt en fonction de la fluorescence émise, sachant que les parasites sont marqués au

Vybrant Green et à l'anti-CD71. (**Figure 26)**. Les données recueillies ont ensuite été analysées avec le logiciel FlowJo version 10.7 pour obtenir le pourcentage de parasites infectés dans les réticulocytes et les normocytes. De cette analyse, nous étions capables de calculer le taux de réticulocytes présents chez chaque individu et par la suite de déterminer la préférence réticulocytaire.

a) Définition de la population



b) Sélection des cellules uniques



c) Définition des régions d'intérêt

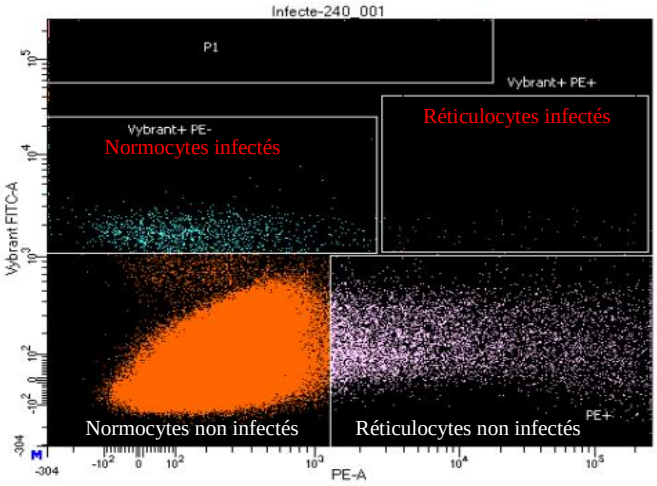


Figure 26: Phase d'aquisition d'un échantillon sur 500000 évènements

3.3.5 Confirmation de l'invasion de *P. falciparum* dans les réticulocytes

La culture a été réalisée par Alejandro Marin Menendez à MIVEGEC, Montpellier durant un de mes séjours au Cameroun.

3.3.5.1 Culture de parasites *in vitro* (souche GB4 et 3D7)

Les parasites (3D7 et GB4) ont été cultivés dans du sang de groupe sanguin O négatif ou A négatif provenant de l'Etablissement Français du Sang (EFS, convention EFS-OCPM 21PLER2020-004), dans un milieu de culture RPMI 1640 (Gibco) complété par 2 g/L de D-

glucose (Sigma), 2 g/L de bicarbonate de sodium (Sigma), 10 mg/L d'hypoxanthine (Sigma), 50 mg/mL de gentamicine (Gibco), 0. 5% Albumax-II (Gibco) et 5% de sérum humain AB+ (obtenu auprès de l'EFS) et maintenus à 37°C dans un environnement gazeux contenant 5% O2, 5% CO2 et 90% N2.

3.3.5.2 Essais de l'invasion et de la préférence réticulocytaire

Les érythrocytes ont été marqués avec 2 µM de CellTrace Far Red Cell Proliferation kit (Invitrogen, UK) (Kariuki et al., 2020). Après une incubation de 2 h à 37°C, les globules rouges colorés ont été lavés et remis en suspension à 2% d'hématocrite avec du milieu complet. Les cellules ont été conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation dans les 24 heures suivant la coloration. Les cultures de parasites contenant principalement des formes schizontes avec 1 à 2% de parasitémie ont été regroupées avec les globules rouges colorés dans un rapport de 1:4, dans un volume final de 100 µl dans des plaques à 96 puits à fond rond. Les échantillons ont été incubés pendant 24 heures à 37°C dans les mêmes conditions comme cité plus haut. Pour sélectionner les globules rouges parasités, les cellules ont été colorées avec un colorant vert le Vybrant Green DyeCycle Green (dilution 1:1000, ThermoFisher, UK) dans du PBS tandis que l'anti-CD71-PE (dilution 1:100) nous a permis de séparer les globules rouges matures (CD71+) des globules rouges immatures (CD71-). Les cellules ont été incubées pendant 1h à 37°C à l'abri de la lumière et lavées une fois dans du PBS avant de les passer sur un cytomètre en flux LSR Fortessa (Beckman Coulter, UK). Le Vybrant Green a été excité par un laser bleu et détecté par un filtre 530/30 ; le rouge Far de CellTrace a été excité par un laser rouge et détecté par un filtre 660/20 ; tandis que l'anti-CD71-PE a été excité par un laser jaune-vert et détecté par un filtre 585/15. 500 000 événements ont été collectés pour chaque échantillon. Les données recueillies ont ensuite été analysées avec FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon) pour obtenir le pourcentage de nouvelles invasions dans chaque groupe sanguin cellulaire. Toutes les expériences ont été réalisées en duplicat avec du sang fraîchement prélevé chez deux donneurs naïfs.

3.3.6 Séquençage de l'ARN en cellule unique (ScRNAseq)

Le séquençage de l'ARN en cellule unique (scRNAseq) est un outil essentiel pour les biologistes. Il a été mis en place pour la première fois par Tang *et al* après avoir constaté que le séquençage de l'ARN en vrac sur les populations cellulaires ne permettait pas d'étudier les interactions entre gènes au sein d'une cellule, d'identifier dans une population des types cellulaires auparavant inconnus et enfin de comprendre la différenciation cellulaire en découvrant des profils transcriptionnels (Tang et al., 2009). Il existe plusieurs technologies de scRNAseq, mais les différentes étapes sont similaires, et diffèrent au niveau de la méthode en

terme de débit (nombre de cellules capturées par expérience), de type de quantification (pleine longueur (Smart-Seq2) ou basée sur les extrémités [3'ou 5'] (10X Chromium)) et enfin sur le coût. Elles suivent ce schéma: l'isolement des cellules uniques, la lyse des cellules et la rétrotranscription des ARNm à partir d'amorces polyT, l'amplification des ADNc neosynthétisés, la préparation des librairies de séquençage (Foulon, 2019).

Au cours de notre étude, nous avons utilisé la technique 10X Chromium pour avoir une référence des anneaux sexuellement engagés à partir du séquençage de l'ARN en cellule unique car jusqu'ici elle n'est pas encore connue. La technique Smart-Seq2, quant à elle nous a permis d'identifier les transcriptomes des anneaux sexuellement engagés dans chaque cellule hôte**.**

3.3.6.1 Technique 10X chromium

Cette technique a été effectuée sur la plateforme MGX de Montpellier par Hugues Parrinello.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la technologie 10X Chromium v3 qui fait partie des méthodes de gouttelettes microfluidiques la plus onéreuse et présente une meilleure performance dans la mesure où elle offre une plus grande sensibilité liée à une capture plus efficace (plus de transcrits et plus de gènes sont mesurés par cellule [capacité à profiler des dizaines de milliers de cellules environ 10000 cellules]). Une seule des extrémités 3' du transcrit est séquencée, l'avantage est qu'il a été combiné à des UMI (identifiants moléculaires uniques) qui aident à améliorer la précision lors de la quantification des transcrits.

3.3.6.1.1 Préparation de la suspension cellulaire et tri cellulaire

Le tri cellulaire a été effectué sur la plateforme MRI de Montpellier par Christophe Duperray.

Nous avons préparé les cellules comme précédemment décrit (**3.3.4.2**) sauf que le marquage s'est réalisé seulement au Vybrant Green sur un seul échantillon et lors de la séparation de la suspension cellulaire en deux nous avons augmenté le volume des cellules à marquer (800 µl) et 200 µl ont été conservés dans une plaque de culture pour les analyses ultérieures. Dans notre étude, ce tri nous a permis de séparer nos cellules d'intérêt (marquées seulement au Vybrant Green) des cellules non marquées. Nous avons trié 50000 cellules marquées au Vybrant Green dans un tube *Eppendorf* contenant du PBS et du BSA à 0,04%. Les cellules ont été aspirées une par une dans un courant continu de tampon (PBS). La lumière était déviée lors de l'interception de la cellule avec le faisceau laser et le signal généré était émis par fluorescence et traité par le programme établi par l'utilisateur pour isoler la cellule. Si la cellule d'intérêt était détectée, l'appareil attendra qu'elle atteigne son temps d'apparition pour charger

la goutte. Une fois le tri terminé, l'échantillon a été traité sur la plateforme 10X Genomics (Montpellier GenomiX).

3.3.6.1.2 Principe de la technique 10X Chromium

Les cellules uniques sont encapsulées dans des gouttelettes individuelles de quelques nanolitres, où elles sont ensuite lysées pour libérer leur ARNm. Ces ARNm sont alors capturés par des amorces à code-barres, délivrées par une bille d'hydrogel (GEM). Chaque bille permet d'apporter dans chaque gouttelette d'huile un code-barres différent ; en effet, chaque bille est fonctionnalisée avec 108 à 109 amorces, contenant une queue polyT, un UMI, et une séquence ADN code-barres, unique pour chaque bille, mais qui diffère d'une bille à l'autre. Ce code-barre indique l'origine cellulaire de chaque ARNm et permet de multiplexer de nombreuses cellules en parallèle. La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) s'effectue directement à partir des cellules lysées, en utilisant des amorces oligo (dT)s pour la synthèse du premier brin et des oligos de commutation de matrice (TSO) pour la synthèse du second brin. La transcriptase inverse ajoute des surplombs CCC après la synthèse du premier brin, qui sert de matrice pour la fixation du GGG à l'extrémité 3' des TSOs. La transcriptase inverse synthétise ensuite le second brin dans la même réaction. Pendant la réaction, les oligoDTs sont attachés à des billes au lieu d'être en solution. Une seule bille est capturée avec une seule cellule dans une gouttelette d'huile (**Figure 27**). Cette gouttelette d'huile contient tous les réactifs nécessaires à la synthèse de l'ADNc, et agit ainsi comme un micro-environnement pour la PCR. Pour l'identification de chaque cellule, tous les oligo (dT)s ont un code-barres (code-barres 10X) qui identifie tous les ARNm capturés sur cette bille. De plus, chaque oligo dT possède un identifiant moléculaire unique (UMI) pour identifier les transcrits individuels. Une fois les cellules et les billes capturées dans les gouttes, les cellules sont lysées et les ARNm se lient aux oligo(dT)s sur les billes, ce qui permet la synthèse de l'ADNc. Ensuite, les gouttelettes sont brisées pour regrouper l'ADNc. Des amorces (ISO - avec des sites de liaison dans les oligoDT et TSO, respectivement) sont ensuite utilisées pour l'amplification de l'ADNc. L'ADNc amplifié est ensuite découpé en fragments plus petits et les adaptateurs sont ligaturés. Des amorces indexées (avec des sites de liaison dans les adaptateurs ISO et ligaturés, respectivement) sont ensuite utilisées pour amplifier de manière sélective l'extrémité 3' des transcrits marquée par l'UMI. En effet, seule l'extrémité 3' de chaque gène a été séquencée. La bibliothèque finale est composée d'une lecture contenant le code-barre spécifique à la cellule (utilisé pour identifier les lectures de différentes cellules) et d'un UMI spécifique à la molécule (utilisée pour quantifier l'expression d'un gène),

tandis que la seconde lecture contient la séquence de la molécule d'ADNc réelle et peut être utilisée pour l'aligner sur un transcriptome de référence (Foulon, 2019).

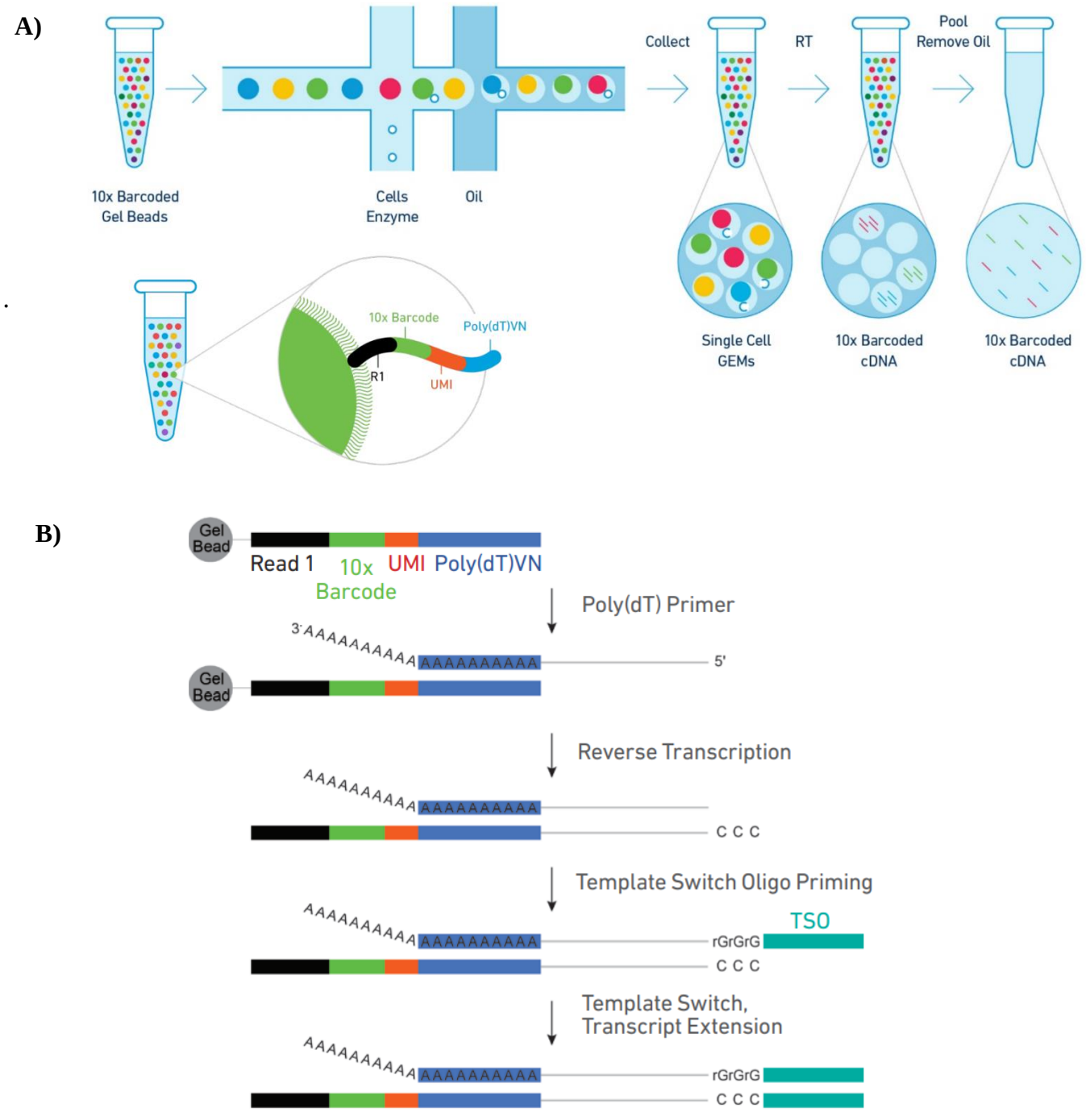


Figure 27: Principe du 10X chromium (https://bauercore.fas.harvard.edu/10X-chromium-system). **A)** Séquence partielle du Read1 d'illumina (22 nucléotides), code-barres 10X (16 nucléotides), identifiant moléculaire unique (10 nucléotides), séquence d'amorce Poly (dT) (30 nucléotides). **B)** Génération des GEMs et code-barre

3.3.6.2 Technique Smart-Seq2

3.3.6.2.1 Préparation de la suspension cellulaire et Tri cellulaire

Le tri cellulaire a été effectué sur la plateforme MRI de Montpellier par Christophe Duperray. L'analyse a été réalisée par le Dr Arthur Talman.

Les cellules ont été préparées comme précédemment décrit dans le paragraphe (**3.3.4.2**). Le marquage s'est réalisé avec du Vybrant Green et de l'anticorps monoclonal CD71 sur 8 échantillons. Lors de la séparation de la suspension cellulaire en deux nous avons augmenté le volume des cellules à marquer (800 µl) et 200 µl ont été conservés dans une plaque de culture pour les analyses ultérieures. Un contrôle de globules rouges non infectés et marqués a été utilisé pour définir les gates. Dans notre étude, le tri nous a permis de séparer les cellules infectées dans les normocytes de celles infectées dans les réticulocytes. Nous avons trié 48 cellules infectées dans les normocytes (VG+, CD71-) et 48 cellules infectées dans les réticulocytes (CD71+, VG-) dans une plaque de 96 puits contenant un tampon de lyse. L'analyse a été réalisée comme défini dans les articles de Howick et al, et de Reid et al, (Howick et al., 2019; Reid et al., 2018).

3.3.6.2.2 Principe de la technique Smart-Seq2

Comme dans le 10X Chromium, elle commence par la synthèse de l'ADNc complémentaire directement à partir des cellules lysées, en utilisant des amorces oligodT pour la synthèse du premier brin et des oligos de commutation de matrice (TSO) pour la synthèse du second brin. La transcriptase inverse ajoute des surplombs CCC après la synthèse du premier brin, qui sert de matrice pour la fixation du GGG à l'extrémité 3' des TSOs. La transcriptase inverse synthétise ensuite le second brin dans la même réaction. Toutes les réactions se déroulent dans le puits, pas besoin d'utiliser des gouttelettes d'huile. La procédure de synthèse de l'ADNc dans Smart-Seq2 est la même que pour 10X. La seule différence est que les UMI spécifiques aux cellules sont absentes de l'oligodT pour Smart-Seq2. L'amplification de l'ADNc avec les amorces ISO est la même que celle décrite pour 10X Chromium. La principale différence entre Smart-Seq2 et 10X Chromium est que, alors que ce dernier ne séquence que la courte extrémité 3' des transcrits, Smart-Seq2 quant à elle séquence les transcrits sur toute leur longueur, ce qui permet d'identifier les variants structurels à l'échelle du gène **(Figure 28).** Cependant Smart-Seq2 est une méthode à faible débit (peu de cellules) et très onéreuse. Il n'est pas possible de regrouper les échantillons dans une seule réaction. Cependant, ce problème peut être surmonté par des UMIs qui sont inclus dans les oligodTs pour le Smart-Seq3.

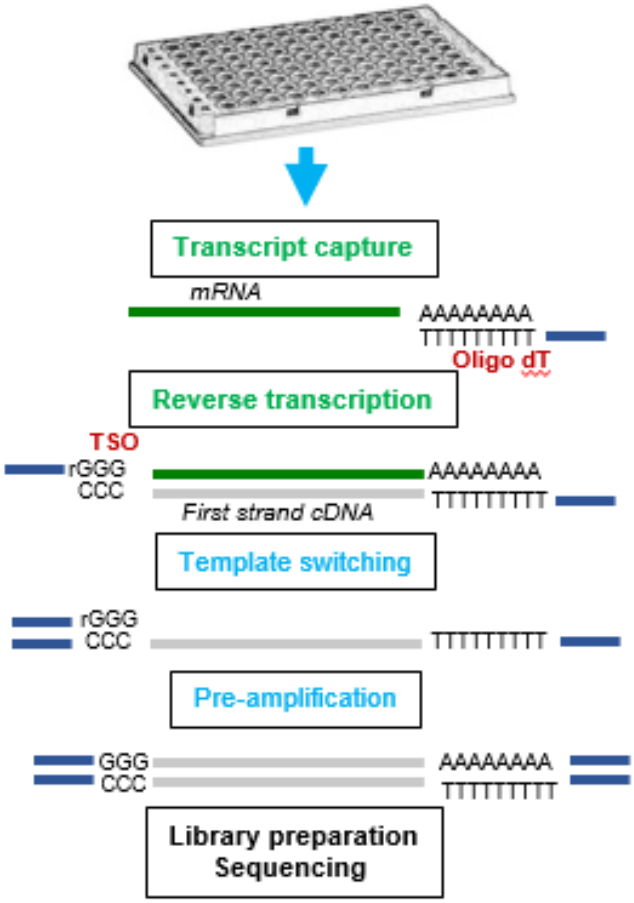


Figure 28: Principe du Smart-Seq2 (Reid et al., 2018)

3.3.7 Analyse de données

3.3.7.1 Analyse de données de la population (140 échantillons)

Le logiciel R version 4.1 et Excel 2016 nous a permis de réaliser toutes nos analyses.

Le tableau descriptif de la population d'étude a été réalisé avec Excel et confirmé avec le logiciel R. Le package ggplot2 nous a permis de tracer les boîtes à moustache d'association entre la parasitémie, l'âge, le trait drépanocytaire, la multiplicité de l'infection (MOI), la réticulocytémie et l'engagement sexuel. Le test de Wilcoxon nous a permis de comparer les sujets AP2G+ de ceux AP2G-. Seules les valeurs ayant un $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives dans toutes les analyses.

Le FACSAria III Becton Dickinson a été utilisé pour analyser les données de cytométrie en flux. Le logiciel Flow Jo version 10.7 nous a permis de déterminer le pourcentage de normocytes infectés (VG+) et non infectés (VG-); le pourcentage de réticulocytes infectés (CD71+) et non infectés (CD71-). La réticulocytémie a été calculée comme la somme du

pourcentage de réticulocytes infectés et du pourcentage de réticulocytes non infectés divisé par le nombre total de globules rouges (infectés et non infectés). La préférence pour la cellule hôte a été définie comme le ratio (R) du nombre de réticulocytes infectés sur le nombre total de réticulocytes (A), par le nombre de normocytes infectés sur le nombre total de normocytes (B) [R=A/B].

3.3.7.2 Analyse de données transcriptomiques

3.3.7.2.1 Analyses de données 10X chromium

En ce qui concerne les analyses transcriptomiques, après avoir obtenu la matrice brute de numération des gènes/code barre de la plateforme MGX, la méthode Seurat v4 a été utilisée pour toutes les analyses (https://www.singlecellcourse.org/single-cell-rna-seq-analysis-using-seurat.html et https://scrnaseq-course.cog.sanger.ac.uk/website/seurat-chapter.html). Nous avons chargé la matrice de numération brute dans R à l'aide de la fonction read10X et du package *Seurat*, cela a créé un objet CreateSeuratObject où chaque colonne correspondait à un code-barres de cellule. Nous avons effectué un contrôle qualité en retirant les cellules qui ont trop peu de gènes. Nous avons éliminé de l'ensemble de données les cellules qui comportaient moins de 100 gènes et les gènes présents dans moins de 5 cellules. La filtration de cellule nous a permis d'éliminer les cellules indésirables. Une fois les cellules filtrées nous avons procédé à la normalisation de la matrice de nos données. La méthode « LogNormalize » a permis de mesurer l'expression des gènes de chaque cellule sur l'expression totale en multipliant par un facteur (par défaut nous avons utilisé 10000), ensuite le résultat a été transformé en logarithme. La fonction FindVariableFeatures nous a permis de déterminer les gènes variables dans les cellules individuelles en calculant l'expression et la dispersion moyenne pour chaque gène. Nous avons regroupé les cellules en fonction du profil d'expression des gènes les plus variables afin de constituer des groupes de cellules. 1795 transcriptomes de haute qualité ont été récupérés après filtration et élimination des doublets. L'âge des parasites de *P. falciparum* présents dans nos données a été déterminé par une analyse de corrélation avec une cinétique de développement de référence (Otto et al., 2010). Ensuite, nous avons effectué une expression différentielle des gènes (fonction doHeatmap) dans les différents clusters afin de déterminer le niveau d'expression de chaque gène présent à différents stades parasitaires.

3.3.7.2.2 Analyses de données Smart-Seq2

En ce qui concerne les données Smart-Seq2 les données ont été normalisées avec la méthode scater (v1.20.1). Nous avons filtré les cellules avec moins de 100 gènes ou moins de 5% de lecture mappée au génome de *P. falciparum* et les avons retirées de l'analyse. Les gènes

identifiés dans plus de 2 cellules par au moins 5 lectures ont été conservés dans l'analyse. Après filtration, 610 transcriptomes de haute qualité ont été récupérés. L'âge des parasites de *P. falciparum* présents dans nos données a été déterminé par une analyse de corrélation avec une cinétique de développement de référence (Otto et al., 2010). Pour déterminer les transcriptomes de parasites dans les réticulocytes dans les 8 échantillons, nous avons ensuite construit un index de cluster des données 10X de référence à l'aide du package scmap qui nous a permis de classer les cellules en fonction de leur profil d'expression (v1.14.0) (Kiselev et al., 2018). La fonction scmapCluster a permis d'affecter chaque cellule requête (à partir des données smartseq2) au cluster d'index avec lequel elle avait la plus grande similarité en cosinus. Nous avons utilisé un seuil de similarité cosinus d'affectation de 0,3.

CHAPITRE 4:

INFLUENCE OF SICKLE CELL TRAIT ON PLASMODIUM FALCIPARUM TRANSMISSION IN NATURALLY INFECTED GAMETOCYTE CARRIERS

4.1 Contexte de l'étude

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet de recherche intitulé PADRE, déposé pour financement à Path-MVI et financé par l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) à travers la Jeune Equipe Associée à l'IRD (JEAI) « IMPALA » co-portée par Sandrine Nsango et Isabelle Morlais.

La contribution des sujets paludéeens asymptomatiques et porteurs du trait drépanocytaire dans la transmission du paludisme a été très peu documentée à ce jour, alors que ces individus asymptomatiques, et particulièrement ceux porteurs de gamétocytes, représentent un important réservoir de parasites et ils contribuent à maintenir la transmission (Bousema et al., 2014; Drakeley et al., 2006). Notre étude a comparé le niveau d'infection palustre entre des enfants HbAS et HbAA et mesuré l'infectivité des gamétocytes pour les moustiques chez les sujets HbAS et HbAA pour évaluer leur contribution dans la transmission.

4.2 Description de l'étude

Dans le but de déterminer l'impact du trait drépanocytaire sur la transmission de *P. falciparum,* nous avons travaillé dans la localité de Mfou, zone pilote à forte prévalente de *P. falciparum* dans laquelle nous travaillons depuis 2004. Les porteurs asymptomatiques de *P. falciparum* ont été recherchés chez les enfants de moins de 15 ans, tranche d'âge qui comprend le plus d'infections par des gamétocytes. Nous avons échantillonné une cohorte de 1557 enfants afin de déterminer l'impact du trait drépanocytaire sur le portage des stades sexués et asexués de *P. falciparum* dans notre zone d'étude. Nous avons tenu compte de l'âge des enfants, de leur sexe et leur village d'origine dans les comparaisons.

Nous avons sélectionné les enfants porteurs de gamétocytes pour réaliser des infections expérimentales par gorgement sur membrane de la colonie *d'An. coluzzi* maintenue à l'insectarium à Yaoundé. Les gorgements ont été réalisés sur sang total (WB), sur sang déplété en facteurs immuns (AB) et sur sang reconstitué où le sérum du porteur est remis dans le tube après centrifugation afin de mesurer le biais éventuel de la centrifugation du sang sur l'infectivité des gamétocytes. Les niveaux d'infections ont été mesurés après dissection des moustiques 8 jours après le repas infectant, en comptant le nombre d'oocystes par estomac. Nous avons comparé l'infectivité des gamétocytes selon différents facteurs : densité gamétocytaire, multiplicité d'infection, facteurs immuns et trait drépanocytaire. Les oocystes ne sont pas normalement distribués chez les moustiques, ils suivent une distribution binomiale et les prévalences présentent un excès de 0 (Pichon et al., 2000). Nous avons alors modélisé les données de comptage par régression binomiale négative en appliquant des modèles inflatés en

zéro, ZINB et Hurdle. Les valeurs d'AIC ont montré que les modèles Hurdle s'appliquaient mieux à notre étude et ce modèle a été utilisé.

Nos résultats ont montré que le portage du trait drépanocytaire influence la prévalence en gamétocytes chez les enfants, les enfants HbAS ont une prévalence plus élevée en gamétocytes par rapport aux enfants HbAA [18.47% (58/314) chez les HbAS et 13.57% (168/1238) chez les HbAA, $\chi^2 = 4.61$, P = 0.032]. Chez le moustique, nous avons également observé une influence du trait drépanocytaire. Le nombre d'oocystes par moustique est 2 fois supérieur chez les porteurs de gamétocytes de génotype HbAS, pour les 3 types de sang utilisé, et la prévalence d'infection est également augmentée chez les HbAS. L'effet du trait drépanocytaire sur l'infectivité des gamétocytes est fortement lié à la densité gamétocytaire chez le donneur de sang, et une interaction avec la MOI est observée. La MOI est significativement plus faible chez les HbAS [HbAS, médiane MOI = 2 [IQR 1-3] et HbAA, médiane MOI = 3.5 [IQR 2-6]; W = 188, *P* = 0.032]. L'effet est retrouvé pour les 3 types de sang, ce qui indiquerait que les facteurs immuns seraient peu ou pas associés.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la plus forte infectivité des porteurs de gamétocytes de génotype HbAS. La mutation HbS pourrait avoir un effet sur la gamétocytogénèse durant la maturation des stades sexués (stade I à IV) (Trager & Gill, 1992). Aussi, le stress oxydatif lié au portage de la mutation HbS pourrait augmenter l'infectivité des gamétocytes. Ou bien la durée de circulation des gamétocytes pourrait différer entre les individus HbAS et HbAA, et des gamétocytes matures pourraient être présents en plus grand nombre chez les HbAS. Certains génotypes portant des mutations conférant des résistances aux anti-malariques pourraient être mieux adaptés pour se développer chez des sujets HbS et ces parasites pourraient avoir un meilleur fitness au stade sexué (Band et al., 2022; Kavishe et al., 2017).

Les résultats issus de ce travail ont fait l'objet d'un article, en cours de révision pour publication dans le journal BMC ID et sous le titre:

Influence of the sickle cell trait on *Plasmodium falciparum* transmission from naturally infected gametocyte carriers

Article 1: Influence of the sickle cell trait on *Plasmodium falciparum* transmission from naturally infected gametocyte carriers

Christelle M. Ngou,[1,2] Albert N. Bayibéki,[3] Luc Abate,[1] Olesula S. Makinde,[4] Lionel B. Feufack-Donfack,[2] Elangwe M. Sarah-Matio,[1,5] Gaelle A. Bouopda,[2,6] Paul Taconet,[1] Nicolas Moiroux,[1] Parfait H. Awono-Ambéné,[7] Arthur Talman,[1] Lawrence S. Ayong,[2] Antoine Berry,[8,9] Sandrine E. Nsango,[2,6,a] and Isabelle Morlais[1,a,*]

[1] MIVEGEC, Univ. Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France

[2] Malaria Research Unit, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroon

[3] Université Catholique d'Afrique Centrale, Yaoundé, Cameroon

[4] Department of Statistics, Federal University of Technology, Akure P.M.B 704, Nigeria

[5] Institute for Parasitology, Centre for Infection Medicine, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

[6] Department of Biological Sciences, Faculté de Médecine et des Sciences Pharmaceutiques, Université de Douala, Douala, Cameroon

[7] Laboratoire d'entomologie médicale, OCEAC, BP288, Yaoundé, Cameroon

[8] Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), Université Toulouse, CNRS UMR5051, INSERM UMR1291, UPS, Toulouse, France

[9] Service de Parasitologie_Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

[a] S. E. N. and I. M. contributed equally to this work

**** Corresponding author:*** Isabelle Morlais, MIVEGEC, Institut de Recherche pour le Développement, 91 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier, France (isabelle.morlais@ird.fr)

Abstract

Background. Deciphering the impact of the Sickle Cell Trait (SCT) on human to mosquito malaria transmission is key to understanding mechanisms that maintain the trait in malaria endemic areas.

Methods. The study was conducted from June to July 2017 among asymptomatic children living in the locality of Mfou, Cameroon. Finger-prick blood samples were collected from asymptomatic children to perform malaria diagnosis by microscopy, *Plasmodium* species by PCR and haemoglobin typing by RFLP. Infectiousness of gametocytes for mosquitoes was assessed by membrane feeding assays using blood from gametocyte carriers of HbAA and HbAS genotypes. A hurdle model was fitted to predict distribution of oocysts in mosquitoes according to haemoglobin genotype of the gametocyte donor.

Results. Among the 1557 children enrolled in the study, 314 (20.16%) were of the HbAS genotype. The proportion of children with *P. falciparum* gametocytes was significantly higher in HbAS versus HbAA individuals, 18.47% and 13.57% respectively. Multiplicity of infection was lower in HbAS gametocyte carriers (median = 2 genotypes/carrier in HbAS versus 3.5 genotypes/carrier in HbAA). Gametocytes from SCT children lead to higher infection rates in mosquitoes in both naïve and immune blood and gave rise to a two-fold increase in oocyst loads.

Conclusion. Malaria transmission stages were more prevalent and infectious in SCT carriers. This may reflect parasite adaptations to the host environment that compensate potential cost

arising from the protective effect of SCT. Mechanisms underlying the higher infectiousness of gametocytes from HbAS individuals remains to be elucidated.

Keywords: sickle cell trait, asymptomatic carriers, malaria transmission, mosquito infectivity, gametocytes

Background

Malaria parasites have exerted the strongest known selective pressure on the human genome over the last 10, 000 years [1]. Polymorphisms in red blood cell (RBC) genes that confer a protective role in malaria susceptibility have been maintained in the human population and their frequencies have been found with the highest prevalence in sub-Saharan Africa [1, 2]. Sickle cell disease (SCD) is among the most common monogenic disorders worldwide, it results from a single amino acid substitution in the beta globin protein leading to abnormal hemoglobin S (HbS). Heterozygous carriers (HbAS) of this allele have sickle cell trait (SCT) and are usually asymptomatic, whilst homozygous individuals (HbSS) suffer from sickle cell anemia (SCA) [3].

SCT protects against severe and uncomplicated malaria, which is linked to diminished proliferation of the parasite asexual stage, and lower malaria parasite densities are reported in febrile cases [4-6]. Protection against symptomatic malaria has specifically been associated with several mechanisms including but not limited to growth inhibition in low oxygen conditions [7], impaired cytoadherence [8] or altered hemoglobin digestion [9]. By contrast, studies that investigated the protection of SCT carriage against asymptomatic *P. falciparum* infection have reported inconsistent results [10-12]. SCT was shown to reduce the frequency of asymptomatic infections and delay onset of malaria [5, 11]. while no association between asymptomatic carriage and haemoglobin genotype was found in other reports [10, 12].

Asymptomatic malaria infections represent an important reservoir for parasites and contribute to onward mosquito infections [13]. Transmission from human to mosquito relies on the availability of sexual stages, the gametocytes, and multiple factors such as parasite density, sex ratio, maturity or other human and mosquito factors known to influence parasite transmissibility [13, 14]. It has been previously reported that human genetic factors contribute to gametocyte prevalence in asymptomatic infections and the HbS mutation was found associated with increased gametocyte positivity and density [15]. Earlier work had also evidenced that the SCT carriage resulted in an enhanced infectivity to mosquitoes. Indeed, mosquitoes fed on gametocyte-containing blood from HbAS individuals gave rise to higher infection rates as compared to those fed on blood from HbAA individuals, despite similar gametocyte densities [16-18].

These studies have not elucidated how this enhanced infectivity may occur and what other infection parameters may be associated with SCT and transmission. Here, we investigate the association between malaria transmission parameters and SCT carriage among a large asymptomatic cohort in an area of high malaria transmission in Cameroon.

Methods

Ethics approval and consent to participate

This work has been approved by the National Committee of Ethics Research for Human Health (CNERSH) under agreement 2017/06/922/CE/CNERSH/SP and obtained research agreement from the Ministry of Health (032/L/MINSANTE/SG/DRSPC/SSD/MFOU). All patients were enrolled as volunteers after they or their parents signed an informed consent form.

Study population and collection of blood samples

Screening surveys were conducted in June 2017 in villages of the health district of Mfou, about 30 km from Yaoundé, Cameroon. Recruitment was performed without knowledge of the genetic

background of volunteers. Malaria diagnosis was performed upon microscopic examination of Giemsa-stained blood smears. Parasite-positive volunteers received a free treatment with Artesunate Amodiaquine according to national guidelines. Parasite densities were estimated per microliter of blood, by counting the number of trophozoites per 500 leucocytes and gametocytes per 1000 leukocytes, and assuming a standard number of 8000 leukocytes/µL. Dried blood spots (DBSs) on Whatman® Grade 17 paper were obtained from finger pricks for the diagnosis of SCT. For *P. falciparum* gametocyte carrier volunteers, venous blood samples were collected on a 5 ml heparinised tube for experimental infections of mosquitoes and on a 5 ml EDTA tube for gametocyte isolation and genotyping. Genomic DNA from DBSs was extracted using the Chelex-100 (Bio-Rad Laboratories, USA) method as previously described [19]. DNA extracts were used for molecular detection of *Plasmodium* spp using a multiplex PCR as described in Padley [20] and for diagnosis of SCT by PCR-RFLP according to Saiki and colleagues [21].

Gametocyte isolation and *P. falciparum* genotyping

Gametocyte enrichment was performed using a MACS® system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) with LD columns using 1 ml of serum-free blood as previously described [22]. Genotyping was performed at seven microsatellite loci according to Anderson et al [23]. Labelled PCR products were analysed on an ABI 3500 XL DNA genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the GenSeq platform in Montpellier and alleles determined with the GeneMapper® software (v6, Applied Biosystems). Multiplicity of infection (MOI) was defined as the maximum number of alleles at the most polymorphic locus.

Experimental infections of mosquitoes

Membrane feeding assays (MFAs) were performed using the local Ngousso colony of *An. coluzzii*, as previously described [24, 25]. For each gametocyte donor, feeding experiments were set under three blood conditions: whole blood (WB) and serum replacements with serum from the same carrier's (OWN) or naïve AB serum (AB). In WB assays, fresh blood was

provided directly to female mosquitoes. In serum replacement assays, the gametocyte carrier plasma was removed after 5 minutes centrifugation at 2000 rpm and replaced either by an AB serum from a non-immune European donor or by an equal volume of the original plasma (OWN). For all MFAs, 400 µl volume of blood was dispensed into pre-warmed glass feeders and batches of 50-80 female mosquitoes starved overnight were allowed to feed for 25 minutes.

Fully engorged female mosquitoes were kept in the insectary under standard conditions (28 ± 2°C, 80 ± 5% relative humidity, 12/12-hour light/dark cycle) until dissection at 8 days post-feeding. Individual midguts were examined under a light microscope at X200 magnification for oocyst counts. Prevalence of infection was defined as the proportion of mosquitoes with at least one *P. falciparum* oocyst per midgut and intensity of infection as the mean number of oocysts per infected mosquito.

Data analysis

Statistical analyses were carried out using R 4.0.5. The effects of hemoglobin variant, sex, age and school were tested for parasite prevalence and infection densities. Prevalences of infection were compared using χ^2 test. Trophozoites and gametocytes densities were compared using Wilcoxon sum rank test for two group comparisons on log-transformed parasite densities and generalized linear models (GLMs) were used for multiple comparisons. *P*-value less than 0.05 were considered statistically significant.

Oocyst count data were overdispersed and inflated in zeros. A stepwise model selection procedure based on Akaike information criterion (AIC) was then applied and the models with the lowest AIC values in the fitted zero-inflated negative binomial models were considered the best fitted to our dataset. The predictor variables fitted in the models include hemoglobin status, MOI and gametocyte densities, and the blood donor was set as a random effect to control for variation between individuals. Comparison of AICs of models showed that hurdle negative

binomial GLMM achieved a smaller AIC than the usual negative binomial GLMM (8921.8 versus 9097.1). In the hurdle model, the zero-inflation component contains logit coefficients for predicting excess zeros and the negative binomial regression component estimates the effect of a predictive variable on the count data. Maximum likelihood estimates were obtained using the glmmTMB package in R.

Results

Description of the study population

A total of 1557 asymptomatic children aged 1-16 years were enrolled in 12 villages from the Mfou health district (Table 1). SCT diagnosis identified 1238 (79.51%) individuals of the HbAA genotype, 314 (20.16%) of the HbAS genotype and 5 (0.32%) were of the HbSS genotype. Given the small number of HbSS subjects, they were not included in further analyses. Sex ratio was 51:49 (793 males, 764 females) in the population. Males were over represented in the HbAS group (57.3%, $P = 0.0125$, Table S1).

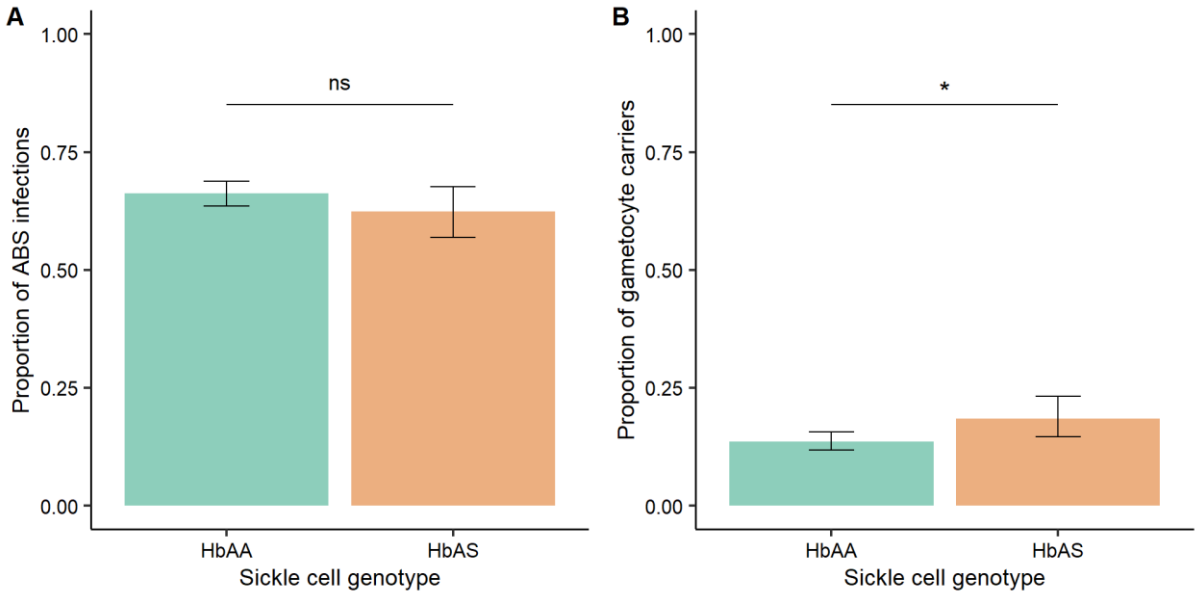


Fig. 1 Proportion of *P. falciparum* infection according to sickle cell genotype for asexual blood stages (A) and gametocyte stages (B). HbAA, homozygous for normal hemoglobin; HbAS,

160 heterozygous for hemoglobin S. ABS, asexual blood stages. Significance was assessed by the
161 Chi-squared test; ns, non significant; *, $P < 0.05$. Black bars indicate the standard error.

162 Prevalence of *Plasmodium* infection was 68.7% (1066/1552). *P. falciparum* was the most
163 prevalent species, present in 95.3% of the infections (1016/1066), followed by *P. malariae*,
164 identified in 19.1% of the infections (297/1066), *P. ovale* was found in only one carrier. Mixed
165 *P. falciparum* - *P. malariae,* infections were observed with a 15.9% prevalence (248/1066).
166 Prevalence of *P. falciparum* infection in HbAA and HbAS individuals was similar for asexual
167 blood stage (ABS) carriage, 66.23% (820/1238) vs 62.42% (196/314) ($\chi^2 = 1.59$, P = 0.206,
168 Fig. 1A). However, prevalence of *P. falciparum* gametocyte carriage was significantly higher
169 in AS individuals, 18.47% (58/314), as compared to AA individuals, 13.57% (168/1238) ($\chi^2 =$
170 4.61, $P = 0.032$**,** Fig. 1B). Parasite densities did not differ between AA and AS groups, neither
171 for ABS (Wilcoxon rank sum test statistic = 78232, $P = 0.564$) or gametocyte stages (Wilcoxon
172 rank sum test statistic = 4934.4, $P = 0.874$) (Table 1). Asexual parasite density was similar
173 between males and females but infection prevalence was significantly higher in males ($\chi^2 =$
174 6.31, $P = 0.012$). Prevalence of *P. falciparum* asexual blood stages varied among villages, from
175 79.8% in Abembé to 41.5% in Nkolda (LRT = 117.74, P < 0.001, Table 1) but the prevalence
176 of *P. falciparum* gametocytes was not significantly different between screened villages ($\chi^2 =$
177 18.45, $P = 0.072$). Mean parasite densities did not differ significantly according to the villages
178 for both sexual and asexual stages. Prevalence of gametocytes decreased with age, from 20.8%
179 in children aged 5 years or less to 12.0% in children older than 10 years ($\chi^2 = 11.91$, $P = 0.003$).
180 Prevalence of ABS varied among age groups and was higher in children less than 10 years (χ^2
181 = 10.93, $P = 0.004$).

182 **Table 1** Parasite metrics of the participants

183

184 **Influence of the sickle cell trait on *P. falciparum* transmission in asymptomatic children**

185 A total of 34 gametocyte carriers aged from 3 to 13 years were included for *ex vivo* transmission
186 assays. Among them, 21 individuals were of the HbAA genotype and 13 were of the HbAS
187 genotype. Gametocyte densities were 20% higher in the HbAS cohort as compared to the HbAA
188 parasite donor, however the difference did not reach statistical significance (W = 101, P =
189 0.292, Fig. 2A). Gametocyte carriers of HbAS group had significantly lower *P. falciparum*
190 genotypes as compared to the HbAA group (HbAS, median MOI = 2 [IQR 1-3] and HbAA,
191 median MOI = 3.5 [IQR 2-6]; W = 188, P = 0.032 and Fig. 2B).

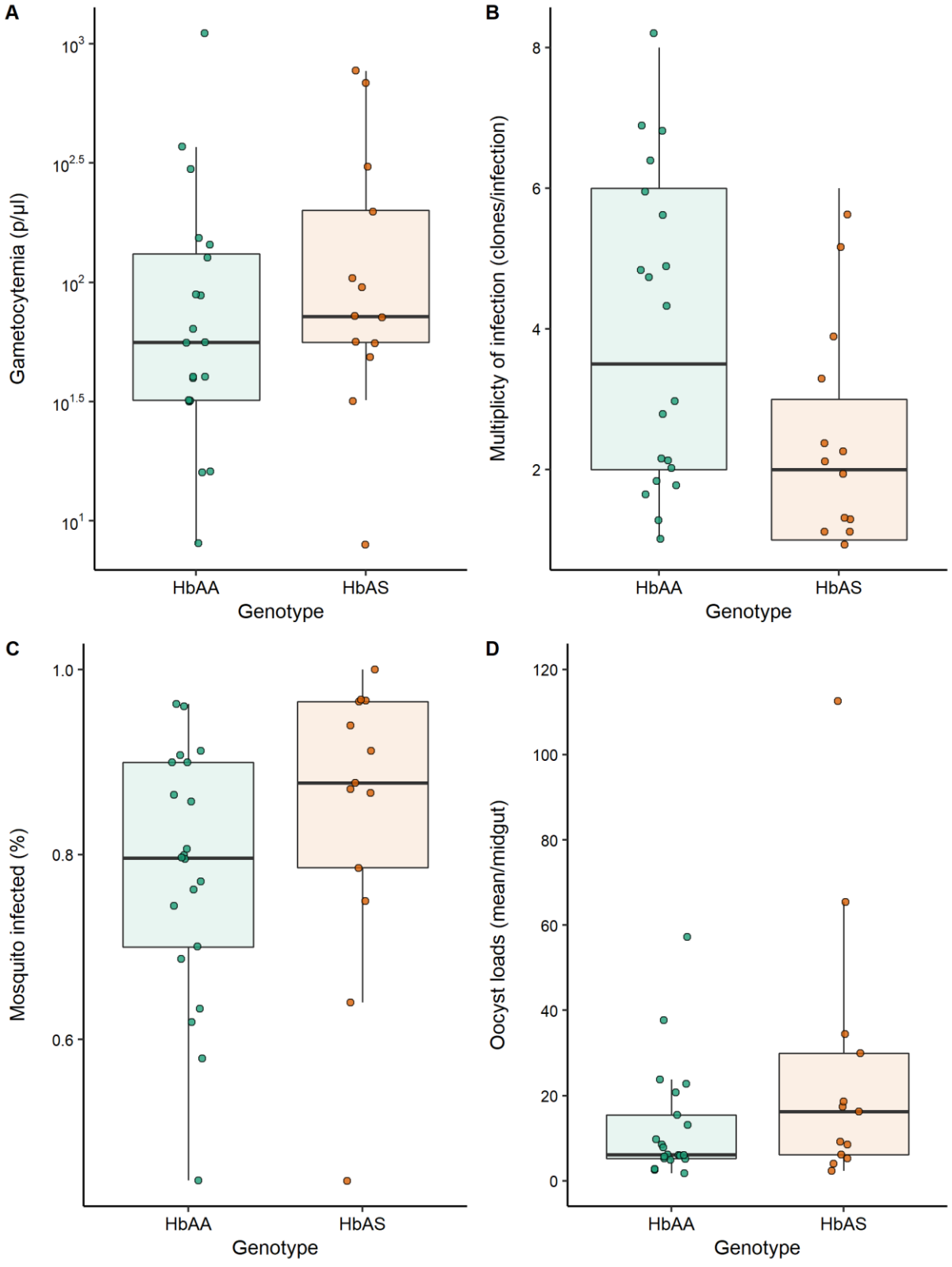


Fig. 2 Parasitological data of HbAA and HbAS gametocyte carriers used for membrane feeding assays and outcomes of mosquito infection. A, median gametocyte densities in HbAS, 72 parasites/µl [IQR 56-200], and in HbAA, 56 parasites/µl [IQR 32-132], were not different

196 (Wilcoxon sum rank test = 1101, *P* = 0.292*)*. B, MOI of gametocyte stages in HbAS carriers
197 was significantly lower than that in their HbAA counterparts, 2 [IQR 1-3] versus 3.5 [IQR 2-6]
198 respectively (Wilcoxon sum rank test = 188, *P* = 0.032). C, mean proportion of infected
199 mosquitoes when fed on blood from HbAA and HbAS gametocyte carriers. Prevalence is
200 significantly lower for mosquitoes fed on HbAA (77.65%) than HbAS (84.67%) blood (Chi-
201 square test = 9.41, *P* = 0.002). and D, mean oocyst densities in infected mosquitoes per blood
202 donor upon membrane feedings assays with serum replacement. Mean oocyst density over all
203 infected mosquitoes was significantly higher for mosquitoes fed on HbAS blood as compared
204 to HbAA (29.62 vs 14.55 oocysts/midgut, respectively; Wilcoxon sum rank test = 117332, *P* =
205 0.000*)*. Each dot represents data from a gametocyte donor.

206 Mosquito infection prevalence and oocyst intensity for HbAA and HbAS genotype for the three
207 membrane feeding experiments, AB, OWN and WB are presented in Table 2. Kruskal-Wallis
208 test was employed to test for difference in prevalence of infection between the three feeding
209 conditions and showed that mean prevalence of infection was significantly different between
210 the three feeding conditions ($P < 0.0001$, Table 2 and Fig. 2C, 3A). A post hoc test based on
211 Tukey HSD test was implemented to present pairwise comparison of mean prevalence of
212 infection for the three feeding conditions. The Tukey HSD test showed a significant difference
213 in the prevalence of infection between AB and WB ($P < 0.0001$), WB and OWN ($P < 0.0001$)
214 and AB and OWN ($P < 0.0001$). These results are in line with previous works that reported
215 variability in the efficiency of membrane feeding experiments and higher proportion of infected
216 mosquitoes after serum replacement [24].

217

218

219

Table 2 Mosquito infection in membrane feeding assays

HBB	Whole blood		OWN blood mixture		AB blood mixture	
	Prev (n/N)	Ooc mean [range]	Prev (n/N)	Ooc mean [range]	Prev (n/N)	Ooc mean [range]
HbAA	52.95 (440/831)	15.51 (30.81) [1-267]	47.07 (426/905)	9.30 (19.87) [1-145]	77.65 (754/971)	14.55 (17.19) [1-122]
HbAS	64.08 (314/490)	19.16 (29.91) [1-196]	56.39 (247/438)	14.50 (24.70) [1-163]	84.67 (381/450)	29.62 (44.03) [1-256]

Mosquito feeding experiments were performed using whole blood from the donor or with serum replacement from the same carrier's (OWN) or a naïve AB serum (AB). HBB, hemoglobin type of the gametocyte blood donor; Prev, pevalence of infection in percentage; Ooc mean, oocyst mean per infected midgut with standard deviation in bracket.

Oocyst means were higher in mosquitoes fed on blood from HbAS donors as compared to those fed on HbAA blood. Wilcoxon rank sum test with continuity correction was applied to test if oocyst loads in mosquitoes fed on HbAA and HbAS blood are equally distributed. For MFA with serum replacement (AB condition), the Wilcoxon rank sum test showed that oocysts loads are not equally distributed in HbAA and HbAS backgrounds and the oocyst means were significantly higher in mosquitoes fed on HbAS blood as compared to those fed on HbAA blood ($P < 0.0001$, Table 2 and Fig. 2D). Similar results were obtained for the two other feeding conditions, OWN and WB (Table 2 and Fig. 3B).

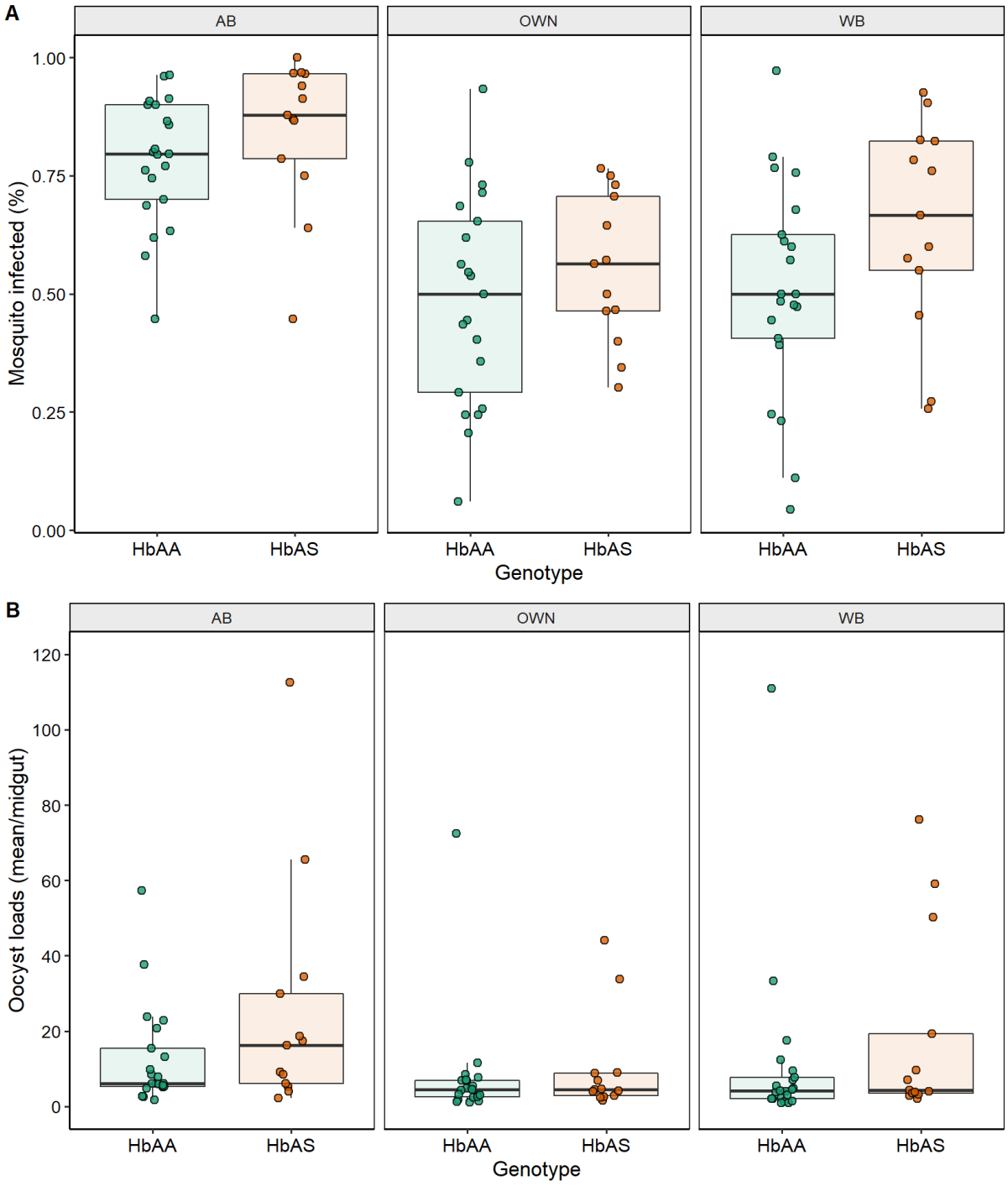


Fig. 3 Infectivity of HbAA and HbAS gametocyte carriers to mosquitoes in the different membrane feeding assays. A, proportion of infected mosquitoes and B, mean oocyst densities in infected mosquitoes**.** AB, membrane feeding assays with naïve serum replacement. OWN, blood mixture with the serum from the donor. WB, whole blood.

Estimates from the hurdle negative binomial GLMM were computed for the three blood feeding conditions (Table 3, Table S3 and S4). The conditional model provided estimates of the effect of the predictive variables (gametocyte density, infection prevalence and MOI) on oocyst counts with their standard error, z-score and *P*-value. The zero-inflation model contains logit coefficients for predicting excess zeros and the corresponding standard errors, z-scores and *P*-values for the coefficients. The coefficients of gametocyte density in the negative binomial regression component (conditional model) and the logit model component (zero-inflation model) were statistically significant for the three membrane feeding experiments AB, OWN and WB (Table 3, Table S3 and S4). Coefficients for hemoglobin genotype and MOI were not statistically significant.

Table 3 Estimates of hurdle negative binomial generalized linear mixed model for oocysts count of AB feedings

Conditional model				
	Estimate	Std.Error	z value	Pr(>|z|)
(Intercept)	1.756649	0.425095	4.132	3.59e-05***
HBB genotype	0.293333	0.350847	0.836	0.403
gametocytemia	0.002751	0.000659	4.174	2.99e-05***
MOI	-0.02205	0.085616	-0.258	0.797
Zero-inflation model				
	Estimate	Std.Error	z value	Pr(>|z|)
(Intercept)	-1.28962	0.407575	-3.164	0.00156**
HBB genotype	-0.40859	0.355597	-1.149	0.25055
gametocytemia	-0.00171	0.000819	-2.083	0.03725*
MOI	0.013399	0.080707	0.166	0.86814

*Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1; Dispersion parameter for truncated_nbinom2 family (): 12.5; MOI, multiplicity of infection*

The likelihood that the number of oocysts would be zero decreases with an increase in gametocyte density in the three feeding conditions. Hence, prevalence of infection is associated with gametocyte density in the blood donor for each feeding condition. Mean oocyst loads in mosquitoes fed on HbAS blood donors in AB feeding assays increased significantly when gametocyte density increased and other variables were held constant (odds = 0.002751, *P* = 2.99e-05, Table 3). The odds of being an excessive zero decreased with increasing gametocyte density (odds = -0.00171, *P* = 0.037, Table 3) and this indicates that it is more likely to have any oocysts as gametocyte density increases in mosquitoes fed on HbAS donors. Although the HbAS genotype was associated with higher log oocyst counts in mosquitoes as compared to HbAA genotype at the highest gametocyte densities, the difference did not reach significant level (Wald test, P = 0.318, Fig. 4). Similarly, mean oocyst loads in mosquitoes fed on blood from HbAS genotype increased with gametocyte density when other variables were held constant for feeding conditions OWN and WB (Tables S3 and S4). Immune factors from the blood donor are unlikely to fully explain the higher infectivity of mosquitoes fed on HbAS blood.

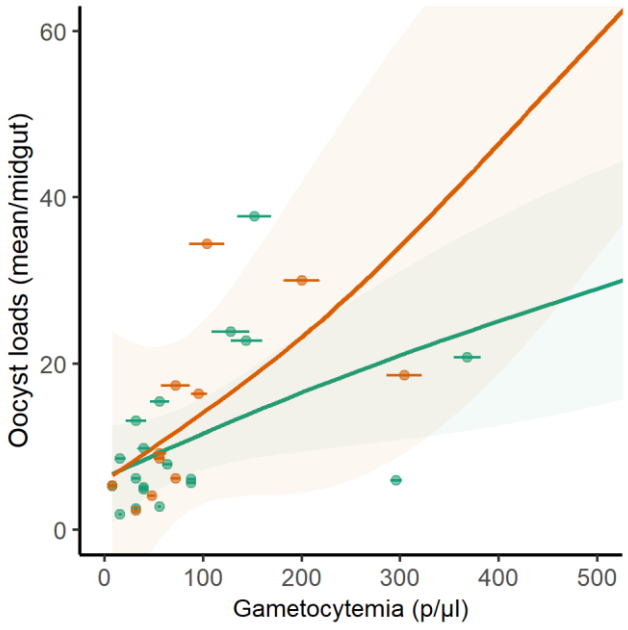


Fig. 4 Mosquito infection burden according to gametocytemia in HbAA and HbAS blood donors. The relationship between gametocyte density of the blood donor and oocyst intensity differed between HbAA (green) and HbAS (red) individuals. Mosquitoes fed on blood from HbAS children have higher oocyst loads, the difference increased with gametocyte densities but did not reach significant level (Wald test, P = 0.318).

Discussion

In this study, we screened asymptomatic children for malaria infection and sickle cell trait carriage. About two third of the children (65.5%) presented *Plasmodium* infection and 95% of the infections harboured *P. falciparum*, in line with previous observations obtained from the same population in this locality of Mfou [26-28]. Malaria prevalence has even increased over the past fifteen years, from 51% in 2005-2006, 55% in 2013-2014 to 66% in 2017 and 2018, despite continued control interventions.

Prevalence of malaria infection and parasite densities decreased with age, as a result of the low level of acquired immunity in younger children [29, 30]. We observed a higher prevalence of malaria infection in males compared to females and the sex-specific difference increased with age. A male bias in the malaria prevalence or incidence has frequently been reported from late childhood [31-33], it could be in part explained by behavioural differences causing males to be more exposed to mosquito bites. Nevertheless,longitudinal studies have revealed biological sex-based differences, such as a faster rate of parasite clearance in females [34]. Spatial heterogeneity of malaria infections was observed, and both malaria prevalence and parasite densities differed between the different villages. Hotspots of transmission have been largely described, and these areas of higher malaria incidence have been associated with host genetic factors as well as socioeconomic and environmental factors [35, 36]. In area of low endemicity, hotspots are the focus of spatially targeted interventions as they constitute a reservoir of

parasites that maintain residual transmission. In high transmission settings (malaria prevalence > 50%) intensified control measures are needed through the whole area.

Prevalence of sickle cell trait was 20.2% in our cohort, which is in agreement with the reported range in Central Africa [2, 37, 38]. Since SCT provides protection against severe symptoms of malaria [1, 2, 39] the HbS frequency has been maintained at high levels in the area. The protective effect of SCT against symptomatic malaria has been associated with a better ability of HbAS carriers to control parasitemia, which is explained by a decreased viability of parasites in altered HbS RBCs and a reduced cytoadherence that inhibits sequestration and improves clearance by the spleen [7-9]. In our study, malaria prevalence and *P. falciparum* asexual densities did not differ significantly between the HbAS and HbAA groups, which is in agreement with other previous surveys [6, 40, 41]. Few studies have analysed the impact of SCT on asymptomatic individuals and these works were conducted in areas with varying epidemiological settings, making it difficult to draw consistent conclusion on the protective effect of HbAS on asymptomatic malaria. Nonetheless, SCT could provide indirect protection that is likely missed in cross-sectional studies, particularly in high transmission settings where children develop acquired antimalarial immunity by the age of 5. Indeed, longitudinal studies in malaria endemic areas have provided evidence that HbAS delayed both time to first malaria episode and parasite reappearance after antimalarial treatment [5, 11, 41, 42]. The longer duration of asymptomatic infections in HbAS children as compared to HbAA ones may explain why we found a higher prevalence of *P. falciparum* gametocytes in SCT carriers.

The lower multiplicity of infection we found in gametocyte samples of HbAS genotypes as compared to HbAA likely results from lower MOI in asexual stages. Previous studies have reported a higher prevalence of polyclonal infections in SCT children [5, 38] and this may be imply that SCT carriers may hosting multiple parasite clones, by controlling them at low levels to establish a more effective antibody response directory compared to HbAA children. [5, 6].

317 Interestingly, a recent study from human blood collections reports an association between HbS
318 and parasite polymorphisms in three genes [43], it will be important to genotype these loci also
319 in gametocyte and oocyst transmission stages to determine if they are found at all parasite
320 developmental stages and to understand what the fitness advantage/cost of these mutations may
321 be in HbAS and HbAA individuals.

322 In this study, carriage of sickle cell trait was associated with higher infection rate in mosquitoes,
323 consistent with previous studies showing an increased infectiousness of gametocytes from
324 HbAS individuals as compared to HbAA [16-18, 44]. In our membrane feeding assays, oocyst
325 densities also correlated with the haemoglobin status, gametocyte isolates from HbAS donors
326 led to higher oocyst loads. This finding may be related to the longer period of circulation of
327 stage V gametocytes in HbAS individual blood, which provide parasites a greater chance to
328 reach the peak of infectivity for the mosquito [45]. Furthermore, influence of the SCT trait on
329 mosquito infection, both for intensity and prevalence of infection, increased with increasing
330 gametocyte densities. This density-dependence effect may reflect a higher fitness of
331 gametocytes in an HbAS background. In fact, the lower MOI we found in HbAS blood donors
332 must limit the amount of outcrossing and we have previously reported that mating between
333 clones results in higher mosquito infections [46].

334 The association between HbS genotype and mosquito infectivity was revealed in both naive
335 and immune blood assays (AB and OWN/WB experiments, respectively) which indicated that
336 the higher infectiousness of gametocytes from HbAS individuals is independent of the host
337 humoral immunity. In our membrane feeding assays, gametocyte donor children were aged over
338 5 years and the observed effect may vary in other age groups. Indeed, previous studies have
339 reported that protection of HbAS against symptomatic malaria or high density parasitemia
340 varied with age as a result of acquired immunity in endemic areas [4, 5, 11]. Nonetheless, the

public health impact of our results points the need for intensive malaria control interventions in areas with high prevalence of HbAS.

Conclusion

Mechanisms underlying the higher infectiousness of gametocytes from HbAS individuals remains to be elucidated. Our observation may represent a mechanism underlying host-pathogen co-evolution, whereby *P. falciparum* would have developed means to increase its infectiousness for the mosquito to compensate the protection against malaria conferred by the sickle cell trait in the human host. In HbAS individuals, protection against severe malaria occurs through reduced cytoadherence capacity of infected RBCs to microvascular blood vessel endothelium and increased oxidative stress in RBCs infected by asexual parasites [8, 47, 48]. By contrast, RBCs infected by immature stages of gametocytes do not adhere to endothelial cells but sequester in the bone marrow [49]. In *in vitro* conditions, development from stage I to IV can take place within erythroblasts and infection of erythroblasts by Plasmodium induces oxidative stress and delay erythroblast differentiation into reticulocytes [50]. So far, no study has investigated the molecular and biochemical changes caused by the HbS carriage on gametocytogenesis, particulary in the bone marrow niche. Further studies will address whether gametocyte-infected HbAS cells harbour different properties that could affect maturity and infectiousness.

Abbreviations

SCT: sickle cell trait; HBB: hemoglobin; HbS: sickle cell haemoglobin; RBC: red blood cell; DBS: dried blood spot; MOI: multiplicity of infection; MFA: membrane feeding assay; WB: whole blood; AB: naïve serum from a AB donor; OWN: serum from the donor; CNERSH: National Committee of Ethics Research for Human Health; AIC: Akaike information criterion ; GLM : generalized linear models

Supplementary Information

The online version contains supplementary material.

Additional file 1 : Table S1. Characteristics of the population

Additional file 1 : Table S2. Characteristics of the gametocyte blood donors and mosquito infection in membrane feeding assays

Additional file 1 : Table S3. Estimates of hurdle negative binomial generalized linear mixed model for oocysts count of the OWN membrane feeding condition assay

Additional file 1 : Table S4. Estimates of hurdle negative binomial generalized linear mixed model for oocysts count of the whole blood membrane feeding assay

References

1. Kwiatkowski DP: **How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria**. *Am J Hum Genet* 2005, **77**(2):171-192.
2. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, Temperley WH, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI: **Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates**. *Lancet* 2013, **381**(9861):142-151.
3. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT: **Sickle-cell disease**. *Lancet* 2010, **376**(9757):2018-2031.
4. Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, Kariuki S, Nahlen BL, Lal AA, Udhayakumar V: **Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality**. *Lancet* 2002, **359**(9314):1311-1312.
5. Gong L, Maiteki-Sebuguzi C, Rosenthal PJ, Hubbard AE, Drakeley CJ, Dorsey G, Greenhouse B: **Evidence for both innate and acquired mechanisms of protection**

from Plasmodium falciparum in children with sickle cell trait. *Blood* 2012, **119**(16):3808-3814.

6. Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, Alexander ND, Kortok M, Snow RW, Marsh K: **Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases**. *J Infect Dis* 2005, **192**(1):178-186.

7. Friedman MJ: **Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, **75**(4):1994-1997.

8. Cholera R, Brittain NJ, Gillrie MR, Lopera-Mesa TM, Diakite SA, Arie T, Krause MA, Guindo A, Tubman A, Fujioka H *et al*: **Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(3):991-996.

9. Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ: **Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against P. falciparum malaria**. *Nature* 1978, **274**(5672):701-703.

10. Acquah FK, Donu D, Bredu D, Eyia-Ampah S, Amponsah JA, Quartey J, Obboh EK, Mawuli BA, Amoah LE: **Asymptomatic carriage of Plasmodium falciparum by individuals with variant blood groups and haemoglobin genotypes in southern Ghana**. *Malar J* 2020, **19**(1):217.

11. Crompton PD, Traore B, Kayentao K, Doumbo S, Ongoiba A, Diakite SA, Krause MA, Doumtabe D, Kone Y, Weiss G *et al*: **Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria**. *J Infect Dis* 2008, **198**(9):1265-1275.

12. Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM: **Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis**. *Lancet Infect Dis* 2012, **12**(6):457-468.

13. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C: **Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance**. *Nat Rev Microbiol* 2014, **12**(12):833-840.

14. Bousema T, Drakeley C: **Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination**. *Clin Microbiol Rev* 2011, **24**(2):377-410.

15. Lawaly YR, Sakuntabhai A, Marrama L, Konate L, Phimpraphi W, Sokhna C, Tall A, Sarr FD, Peerapittayamongkol C, Louicharoen C *et al*: **Heritability of the human infectious reservoir of malaria parasites**. *PLoS One* 2010, **5**(6):e11358.

16. Gouagna LC, Ferguson HM, Okech BA, Killeen GF, Kabiru EW, Beier JC, Githure JI, Yan G: **Plasmodium falciparum malaria disease manifestations in humans and transmission to Anopheles gambiae: a field study in Western Kenya**. *Parasitology* 2004, **128**(Pt 3):235-243.

17. Robert V, Tchuinkam T, Mulder B, Bodo JM, Verhave JP, Carnevale P, Nagel RL: **Effect of the sickle cell trait status of gametocyte carriers of Plasmodium falciparum on infectivity to anophelines**. *Am J Trop Med Hyg* 1996, **54**(2):111-113.

18. Gouagna LC, Bancone G, Yao F, Yameogo B, Dabire KR, Costantini C, Simpore J, Ouedraogo JB, Modiano D: **Genetic variation in human HBB is associated with Plasmodium falciparum transmission**. *Nat Genet* 2010, **42**(4):328-331.

19. Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE: **Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa**. *Am J Trop Med Hyg* 1995, **52**(6):565-568.

20. Padley D, Moody AH, Chiodini PL, Saldanha J: **Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present**. *Ann Trop Med Parasitol* 2003, **97**(2):131-137.

21. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. *Science* 1988, **239**(4839):487-491.

22. Ribaut C, Berry A, Chevalley S, Reybier K, Morlais I, Parzy D, Nepveu F, Benoit-Vical F, Valentin A: **Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human Plasmodium species**. *Malar J* 2008, **7**:45.

23. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N *et al*: **Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite Plasmodium falciparum**. *Mol Biol Evol* 2000, **17**(10):1467-1482.

24. Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, Gouagna LC, van Warmerdam T, Awono-Ambene PH, Bonnet S, Diallo M, Coulibaly M, Tchuinkam T *et al*: **Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected Plasmodium falciparum gametocyte carriers**. *PLoS One* 2012, **7**(8):e42821.

25. Nsango SE, Abate L, Thoma M, Pompon J, Fraiture M, Rademacher A, Berry A, Awono-Ambene PH, Levashina EA, Morlais I: **Genetic clonality of Plasmodium falciparum affects the outcome of infection in Anopheles gambiae**. *Int J Parasitol* 2012, **42**(6):589-595.

26. Mendes AM, Schlegelmilch T, Cohuet A, Awono-Ambene P, De Iorio M, Fontenille D, Morlais I, Christophides GK, Kafatos FC, Vlachou D: **Conserved mosquito/parasite interactions affect development of Plasmodium falciparum in Africa**. *PLoS Pathog* 2008, **4**(5):e1000069.

27. Sandeu MM, Bayibeki AN, Tchioffo MT, Abate L, Gimonneau G, Awono-Ambene PH, Nsango SE, Diallo D, Berry A, Texier G *et al*: **Do the venous blood samples replicate malaria parasite densities found in capillary blood? A field study performed in naturally-infected asymptomatic children in Cameroon**. *Malar J* 2017, **16**(1):345.

28. Tuedom AGB, Sarah-Matio EM, Moukoko CEE, Feufack-Donfack BL, Maffo CN, Bayibeki AN, Awono-Ambene HP, Ayong L, Berry A, Abate L *et al*: **Antimalarial drug resistance in the Central and Adamawa regions of Cameroon: Prevalence of mutations in P. falciparum crt, Pfmdr1, Pfdhfr and Pfdhps genes**. *PLoS One* 2021, **16**(8):e0256343.

29. Doolan DL, Dobano C, Baird JK: **Acquired immunity to malaria**. *Clin Microbiol Rev* 2009, **22**(1):13-36, Table of Contents.

30. White M, Watson J: **Age, exposure and immunity**. *Elife* 2018, **7**.

31. Houngbedji CA, N'Dri PB, Hurlimann E, Yapi RB, Silue KD, Soro G, Koudou BG, Acka CA, Assi SB, Vounatsou P *et al*: **Disparities of Plasmodium falciparum infection, malaria-related morbidity and access to malaria prevention and treatment among school-aged children: a national cross-sectional survey in Cote d'Ivoire**. *Malar J* 2015, **14**:7.

32. Landgraf B, Kollaritsch H, Wiedermann G, Wernsdorfer WH: **Parasite density of Plasmodium falciparum malaria in Ghanaian schoolchildren: evidence for influence of sex hormones?** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994, **88**(1):73-74.

33. Molineaux L, Gramiccia G: **The garki project : research on the epidemiology and control of malaria in the Sudan savanna of West Africa.** *World Health Organization* 1980, **https://apps.who.int/iris/handle/10665/40316**.

34. Briggs J, Teyssier N, Nankabirwa JI, Rek J, Jagannathan P, Arinaitwe E, Bousema T, Drakeley C, Murray M, Crawford E *et al*: **Sex-based differences in clearance of chronic Plasmodium falciparum infection**. *Elife* 2020, **9**.

35. Bousema T, Drakeley C, Gesase S, Hashim R, Magesa S, Mosha F, Otieno S, Carneiro I, Cox J, Msuya E *et al*: **Identification of hot spots of malaria transmission for targeted malaria control**. *J Infect Dis* 2010, **201**(11):1764-1774.

36. Rouamba T, Nakanabo-Diallo S, Derra K, Rouamba E, Kazienga A, Inoue Y, Ouedraogo EK, Waongo M, Dieng S, Guindo A *et al*: **Socioeconomic and environmental factors associated with malaria hotspots in the Nanoro demographic surveillance area, Burkina Faso**. *BMC Public Health* 2019, **19**(1):249.

37. Elguero E, Delicat-Loembet LM, Rougeron V, Arnathau C, Roche B, Becquart P, Gonzalez JP, Nkoghe D, Sica L, Leroy EM *et al*: **Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**(22):7051-7054.

38. Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O, Ossari S, Luty A, Reltien J, Georges A, Millet P: **Plasmodium falciparum: sickle-cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections**. *Exp Parasitol* 1997, **87**(1):39-46.

39. Allison AC: **Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malareal infection**. *Br Med J* 1954, **1**(4857):290-294.

40. Fleming AF, Storey J, Molineaux L, Iroko EA, Attai ED: **Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. I. Prevalence of haemoglobins and relationships between sickle cell trait, malaria and survival**. *Ann Trop Med Parasitol* 1979, **73**(2):161-172.

41. Migot-Nabias F, Pelleau S, Watier L, Guitard J, Toly C, De Araujo C, Ngom MI, Chevillard C, Gaye O, Garcia A: **Red blood cell polymorphisms in relation to**

Plasmodium falciparum asymptomatic parasite densities and morbidity in Senegal. *Microbes Infect* 2006, **8**(9-10):2352-2358.

42. Lell B, Mordmuller B, Dejon Agobe JC, Honkpehedji J, Zinsou J, Mengue JB, Loembe MM, Adegnika AA, Held J, Lalremruata A *et al*: **Impact of Sickle Cell Trait and Naturally Acquired Immunity on Uncomplicated Malaria after Controlled Human Malaria Infection in Adults in Gabon**. *Am J Trop Med Hyg* 2018, **98**(2):508-515.

43. Band G, Leffler EM, Jallow M, Sisay-Joof F, Ndila CM, Macharia AW, Hubbart C, Jeffreys AE, Rowlands K, Nguyen T *et al*: **Malaria protection due to sickle haemoglobin depends on parasite genotype**. *Nature* 2022, **602**(7895):106-111.

44. Gouagna LC, Bonnet S, Gounoue R, Verhave JP, Eling W, Sauerwein R, Boudin C: **Stage-specific effects of host plasma factors on the early sporogony of autologous Plasmodium falciparum isolates within Anopheles gambiae**. *Trop Med Int Health* 2004, **9**(9):937-948.

45. Barry A, Bradley J, Stone W, Guelbeogo MW, Lanke K, Ouedraogo A, Soulama I, Nebie I, Serme SS, Grignard L *et al*: **Higher gametocyte production and mosquito infectivity in chronic compared to incident Plasmodium falciparum infections**. *Nat Commun* 2021, **12**(1):2443.

46. Morlais I, Nsango SE, Toussile W, Abate L, Annan Z, Tchioffo MT, Cohuet A, Awono-Ambene PH, Fontenille D, Rousset F *et al*: **Plasmodium falciparum mating patterns and mosquito infectivity of natural isolates of gametocytes**. *PloS One* 2015, **10**(4):e0123777 [0123714].

47. Archer NM, Petersen N, Clark MA, Buckee CO, Childs LM, Duraisingh MT: **Resistance to Plasmodium falciparum in sickle cell trait erythrocytes is driven by oxygen-dependent growth inhibition**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, **115**(28):7350-7355.

48. Cyrklaff M, Srismith S, Nyboer B, Burda K, Hoffmann A, Lasitschka F, Adjalley S, Bisseye C, Simpore J, Mueller AK *et al*: **Oxidative insult can induce malaria-protective trait of sickle and fetal erythrocytes**. *Nat Commun* 2016, **7**:13401.

49. Aguilar R, Moraleda C, Achtman AH, Mayor A, Quinto L, Cistero P, Nhabomba A, Macete E, Schofield L, Alonso PL *et al*: **Severity of anaemia is associated with bone marrow haemozoin in children exposed to Plasmodium falciparum**. *Br J Haematol* 2014, **164**(6):877-887.

50. Neveu G, Richard C, Dupuy F, Behera P, Volpe F, Subramani PA, Marcel-Zerrougui B, Vallin P, Andrieu M, Minz AM *et al*: **Plasmodium falciparum sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis**. *Blood* 2020, **136**(12):1381-1393.

Acknowledgements

We thank the study participants and the medical team from the Mfou Hospital for technical assistance in sample collection. We thank the GenSeq technical facilities at the « Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier » supported by the LabEx CeMEB, an ANR "Investissements d'avenir" program (ANR-10-LABX-04-01). We are grateful to Francis Essengue, Ballotin Fongang and Majoline Tchioffo for their advice and support in the data analysis.

Author contributions

AB, SEN and AM designed and conceptualized the study. CMN, ANB, LA, LBF-D, EMS-M, and GAB performed the field work. CMN, ANB, LA, LBF-D, EMS-M, GAB and PHA-A performed the mosquito infections. LSA and SEN coordinated study implementation. OSM, PT and NM performed the computational analyses. CNM, AT, SEN, and IM analyzed and

interpreted the data. CNM, SEN and IM wrote the paper, and all other authors contributed to the writing. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was funded by the French National Research Institute for Sustainable Development (IRD) and through the JEAI-IMPALA project granted to SEN. CNM was supported by the ARTS PhD grant programme from IRD and EMS-M and LBF-D by doctoral fellowship from the Labex ParaFrap.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files.

Ethics declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the National Committee of Ethics Research for Human Health (CNERSH) under agreement 2017/06/922/CE/CNERSH/SP and obtained research agreement from the Ministry of Health (032/L/MINSANTE/SG/DRSPC/SSD/MFOU). All participants provided written informed consent prior to enrollment.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Table 1 Parasite metrics of the participants

Variable		Asexual blood stages				Gametocyte stages			
	Category	Prevalence (%)	*P*_value	Density (p/µl) ± SD	*P*_value	Prevalence (%)	*P*_value	Density (p/µl) ± SD	*P*_value
Sex			***0.012***		*0.865*				*0.539*
	Female (n= 764)	62.37		3488.88 (8804.55)		13.95		180.83 (1010.39)	
	Male (n= 793)	68.43		3623.88 (9644.74)		15.15		54.14 (366.45)	
Hemoglobin			*0.206*		*0.564*		***0.032***		*0.874*
	AA (n=1238)	66.24		3660.12 (9568.52)		13.57		118.62 (804.37)	
	AS (n=314)	62.42		3145.79 (7834.63)		18.47		98.87 (529.98)	
Age class			***0.004***		***0.000***		***0.003***		*0.255*
	≤ 5 (n=303)	65.68		7575.72 (16322.45)		20.79		98.54 (509.27)	
	6-10 (n=728)	69.09		3013.28 (6877.46)		13.74		183.84 (1039.04)	
	> 10 (n=672)	61.01		1883.19 (4462.98)		11.98		17.02 (18.43)	
Village			***0.000***		*0.094*		*0.072*		*0.091*
	Abembe (n= 99)	79.79		3508.86 (4679.77)		22.22		22.91 (14.75)	

Ekali I (n= 114)	71.93	2776.59 (10698.78)	17.54	18.80 (27.63)
Ekali II (n= 151)	78.81	4023.13 (7733.49)	16.56	20.16 (2138.21)
Ekok (n= 80)	71.25	2689.96 (5913.93)	10.00	827.00 (769.94)
Essazok (n= 203)	67.16	2754.96 (3650.20)	13.43	164.74 (4.13)
Kamba (n= 58)	75.86	3017.45 (8603.15)	10.34	10.67 (17.11)
Koumou (n= 103)	53.40	3655.85 (5546.48)	17.48	16.89 (6.64)
Mekomba (n= 160)	72.50	2525.10 (7834.63)	15.00	12.67 (184.01)
Nkassomo (n= 58)	53.45	3435.35 (8560.84)	18.97	75.64 (8.82)
Nkilzok (n= 111)	78.38	4710.44 (2946.73)	18.92	13.71 (725.86)
Nkolmefou (n= 145)	67.36	1806.52 (19086.16)	8.33	223.33 (1437.94)
Nkolnda (n= 275)	41.76	6936.00 (4679.77)	11.72	273.25 (14.75)

Densities are expressed as parasites/µl and shown with standard deviation. P_values were obtained using χ^2 test for prevalence of infection. Wilcoxon sum rank tests were computed for two group comparisons on log-transformed parasite densities and GLMs were used for multiple comparisons. Significant P_values are shown in bold.

Table S1 Characteristics of the population

	HbAA (n=1238)	HbAS (n=314)	OR [95% CI]	*P*_value
Gender, n (%)				
Male	612 (49.43)	180 (57.32)	1.37 [1.07-1.76]	0.012*
Female	626 (50.57)	134 (42.68)		
Median age [range]	9 [1-16]	8 [1-15]		
Age groups (years), n (%)				
≤ 5	239 (19.31)	64 (20.38)	1.07 [0.79-1.45]	0.667
6-10	567 (45.80)	157 (50)	1.18 [0.92-1.52]	0.183
> 10	432 (34.89)	93 (29.62)	0.785 [0.60-1.02]	0.078

*OR, odds ratio; CI, confidence interval; *: statistically significant with the Chi-squared test*

Table S2 Characteristics of the gametocyte blood donors and mosquito infection in membrane feeding assays

Characteristics of the blood donor							AB blood mixture			OWN blood mixture			Whole blood		
ID	HBB	Age	Sex	MOI	ABS	SBS	N	Prev (%)	Mean (SD)	N	Prev (%)	Mean (SD)	N	Prev (%)	Mean (SD)
C337	HbAA	8	M	5	2231	na	20	80.00	6.06 (3.32)	21	61.90	4.85 (4.24)	23	39.13	4.00 (2.45)
C340	HbAA	12	F	2	949	32	60	63.33	6.16 (4.10)	42	50.00	4.76 (3.67)	36	47.22	2.18 (1.98)
C366	HbAA	12	F	na	0	32	42	61.90	2.54 (1.68)	36	44.44	1.75 (0.68)	31	48.39	2.07 (1.33)
C393	HbAA	8	F	3	688	40	48	68.75	4.88 (4.48)	54	68.52	4.30 (3.75)	19	78.95	3.87 (2.70)
C409	HbAA	6	M	2	0	144	64	74.47	22.77 (15.79)	82	24.39	7.70 (6.60)	74	40.54	9.53 (5.59)
C415	HbAA	10	M	2	768	128	78	79.49	23.81 (19.15)	78	53.85	6.95 (6.31)	72	61.11	5.45 (4.89)
C427	HbAA	13	F	3	288	16	38	44.74	1.82 (1.38)	34	20.59	1.14 (0.38)	39	23.08	1.22 (0.67)
C431	HbAA	5	F	2	368	296	20	70.00	5.93 (5.74)	62	40.32	2.48 (1.78)	23	4.35	1.00 (NA)
C432	HbAA	10	M	6	896	16	57	91.23	8.56 (5.49)	26	73.08	6.84 (5.18)	27	11.11	1.00 (0.00)
C436	HbAA	13	M	4	128	40	42	76.19	5.09 (4.66)	33	6.06	11.50 (14.85)	36	44.44	1.44 (0.73)
C441	HbAA	5	M	2	384	40	25	96.00	9.75 (6.17)	26	65.38	8.53 (7.11)	28	57.14	4.25 (4.42)
C451	HbAA	7	F	1	5808	1104	27	96.30	57.27 (32.15)	30	93.33	72.46 (37.68)	31	67.74	110.86 (79.71)
C457	HbAA	11	F	2	448	88	30	90.00	6.07 (4.21)	32	56.25	2.83 (2.26)	30	76.67	7.13 (4.52)

C458	HbAA	5	M	7	2976	8	56	85.71	5.27 (3.24)	39	25.64	1.40 (0.70)	41	75.61	4.77 (3.52)
C512	HbAA	10	F	6	3344	64	31	80.65	7.84 (5.23)	22	54.55	5.50 (3.00)	24	50.00	3.08 (2.64)
C513	HbAA	9	F	7	1792	88	48	77.08	5.65 (4.45)	45	24.44	2.64 (1.96)	30	60.00	4.56 (5.09)
C519	HbAA	5	F	1	0	368	54	79.63	20.72 (13.62)	35	71.43	4.52 (4.81)	38	50.00	17.53 (13.04)
C521	HbAA	9	F	8	192	56	50	58.00	2.79 (1.66)	48	29.17	1.29 (0.83)	53	24.53	2.08 (1.50)
C535	HbAA	12	F	6	2624	152	54	90.74	37.71 (17.14)	69	43.48	3.23 (2.36)	70	97.14	33.25 (21.17)
C542	HbAA	8	F	5	1088	56	60	90.00	15.44 (9.95)	63	77.78	7.12 (6.32)	64	62.50	12.45 (10.40)
C550	HbAA	11	F	5	0	32	37	86.49	13.13 (10.10)	28	35.71	3.00 (2.98)	42	47.62	7.70 (5.88)
C395	HbAS	6	F	3	256	56	33	93.94	9.16 (6.61)	15	46.67	8.86 (7.36)	39	25.64	2.90 (2.88)
C402	HbAS	6	F	1	0	200	31	87.10	29.96 (17.86)	28	57.14	4.56 (6.46)	40	55.00	4.36 (3.44)
C403	HbAS	5	M	1	0	8	24	75.00	5.28 (4.60)	20	40.00	1.63 (0.74)	22	27.27	2.00 (0.89)
C428	HbAS	13	F	4	2112	48	38	44.74	4.06 (3.75)	41	46.34	2.63 (1.50)	55	45.45	3.16 (3.76)
C433	HbAS	6	M	1	208	56	57	91.23	8.56 (5.49)	26	73.08	6.84 (5.18)	55	60.00	3.61 (2.40)
C435	HbAS	7	M	2	272	72	29	96.55	17.36 (14.48)	43	30.23	9.08 (8.79)	50	76.00	19.24 (13.61)
C445	HbAS	13	F	1	0	96	30	96.67	16.31 (8.11)	59	64.41	4.68 (4.62)	23	82.61	9.68 (8.06)
C448	HbAS	5	M	2	8416	768	31	100.00	65.45 (51.17)	24	75.00	33.72 (33.77)	27	92.59	59.04 (42.90)

C455	HbAS	3	F	2	45984	304	30	86.67	18.62 (17.82)	30	50.00	2.93 (2.25)	30	66.67	4.05 (2.52)
C456	HbAS	3	M	2	0	104	31	96.77	34.40 (17.81)	17	70.59	4.17 (3.54)	31	90.32	50.29 (27.53)
C515	HbAS	6	M	5	0	688	49	87.76	112.58 (66.21)	64	76.56	44.02 (35.09)	23	78.26	76.11 (47.18)
C520	HbAS	7	F	6	11648	72	42	78.57	6.12 (4.17)	39	56.41	2.45 (1.90)	33	57.58	3.84 (3.06)
C544	HbAS	7	M	1	0	32	25	64.00	2.31 (1.54)	32	34.38	4.09 (3.73)	62	82.26	7.04 (5.09)

HBB, hemoglobin type; MOI, multiplicity of infection; ABS, asexual blood stages (p/µl); SBS, sexual blood stages (p/µl); N, number of dissected mosquitoes; Prev, prevalence of mosquito infection in percentage; Mean, oocyst mean per infected midgut; SD, standard deviation

Table S3 Estimates of hurdle negative binomial generalized linear mixed model for oocysts count of the OWN membrane feeding condition assay

Conditional model				
	Estimate	Std.Error	z value	Pr(>|z|)
(Intercept)	1.044525	0.384778	2.715	0.00664**
HBB genotype	0.090838	0.321517	0.283	0.77754
gametocytemia	0.003032	0.000612	4.953	7.32e-07***
MOI	-0.08466	0.078237	-1.082	0.27918
Zero-inflation model				
	Estimate	Std.Error	z value	Pr(>|z|)
(Intercept)	0.162544	0.349475	0.465	0.641853
HBB genotype	-0.13252	0.300639	-0.441	0.659353
gametocytemia	-0.00212	0.000638	-3.318	0.000905***
MOI	0.057673	0.070231	0.821	0.411535

*Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1; Dispersion parameter for truncated_nbinom2 family*

(): 0.987; MOI, multiplicity of infection

Table S4 Estimates of hurdle negative binomial generalized linear mixed model for oocysts count of the whole blood membrane feeding assay

Conditional model				
	Estimate	Std.Error	z value	Pr(>|z|)
(Intercept)	0.854663	0.476879	1.792	0.0731.
HBB genotype	0.412393	0.397626	1.037	0.2997
gametocytemia	0.003796	0.000754	5.032	4.86e-07***
MOI	0.010487	0.094754	0.111	0.9119
Zero-inflation model				
	Estimate	Std.Error	z value	Pr(>|z|)
(Intercept)	0.204579	0.511896	0.4	0.689
HBB genotype	-0.62917	0.429932	-1.463	0.143
gametocytemia	-0.0012	0.000854	-1.405	0.16
MOI	-0.03141	0.10228	-0.307	0.759

*Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1; Dispersion parameter for truncated_nbinom2 family (): 1.49; MOI, multiplicity of infection*

CHAPITRE 5:

PREFERENCE DES CELLULES HOTES ET HETEROGENEITE DES PARASITES CIRCULANTS DANS LES INFECTIONS NATURELLES A PLASMODIUM FALCIPARUM

Ce travail a été réalisée dans le cadre du projet de recherche SIDEWAYS, financé par l'agence Nationale de Recherche (ANR) et par l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

5.1 Description de l'étude

Dans cette étude, nous avons déterminé la relation qui existe entre l'âge des érythrocytes et l'invasion de *P. falciparum* dans des conditions naturelles, à partir d'échantillons de sang prélevés chez des sujets asymptomatiques dans la localité de Mfou au Cameroun. Une analyse par cytométrie en flux a été réalisée sur 140 enfants infectés par *P. falciparum* afin de différencier les parasites dans les érythrocytes immatures (présence de Vybrant Green positif (VG+), anticorps monoclonal positif (anti-CD71+) et matures (VG- et CD71-). Les parasites dans les réticulocytes ont contribué de manière significative à la biomasse parasitaire et la probabilité qu'un parasite se trouve dans un réticulocyte était en moyenne 30 fois plus élevée par rapport à une cellule hôte normocytaire. Pour vérifier que ce résultat obtenu dépend de l'invasion, nous avons testé l'invasion en condition de laboratoire sur deux souches de *P. falciparum* provenant d'Afrique 3D7 et GB4. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que *P. falciparum* a une préférence pour les réticulocytes en condition *in vivo* et *in vitro* et le test de Spearman a montré que cette préférence était corrélée à la parasitémie ($r=-0.55$, $p=1.3*10^{-12}$).

La prochaine étape consistait de savoir si cette préférence réticulocytaire était différente au niveau des stades de développement du parasite, sachant que deux études antérieures ont montré que la réticulocytémie est associée à l'engagement sexuel chez *P. falciparum* (Trager et al., 1999) et *P. chabaudi* (Gautret et al., 1996). Sur nos 140 échantillons infectés uniquement à *P. falciparum*, nous avons mesuré l'expression d'AP2G par une RTqPCR, dans un premier temps pour confirmer la présence des stades anneaux sexuellement engagés en condition de terrain et d'autre part pour déterminer les facteurs associés à l'engagement sexuel. Seuls les sujets avec un cycle treshold (CT) <36 cycles ont été considérés comme AP2G positif et comme négatif tout échantillon présentant un CT> 36 cycles. Il ressort de nos analyses que 38% (53) des sujets exprimaient AP2G. Nous avons ensuite vérifié s'il existe une association entre l'expression d'AP2G, la parasitémie, la réticulocytémie, la préférence réticulocytaire, l'âge, la MOI et le trait drépanocytaire. De tous ces paramètres, seule la parasitémie a montré une forte association à l'engagement sexuel chez *P. falciparum* (t.test, $p=0.039$). Nos données suggèrent que l'engagement sexuel n'était pas associé à la préférence réticulocytaire au niveau de la population parasitaire. Cependant, les mesures basées sur la population parasitaire ne

permettent pas de déterminer si la préférence peut être modifiée spécifiquement dans la lignée sexuelle par rapport à la lignée asexuelle, ce qui nécessite une approche unicellulaire. A ce jour, les populations de parasites contenant des cellules engagées ont été analysées à l'aide de la transcriptomique en vrac (Prajapati et al., 2020), et de la transcriptomique unicellulaire au stade schizonte engagé sur les souches de laboratoire (Poran et al., 2017), mais le transcriptome unicellulaire de stades anneaux sexuellement engagés en condition de terrain et *in vitro* n'a pas encore été caractérisé. Nous avons d'abord généré une référence transcriptomique pour ce type de cellule en sélectionnant un échantillon avec une parasitémie et un niveau d'AP2G assez élevés parmi nos 140 échantillons en utilisant la transcriptomique unicellulaire. Sur cet échantillon, nous avons préparé une suspension cellulaire dans laquelle les parasites ont été marqués avec du Vybrant Green (lequel colore l'ADN des parasites), puis 50000 cellules ont été triés par FACS et analysés avec la technologie de séquençage en cellule unique scRNAseq (10X Genomics). Après un contrôle de qualité des cellules, une analyse en composantes principales de 1795 transcriptomes de haute qualité et clustering consensuel ont permis d'identifier trois clusters dans nos données à l'aide du logiciel R et du package Seurat. Dans le but de déterminer l'âge de nos cellules, nous avons effectué une analyse corrélationnelle avec une cinétique de développement de référence (Otto et al., 2010). Elle nous a permis d'identifier les clusters 1 et 3 comme des anneaux précoces, tandis que le cluster 2 correspondait aux jeunes trophozoïtes (~16h après l'invasion). Nous avons constaté que le cluster 3 était caractérisé par une expression marquée d'AP2G, ce qui indique qu'il correspond probablement à des anneaux sexuellement engagés. Pour confirmer cela, nous avons effectué une expression différentielle des gènes entre les clusters 1 et 3 et avons trouvé 14 gènes surexprimés et 2 gènes sous-exprimés aux stades anneaux sexuellement engagés. Une grande partie de ces gènes surexprimés ont déjà été identifiés précédemment par la transcriptomique en vrac (Prajapati et al., 2020) et la transcriptomique unicellulaire des schizontes engagés (Poran et al., 2017), confirmant ainsi que les transcriptomes du cluster 3 correspondent aux anneaux sexuellement engagés. Il est important de souligner que certains gènes régulateurs étaient présents dans nos données comme AP2G, LSD2, HDA1 qui ont été précédemment identifiés au stade schizonte sexuellement engagé, ils sont impliqués dans l'engagement et la gamétocytogenèse confirmant la poursuite du développement sexuel après les étapes initiales d'engagement. Nous avons aussi trouvé parmi ces gènes surexprimés aux stades anneaux sexuellement engagés, les membres de la famille multigénique SURFIN (1.2; 4.1;4.2 et 13.1) qui jouent un rôle putatif dans la cellule hôte. Dans l'ensemble, nos données confirment que les anneaux sexuellement engagés circulent

chez les porteurs infectés à *P. falciparum* en condition naturelle. Après avoir obtenu une référence transcriptomique des stades anneaux sexuellement engagés, nous avons sélectionné 8 échantillons y compris celui utilisé pour la référence, cette fois ci pour comparer les parasites résidant dans les érythrocytes à différentes étapes de maturation. Pour cela, nous avons marqué nos cellules avec du Vybrant Green pour différencier les globules infectés des globules rouges non infectés d'une part et d'autre part avec de l'anti-CD71 pour différencier les globules rouges immatures des globules rouges matures. Nous avons trié 48 cellules infectées dans les normocytes (VG+, CD71-) et 48 cellules infectées dans les réticulocytes (VG+, CD71+) dans une plaque de 96 puits et analysé avec une méthode transcriptomique unicellulaire (Smart-Seq2). Une analyse en composantes principales des 610 transcriptomes (347 transcriptomes de cellules CD71- et 263 transcriptomes de cellules CD71+) et une analyse de corrélation avec une cinétique de développement de référence (Otto et al., 2010) ont permis d'identifier les parasites jeunes et âgés dans nos 8 échantillons. La séparation des clusters était moins évidente dans cet ensemble de données de référence et de plus, l'expression d'AP2G était limitée à quelques cellules, ce qui suggère que ce gène est moins susceptible d'être détecté par la méthode Smart-Seq2. Cependant, le gène SURFIN 4.1 qui fait partie des 14 gènes surexprimés au stade anneau sexuellement engagé sur notre référence, nous a permis d'identifier des anneaux engagés dans les 8 échantillons. Afin de différencier les cellules engagées et non engagées avec confiance, nous avons utilisé une approche de cartographie scmap (Kiselev et al., 2018) qui consiste à faire une prédiction de la similarité de chaque cellule requête dans l'ensemble de données Smart-Seq2 par rapport à la référence 10X. Avec cette approche, nous avons identifié les cellules engagées pour chaque échantillon à la fois dans les réticulocytes et les normocytes. Nos données montrent que l'engagement sexuel se produit à la fois dans les normocytes et les réticulocytes dans les 8 échantillons. Cependant, nous avons constaté que la proportion relative de cellule engagées dans les réticulocytes était en moyenne de 29% contre 16% dans les normocytes (test de Wilcoxon, p=0.01172). Nous avons également vérifié, si le trait drépanocytaire pouvait avoir une influence sur la préférence réticulocytaire de nos 8 échantillons. Lors de la sélection de ces échantillons, 4 échantillons étaient porteurs du trait drépanocytaire (AS) et 4 porteurs du génotype sauvage AA. Mais nos résultats ont montré que les stades anneaux sexuellement engagés étaient présents aussi bien dans les réticulocytes que les normocytes, quel que soit le génotype (AA ou AS). Nous avons ensuite effectué une analyse d'expression différentielle des parasites résidant chez les porteurs du trait drépanocytaire et avons observé une différence marquée au même stade de maturation. Notre étude met en évidence la puissance du scRNAseq

pour comprendre les infections naturelles et la dynamique intra-hôte, et indiquent que la cellule hôte est un élément clé dans l'engagement sexuel.

Les résultats issus de nos différentes analyses ont fait l'objet d'un article scientifique en cours de publication dans le journal Science Advances avec pour titre:

***Plasmodium falciparum* preferentially invades and commits to sex in younger erythrocytes**

Article 2: *Plasmodium falciparum* preferentially invades and commits to sex in younger erythrocytes

Authors/affiliations

Ngou MC[1,2,#], Marin-Menendez A[1,#], Abate L[1], Delorme Q[1], Cassan C[1], Tchakounte A[1], Cheteug NG[2], Tuedom GA[2,6], Feufack-Donfack LB[2], Sarah-Matio E[1], Ayong L[2], Dechavanne C[3], Poinsignon A[1], Heaton H[4], Howick VM[5], Nsango SE [2,6], Morlais I[1], Talman AM[1]*

[1] MIVEGEC, Université de Montpellier, IRD, CNRS, Montpellier, France

[2] Service de Recherche sur le Paludisme, Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274, Yaoundé, Cameroun

[3] Université de Paris, IRD, UMR 261 MERIT, Paris, France

[4] Auburn University, Auburn, Alabama, United States

[5] Institute of Biodiversity, Animal Health, and Comparative Medicine, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom

[6] Faculté de Médecine et de Sciences Pharmaceutique, Université de Douala, BP 2701, Douala, Cameroun

Author list footnotes

[#] These authors contributed equally to the paper

* Lead contact

Contact info

Correspondence: arthur.talman@ird.fr

Summary

The intra-erythrocytic cycle of *P. falciparum* is responsible for malaria pathology. During this cycle, parasites replicate asexually and can also bifurcate to a sexual fate which will lead to their eventual transmission to mosquitoes. While they reside in red blood cells, parasites only circulate for the initial phase of the cycle and later stages of development sequester in microvasculature of host organs. *P. falciparum* can invade all erythrocyte cell types including maturing ones. It is unclear whether the maturity of the host red blood cell influences the

intracellular life of the parasites and its developmental decisions. Here we have leveraged host cell mapping using flow cytometry and single cell RNAseq of parasites from naturally-infected carriers to understand how host cells affect parasites and the heterogeneity of the parasite population. We find that *P. falciparum* has a strong preference for CD71+ erythrocytes in natural asymptomatic infections and in *in vitro* conditions. We further generated a parasite population dataset of 8 natural infections encompassing single cell transcriptomes from different host cell types. Our data demonstrates that commitment to sex can occur in both CD71- and CD71+ cells but commitment is much more likely in younger cells (CD71+), indicating a link between host cell and parasite fate. We also find that the parasite adapts its transcriptome to life in host cells at various points of maturity and in sickle cell trait carriers. Altogether our data highlight the host cell as a pivotal determinant of the parasite's developmental decisions, and establishes the first single cell intrahost dynamic map of natural *P. falciparum* infections.
Keywords. Malaria, host cell preference, single cell transcriptomics, commitment to sex

Introduction

The intra-erythrocytic cycle of *P. falciparum* is responsible for malaria pathology. Parasites undergo asexual rounds of replication inside the red blood cell lasting around 48 hours but the infected cell is only in circulation in the first portion of this cycle and later sequesters in microvasculature of host organs. Parasite may also bifurcate to a sexual fate which is initiated under the control of the master regulator of sex, AP2G (Kafsack et al., 2014; Sinha et al., 2014). Like in the asexual cycle, early commited parasites are thought to be circulating (Usui et al., 2019) but further intracellular maturation takes place in the bone marrow (Aguilar et al., 2014) for a period of ~10 days before mature mosquito-transmissible male and female gametocytes are released in the circulation. Consequently most *P. falciparum* infections display a limited range of developmental stages in circulation: (i) asexual ring stage parasites (ii) sexual ring stage parasites which are morphologically indistinguishable from asexual parasites but can be detected by a gene expression signature (Prajapati et al., 2020) (iii) mature sexual stages. In both asexual and sexual phases of the life cycle, malaria parasites encounter a heterogenous population of potential host red blood cells (RBCs), for instance different maturation stages of the red blood cell. The parasite may also encounter diversity between hosts that can affect its growth, for example haemoglobin variants (Taylor et al., 2013). Although it can invade all erythrocytes, several lines of evidence suggest that *P. falciparum* displays preference for reticulocytes over normocytes (Chwatt, 1948; Naidu et al., 2019; Pasvol et al., 1980), but this

preference has not been investigated thoroughly in natural infections. The contribution of reticulocyte invasion to overall parasite biomass and whether asexual and sexual stage parasites have differing host cell preference in natural *P. falciparum* infections remains unknown. In a rodent model, a recent study found increased sexual commitment in reticulocytes (Hentzschel et al., 2022*)*. It was also suggested that reticulocyte-rich blood favour commitment to sex in rodent malaria (Gautret et al., 1996) and *P. falciparum* (Trager et al., 1999). Here we leverage host cell mapping and single cell transcriptomics of circulating early intra-erythrocytic asexual and sexual stages and compare the heterogeneity of these populations in different hosts as well as the host cell preference of these parasites.

Results

P. falciparum parasites preferentially invade young erythrocytes in naturally infected carriers and *in vitro.*

Ex vivo samples from 140 *P. falciparum* natural infections in asymptomatic carriers (Table S1) were stained with an anti-CD71 monoclonal antibody and Vybrant Green (VG, marking parasitised cells) and analysed by flow cytometry (Figure 1A). We used a gating strategy to quantify: i) the proportion of CD71+ RBCs and CD71- RBCs; ii) parasites residing in CD71+ (CD71+, VG+) or CD71- host cells (CD71-, VG+) (Figure 1A and S1A). Our data shows that CD71+ cells, which represent on average 1.10 % of total red blood cells, bear on average over 14.58 % of the total parasite biomass (Figure 1B). The parasitemia in CD71+ was superior to that in CD71- for all samples, with a mean 2.42 % in reticulocytes and 0.14 % in normocytes (Figure 1C). The probability of a parasite to be in a CD71+ was on average 30 times that of a CD71- host cell. Surprisingly this preference was inversely correlated to the overall parasitemia (Figure S1B) and total CD71+ cells in the samples (Figure S1C), indicating that preference is not dependent on CD71+ cell availability. To verify whether this finding is invasion-dependent, we assayed parasite invasion *in vitro* with blood containing both CD71+ and CD71-, which were labelled with a cytoplasmic dye, allowing to identify new invasions (Kariuki et al., 2020). Two different parasite strains (3D7 and GB4) were 9.8 and 9.05 times more likely to invade a CD71+ than a CD71- cell (Figure 1D). Altogether our data indicates that *P. falciparum* has a strong preference for CD71+ reticulocytes, and that the reservoir of parasites in younger RBCs is biologically relevant and important for both the epidemiology of malaria and the parasite biology including invasion. Although this could suggest that CD71 could be an invasion ligand

as is the case in *P. vivax* (Gruszczyk et al., 2018) and *P. berghei* (Hentzschel et al., 2022), we did not see any inhibition of CD71+ cell invasion using three different monoclonal antibodies (Fig S1D).

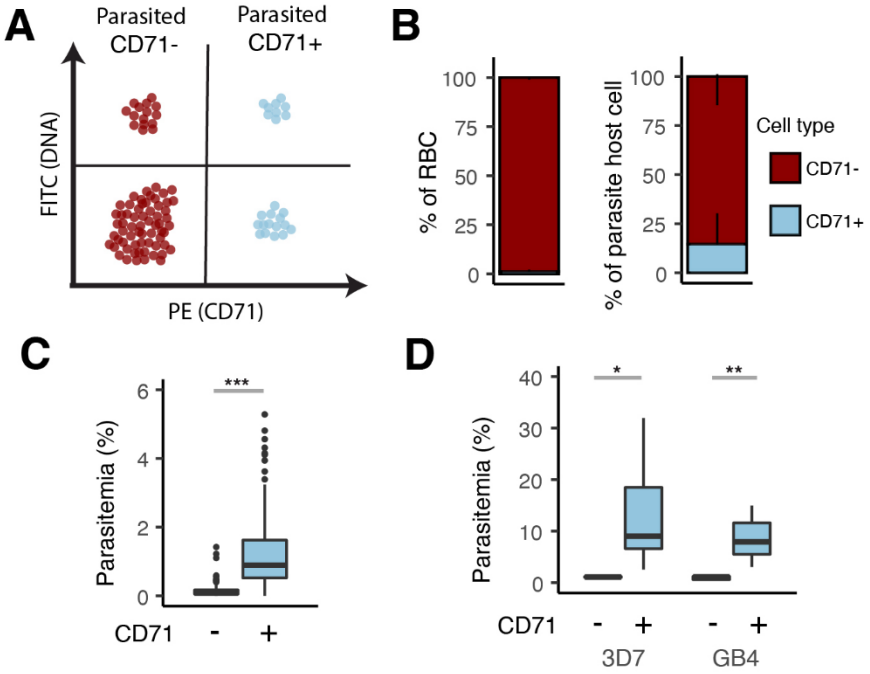


Figure 1. *P. falciparum* parasites preferentially invade reticulocytes. (**A**) Schematic of gating strategy for differentiating parasitised *ex vivo* and *in vitro* red blood cells that are either CD71+ or CD71- (less or more mature RBCs). (**B**) Percentage of total RBC (left) or parasites RBC which are CD71+ or CD71-. (**C**) Parasitemia observed in CD71+ or CD71- from 140 *ex vivo* samples (two paired t.test with unequal variances, *p= 0.00009*). (**D**) Parasitemia observed in CD71+ or CD71- for 2 different *in vitro* cultured lab strains 3D7 (two paired t.test with unequal variances, *p= 0.04*) and GB4 (two paired t.test with unequal variances, *p= 0.009*).

Commitment to sex occurs preferentially in younger red blood cells.

We next tested whether erythrocyte maturation was linked to sexual commitment. Commitment to sex was assesed by a relative quantitative RT-PCR measuring the master regulator of sex AP2-G normalised to a parasite house keeping gene 18S rRNA (Usui et al., 2019). We tested whether infection parameters were associated with sexual commitment as previously shown *in vivo* (Usui et al, 2019) and found that sexual commitment is positively associated with total parasitaemia within an infection (Figure 2A) (t.test, p=0.039) but not multiplicity of infection or age (t.test, p=0.53, p=0.08 respectively). We found that infection that bore sexually commited cells did not differ to those that don't in relative proportion of CD71+ cells (Figure 2B). These data suggest that commitment was not linked to overall cell type availability, however population based measurements cannot ascertain whether preference may be altered

specifically in the sexual vs asexual lineage, which requires a single cell approach. Committed cell-containing parasite populations have been analysed by bulk transcriptomics (Prajapati et al., 2020) but the transcriptome of single committed parasites has not been characterised. We, therefore, first generated a reference for this cell type by characterising one high-commitment sample using droplet based single cell transcriptomics. Parasites stained with Vybrant Green were sorted and analysed with 10X Genomics single cell technology. After initial QC, a principal component analysis of 1795 high quality transcriptomes and consensus clustering identified three robust clusters in the data (Figure 2C) (Kiselev et al., 2017). A correlation analysis to a reference time course (Otto et al., 2010) identified clusters 1 and 3 as early rings whilst cluster 2 corresponded to a later time point (~16h post invasion) (Figure 2D). Cluster 3 was characterised by a marked expression of AP2G (Fig 2C) indicating it likely corresponds to committed rings.

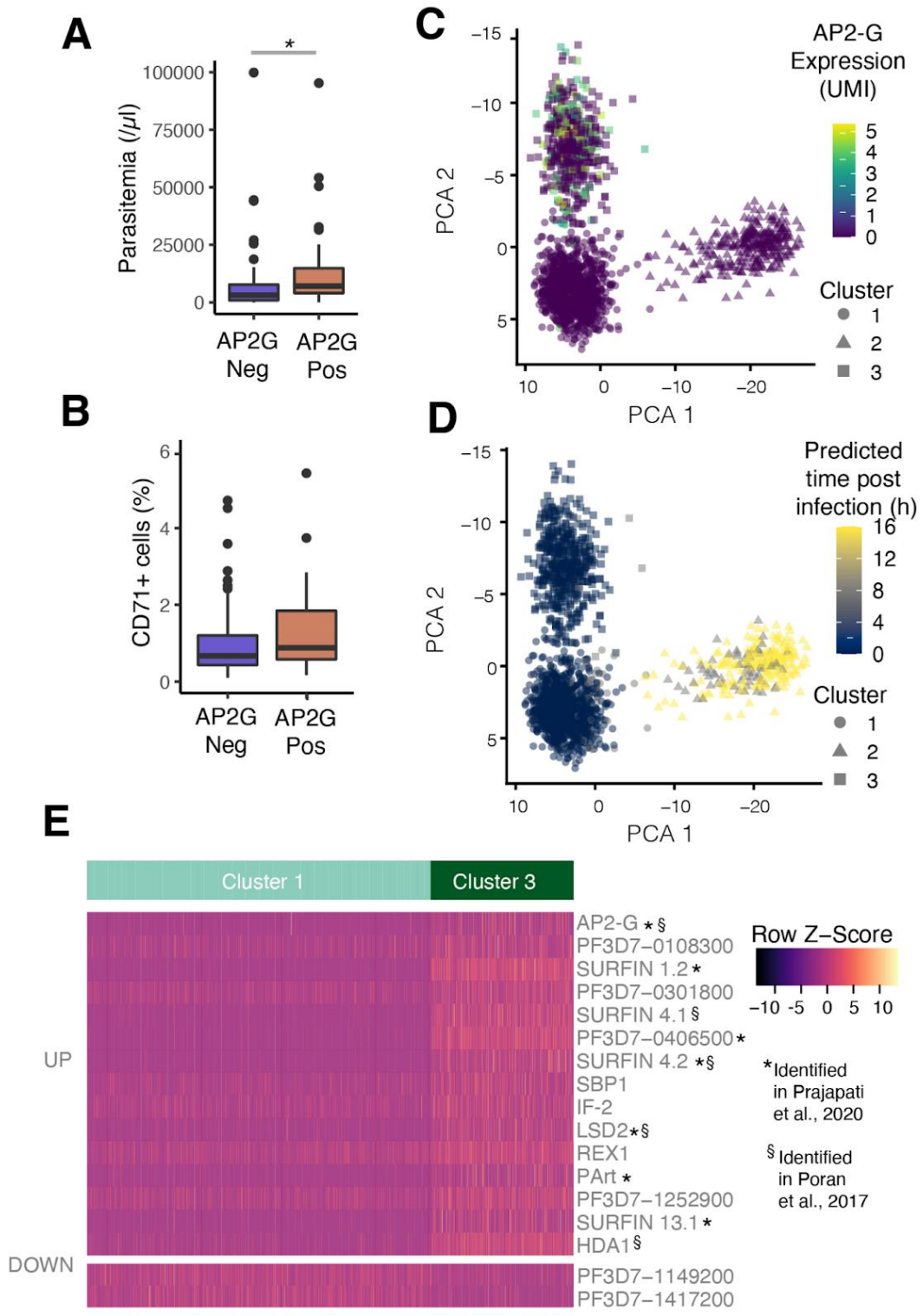


Figure 2. *P. falciparum* sexually-commited parasite are in circulation and have a distinct transcriptome. CD71+ preference (**A**) and parasitemia (**B**) from 140 samples which either contained committed rings (AP2G pos) or didn't (AP2G Neg). (**C**) Principal component analysis of single cell parasite transcriptomes from the circulation of a naturally infected carrier, consensus clustering identified 3 clusters including one with distinct expression of the master regulator fo sex AP2G. (**D**) a correlation analysis with a bulk reference (Otto et al., 2010)

identifies the age of the parasites. (**E**) Expression of genes differentially expressed between cluster 1 and 3 is displayed in these two clusters. Genes that were previously associated with committed parasites in two reference papers (Poran et al., 2017; Prajapati et al., 2020) are highlighted.

We conducted a differential gene expression between clusters 1 and 3 and found 14 upregulated genes and 2 downregulated genes. Several upregulated genes identified previously by bulk transcriptomics (Prajapati et al., 2020) and single cell transcriptomics of committed schizonts (Poran et al., 2017) (Figure 2E), confirming that cluster 3 transcriptomes correspond to committed rings. Interestingly some, but not all, regulatory genes identified in committed schizonts were present (e.g. AP2G, LSD2, HDA1) implicating them in continuing sexual development after the initial commitment steps. Notably a majority of up and down regulated genes have a putative role in the host cell or are predicted to be exported to the host cell, including several members of the SURFIN multigene family (Winter et al., 2005). These distinct host-interaction genetic expression programme may already represent the first steps in differential targeting of sexual and asexual parasites for distinct host compartment sequestration. Altogether these data confirm that committed rings circulate in naturally infected carriers, are characterised by an altered expression profile compared to their asexual counterparts and provide a reference for this cell type.

We next wanted to assess the relative burden of committed rings in normocytes and reticulocytes. We used an alternative single cell transcriptomic method (Smartseq2) in which host cell information can be recorded during the single cell sort. 8 samples with an AP2-G signal (Table S2) were selected, including the one used for the reference. Since sickle cell trait genotyping was performed, we selected 4 heterozygous carrier samples (AS) and 4 samples with a wild type allele (AA). Samples were stained with an anti-CD71 monoclonal antibody and Vybrant Green (VG) and 48 parasites residing in reticulocytes (CD71+, VG+) as well as 48 parasites residing in normocytes (CD71-, VG+) were sorted into single wells and the FACs index information for each well was recorded. The smartseq2 protocol was applied as described (Howick et al., 2019; Reid et al., 2018). After initial QC, we recovered 347 transcriptomes from CD71- cells and 263 transcriptomes from CD71+ cells (Figure 3A and B); all 8 samples yielded high quality data. A principal component analysis of these 610 transcriptomes and correlation analysis to a reference time course (Otto et al., 2010) identified young and older parasites (Figure S2A). Detection of AP2G in this dataset was limited to a few cells, suggesting this gene

is less prone to be detected with smartseq2 technology, however other genes identified above, for instance *surfin 4.1*, identified committed rings in the dataset (Figure 2C). Although these cells clustered somewhat to the same region of the PCA, the separation was less obvious than in the reference dataset in the first two components (Figure 2C). In order to unambiguously differentiate committed and non-committed cells with confidence we used a mapping approach and produced a prediction of the similarity of each query cell in the smartseq2 dataset compared to the 10X reference using *scmap* (Kiselev et al., 2018). With this approach we identified committed cells for each host cell type (Figure 2D) and in each sample (Figure S2B). Committed rings were present in both reticulocytes and normocytes in all samples (Figure S2B). Strikingly the proportion of committed cells in CD71+ cells was on average 29% whilst it was 16% in CD71- cells, a wilcoxon test confirmed a distinct enrichment for committed cells in CD71+ cells in these 8 infections ($p = 0.01172$) (Figure 2E). Whilst this could indicate an even enhanced CD71+ preference of committed merozoites, we didn't observe a difference in CD71 preference in committed vs non committed merozoites for either 3D7 or GB4 (FigS2C, D, E), suggesting that enhanced commitment in CD71+ cells is decided post-invasion (same cycle commitment). Altogether these data indicate that the host cell is a key element in determining commitment to sex probably within the same cycle.

Single cell RNAseq offers the possibility to deconvolute multi-clonal infection (Heaton et al., 2020); we next leveraged this method to ask whether parasite stage composition was homogenous between different genotypes within each infection. The proportion of committed rings in the four different genotypes identified by genotype clustering in our reference dataset was very similar (Figure 3F and G). Altogether this data supports the notion that the host environment and host cell is key in determining the stage composition of an infection, with different genotypes displaying similar investment in reproduction within a host.

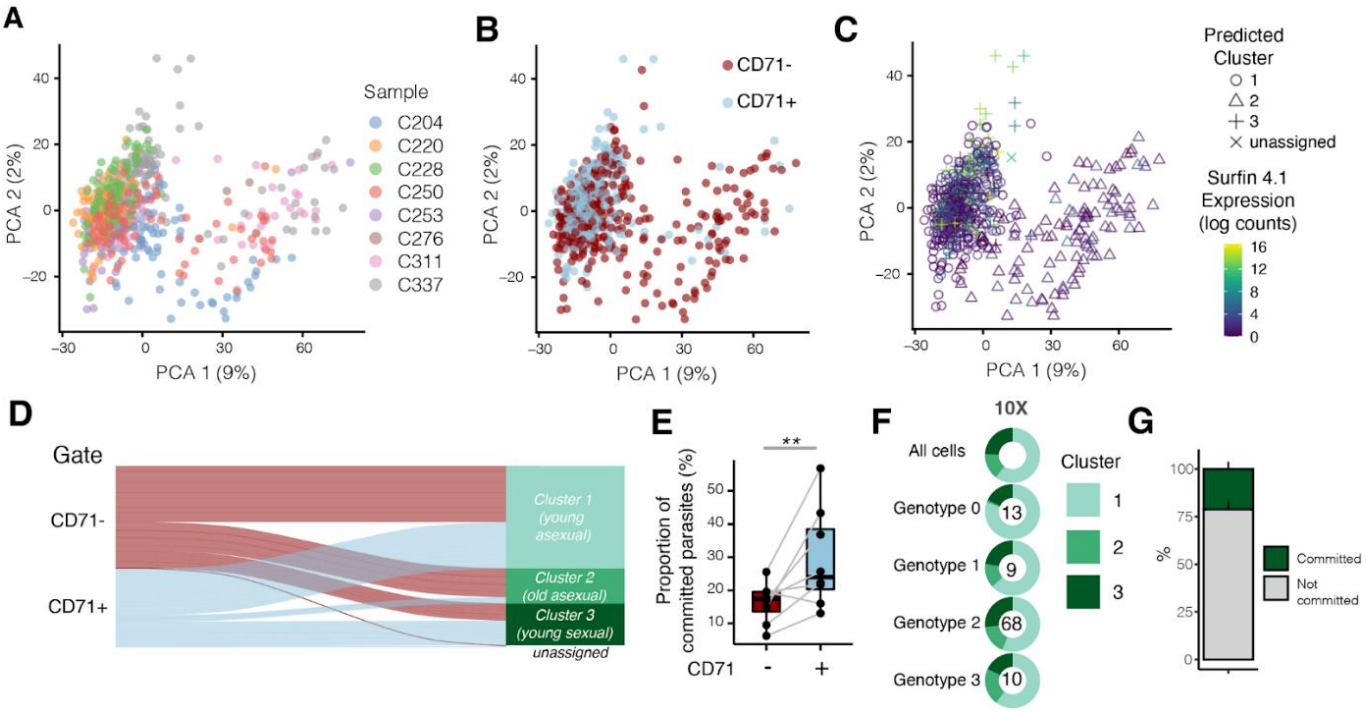


Figure 3. *P. falciparum* sexually-commited parasites are enriched in younger red blood cells. (**A**) Principal component analysis of 610 transcriptomes from 8 carriers, cells residing in either CD71- or CD71+ are displayed in (**B**). (**C**) Cells were mapped to reference clusters from Fig 2C and expression of a commitment marker (*surfin 4.1*) is displayed. (**D**) Sankey plot of association between parasites residing in CD71- or CD71+ host cells and their predicted parasite maturation stage, the unassigned cell category is the bottom most. (**E**) Proportion of committed parasites in each infection found in CD71- or CD71+ host cells (wilcoxon test, p = 0.01172). (**F**) Genotype deconvolution shows the stage composition of different circulating clones of parasites within the same infection in the 10X reference; the number of cells for each genotype is displayed in the centre of the donut. (**G**) Proportion of committed parasites in different genotypes of the same infection (10X).

Parasites have altered transcriptomes in different host cell types

Parasites in our datasets were found to exist in different types of host cell. We next queried whether the parasite transcriptome was modified in different host cells. To control for developmental variation which produces the strongest signal of differential expression between cells, we conducted a cluster-specific differential expression analysis (Finak et al., 2015). We first compared cells residing in CD71+ vs CD71- cells (Figure S3A and B). In upregulated genes in cluster 1 and 3 we noted an overrepresentation of proteins predicted to be exported

(4/7 and 4/11 respectively) (Table S3) suggesting the parasites caters the expression of its host interactome to the maturation state of its host cell. It is particularly interesting to note that parasites residing in reticulocytes might have altered drug sensitivity and host cell remodelling (Naidu et al., 2019), highlighting the importance of taking this reservoir into account in assessing and designing intervention strategies. We also conducted a differential expression analysis of parasites residing in sickle cell trait carriers and observed a marked difference at the same stage of maturation (Figure S2C and D). We conducted a gene ontology analysis, most striking was the over-representation of the *regulation of transcription* term (GO:0006355, p=0.0108) as biological process and *nucleus* (GO:0005634, p=0.000000489) as well as *lysosome* (food vacuole) (GO:0005764, p=0.0000586) as cellular component. This enrichment likely signifies that the parasite has a specific alteration of its transcriptional program in sickle cell trait carriers and a specific response to an altered food source (haemoglobin variant), as has been recently suggested (Saelens et al., 2021). Altogether these analyses suggest that the parasite has the ability to fine tune its gene expression to adapt to its host cell and best exploit the resources available in host erythrocytes that may be in many different metabolic states.

Discussion.

We observe a very significant preference of *P. falciparum* for CD71+ erythrocyte in spite of them providing only a fraction of the available host cells. This raises the pivotal question of how these cells are preferentially invaded. Erythrocyte differentiation is initiated in the bone marrow and includes erythroblast enucleation and organelle removal (Ney, 2011). Once in circulation, reticulocyte maturation continues to mature over a 72 hour period (Chasis et al., 1989), although the transferrin receptor is lost after about 1 day in circulation (Malleret et al., 2013; Ovchynnikova et al., 2017). Further maturation of CD71- cells include further size reduction, membrane loss and increased membrane deformability (Waugh et al., 2001). Since we find that interfering with CD71 with monoclonal antibodies has no effect on invasion preference, it is unlikely that the parasite recognises younger cells using this receptor as is the case in *P. vivax* (Gruszczyk et al., 2018) and in *P. berghei* (Hentzschel et al., 2022). Instead the reticulocyte altered membrane and cytoskeletal features may be key factors in this preference. RBC membrane properties, such as tension and bending modulus, have recently been identified as an important determinant of invasion efficiency (Introini et al., 2022; Kariuki et al., 2020). Reticulocytes have been found to be less deformable (Waugh et al., 2001) and have stiffer membranes (Li et al., 2018) than mature RBCs. In particular, the instability of the reticulocytes,

with extended cytoskeleton and reduced cytoskeleton/membrane connectivity, has been hypothesised to facilitate parasite entrance (Li et al., 2018).

Beyond the general parasite preference for CD71+ cells, we observe that, at even sampling, sexual commitment is much more likely to occur in a CD71+ cells. Commitment has recently been shown to occur in both schizonts for a next cycle commitment (NCC) and in rings during same cycle commitment (SCC) (Bancells et al., 2019). Therefore, the observed preference could be the result of either an even-increased invasion of CD71+ cells by committed merozoites during NCC, or a post-invasion increased commitment when parasites invade a younger cell (SCC). Llorà-Batlle and colleagues found no difference in committed cell propensity to invade different maturation stages of erythrocyte (Llorà-Batlle et al., 2020) and we confirmed this finding. Therefore, the increased commitment likely originates from SSC, interestingly it suggests that the environment of the parasitophorous space in the reticulocyte has cues which the parasite can detect and that influence its fate. It will be interesting to contrast the availability of metabolites known to influence this process such as lyso-PC (Brancucci et al., 2017), choline (Brancucci et al., 2017; Portugaliza et al., 2020) or S-adenosylmethionine (Harris et al., 2022) in CD71+ or CD71- cells.

Whilst our study has found that parasites have a preference for younger erythrocyte in both asexual and sexual lineages and that the parasite can adapt its transcriptional program to the maturation status of its host cell, it is still unknown whether this preference may confer a fitness advantage to those parasites. Whilst an increased multiplication rate was not found in reticulocytes (Naidu et al., 2019), parasites appear to better resist drugs in this host cell. It is also possible that susceptibility to the immune system, either directly or through reduced splenic clearance may be altered depending on the host cell. Finally, an interesting possibility is that preference may be driven by interspecific competition (Djidjou-Demasse et al., 2021).

Committed rings had been postulated to be circulating, based on gene expression signatures (Barry et al., 2021; Prajapati et al., 2020; Usui et al., 2019), our data confirmed their presence in the circulation unambiguously by establishing that there is a specific parasite sub-population that is circulating and has a committed state signature. We find that this signature is composed of two broad categories of genes, those that are known to regulate the onset of gametocytogenesis as expected and a set of exported proteins with an enrichment of the *surfin* gene family (Winter et al., 2005). Although this gene family's function is not known, some of its members are exported to the host cell, including *surfin 4.1* (Miyazaki et al., 2021), and

surfins have partial homology to *var* genes (Winter et al., 2005), together this suggest that *surfins* may play an important role in sexual stage sequestration.

Following initial commitment, maturing sexual stage are enriched in the bone marrow (Joice et al., 2014), raising the question of the mechanisms allowing them to reach the bone marrow. It is possible that some of this reservoir is generated by asexual parasites already present in the bone marrow, however the abundance of circulating committed stages identified in our study suggests that committed parasites may have the ability to home to the bone marrow. It is particularly interesting to note that gametocytogenesis can develop in erythroid precursors (Neveu et al., 2020), some of which are known to be able to home back to the bone marrow (Caocci et al., 2017). However, the circulating committed parasites we identify in this study are clearly in already-enucleated cells suggesting that invading circulating erythroid precursors capable of homing is not the mechanism of bone marrow access. We instead postulate that the committed-specific exported genes are able to target the parasites to that compartment; it will be interesting to understand whether our observed preference for commitment in younger RBCs is related to homing efficiency.

A surprising aspect of our data is the very high number of committed cells, which were only thought to constitute a very low percentage of cells within an infection (Bousema and Drakeley, 2011). Even though we specifically selected infections containing committed cells, it is a surprise to see that they constitute on average 23% of cells (range 9-35%). Taking into account each infection's parasitemia and if all cells matured successfully, this would equate to an average of 3468 gametocyte/µl (range 464-7060), which whilst not unheard of would be highly unusual in 8 infections. Our data suggest there may be important losses of maturing gametocytes or that sequestered gametocyte maturation may actually be longer than previously thought, perhaps with commitment occurring in burst and with partial release of mature stages in the circulation that produces the observed low number of circulating mature gametocytes. Future efforts using longitudinal sampling and methods similar to the ones applied here may reveal the intrahost dynamics of commitment and how to better target the infectious reservoir. In conclusion, our results suggest that the host cell is pivotal in determining the parasite's fate and that the parasite can fine tune its expression to its cellular environment to maximise its fitness.

Acknowledgments

We acknowledge the support of the MRI core cytometry facility and the MGX sequencing core facility. This work was supported by a starting grant from the Agence Nationale de la Recherche

(ANR-19-CE15-0007) awarded to A.M.T. This work was supported by the French National Research Institute for Sustainable Development (IRD). A.M.M. is a recipient of a H2020-MSCA Individual Fellowship (891456).

Author contributions.

A.M.T. conceived the study. C.M.N., Lu.A., A.T, N.G.C., G.A.T., L.B.F.D., E.S.M. performed field collections. C.M.N., La.A. and S.E.N. coordinated and supervised field collections. C.M.N., A.M.M., Lu.A. and A.M.T. performed experimental work. C.M.N., Q.D., H.H., A.P, V.M.H and A.M.T. performed statistical and bioinformatic analyses. A.M.T. and I.M. secured funding for the work. A.M.T. wrote the manuscript with contributions from all authors.

Declaration of interests.

The authors declare no competing interests.

STAR Methods

Sample collection. All work was approved by the National Human Health Research Ethics Committee (NHREC) N°: 2020/07/1259/CE/CNERSH/SP and the Chief Medical Officer of Mfou District Hospital (CDH) N° 002/ L/ MSP/ SG/ DRSPC/ DSM. Informed consent was obtained from volunteers or their legal guardians. All samples collected were anonymised. Our study took place in Mfou (11°35' and 11°40'E; 3°40' and 3°45' N), capital of the Mefou and Afamba Department, Central Region, Cameroon. The screening survey was conducted at the end of the main transmission season (end of July to end of August in 15 villages of the Mfou Health District) and in the middle of malaria transmission (end of October to beginning of December in 7 public schools of the Mfou Health District). Malaria is hyper-endemic in this area and its transmission is perennial. A thick blood smear was taken for all volunteers. Parasitaemia was assessed by counting the number of parasites per 200 leukocytes on Giemsa-stained thick blood smears, assuming an average number of 8000 leukocytes/µl. After microscopic quantification, volunteers with a parasitaemia of more than 5000 *P. falciparum* parasites/µl of blood who were asymptomatic and had no history of symptomatic malaria in the past two weeks were selected. 168 *Plasmodium*-infected asymptomatic children who met the inclusion criteria were enrolled in our study. Recruitment was done without knowledge of their genetic history. Volunteers were aged 4-14 years. The study population consisted of 93 (55.75%) males and 75 (44.25%) females and the mean age was 8.38 years (± 2.49 years). A

venous sample on EDTA tube was taken from each subject enrolled in the study. Co-infection with other malaria species (*P. malariae* and *P. ovale*) on stained smears were recorded and excluded from the rest of the study. After this step 140 samples infected with *P. falciparum* were retained (TableS1). Using the same method as above, a precise parasitemia was re-counted for every included sample by two experienced microscopists.

Expression of AP2G by RT-qPCR. Triplicate samples of 100 µl of EDTA blood were placed in 300 µl TRizol and stored at -80 °C until processing. Total RNA was extracted with TRizol Reagent (Invitrogen) and eluted in 30µl of RNAse free water followed by digestion using the Turbo DNA-free kit (Invitrogen). The resulting RNA was reverse transcribed using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) supplemented with 50 µM oligo DTs (Invitrogen) and superRNAsin (Invitrogen). RT reactions were incubated 10 min at 25°C, 120 min at 37°C and heat inactivated 5 min at 85°C. qPCR was performed to quantify the transcript levels of AP2G (PF3D7_1222600) and 18S rRNA (PF3D7_0725600) used as an endogenous control (Table S4). Real-time PCR was performed on a LightCyclerR Real-Time PCR touch system using the Power up SYBR Green Master Mix kit (Applied Biosystems) and primers at 400nM final concentration. The amplification program was: an initial pre-incubation at 95°C for 20 seconds, followed by 44 cycles of 95°C for 10 seconds, 60°C for 20 seconds. Melting curve analysis was performed after the last amplification cycle to confirm the specificity of the PCR amplicons. Gene-specific primers were those described by Prajapati and colleagues (Prajapati et al., 2020) (Table S4). A mean cycle threshold (Ct) of 36 was considered as positive and any sample with a Ct>36 was considered as negative. The relative amount ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak and Schmittgen, 2001) for each gene was calculated using a committed reference parasite sample from the NF54 strain as a calibrator. Results were obtained from two biological replicates and in case of discrepancy between the two replicates, a third replicate was performed and all biological samples were measured with two technical replicates.

Sickle cell trait genotyping by PCR-RFLP. Genotyping of haemoglobin beta chain mutations was performed according to a published protocol (Saiki et al., 1988). Blood samples were preserved at -20°C. DNA was extracted from individual blood samples using the MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Tissue, Mini kit for DNA from cells and tissue following the manufacturer's instructions. 2 µl of DNA from each sample was amplified in a final volume of 25 µl of reaction medium using specific primers (Table S4) and the GoTaq Green Master Mix 2X kit (Promega). Amplification conditions were as follows: 5 min denaturation at 94°C, 40 cycles of 30 seconds denaturation at 94°C, 30 seconds primer hybridisation at 58°C, 30 seconds

elongation at 72°C and finally a 5 min terminal elongation at 72°C. The result of PCR product (536bp) was digested with the enzyme Eco81l which specifically recognises the GAG-GTG mutation at codon 6 of haemoglobin. Digested samples were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel containing GelRed as an intercalant and the bands were visualised on a transilluminator (Biocapt).The normal HBB gene contains 3 restriction sites and 4 fragments of sizes 201, 148, 99 and 88 bp respectively were obtained. The mutation occurs at one of the restriction sites and the enzyme then cleaves the fragment only at the other 2 restriction sites of the enzyme, resulting in 3 bands of sizes 349, 99 and 88 bp. If the individual is AS heterozygous (1 mutated allele and 1 normal allele), the cleavage will generate 5 fragments of sizes 349, 201, 148, 99 and 88 bp.

Multiplicity of infection. Different allelic families of *msp1 (*K1, MAD20 and RO33) and *msp2 (*3D7 and FC27) were assessed by nested PCR. 2 µl of extracted DNA were amplified with the Diamond Taq® DNA Polymerase kit (Eurogentec) as previously described (Metoh et al., 2020). Specific primers for the different allelic families for *msp1* and for *msp2* are given in Table S4. Fragment sizes were revealed by 1.5% agarose gel electrophoresis stained with GelRed on a current generator set at 135 volts for 45 min to 1h. The gels were visualised on an ultraviolet transilluminator and the size was determined using Bio Capt software. The MOI was defined as the number of distinct parasite genotypes co-infecting a single host within a given infection. It was calculated using the number of PCR fragments obtained from the gels (K1+MAD20+RO33) for the *msp1* gene, while the MOI for *msp2* represented the number of PCR fragments obtained from the gels (3D7 + FC27). The final MOI represented the maximum MOI value for the *msp1* and *msp2* loci (Sondo et al., 2020).

Measuring host cell preference in *ex vivo* samples of reticulocytes. Cryopreserved samples were thawed with an incubation of 5 min with 12% NaCl added dropwise, followed by an incubation for 5 more min with 10 mL of 1.6% NaCl. Cells were centrifuged (500 g for 5 min) and washed once with culture medium. After the last spin, blood pellets were resuspended in 1 mL of culture medium and 100 µl were used for the following experiment. Samples were incubated with anti-CD71-PE (1:100 dilution in RPMI, Miltenyi Biotec 130-115-029 (Clone REA902)) and Vybrant Green (1:1000 dilution in RPMI, ThermoFisher) for 1 h at 4°C. An unstained control and stained controls with Vybrant Green and anti-CD71-PE antibodies were prepared with non-parasitized RBCs to establish the negative populations for both fluorochromes. After incubation, samples were washed 3 times and resuspended in 200µl RPMI and analysed in a BD Flow Cytometer Cell Sorter FACSAria. Vybrant Green was excited by a

blue laser and detected by a 530/30 filter, while anti-CD71-PE was excited by a Yellow-Green laser and detected by a 582/15BP filter. 50,000 events were collected for each sample. The data collected were analysed with FlowJo v10.7 (Tree Star, Ashland, Oregon) to obtain the percentage of parasitaemia within each cell type (normocytes and reticulocytes). All experiments were carried out in duplicates.

RBC invasion and preference assays. Clones 3D7 and GB4 obtained from BEI resources were cultured in O^- or A^- blood obtained from the Etablissement Français du sang (21PLER2020-004), in RPMI 1640 culture medium (Gibco) supplemented with 2 g/L D-glucose (Sigma), 2 g/L sodium bicarbonate (Sigma), 10 mg/L hypoxanthine (Sigma), 50 mg/mL gentamicin (Gibco), 0.5% Albumax-II (Gibco) and 5% AB+ human serum (obtained from the EFS, 21PLER2020-004), and kept at 37°C in a gaseous environment containing 5% O_2, 5% CO_2 and 90% N_2. For the invasion assay, RBCs were stained with 2 µM of CellTrace Far Red Cell Proliferation kit (Invitrogen, UK) (Kariuki et al., 2020). After a 2 h incubation at 37°C under rotation, stained RBCs were washed and resuspended at 2% hematocrit in complete medium. The cells were stored at 4°C until use within 24 h after staining. Parasite cultures containing mostly schizont forms at 1-2% parasitaemia were mixed with stained RBCs at a 1:4 ratio in 100 µl final volume in round bottom 96-well plates. The samples were incubated for 24 h at 37°C under static conditions as described above. To evaluate all parasitized RBCs, the cells were stained with Vybrant Green DyeCycle Green Stain (1:1000 dilution in RPMI) in PBS while anti-CD71-PE (1:100 dilution in RPMI) allowed us to separate reticulocytes (CD71+ cells) from normocytes (CD71-). Cells were incubated for 1h at 37°C and washed once in PBS before running them on a LSRFortessa flow cytometer (Beckman Coulter). Vybrant Green was excited by a blue laser and detected by a 530/30 filter; CellTrace Far Red was excited by a red laser and detected by a 660/20 filter; while anti-CD71-PE was excited by a Yellow-Green laser and detected by a 585/15BP filter. 500,000 events were collected for each sample. The data collected were analyzed with FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon) to obtain the percentage of new invasions within each cell blood group. All experiments were carried out in duplicates.

For the antibody invasion inhibition test, 3D7 schizonts at 1-2% parasitaemia, were mixed with stained RBCs as described above including different antibody concentrations (0.1, 1 and 10 mg/mL) in 100 µl final volume in round bottom 96-well plates. A control with no antibody was also prepared. Three different human anti-CD71 antibodies (BD, clone: REA902; Biolegend, clone: Clone CY1G4; Miltenyi Biotec, M-A712) were used in duplicates for each concentration

in three independent experiments. Cultures were incubated and prepared for flow cytometry as described in the previous section.

For the invasion of committed parasites test, 3D7 and GB4 were cultured to 4% parasitemia for the stressed culture or 1% for the non-stressed culture and mixed with freshly-collected (less than 2 hours from withdrawal to ensure presence of reticulocytes) stained RBCs, from two different donors, at a 1:2 ratio at 4% Haematocrit in 200 µl final volume in triplicates in round bottom 96-well plates. Samples were incubated for 24 h at 37°C under static conditions. Cells were stained with Vybrant Green DyeCycle Green Stain and anti-CD71-PE as described above. 1 million cells were acquired on a FACs

Aria II cell sorter and newly parasitized reticulocytes (APC+VG+PE+) and normocytes (APC+VG+PE-) were calculated. A triple-stained uninfected red blood cell control was used to establish the gating strategy.

Generation of single cell transcriptomes. *10X sample preparation, library generation, sequencing and initial mapping.* A cryopreserved sample was thawed as above. This sample and an uninfected control were stained with Vybrant Green DyeCycle Green Stain (1:1000 dilution in RPMI) in PBS. 50, 000 cells were sorted on a FACsAria II cell sorter (BD Biosciences) with a 100 µm nozzle. Parasitized cells were sorted by gating on single-cell events and on the FITC channel. A stained uninfected red blood cell control was used to establish the gating strategy. Cells were then placed at 2000 parasites/µl and processed with the 10X chromium platform with a target recovery of 4000 parasite cells per run and using the v3 chemistry. Sequencing was conducted on a lane of the NovaSeq 6000 SP flow cell using PE sequencing (26 and 98 bp) and yielded ~150 millions reads per run. The data was mapped to the *P. falciparum* v3 genome sequence (GenedB, June 2021) using Cell Ranger v6.0.1. *Smartseq2 sample preparation, library generation and sequencing***.** Single cell transcriptomics was conducted as reported previously (Howick et al., 2019; Reid et al., 2018). Cryopreserved samples were thawed and stained as above (with Vybrant Green and anti-CD71-PE). A stained uninfected red blood cell control was used for establishing the gating strategy. For each of 8 samples, 48 cells in the VG+CD71- and 48 cells in the VG+CD71+ gates were sorted on a FACsAria II cell sorter (BD Biosciences) with a 100 µm nozzle into 96 well plate containing 4 µl of lysis buffer (0.8% of RNAse-free Triton-X (Fisher) in nuclease-free water (Ambion), UV-treated for 5 min with a Stratalinker UV Crosslinker 2400 at 200, 000 µJ/cm2, 2.5 mM dNTPs (Life Technologies), 2.5 µM of oligo(dT) (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT−3')

and 2U of SuperRNAsin (Life Technologies)). Sorted plates were spun at 1000g for 10 s and immediately placed on dry ice. Plates were heated at 72°C for 3 min. A reverse transcription mix, containing 1 µM of LNA-oligonucleotide (5'-AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrG+G-3'; Qiagen), 6 µM MgCl2, 1M Betaine (VWR), 1X reverse transcription buffer, 50 µM DTT, 0.5 U of SuperRNAsin, and 0.5 µl of Smartscribe reverse transcriptase (Takara), was added to the plates. The total volume of the reaction was 10 µl. The following cycling conditions were used: a single incubation period at 42°C for 90 min; followed by 10 cycles (42°C/2 min, 50°C/2 min); before a final incubation at 70°C for 15 min. A further PCR mix was added to the plates, containing 1X KAPA Hotstart HiFi Readymix and 2.5 µM of the ISO SMART primer (Picelli et al., 2014) and incubated using the following programme: a single incubation at 98°C for 3 min; 30 cycles (98°C/20 s, 67°C/15 s, 72°C/6 min); a final incubation at 72°C for 5 min. Reactions were purified with 1X Agencourt Ampure beads (Beckman Coulter) according to the manufacturer's instructions. Amplified cDNA was eluted with 10 µl nuclease-free water (Ambion). The quality of a subset of cDNA samples was assessed with the high-sensitivity DNA chip (Agilent) with an Agilent 2100 Bioanalyser. Sequencing libraries were prepared using the Nextera XT 96 kit (Illumina) according to manufacturer recommendations but using eighth reactions. Dual indices set A, B, C, D were used (Illumina) for 384 different index combinations, for a total of 768 libraries. Libraries were pooled in two pool and cleaned up with Agencourt Ampure beads (Beckman Coulter) used at a 4:5 ratio. Quality of the libraries was assessed with the high sensitivity DNA chip (Agilent) ran on an Agilent 2100 Bioanalyser. Each pool was sequenced on a Hiseq 4000 at 150PE. FASTQ files were obtained after base calling and demultiplexing with Illumina's software. Nextera adapter sequences were trimmed with Trim Gallore (v0.6.5) using *trim_galore -q 20 -a CTGTCTCTTATACACATCT --paired --stringency 3 --length 50 -e 0.1*. HISAT2 (v2.0.0) (Kim et al., 2015) indexes were produced for the *P. falciparum* v3 genome sequence (GenedB, November 2019) using default parameters. Trimmed, paired reads were mapped to the *P. falciparum* genome sequence using *hisat2 --max-intronlen 5000 p 12*. SAM files were converted to BAM using *samtools-1.2 view –b* and sorted with *samtools-1.2 sort.* Read counts were obtained with HTSeq (v0.12.4) (Anders et al., 2015) using *htseq-count -f bam -r pos -s no –t CDS* using a custom GTF as described elsewhere (Reid et al., 2018). Genes belonging to the variable gene families var, rifin and stevor were excluded from the analysis to prevent inaccurate mapping. The raw read counts from all single cell runs are presented in Table S5.

Single cell transcriptomics analyses. Analyses were conducted in R (4.1.0) implemented in Rstudio (1.4.1717). *Quality control of cells.* 10X data was initially filtered using Seurat (v4.0.4) (Butler et al., 2018). Cells with less than 100 genes and genes present in less than 5 cells in the dataset were removed from the analysis. The data was normalised using *NormalizeData* with -*LogNormalize* method, variable features were identified with *FindVariableFeatures* and the data was scaled with *ScaleData*. Doublets were identified and filtered with scDblFinder (v1.6.0). After filtration and doublet removal we recovered 1795 high quality cells. For the smartseq2, the count data was read in as single cell experiments (v1.8.0) (Amezquita et al., 2020) and normalised in scater (v1.20.1) (McCarthy et al., 2017) and cells with fewer than 100 genes or 25,000 reads or less than 5% of reads mapped to the *P. falciparum* genome were removed from the analysis. Genes identified in more than 2 cells by at least 5 reads were kept in the analysis. Filtration resulted in 610 high quality cells.

Classification of cells and differential expression analysis. Principal component analysis was conducted within scater (v1.20.1) (McCarthy et al., 2017). Cells were compared to a reference time course using spearman Rank correlation (Otto et al., 2010). The reference 10X dataset was clustered using sc3 (Kiselev et al., 2017) which allowed to identified young asexual, young sexual and old asexual clusters robuslty. Differential expression analysis was conducted using the MAST package (v1.3.4) (Finak et al., 2015) in which a hurdle model is implemented to each gene with *zlm*, genes with a log fold change superior to |1| and an FDR inferior to 1% were considered differentially expressed. We next built a cluster index of this reference data using the scmap package (v1.14.0) (Kiselev et al., 2018) and used the *scmapCluster* function to assign each query cell (from smartseq2 data) to the index cluster with which it had the highest cosine similarity. We used an assignment cosine similarity threshold of 0.3, as previously determined for this cell type (Howick et al., 2019).

Supplemental information

Table S1. Cohort description.

Group		July-August		All
Number of samples		72	96	168
Age in years		8.65±2.82	8.17± 2.20	8.38±2.49
Gender	**Female**	28 (38.88)	47 (65.27)	75 (44.64)
	Male	44 (47.31)	49 (52.69)	93 (55.35)
Weight (Kg)		27.96± 8,29	26.76±7.29	27.27±7.73
Body temperature (°C)		34.73±1.07	36.72±0.32	35.97±1.19
Parasitemia (Ring/µl)		12972.58±18015.23	6013.24±6948.44	8995.82± 13318.36
Gametocytemia (Gametocyte/µl)		140±141.42	43.68±72.49	50.10±78.60
CD71+ erythrocytes (%)		1.16±0.90	1.29±1.81	1.24±1.48
CD71+ parasitemia /CD71- parasitemia		17.53±29.74	35.18±54.27	27.62±46.13
***Plasmodium falciparum* monoinfection (%)**		65 (46.42)	75 (53.57)	140 (83.33)
Co-infection *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* (%)		3 (17.64)	14 (82.35)	17 (10.12)
Co-infection *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium ovale* (%)		4 (44.44)	5 (55.55)	9 (5.35)
Co-infection *Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* (%)		0	1(100)	1 (0.59)
AP2G	**AP2G + (%)**	32 (48.48)	34 (51.51)	66 (39.28)
	AP2G - (%)	40 (39.21)	62 (60.78)	102 (60.71)

MOI	**1**	4 (66.66)	2 (33.33)	6(3.57)
	>1	68 (41.97)	94 (58.02)	162 (96.42)
HBB	**AA**	64 (44.44)	80 (55.55)	144 (85.71)
	AS	8 (33.33)	16 (66.66)	24 (14.28)

Table S2. scRNASeq Sample description.

Sample name	Parasitemia	AP2G fold change	MOI (MSP)	HBB	Number of cells passing QC	Single Cell Method
C204	32738	30,80302218	2	AA	71	SS2
C220	8560	25,63423608	3	AS	92	SS2
C228	14320	41,21221214	6	AS	84	SS2
C250	8720	22,00866909	4	AA	77	SS2
C253	31520	39,00866909	4	AA	1795	10X
C253	31520	39,80837291	4	AA	71	SS2
C276	5397	17,69169045	3	AS	39	SS2
C311	5165	9,253505471	4	AA	85	SS2
C337	14202	5,115942325	4	AS	91	SS2

Table S3. Differential expression analyses.

Gene_ID	Description	p value	log fold change	Direction	Cluster
PF3D7_0108500	ELM2 domain-containing protein, putative	0,02427439	1,297243209	downinAS	1
PF3D7_0202500	early transcribed membrane protein 2	0,035778277	1,777654339	downinAS	1
PF3D7_0220000	liver stage antigen 3	0,015878659	2,31270025	downinAS	1
PF3D7_0304200	EH domain-containing protein	0,00054391	2,584084278	downinAS	1
PF3D7_0310200	phd finger protein, putative	0,00475961	2,06337168	downinAS	1
PF3D7_0424600	Plasmodium exported protein (PHISTb)	0,355781898	0,876026894	downinAS	1
PF3D7_0424800	Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function	0,008965929	1,320162323	downinAS	1
PF3D7_0628300	choline/ethanolaminephosphotransferase, putative	0,710345531	0,462699524	downinAS	1
PF3D7_0706500	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,699549392	0,104763037	downinAS	1
PF3D7_0716200	PDCD2 domain-containing protein, putative	0,001763072	1,340046096	downinAS	1
PF3D7_0814000	60S ribosomal protein L13-2, putative	0,022004533	1,528903144	downinAS	1
PF3D7_0916700	RNA-binding protein musashi, putative	0,000215505	1,750255603	downinAS	1
PF3D7_1010100	PI31 domain-containing protein, putative	0,00190678	1,865135996	downinAS	1
PF3D7_1011800	PRE-binding protein	0,920140564	-0,208720773	downinAS	1
PF3D7_1024800	exported protein 3	2,79E-05	3,281883014	downinAS	1
PF3D7_1033700	bromodomain protein 1	0,723256565	0,433164541	downinAS	1
PF3D7_1121600	exported protein 1	0,380925879	0,968503635	downinAS	1
PF3D7_1200700	acyl-CoA synthetase	0,002172229	2,187005209	downinAS	1
PF3D7_1201200	Plasmodium exported protein (PHISTa-like), unknown function	0,010477425	1,658234496	downinAS	1
PF3D7_1202600	nuclear export mediator factor NEMF, putative	0,789334448	-0,101772304	downinAS	1
PF3D7_1203700	nucleosome assembly protein	0,000260417	2,193347797	downinAS	1
PF3D7_1243600	translation initiation factor SUI1, putative	0,001244441	1,440227525	downinAS	1
PF3D7_1252900	Plasmodium exported protein, unknown function	0,001176372	2,233029477	downinAS	1
PF3D7_1322100	histone-lysine N-methyltransferase SET2	0,472476993	0,679375073	downinAS	1

PF3D7_1347500	DNA/RNA-binding protein Alba 4	0,70706563	0,573191543	downinAS	1
PF3D7_1451200	conserved Plasmodium protein, unknown function	4,63E-06	3,165609776	downinAS	1
PF3D7_0206500	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,003312952	0,751940744	downinAS	2
PF3D7_0209800	ATP-dependent RNA helicase UAP56	0,018827457	0,507374388	downinAS	2
PF3D7_0220000	liver stage antigen 3	0,015878659	2,31270025	downinAS	2
PF3D7_0220100	DnaJ protein, putative	0,002482805	2,036951345	downinAS	2
PF3D7_0306900	40S ribosomal protein S23, putative	0,060610696	1,27360765	downinAS	2
PF3D7_0322700	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,499959314	0,255710032	downinAS	2
PF3D7_0406500	NYN domain-containing protein, putative	0,298921485	1,400106493	downinAS	2
PF3D7_0411000	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,460340576	0,230963715	downinAS	2
PF3D7_0424800	Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function	0,008965929	1,320162323	downinAS	2
PF3D7_0610200	RNA-binding protein 25, putative	0,545822509	-0,263639333	downinAS	2
PF3D7_0622900	AP2 domain transcription factor AP2Tel	0,631772546	0,388578527	downinAS	2
PF3D7_0717300	transcription initiation factor IIE subunit alpha, putative	0,306348675	-0,152362284	downinAS	2
PF3D7_0725800	5.8S ribosomal RNA	0,005902092	0,544657996	downinAS	2
PF3D7_0804000	cactin homolog, putative	0,772522346	0,267654119	downinAS	2
PF3D7_0811300	CCR4-associated factor 1	0,035152888	0,957467166	downinAS	2
PF3D7_0826700	receptor for activated c kinase	0,714079584	-0,248673339	downinAS	2
PF3D7_0831800	histidine-rich protein II	0,013821923	2,019359583	downinAS	2
PF3D7_0935900	ring-exported protein 1	0,616332122	0,786116389	downinAS	2
PF3D7_1010100	PI31 domain-containing protein, putative	0,00190678	1,865135996	downinAS	2
PF3D7_1027800	60S ribosomal protein L3	0,076267049	0,732767667	downinAS	2
PF3D7_1033700	bromodomain protein 1	0,723256565	0,433164541	downinAS	2
PF3D7_1108600	endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein	0,449010504	-0,154318817	downinAS	2
PF3D7_1216400	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	0,725633578	0,332461014	downinAS	2
PF3D7_1322100	histone-lysine N-methyltransferase SET2	0,472476993	0,679375073	downinAS	2

PF3D7_1342000	40S ribosomal protein S6	0,093319926	0,293805686	downinAS	2
PF3D7_1350100	lysine--tRNA ligase	0,623201997	-0,148996366	downinAS	2
PF3D7_1351400	60S ribosomal protein L17, putative	0,957476045	0,070866803	downinAS	2
PF3D7_1372200	histidine-rich protein III	0,782753292	-0,041085364	downinAS	2
PF3D7_1408100	plasmepsin III	0,409308173	0,173962821	downinAS	2
PF3D7_1434500	dynein-related AAA-type ATPase, putative	0,954658422	0,082539981	downinAS	2
PF3D7_1439300	Sad1/UNC domain-containing protein, putative	0,186535209	0,363527328	downinAS	2
PF3D7_1446300	conserved Plasmodium membrane protein, unknown function	0,729205315	0,031730844	downinAS	2
PF3D7_1447400	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,075795977	0,056897537	downinAS	2
PF3D7_1457200	thioredoxin 1	0,718337696	-0,057256591	downinAS	2
PF3D7_1457700	large ribosomal subunit nuclear export factor, putative	0,558934861	-0,416845951	downinAS	2
PF3D7_1462800	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,00015406	1,323383557	downinAS	2
PF3D7_0102200	ring-infected erythrocyte surface antigen	0,018369884	1,495865588	downinAS	3
PF3D7_0108500	ELM2 domain-containing protein, putative	0,02427439	1,297243209	downinAS	3
PF3D7_0202500	early transcribed membrane protein 2	0,035778277	1,777654339	downinAS	3
PF3D7_0220000	liver stage antigen 3	0,015878659	2,31270025	downinAS	3
PF3D7_0220100	DnaJ protein, putative	0,002482805	2,036951345	downinAS	3
PF3D7_0304200	EH domain-containing protein	0,00054391	2,584084278	downinAS	3
PF3D7_0310200	phd finger protein, putative	0,00475961	2,06337168	downinAS	3
PF3D7_0409100	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein PRP31, putative	6,00E-05	1,437535229	downinAS	3
PF3D7_0424500	serine/threonine protein kinase, FIKK family	0,014885088	1,919465113	downinAS	3
PF3D7_0424800	Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function	0,008965929	1,320162323	downinAS	3
PF3D7_0607000	translation initiation factor IF-2, putative	0,008194509	1,51875399	downinAS	3
PF3D7_0610800	transketolase	1,28E-06	2,074579598	downinAS	3
PF3D7_0702300	sporozoite threonine and asparagine-rich protein	0,019210984	1,023667378	downinAS	3
PF3D7_0705500	inositol-phosphate phosphatase, putative	0,014088879	1,421348473	downinAS	3

PF3D7_0716200	PDCD2 domain-containing protein, putative	0,001763072	1,340046096	downinAS	3
PF3D7_0730800	Plasmodium exported protein, unknown function	0,04432424	1,661521261	downinAS	3
PF3D7_0814000	60S ribosomal protein L13-2, putative	0,022004533	1,528903144	downinAS	3
PF3D7_0831800	histidine-rich protein II	0,013821923	2,019359583	downinAS	3
PF3D7_0916700	RNA-binding protein musashi, putative	0,000215505	1,750255603	downinAS	3
PF3D7_0922200	S-adenosylmethionine synthetase	0,016681168	1,344104632	downinAS	3
PF3D7_1010100	PI31 domain-containing protein, putative	0,00190678	1,865135996	downinAS	3
PF3D7_1016800	Plasmodium exported protein (PHISTc), unknown function	0,043002456	1,408559444	downinAS	3
PF3D7_1023900	chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 homolog, putative	0,004428251	1,582498964	downinAS	3
PF3D7_1024800	exported protein 3	2,79E-05	3,281883014	downinAS	3
PF3D7_1110200	pre-mRNA-processing factor 6, putative	0,005644143	1,448754805	downinAS	3
PF3D7_1121100	conserved protein, unknown function	0,03844699	1,134312656	downinAS	3
PF3D7_1200700	acyl-CoA synthetase	0,002172229	2,187005209	downinAS	3
PF3D7_1201200	Plasmodium exported protein (PHISTa-like), unknown function	0,010477425	1,658234496	downinAS	3
PF3D7_1203700	nucleosome assembly protein	0,000260417	2,193347797	downinAS	3
PF3D7_1208100	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,006316528	1,771126136	downinAS	3
PF3D7_1243600	translation initiation factor SUI1, putative	0,001244441	1,440227525	downinAS	3
PF3D7_1252900	Plasmodium exported protein, unknown function	0,001176372	2,233029477	downinAS	3
PF3D7_1329500	conserved protein, unknown function	0,023803252	1,042892285	downinAS	3
PF3D7_1352200	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15, putative	0,010890942	1,067105548	downinAS	3
PF3D7_1352900	Plasmodium exported protein, unknown function	0,024706888	1,366739683	downinAS	3
PF3D7_1357800	T-complex protein 1 subunit delta	0,002324586	1,884220969	downinAS	3
PF3D7_1405900	RNA-binding protein, putative	0,006097247	1,213359597	downinAS	3
PF3D7_1407800	plasmepsin IV	8,59E-05	2,329537972	downinAS	3
PF3D7_1417500	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4, putative	0,044151814	1,841729918	downinAS	3

PF3D7_1436300	translocon component PTEX150	0,004032532	1,903092557	downinAS	3
PF3D7_1450700	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,046893821	1,348885185	downinAS	3
PF3D7_1451200	conserved Plasmodium protein, unknown function	4,63E-06	3,165609776	downinAS	3
PF3D7_1462800	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,00015406	1,323383557	downinAS	3
PF3D7_1004000	60S ribosomal protein L13, putative	0,055864015	1,018214725	upinAS	1
PF3D7_1233600	asparagine and aspartate rich protein 1	0,768881056	0,081909208	upinAS	1
PF3D7_1308900	mRNA-decapping enzyme 2, putative	1,18E-05	-1,286316873	upinAS	1
PF3D7_1323100	60S ribosomal protein L6, putative	0,430460455	-0,634078864	upinAS	1
PF3D7_1346300	DNA/RNA-binding protein Alba 2	0,156801967	0,547050746	upinAS	1
PF3D7_1346400	VPS13 domain-containing protein, putative	0,053738704	-0,558808774	upinAS	1
PF3D7_1350500	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,681879027	-0,336444744	upinAS	1
PF3D7_1409600	histidine phosphatase, putative	0,703340205	-0,275311995	upinAS	1
PF3D7_0309500	asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing], putative	0,000661954	-0,683797249	upinAS	2
PF3D7_0401800	Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function	0,178710373	0,060714486	upinAS	2
PF3D7_0500800	mature parasite-infected erythrocyte surface antigen	2,37E-05	-0,72387431	upinAS	2
PF3D7_0608800	ornithine aminotransferase	0,024170882	-0,692780219	upinAS	2
PF3D7_1033200	early transcribed membrane protein 10.2	0,012211297	-0,211318007	upinAS	2
PF3D7_1123000	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,385377359	-0,752590926	upinAS	2
PF3D7_1130200	60S ribosomal protein P0	0,561027543	0,313738409	upinAS	2
PF3D7_1149000	antigen 332, DBL-like protein	0,012828794	-0,845258669	upinAS	2
PF3D7_1201000	Plasmodium exported protein (PHISTb), unknown function	0,000307367	-0,730397528	upinAS	2
PF3D7_1311800	M1-family alanyl aminopeptidase	0,107844747	-0,231226103	upinAS	2
PF3D7_1333400	AMMECR1 domain-containing protein, putative	0,044478852	-0,217341346	upinAS	2
PF3D7_1351000	phosphatidylinositol transfer protein, putative	0,412298413	-0,096289479	upinAS	2
PF3D7_1366300	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,434260479	-0,554533037	upinAS	2
PF3D7_1443300	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm5, putative	0,150738389	-0,125626629	upinAS	2

PF3D7_1471100	exported protein 2	0,310282981	0,577070228	upinAS	2
PF3D7_0516700	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2, putative	2,51E-06	-1,178083757	upinAS	3
PF3D7_0830500	sporozoite and liver stage tryptophan-rich protein, putative	0,015596965	-2,143297863	upinAS	3
PF3D7_1107300	polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative	5,98E-05	-1,323116833	upinAS	3
PF3D7_1205900	conserved protein, unknown function	0,00066473	-1,137377425	upinAS	3
PF3D7_1211200	conserved Plasmodium protein, unknown function	0,045215944	-1,095249192	upinAS	3
PF3D7_1308900	mRNA-decapping enzyme 2, putative	1,18E-05	-1,286316873	upinAS	3

Table S4. Primers used in this study.

Gene	Allelic family	Primer name	PrimerSequence(5'-3')
AP2G (PF3D7_1222600)	/	AP2-g_F	CCTGTATACCCTTCTTCGAAAGC
		AP2-g_R	TCAAAAGTGCTCTCCTTTCGTG
18S rRNA (PF3D7_0725600)	/	Pf18SrRNA-F	GCTGACTACGTCCCTGCCC
		Pf18SrRNA-R	ACAATTCATCATCATATCTTTCAATCGGTA
Hemoglobin subunit beta (HBB)	/	HBB_F	GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG
		HBB_R	ACACAACTGTGTTCACTAGC
MSP1 (PF3D7_0930300)	/	MSP1_F	CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG
		MSP1_R	CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA
	K1	K1_F	AAATGAAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC
		K1_R	GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA
	MAD20	MAD20_F	AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC
		MAD20_R	ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC
	RO33	RO33_F	TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG
		RO33_R	CATTTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGATC
MSP2 (PF3D7_0206800)	**/**	MSP2_F	ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTATA
		MSP2_R	CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT
	3D7/IC	3D7/IC27_F	AGAAGTATGGCAGAAAGTAAKCCTYCTACT
		3D7/IC27_R	GATTGTAATTCGGGGGATTCAGTTTGTTCG
	FC27	FC27_F	ATATTAAGAGTGTAGGTGCARATGCTCCA
		FC27_R	TTTTATTTGGTGCATTGCCAGAACTTGAAC

Table S5. Read counts and metadata for all datasets used in the study.

Please follow this link to access this dataset.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1lYemm-eXYh5tn4CzkbC_NdKjMvVUuk3z/edit#gid=53897082

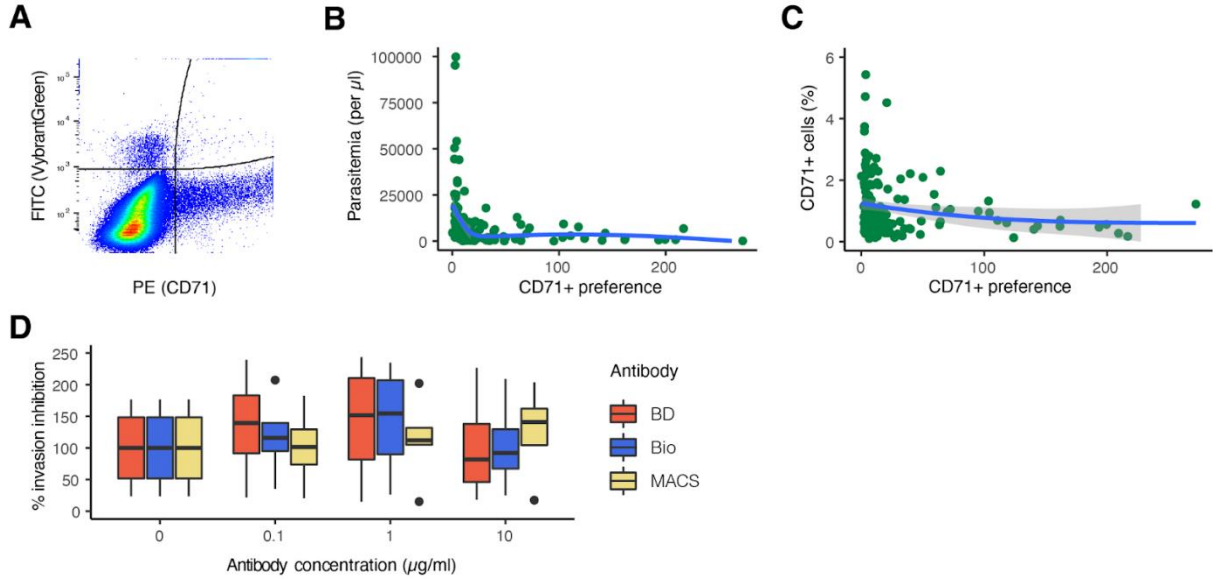


Figure S1. *P. falciparum* parasites preferentially invade reticulocytes. (**A**) Example of a FACs plot. (**B**) Relationship between the observed parasitemia and the CD71+ preference (parasitemia in CD71+ / parasitemia in CD71-) (Spearman's rank-order correlation r=-0.55, $p=1.3*10^{-12}$). (**C**) Relationship between the observed CD71+ cell proportion and the CD71+ preference (calculated as the ratio of parasitemia in CD71+/parasitemia in CD71- cells) (Spearman's rank-order correlation r=-0.29, p=0.0004). (**D**) Invasion of labelled erythrocytes was measured specifically in CD71+ cells, invasion inhibition is given at differing concentrations of anti-CD71 antibodies.

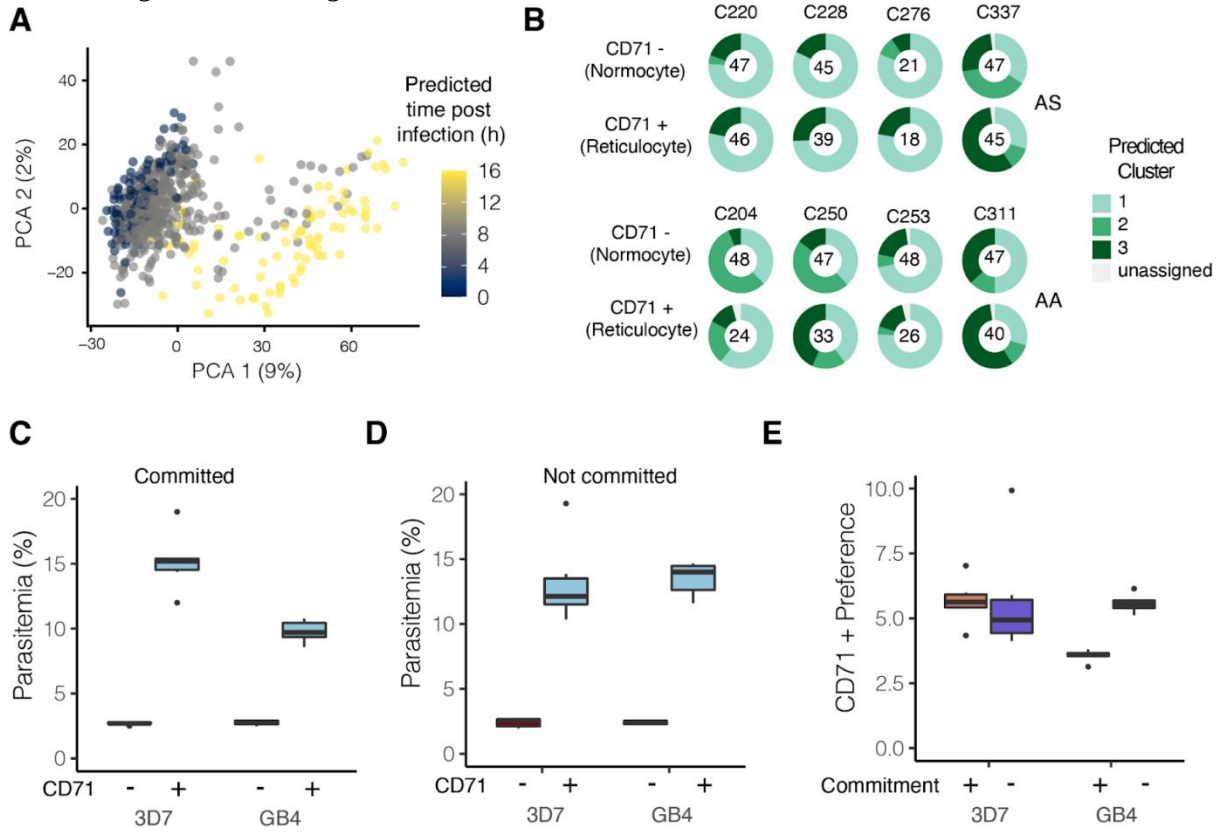


Figure S2. (**A**) Principal component analysis of single cell parasite transcriptomes from the circulation of 8 natural infected carriers analysed by smartseq2 technology, a correlation analysis with a bulk reference (Otto et al., 2010) identifies the age of the parasites. (**B**) Proportion of parasites corresponding to early asexual rings (cluster 1), older rings (cluster 2), sexual rings (cluster 3) for each infection either in normocytes (top row) or in reticulocutes (bottom row). Unassigned cells are also displayed. The total number of cells is given at the centre of the donut. (**C**) Parasitemia observed in CD71+ or CD71- for 2 different *in vitro* cultured lab strains 3D7 and GB4 that were committed to sex. (**D**) Parasitemia observed in CD71+ or CD71- for 2 different *in vitro* cultured lab strains 3D7 and GB4 that were not committed to sex (**E**) CD71+ host cell preference (parasitemia in CD71+/parasitemia in CD71-) for the two lab strain either in committed or not committed conditions.

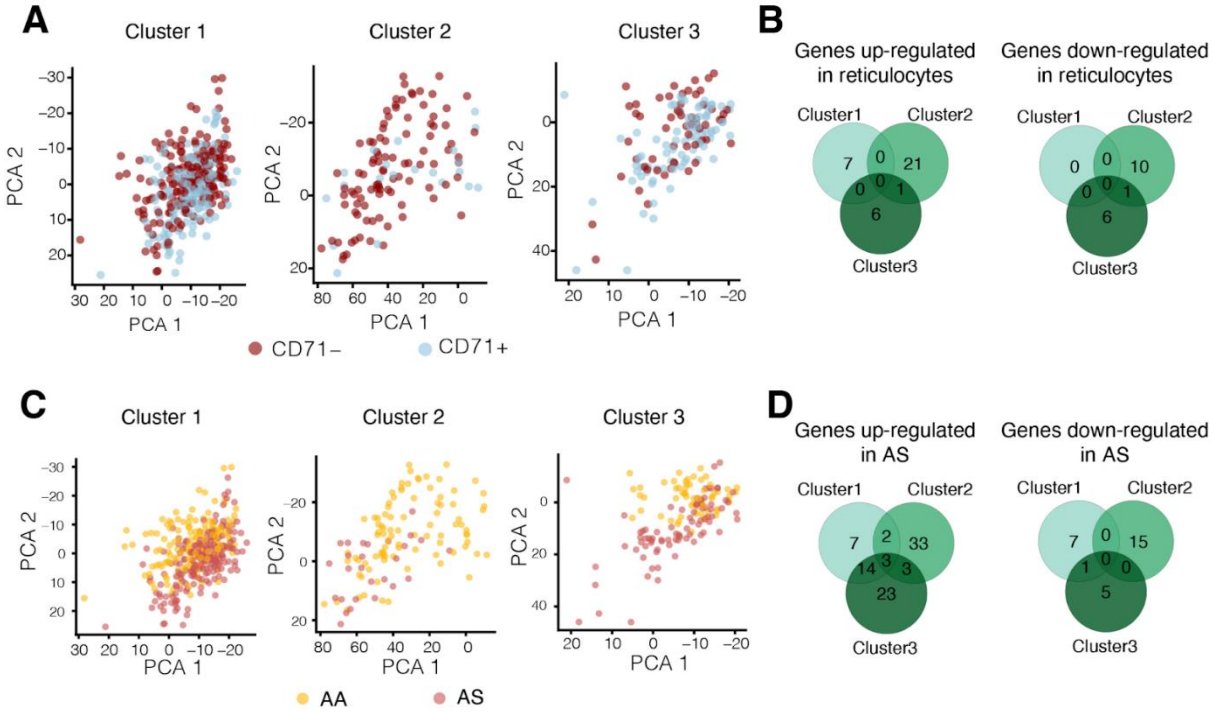


Figure S3. (**A**) Principal component analysis of parasites in CD71+ and CD71- in each cluster. (**B**) Differential expression analysis by cluster of parasites residing in CD71+ and CD71- host cells. (**C**) Principal component analysis of cells in AA and AS hosts in each cluster. (**D**) Differential expression analysis by cluster of parasites in AA and AS hosts.

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, The Journal of the American Society of Hematology *123*, 959–966. .

Amezquita, R.A., Lun, A.T.L., Becht, E., Carey, V.J., Carpp, L.N., Geistlinger, L., Marini, F., Rue-Albrecht, K., Risso, D., Soneson, C., et al. (2020). Orchestrating single-cell analysis with Bioconductor. Nat. Methods *17*, 137–145. .

Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics *31*, 166–169. .

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. .

Barry, A., Bradley, J., Stone, W., Guelbeogo, M.W., Lanke, K., Ouedraogo, A., Soulama, I., Nébié, I., Serme, S.S., Grignard, L., et al. (2021). Higher gametocyte production and mosquito infectivity in chronic compared to incident Plasmodium falciparum infections. Nat. Commun. *12*, 2443. .

Bousema, T., and Drakeley, C. (2011). Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. Clin. Microbiol. Rev. *24*, 377–410. .

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. .

Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E., and Satija, R. (2018). Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. Nat. Biotechnol. *36*, 411–420. .

Caocci, G., Greco, M., and La Nasa, G. (2017). Bone Marrow Homing and Engraftment Defects of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis. *9*, e2017032. .

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

Cholera, R., Brittain, N.J., Gillrie, M.R., Lopera-Mesa, T.M., Diakité, S.A.S., Arie, T., Krause, M.A., Guindo, A., Tubman, A., Fujioka, H., et al. (2008). Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 991–996. .

Chwatt, L.J. (1948). Infection of reticulocytes by Plasmodium falciparum and Plasmodium malariae in hyperendemic indigenous malaria. Ann. Trop. Med. Parasitol. *42*, 101–112. .

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. .

Djidjou-Demasse, R., Mann-Manyombe, M.L., Seydi, O., and yatat-Djeumen, I.V. (2021). Differential preferences for RBCs is key for Plasmodium species evolutionary diversity within human host.

Ferreira, A., Marguti, I., Bechmann, I., Jeney, V., Chora, A., Palha, N.R., Rebelo, S., Henri, A., Beuzard, Y., and Soares, M.P. (2011). Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. Cell *145*, 398–409. .

Finak, G., McDavid, A., Yajima, M., Deng, J., Gersuk, V., Shalek, A.K., Slichter, C.K., Miller, H.W., McElrath, M.J., Prlic, M., et al. (2015). MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. Genome Biol. *16*, 278. .

Gautret, P., Miltgen, F., Gantier, J.C., Chabaud, A.G., and Landau, I. (1996). Enhanced gametocyte formation by Plasmodium chabaudi in immature erythrocytes: pattern of production, sequestration, and infectivity to mosquitoes. J. Parasitol. *82*, 900–906. .

Gruszczyk, J., Kanjee, U., Chan, L.-J., Menant, S., Malleret, B., Lim, N.T.Y., Schmidt, C.Q., Mok, Y.-F., Lin, K.-M., Pearson, R.D., et al. (2018). Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax. Science *359*, 48–55. .

Harris, C.T., Tong, X., Campelo, R., Vanheer, L.N., Marreiros, I.M., Nahiyaan, N., Zuzarte-Luís, V.A., Deitsch, K.W., Mota, M.M., Rhee, K.Y., et al. (2022). Metabolic competition between lipid metabolism and histone methylation regulates sexual differentiation in human malaria parasites.

Heaton, H., Talman, A.M., Knights, A., Imaz, M., Gaffney, D.J., Durbin, R., Hemberg, M., and Lawniczak, M.K.N. (2020). Souporcell: robust clustering of single-cell RNA-seq data by genotype without reference genotypes. Nat. Methods *17*, 615–620. .

Hentzschel, F., Gibbins, M.P., Attipa, C., and Beraldi, D. (2022). Host cell maturation modulates parasite invasion and sexual differentiation in Plasmodium berghei. Science.

Howick, V.M., Russell, A.J.C., Andrews, T., Heaton, H., Reid, A.J., Natarajan, K., Butungi, H., Metcalf, T., Verzier, L.H., Rayner, J.C., et al. (2019). The Malaria Cell Atlas: Single parasite transcriptomes across the complete Plasmodium life cycle. Science *365*. https://doi.org/10.1126/science.aaw2619.

Introini, V., Marin-Menendez, A., Nettesheim, G., Lin, Y.-C., Kariuki, S.N., Smith, A.L., Jean, L., Brewin, J.N., Rees, D.C., Cicuta, P., et al. (2022). The erythrocyte membrane properties of beta thalassaemia heterozygotes and their consequences for Plasmodium falciparum invasion. Sci. Rep. *12*, 8934. .

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. .

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. .

Kariuki, S.N., Marin-Menendez, A., Introini, V., Ravenhill, B.J., Lin, Y.-C., Macharia, A., Makale, J., Tendwa, M., Nyamu, W., Kotar, J., et al. (2020). Red blood cell tension protects against severe malaria in the Dantu blood group. Nature *585*, 579–583. .

Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nat. Methods *12*, 357–360. .

Kiselev, V.Y., Kirschner, K., Schaub, M.T., Andrews, T., Yiu, A., Chandra, T., Natarajan, K.N., Reik, W., Barahona, M., Green, A.R., et al. (2017). SC3: consensus clustering of single-cell RNA-seq data. Nat. Methods *14*, 483–486. .

Kiselev, V.Y., Yiu, A., and Hemberg, M. (2018). scmap: projection of single-cell RNA-seq data across data sets. Nat. Methods *15*, 359–362. .

Li, H., Yang, J., Chu, T.T., Naidu, R., Lu, L., Chandramohanadas, R., Dao, M., and Karniadakis, G.E. (2018). Cytoskeleton Remodeling Induces Membrane Stiffness and Stability Changes of Maturing Reticulocytes. Biophys. J. *114*, 2014–2023. .

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- ΔΔCT method. Methods *25*, 402–408. .

Llorà-Batlle, O., Michel-Todó, L., Witmer, K., Toda, H., Fernández-Becerra, C., Baum, J., and Cortés, A. (2020). Conditional expression of PfAP2-G for controlled massive sexual conversion in Plasmodium falciparum. Sci Adv *6*, eaaz5057. .

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. .

McCarthy, D.J., Campbell, K.R., Lun, A.T.L., and Wills, Q.F. (2017). Scater: pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. Bioinformatics *33*, 1179–1186. .

Metoh, T.N., Chen, J.-H., Fon-Gah, P., Zhou, X., Moyou-Somo, R., and Zhou, X.-N. (2020). Genetic diversity of Plasmodium falciparum and genetic profile in children affected by uncomplicated malaria in Cameroon. Malar. J. *19*, 115. .

Miyazaki, S., Chitama, B.-Y.A., Kagaya, W., Lucky, A.B., Zhu, X., Yahata, K., Morita, M., Takashima, E., Tsuboi, T., and Kaneko, O. (2021). Plasmodium falciparum

SURFIN4.1 forms an intermediate complex with PTEX components and Pf113 during export to the red blood cell. Parasitol. Int. *83*, 102358. .

Naidu, R., Chu, T.T.T., Tripathi, J., Hu, Y., Subramanian, G., Tong, J.X., Tripathi, P., Fang, K., Tan, K.S.W., Lim, C.T., et al. (2019). Reticulocyte Infection Leads to Altered Behaviour, Drug Sensitivity and Host Cell Remodelling by Plasmodium falciparum.

Neveu, G., Richard, C., Dupuy, F., Behera, P., Volpe, F., Subramani, P.A., Marcel-Zerrougui, B., Vallin, P., Andrieu, M., Minz, A.M., et al. (2020). Plasmodium falciparum sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis. Blood *136*, 1381–1393. .

Ney, P.A. (2011). Normal and disordered reticulocyte maturation. Curr. Opin. Hematol. *18*, 152–157. .

Otto, T.D., Wilinski, D., Assefa, S., Keane, T.M., Sarry, L.R., Böhme, U., Lemieux, J., Barrell, B., Pain, A., Berriman, M., et al. (2010). New insights into the blood-stage transcriptome of Plasmodium falciparum using RNA-Seq. Mol. Microbiol. *76*, 12–24. .

Ovchynnikova, E., Aglialoro, F., Bentlage, A.E.H., Vidarsson, G., Salinas, N.D., von Lindern, M., Tolia, N.H., and van den Akker, E. (2017). DARC extracellular domain remodeling in maturating reticulocytes explains Plasmodium vivax tropism. Blood *130*, 1441–1444. .

Pasvol, G., Weatherall, D.J., and Wilson, R.J. (1978). Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against P. falciparum malaria. Nature *274*, 701–703. .

Pasvol, G., Weatherall, D.J., and Wilson, R.J. (1980). The increased susceptibility of young red cells to invasion by the malarial parasite Plasmodium falciparum. Br. J. Haematol. *45*, 285–295. .

Picelli, S., Faridani, O.R., Björklund, A.K., Winberg, G., Sagasser, S., and Sandberg, R. (2014). Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. Nat. Protoc. *9*, 171–181. .

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.

Portugaliza, H.P., Miyazaki, S., Geurten, F.J., Pell, C., Rosanas-Urgell, A., Janse, C.J., and Cortés, A. (2020). Artemisinin exposure at the ring or trophozoite stage impacts Plasmodium falciparum sexual conversion differently. Elife *9*. https://doi.org/10.7554/eLife.60058.

Prajapati, S.K., Ayanful-Torgby, R., Pava, Z., Barbeau, M.C., Acquah, F.K., Cudjoe, E., Kakaney, C., Amponsah, J.A., Obboh, E., Ahmed, A.E., et al. (2020). The transcriptome of circulating sexually committed Plasmodium falciparum ring stage parasites forecasts malaria transmission potential. Nat. Commun. *11*, 6159.

Reid, A.J., Talman, A.M., Bennett, H.M., Gomes, A.R., Sanders, M.J., Illingworth, C.J.R., Billker, O., Berriman, M., and Lawniczak, M.K. (2018). Single-cell RNA-seq reveals hidden transcriptional variation in malaria parasites. Elife *7*. https://doi.org/10.7554/eLife.33105.

Saelens, J.W., Petersen, J.E.V., Freedman, E., Moseley, R.C., Konaté, D., Diakité, S.A.S., Traoré, K., Vance, N., Fairhurst, R.M., Diakité, M., et al. (2021). Impact of Sickle Cell Trait Hemoglobin on the Intraerythrocytic Transcriptional Program of Plasmodium falciparum. mSphere *6*, e0075521.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of β-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. Science *230*, 1350–1354. .

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.

Sondo, P., Derra, K., Rouamba, T., Nakanabo Diallo, S., Taconet, P., Kazienga, A., Ilboudo, H., Tahita, M.C., Valéa, I., Sorgho, H., et al. (2020). Determinants of Plasmodium falciparum multiplicity of infection and genetic diversity in Burkina Faso. Parasit. Vectors *13*, 427.

Taylor, S.M., Cerami, C., and Fairhurst, R.M. (2013). Hemoglobinopathies: slicing the Gordian knot of Plasmodium falciparum malaria pathogenesis. PLoS Pathog. *9*, e1003327.

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. .

Usui, M., Prajapati, S.K., Ayanful-Torgby, R., Acquah, F.K., Cudjoe, E., Kakaney, C., Amponsah, J.A., Obboh, E.K., Reddy, D.K., Barbeau, M.C., et al. (2019). Plasmodium falciparum sexual differentiation in malaria patients is associated with host factors and GDV1-dependent genes. Nat. Commun. *10*, 2140. .

Waugh, R.E., Mantalaris, A., Bauserman, R.G., Hwang, W.C., and Wu, J.H. (2001). Membrane instability in late-stage erythropoiesis. Blood *97*, 1869–1875. .

Winter, G., Kawai, S., Haeggström, M., Kaneko, O., von Euler, A., Kawazu, S.-I., Palm, D., Fernandez, V., and Wahlgren, M. (2005). SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes. J. Exp. Med. *201*, 1853–1863.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce projet de thèse avait pour objectifs principaux de : 1) déterminer l'influence du trait drépanocytaire sur la transmission de *P. falciparum*, et 2) étudier la relation entre l'âge des érythrocytes et la biologie de *P. falciparum* dans des conditions naturelles. Pour mes travaux de thèse, j'ai effectué des séjours en alternance entre le Cameroun, pour la collecte des échantillons et la France, pour les analyses des échantillons biologiques.

Objectif 1 : Trait drépanocytaire et transmission du paludisme

Dans le chapitre 4 de notre étude, nous rapportons que la prévalence globale du paludisme asymptomatique dans notre zone d'étude atteint 65,5% et 95% des infections sont dues à *P. falciparum*. Malgré les interventions de lutte mises en place par le PNLP, la transmission reste toujours élevée dans cette localité. Au Cameroun, la prévention contre le paludisme est axée sur la lutte anti-vectorielle, par le déploiement massif de MILDA, sur la chimio-prévention, TPI et CPS, et par la prise en charge des cas au niveau communautaire. Le paludisme représente toujours aujourd'hui 30% des motifs de consultation au Cameroun et de nouvelles stratégies sont implémentées pour améliorer le diagnostic et la prise en charge au niveau communautaire, notamment pour les enfants de moins de 5 ans, et pour limiter le nombre de gîtes à anophèles, par l'organisation de campagnes d'assainissement de l'environnement. L'effet protecteur du trait drépanocytaire contre le paludisme se caractérise par une meilleure capacité des sujets HbAS à contrôler la parasitémie, par une moindre croissance des parasites dans les globules rouges HbS et une cytoadhérence réduite qui inhibe la séquestration et améliore la clairance par la rate (Ayi et al., 2004; Cholera et al., 2008). Chauvet a émis l'hypothèse selon laquelle la modulation de la phosphorylation des protéines dans les globules rouges infectés pourrait être un mécanisme sous-jacent à la protection relative conférée par l'HbS contre le paludisme (Chauvet et al., 2021). La protection conférée par l'HbAS contre les formes graves du paludisme dues à *P. falciparum* est largement documentée (Elguero et al., 2015; Piel et al., 2010; Williams, 2006), mais peu d'études font mention de la protection du trait drépanocytaire chez les porteurs asymptomatiques.

1.1 Trait drépanocytaire et paludisme asymptomatique chez l'Homme

Au cours de notre enquête parasitologique, nous avons observé que la prévalence et la densité parasitaire des stades asexués de *P. falciparum* était similaire entre les enfants de génotype AA (66.23%) et ceux de génotype AS (62.42%) (*p*. value = 0.206). Ces résultats sont en accord avec d'autres études antérieures (Migot-Nabias et al., 2006; Williams et al., 2005). Nos résultats

suggèrent que les individus asymptomatiques de génotypes HbAA et HbAS ont le même niveau de parasitémie et la même capacité à s'infecter. Cependant, nos résultats sont contraires à l'étude de Billo *et al* au Mali qui a montré que l'HbAS protège contre l'infection asymptomatique à *P. falciparum* en conditions naturelles de transmission (Billo et al., 2012) et celle de Igbeneghu *et al*, au Nigéria qui a observé une forte protection des génotypes HbAS et Hb AC contre le paludisme asymptomatique à *P. falciparum* (Igbeneghu et al., 2015). Ces différences sont peut-être expliquées par une protection plus ou moins visible dans différents contextes de transmission, ou encore une adaptation locale des parasites à un environnement HbS.

Nous avons observé dans notre cohorte que la prévalence du portage des gamétocytes de *P. falciparum* était significativement plus élevée chez les enfants de génotype HbAS comparés aux enfants de génotype HbAA (p=.0.028). Nos résultats corroborent deux études qui ont montré que l'allèle C influence la formation des gamétocytes (Gonçalves et al., 2017; Gouagna et al., 2010). Mais en ce qui concerne l'allèle S, les études précédentes ne rapportent aucune différence significative entre la densité gamétocytaire et le trait drépanocytaire (Amoah et al., 2020) ni entre la prévalence gamétocytaire et le trait drépanocytaire (Gouagna et al., 2010). La plupart des mécanismes qui ont été cités plus haut concernent les formes parasitaires asexuées, et pas les stades sexués. Néanmoins, les mécanismes associés à ce phénotype pourraient résider au niveau de la cellule hôte. En effet, en présence d'une réticulocytémie élevée occasionnée par la production d'érythropoïétine (EPO) en cas d'anémie, on observe une formation accrue de gamétocytes (Reece et al., 2005; Trager et al., 1999) et on sait que certains sujets HbAS peuvent présenter les symptômes similaires aux sujets HbSS tels que l'anémie lorsque les cellules sont soumises à un stress oxydatif (Ashorobi et al., 2022). Aussi une moindre prise de médicament anti-malarique chez les sujets protégés HbAS résidant en zone endémique, peut amener le parasite à perdurer plus longtemps et à s'adapter à l'environnement de son hôte , maintenant ainsi un paludisme asymptomatique (adapté de Labie, 2010). Cette durée plus longue du paludisme asymptomatique chez les enfants HbAS pourrait ainsi expliquer pourquoi nous avons observé une prévalence gamétocytaire plus élevée chez ces enfants. Le phénotype pourrait aussi s'expliquer par le fait qu'en présence d'un globule rouge falciforme, le parasite se retrouve dans un état de stress dû à l'appauvrissement du GR en oxygène et, dans ces conditions, se différencie préférentiellement en gamétocytes (Trager et al., 1999).

1.2 Influence du trait drépanocytaire chez le moustique

Nous avons mesuré que le risque d'infection des moustiques gorgés à partir du sang des porteurs de génotype HbAS était deux fois supérieur par rapport à celui des moustiques gorgés sur sujets de génotype HbAA, et ce dans les trois conditions de gorgement. Nos résultats corroborent ceux de Robert dans une étude au dispensaire de Messa à Yaoundé, qui a également montré que les porteurs de gamétocytes de génotype HbAS étaient 2 fois plus infectants que ceux de génotype HbAA, et un potentiel infectieux 4 fois plus élevé des sujets HbAS était observé dans leur étude, comparé aux individus HbAA (Robert et al., 1996). Gouagna et collaborateurss au Burkina Faso, ont également rapporté que le risque d'infection était 2 fois plus élevé chez les sujets HbAC et légèrement supérieur chez les sujets HbAS comparés à des individus de génotype HbAA (Gouagna et al., 2010; Labie, 2010). Gonçalves et collaborateurs dans une étude au Mali avaient aussi montré que les individus HbAC porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* avaient une capacité accrue à infecter les anophèles (Gonçalves et al., 2017). Les mécanismes qui peuvent expliquer l'influence du trait drépanocytaire sur l'efficacité de la transmission du paludisme ne sont pas encore connus. Une hypothèse pourrait être que les individus de génotype HbAS portent plus de gamétocytes que les sujets de génotype HbAA. En effet, on sait que la charge oocystique est associée à la densité gamétocytaire (Bradley et al., 2018; Da et al., 2015). Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas montré de différence significative de charges en gamétocytes entre les individus HbAA et HbAS.

Nous n'avons pas mesuré le sex-ratio dans notre étude, or il a été rapporté que le sex ratio est un facteur important pour prédire le succès d'infection chez le moustique (Bradley et al., 2018; Tadesse et al., 2019). Le sex-ratio pourrait donc être un facteur explicatif de notre phénotype et ceci mériterait d'être contrasté chez les sujets d'HbAA et d'HbAS. D'autre part, nous avons observé que la MOI dans les populations de gamétocytes était significativement plus faible chez les enfants HbAS que chez ceux HbAA ($P = 0.032$). Cette différence pourrait aussi, en partie, expliquer la plus forte infectivité des gamétocytes chez les sujets HbAS par rapport aux HbAA. En effet, dans des travaux antérieurs, il a été montré que les infections de faible complexité produisent de plus fortes charges en oocystes (Morlais et al. 2015).

Il a aussi été récemment montré que certains variants génétiques chez *P. falciparum* sont spécifiquement associés à l'effet protecteur du trait drépanocytaire contre les formes graves du paludisme (Band et al., 2022). Cela suggère que des mutations compensatoires pourraient être

sélectionnées par le parasite dans un environnement HbAS avec un rôle possible dans une transmission plus efficace.

Enfin, nos résultats suggèrent que l'hémoglobine S est un facteur de risque de portage de gamétocytes et ainsi que les sujets porteurs du trait drépanocytaire contribuent significativement à maintenir la transmission de *P. falciparum*. Il sera intéressant de découvrir les mécanismes associés et considérer cette transmission accrue avec des prismes d'épidémiologie, de modélisation et de stratégies de contrôle.

Objectif 2: Etudier la relation entre l'âge des érythrocytes et la biologie de *P. falciparum* dans des conditions naturelles

2.1 Préférence réticulocytaire pour *P. falciparum*

Dans le chapitre 5 de notre étude, nous avons observé que sur les 140 enfants sélectionnés, les cellules CD71+ circulantes représentaient en moyenne 1% du nombre total de globules rouges (RBCs), mais contenaient près de 15% de la biomasse parasitaire. Des travaux antérieurs ont rapporté un nombre réduit de réticulocytes circulants chez les individus infectés par *P. falciparum* (Abdalla et al., 1980; Kurtzhals et al., 1997; Phillips et al., 1986). Dans un modèle murin, il a été proposé qu'une altération de la maturation des précurseurs érythroïdes en érythrocytes (Villeval et al., 1990), ou une diminution de la production d'érythropoïétine (el Hassan et al., 1997) pourraient être associées à de faibles niveaux de réticulocytes circulants. Tous ces mécanismes sont mis en place au cours de l'infection palustre comme un effet protecteur de l'hôte afin de limiter le nombre de GR disponibles qui pourront être parasités (modèle murin) (Chang et al., 2004). Nous avons observé sur notre jeu de données, que le parasite *P. falciparum* à la capacité d'envahir en moyenne 30 fois plus les réticulocytes que les normocytes et que cette préférence réticulocytaire était corrélée à la densité parasitaire. Chwatt *et al* avait trouvé une corrélation entre la densité parasitaire et la proportion de .réticulocytes infectés par *P. falciparum* (Chwatt, 1948). De même, Pasvol et al, et Naidu et al, ont trouvé que *P. falciparum* a une préférence pour les réticulocytes mais il peut également envahir les érythrocytes matures (Naidu et al., 2019; Pasvol et al., 1980). Il a déjà été montré que la préférence de *P. berghei* pour les réticulocytes est très supérieure à celle des érythrocytes matures (Cromer et al., 2006; Leong et al., 2021), aussi chez *P.vivax* où cette préférence est stricte (Malleret et al., 2015). Sachant que les normocytes sont facilement accessibles et plus nombreux en circulation, on se pose une question, celle de savoir pourquoi le parasite envahit

préférentiellement les réticulocytes. Les mécanismes par lesquels les réticulocytes sont les plus sensibles à l'invasion de *P. falciparum* restent inconnus. Néanmoins, quelques hypothèses ont été mentionnées pour *Plasmodium* en général, notamment celles de Butcher *et al* et Miller *et al* en 1973, ces auteurs se sont intéressés aux récepteurs de la membrane du globule rouge et suggèrent qu'il existe peut-être des récepteurs sur la membrane du réticulocyte qui facilitent l'invasion du parasite. L'invasion de *P. vivax* dans les érythrocytes humains a été associée à la présence de l'antigène du groupe sanguin Duffy à la surface de la cellule hôte, puisqu'en l'absence de cet antigène une résistance à *P. vivax* est observée (Miller et al., 1979). Des études récentes ont montré que le tropisme strict de *P. vivax* pour les réticulocytes dépend de deux récepteurs spécifiques, le CD71 et le CD98 (Gruszczyk et al., 2018; Malleret et al., 2021). Tout récemment, Hentzschel *et al* a identifié le CD71 comme le récepteur hôte pour l'invasion des réticulocytes par *P. berghei* (Hentzschel et al., 2022). Dans notre étude, afin de différencier les globules rouges matures de ceux immatures nous avons aussi utilisé le récepteur de la transferrine (CD71); nous avons mesuré l'invasion des réticulocytes par *P. falciparum* et sa dépendance au récepteur CD71 *in vitro*, nos résultats ont montré que cette préférence est indépendante de ce récepteur. Un large éventail de récepteurs hôtes pour l'invasion de *P. falciparum* a été rapporté, mais aucun de ces récepteurs n'explique le tropisme pour les réticulocytes (Cowman et al., 2017). Il est possible qu'il existe des récepteurs spécifiques à la surface des réticulocytes mais qui jusqu'ici sont encore non identifiés. Les propriétés membranaires du GR, telles que l'extension ou compression et la flexion, ont récemment été identifiées comme un déterminant clé de l'efficacité de l'invasion (Introini et al., 2022; Kariuki et al., 2020). Les auteurs ont constaté que les réticulocytes sont moins déformables (Waugh et al., 2001) et ont des membranes plus rigides (Li et al., 2018) que les GR matures. En particulier, l'instabilité des réticulocytes, avec un cytosquelette étendu et une connectivité cytosquelette/membrane réduite, pourrait faciliter l'entrée des parasites (Li et al., 2018).

Un potentiel bénéfice pour le parasite d'envahir les réticulocytes, est que le réticulocyte est métaboliquement plus actif que les GRs matures et riche en nutriments (Malleret et al., 2013; Naidu et al., 2019; Sass et al., 1964; Srivastava et al., 2015). De plus, il conserve certaines voies métaboliques qui sont capitales pour le parasite (Srivastava et al., 2015). Srivastava *et al*, ont également montré que la biosynthèse du glutathion était plus élevée dans les réticulocytes, on sait que *Plasmodium* utilise son propre système redox de glutathione pour lutter contre le stress oxydatif (Müller, 2004; Srivastava et al., 2015).

Une autre explication de cette préférence réticulocytaire, serait que le parasite préfère envahir les réticulocytes comme stratégie d'évasion. En effet, le réticulocyte émet un signal très élevé de CD47 lui permettant ainsi d'échapper à la clairance phagocytaire (Banerjee et al., 2015).

Pour finir, sur le plan protéomique, la surface des réticulocytes et des normocytes est très différente en raison de la régulation négative des protéines au cours de la maturation des réticulocytes chez l'homme (Chu et al., 2018; Gautier et al., 2018; Wilson et al., 2016). Chu *et al*, après avoir profilé le protéome de réticulocytes chez l'Homme a trouvé que la basigine était légèrement plus élevée à la surface du réticulocyte par rapport au GR mature. Précédemment, il a aussi été démontré que les anticorps anti-basigine inhibent l'invasion de *P. falciparum* (Aniweh et al., 2017). Naidu *et al*, après avoir effectué l'inhibition de l'invasion à *P. falciparum* à partir des Ac anti-basigine, ont obervé que l'invasion avait une sensibilité différente entre les normocytes et les réticulocytes à des concentrations élevées d'anticorps, suggérant un mode d'invasion spécifique aux reticulocytes (Naidu et al., 2019).

2.2 Facteurs associés à l'engagement sexuel et différenciation transcriptomique des anneaux sexuellement engagés.

A ce jour, il n'existe pas de référence transcriptomique des stades anneaux sexuellement engagés. Sachant qu'une lecture microscopique ne nous permet pas de différencier les stades anneaux qui vont continuer la réplication asexuée de ceux qui vont migrer vers la forme sexuée, nous avons réussi à différencier transcriptionnellement les stades anneaux sexuellement engagés de ceux asexués en condition de terrain.

Nos résultats montrent que les anneaux sexués de *P. falciparum* circulent dans le sang périphérique de 39,28% des patients résidant dans la localité. Une telle prévalence élevée n'est pas en accord avec la littérature qui a montré que moins de 10% de parasites s'engagent vers la forme sexuée à partir des cultures *in vitro* (Josling et al., 2018; Josling & Llinás, 2015; Llorà-Batlle et al., 2020). Cependant, quelques auteurs ont trouvé que le taux d'engagement peut aller de 1 à 30% dans les infections à *P. falciparum* (Brancucci et al., 2018; Poran et al., 2017). De même Mackinnon *et al* avait trouvé que l'expression d'AP2G est plus élevée dans les isolats de terrain par rapport aux souches parasitaires adaptées en condition de laboratoire (Mackinnon et al., 2009). Usui et al. quant à eux ont montré que le taux d'engagement pouvait aller jusqu'à 78% dans les infections naturelles au Ghana (Usui et al., 2019). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que ce taux d'engagement sexuel est modulé par la parasitémie (Usui et al., 2019). En

effet, nous avons montré qu'il y a une très forte association entre la parasitémie et l'engagement sexuel, confirmant le résultat d'Usui et collaborateurs.

Nous avons également constaté que la proportion de cellules CD71+ étaient plus élevée chez les sujets AP2G+ par rapport à ceux AP2G-, bien que la différence n'était pas significative par cytométrie en flux sur les 140 échantillons. Nos résultats sont en accord avec les résultats de Trager *et al* qui avaient démontré que l'engagement sexuel est influencé par la présence de réticulocytes en culture *in vitro* qui sont considérés comme les cellules préférées pour le développement de gamétocytes (Gautret et al., 1996; Trager & Gill, 1992).

Nous avons observé une très grande diversité génétique dans notre population d'étude, mais elle n'était pas corrélée à l'engagement sexuel. Nous avons montré la puissance de la technologie du scRNAseq à travers une méthode de déconvolution des génotypes pour montrer la composition des stades des différents clones circulants de parasites au sein de la même infection dans la référence 10X. En effet, sur notre référence 10X, la MOI était égale à 4 par une PCR nichée, nous avons utilisé la méthode souporcell qui a révélé 4 génotypes dans les trois clusters (1,2,3), et la méthode a révélé avec précision le nombre de clones présents dans chaque cluster, mettant en évidence un engagement sexuel similaire dans les quatre génotypes de l'infection (Heaton et al., 2019).

Nous n'avons pas observé d'association entre le trait drépanocytaire et l'engagement sexuel. Nos résultats sont en accord avec ceux d'Amoah *et al*, qui a montré que l'engagement sexuel était similaire chez les individus de génotypes AA et AS (Amoah et al., 2020).

En ce qui concerne les analyses transcriptomiques, parmi les 14 gènes fortement exprimés au stade ring sexué, 2 gènes ont été identifiés comme régulateurs transcriptionnels potentiels de l'engagement sexuel et de la gamétocytogénèse dans des études antérieures, mais en condition de laboratoire: l'histone déméthylase (LSD2) et l'histone déacétylase (Hda1) (Poran et al., 2017). Dans les infections naturelles, Usui *et al.* ont identifié deux protéines exportées à la surface des globules rouges comme des potentiels biomarqueurs des anneaux sexués dans les isolats de terrain au Ghana (Surfin 1.2 et 13.1) (Usui et al., 2019). En plus de ces deux *surfins* trouvé par Usui et collaborateurs, dans notre étude nous avons obtenu deux autres *surfins* (4.1 et 4.2) qui ont déjà été retrouvés au stade schizonte engagé en condition *in vitro* (Poran et al., 2017). Les *surfins* sont dotées d'un domaine de membrane interne C-terminal d'agglutination de cellules infectées par un schizonte (SICA) et, les antigènes variants de SICA exposés à la surface des globules rouges infectés sont à leur tour associés à la virulence du parasite et sont codés par la famille de gènes *SICAvar* (al-Khedery et al., 1999; Barnwell et al., 1983; Howard

et al., 1983; Pain et al., 2008). Ce domaine SICA fait partie de la grande famille des gènes *var*. Les antigènes variants de SICA et PfEMP1 partagent des caractéristiques biologiques communes telles que des mécanismes de régulation impliquant le silençage génétique post-transcriptionnel (Galinski & Corredor, 2004). Les *surfins* ont également un signal d'exportation non canonique (Prajapati et al., 2014). La fonction exacte des surfins n'est pas encore bien clarifiée, néanmoins une hypothèse a été émise selon laquelle ces surfins pourraient jouer un rôle dans les interactions entre la membrane cellulaire de l'hôte et la cellule endothéliale, elles pourraient donc ainsi constituer une des premières étapes de la séquestration des gamétocytes (Prajapati et al., 2020).

Nous avons observé que l'engagement sexuel était beaucoup plus susceptible de se produire dans une cellule CD71+ que dans une cellule CD71-. Les travaux de Bancells *et al*, ont montré que l'engagement sexuel peut se produire à la fois au stade schizonte dans le cycle suivant (NCC) et dans le même cycle au stade anneau sexuellement engagé (Bancells et al., 2019). Par conséquent, la préférence observée pourrait être le résultat soit d'une invasion encore plus importante des cellules CD71+ par les mérozoïtes engagés pendant le NCC, soit d'un engagement accru post-invasion lorsque les parasites envahissent une cellule plus jeune (SCC). Llorà-Batlle et ses collègues n'ont trouvé aucune différence dans la propension des cellules engagées à envahir différents stades de maturation de l'érythrocyte (Llorà-Batlle et al., 2020) et nous avons confirmé ce résultat. Par conséquent, l'augmentation de l'engagement sexuel provient probablement de la voie SSC, ce qui suggère que l'environnement de la membrane parasitophore dans le réticulocyte émet des indices que le parasite peut détecter et influencer son destin. Il sera intéressant de comparer la disponibilité des métabolites connus pour influencer ce processus tels que la Lyso-PC (Brancucci et al., 2017), la choline (Brancucci et al., 2017; Portugaliza et al., 2020) ou la S-adénosylméthionine (Harris et al., 2022) dans les cellules CD71+ ou CD71-.

En conclusion du chapitre 5, nous avons montré que *P. falciparum* envahit préférentiellement les réticulocytes que ce soit en condition *in vitro* ou *in vivo*. Grâce au scRNAseq, nous avons identifié de potentiels biomarqueurs des stades anneaux sexuellement engagés de *P. falciparum*, à partir d'échantillons de terrain prélevés chez les enfants asymptomatiques, et dont certains de ces biomarqueurs pourraient jouer un rôle dans les interactions entre la membrane cellulaire de l'hôte et la cellule endothéliale, et pourraient ainsi constituer une des premières étapes de la séquestration des gamétocytes. Mendez *et al*, avait émis l'hypothèse selon laquelle les souches qui résistent aux médicaments favorisent l'engagement sexuel aux stades anneaux à des taux

élevés, avec ces biomarqueurs nous pouvons vérifier cette hypothèse et ainsi améliorer les stratégies de surveillance de la résistance aux antimalariques (Méndez et al., 2007).

Questions intéressantes auxquelles répondre à l'avenir

A la vue de tous ces résultats obtenus, quelques questions restent en suspens: pourquoi les individus de génotype HbAS et porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* infectent-ils mieux les anophèles par rapport aux individus de génotypes AA? Existe-t-il des différences transcriptomiques ou protéomiques chez les AS qui favorisent cette infectivité? En dehors des hypothèses suscitées qu'est-ce qui pousse réellement *P. falciparum* à envahir les réticulocytes par rapport au normocytes? Existe-t-il des récepteurs primordiaux encore inconnus qui favorisent cette invasion? Est-ce qu'il existe d'autres facteurs circulants qui favorisent l'engagement sexuel qui jusqu'ici sont encore inconnus?

Perspectives

Mieux comprendre la biologie des différents stades de transmission de *P. falciparum* sera un atout pour développer de nouveaux outils, de nouvelles méthodes visant à réduire, voire interrompre la transmission homme-moustique. Améliorer notre connaissance sur l'influence des facteurs génétiques, environnementaux dans la structuration des populations de parasites et l'évolution des génomes permettra d'adapter les stratégies de contrôle aux différents contextes épidémiologiques.

Objectif 1 : Trait drépanocytaire et transmission Homme-moustique

Au cours de mon travail de thèse, nous avons montré que les gamétocytes provenant d'individus de génotype HbAS produisaient de plus fortes infections chez les moustiques. Les porteurs de gamétocytes HbAS présentaient des infections moins complexes que les porteurs de gamétocytes HbAA et les plus fortes charges en oocystes chez les moustiques nourris sur du sang HbAS pourraient résulter d'une meilleure efficacité de la fertilisation des gamètes au moment de la reproduction dans l'estomac du moustique. En effet, il a été montré chez le modèle murin *P. chabaudi* que les parasites sont capables d'adapter des stratégies reproductives pour maximiser leur potentiel de transmission et qu'ils pourraient notamment coopérer entre génotypes apparentés pour échapper à la réponse immunitaire (Reece et al. 2008). Par ailleurs, il a été montré que le mode de reproduction de *P. falciparum* n'est pas panmictique, un déficit

en hétérozygotes est le plus souvent observé et indique que l'allofécondation est favorisée dans les infections multiples (Annan et al., 2007; Morlais et al., 2015). Il conviendra alors de mieux caractériser les populations de gamétocytes chez les porteurs HbAA et HbAS, densité relative des différents clones et sex ratio, degré de parenté entre les différents clones co-infectants, pour déterminer les facteurs mis en jeu pour optimiser le succès de la transmission chez les sujets HbAS.

D'autres facteurs de l'homme devront également être explorés quant à leur effet sur la production et/ou l'infectivité des gamétocytes. En effet, peu d'études se sont intéressées à l'influence du groupage sanguin sur le portage et l'infectivité des gamétocytes (Tchuinkam et al., 1993; Grange et al., 2015). Il faudrait donc effectuer un typage des groupes sanguins des sujets utilisés pour les infections expérimentales, et augmenter les effectifs des expériences de MFA. Des facteurs plasmatiques pourraient être associés au portage et à l'infectivité des gamétocytes et il faudra comparer le plasma des individus HbAA et HbAS. Pour explorer ces facteurs plasmatiques, il faudra mettre en place une approche protéomique sur la plateforme SomaLogic, approche basée sur les aptamères capable d'identifier simultanément 7500 protéines présentes dans le plasma d'un individu (Gold et al., 2010). Les résultats pourraient identifier des protéines candidates qui pourront être validées en condition *in vitro*, par des infections expérimentales avec des souches de parasites de culture, et addition des facteurs protéiques au moment des gorgements. De plus, rechercher des transcriptomes associés à l'infectivité ou au portage des gamétocytes de stades V par scRNAseq pourrait permettre de mieux comprendre le phénotype que nous avons observé.

Le trait drépanocytaire confère une protection contre le paludisme et la plus forte infectivité des gamétocytes chez les porteurs HbAS pourrait représenter une stratégie adaptative pour contre balancer l'effet protecteur chez l'Homme. Des études longitudinales seront nécessaires pour suivre les infections chez des cohortes HbAA et HbAS et mesurer si l'infectivité plus élevée des gamétocytes chez les HbAS provient d'un temps de circulation plus long des gamétocytes de stade V dans la circulation, et donc des parasites plus matures, ou encore d'une différentiation distincte des stades immatures (I à IV) dans la moelle osseuse. Des études longitudinales permettraient de plus de mieux comprendre la dynamique intra-hôte des souches de parasites et particulièrement des stades sexués.

Enfin, l'impact de la meilleure efficacité de la transmission des gamétocytes par les sujets HbAS devra être considéré en terme de santé publique. Les porteurs du trait drépanocytaire doivent être mieux protégés et des mesures de prévention adaptées devront leur être proposées.

Objectif 2: Préférence réticulocytaire pour *P. falciparum* et engagement sexuel

2.1 Autres facteurs de l'hôte associés à l'engagement sexuel

Une des limites de notre étude a été de ne pas avoir mesuré le taux d'hémoglobine et le taux de LysoPC dans nos échantillons sachant que la LysoPC est un puissant antagoniste de l'engagement sexuel et de la gamétocytogénèse. Le plasma a été collecté et conservé lors de notre étude et les échantillons pourront être facilement analysés. Pour déterminer d'autres facteurs de l'hôte et du parasite qui peuvent être associés à l'engagement sexuel, il faudrait différencier sur la plateforme SomaLogic le protéome des sujets AP2G + des sujets AP2G- en condition de terrain en comparant 30 enfants avec un niveau d'AP2G élevé (AA et AS), 30 enfants AP2G négatifs (AA et AS) et 25 enfants non infectés (AA et AS). Concernant, le taux d'hémoglobine, nous allons mesurer l'érythropoétine (EPO) des sujets inclus dans notre étude, afin de savoir si l'anémie était associée à l'engagement sexuel sachant que l'EPO contrôle la production de globules rouges dans l'organisme.

2.2 Persistance ou dormance des jeunes trophozoïtes circulants en condition de terrain?

Nous avons constaté que ce soit dans notre référence (10X) ou dans les 8 échantillons (Smart-Seq2), la présence du cluster 2 qui correspondrait aux jeunes trophozoïtes (16 h après invasion). Sachant que seul le stade anneau est circulant et que les stades trophozoïtes sont séquestrés, on s'attendrait à retrouver juste les clusters des anneaux asexués et sexués dans nos données. Nous avons également observé que les cellules asexuées du cluster 2 avaient une préférence pour les normocytes par rapport aux réticulocytes, ce qui n'est pas surprenant car *P.vivax* au cours de sa maturation entraîne la perte du CD71 (Thomson-Luque & Bautista, 2021). Cependant, on se demande si le fait d'avoir des jeunes trophozoïtes circulants correspondrait peut-être à une stratégie de dormance ou de persistance adaptée par le parasite pour mieux se protéger. Nous comptons dans un futur proche mieux investiguer sur ce cluster 2 circulant. Nous allons chercher à identifier les cellules constitutives du cluster 2 en les comparant à des cellules de référence par des analyses d'expression différentielle. Les cellules du cluster 2 seront comparées aux cellules de la référence à pseudotemps équivalente. L'article d'Andrade et collaborateurs 2020 a montré que les parasites de fin de saison sèche sont transcriptionnellement distincts de ceux des sujets atteints de paludisme symptomatique en saison de transmission, et cette différence se matérialisait par un temps de circulation beaucoup plus long (Andrade et al., 2020). Nous allons ainsi vérifier s'il s'agit de la persistance dans nos

données, en sélectionnant les cellules des clusters 1 et 2 de notre référence 10X qui correspondent respectivement aux stades anneaux asexués et jeunes trophozoïtes que nous allons comparer aux parasites asexués de la saison sèche et de pluie de notre référence. Les résultats ainsi obtenus nous permettront de savoir si le cluster 2 ressemble transcriptionnellement aux parasites de la saison sèche ou de pluie de notre référence.

2.3 Proposition de mise en place du dépistage des stades anneaux sexués en condition de terrain à partir des marqueurs identifiés au cours de ma thèse

Pour finir, les biomarqueurs des stades anneaux sexuellement engagés que nous avons identifiés pourront servir à développer des tests de diagnostic sur le terrain. En effet, actuellement, l'identification des porteurs de gamétocytes est réalisée par microscopie et ne permet pas d'identifier les porteurs submicroscopiques. Parmi les biomarqueurs que nous avons identifiés, certains ont déjà été mentionnés dans d'autres études (AP2G, surfin 1.2, Surfin 13.1, LSD2, Hda1). Il devrait être possible de développer un protocole basé sur la technique RT-LAMP avec nos marqueurs. Une RT-LAMP ciblant la *Pfs16* pour la détection en temps réel des gamétocytes précoces sur l'appareil Genie II a déjà prouvé son efficacité dans une étude menée à Esse au Cameroun (Essangui et al., 2019). La sensibilité de la RT-LAMP pour la détection des ARNm *Pfs16* dans cette étude était de 10 ng, ce qui équivaut à une concentration de 2 ng/µl, un seuil submiscrocopique (limite de détection de 0,4 gamétocyte/µl de sang). Pour les stades asexués, une limite de détection de 0,12 parasite/µl de sang en RT-LAMP en ciblant *PfExp1* a déjà été rapportée par Kemleu et al (Kemleu et al., 2016).

En définitive, l'ensemble des résultats que nous avons obtenus au cours de cette thèse apporte une meilleure compréhension de la biologie du parasite lorsqu'il rencontre des hôtes hétérogènes et différents types de cellules hôtes. Ce travail a été réalisé à l'aide d'une combinaison d'outils de pointe et il a permis d'identifier de potentielles nouvelles pistes de réflexion pour le développement d'interventions bloquant la transmission.

CONCLUSION GENERALE

En définitive, le but de notre étude était de comprendre comment *P. falciparum* réagit lorsqu'il rencontre des hôtes génétiquement différents en présence ou en absence du trait drépanocytaire d'une part et lorsqu'il rencontre différentes cellules hôtes en terme de maturation du globule rouge. Dans un premier temps, nos résultats montrent que le trait drépanocytaire est un facteur de risque de portage de gamétocytes et contribue significativement à maintenir la transmission de *P. falciparum* dans des zones de fortes endémicités palustres. Cependant, nous n'avons pas pu élucider les mécanismes associés, mais nous comptons dans un futur proche découvrir les mécanismes associés afin de proposer des stratégies locales et adaptées pour mieux contrôler ces derniers. Dans un second temps, nos résultats montrent que la cellule hôte joue un rôle central dans la détermination du destin du parasite du fait que *P. falciparum* envahit préférentiellement les globules rouges immatures. Cependant, cette observation est bénéfique aussi bien au niveau du parasite pour se ressourcer, que chez l'hôte car il a été admis que les parasites présents dans les réticulocytes sont plus sensibles aux antimalariques. Il serait donc important d'adapter les nouvelles stratégies de lutte en tenant compte de l'importance de ces paramètres dans la biologie du parasite.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdalla, S., Weatherall, D. j., Wickramasinghe, S. N., & Hughes, M. (1980). The Anaemia of P. falciparum Malaria. *British Journal of Haematology*, *46*(2), 171-183. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1980.tb05956.x

Abdelraheem, M. H., Albsheer, M. M. A., Mohamed, H. S., Amin, M., & Mahdi Abdel Hamid, M. (2016). Transmission of Plasmodium vivax in Duffy-negative individuals in central Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *110*(4), 258-260. https://doi.org/10.1093/trstmh/trw014

Adamou, R., Dechavanne, C., Sadissou, I., d'Almeida, T., Bouraima, A., Sonon, P., Amoussa, R., Cottrell, G., Le Port, A., Theisen, M., Remarque, E. J., Longacre, S., Moutairou, K., Massougbodji, A., Luty, A. J. F., Nuel, G., Migot-Nabias, F., Sanni, A., Garcia, A., … Courtin, D. (2019). Plasmodium falciparum merozoite surface antigen-specific cytophilic IgG and control of malaria infection in a Beninese birth cohort. *Malaria Journal*, *18*(1), 194. https://doi.org/10.1186/s12936-019-2831-x

Aidoo, M., Terlouw, D. J., Kolczak, M. S., McElroy, P. D., ter Kuile, F. O., Kariuki, S., Nahlen, B. L., Lal, A. A., & Udhayakumar, V. (2002). Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet (London, England)*, *359*(9314), 1311-1312. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08273-9

Aingaran, M., Zhang, R., Law, S. K., Peng, Z., Undisz, A., Meyer, E., Diez-Silva, M., Burke, T. A., Spielmann, T., Lim, C. T., Suresh, S., Dao, M., & Marti, M. (2012). Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Cellular Microbiology*, *14*(7), 983-993. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01786.x

Akindeh, N. M., Ngum, L. N., Niba, P. T. N., Ali, I. M., Ayem, O. L. O., Chedjou, J. P. K., Fomboh, C. T., Ekollo, A. H. M., Mbu'u, C. M., & Mbacham, W. F. (2021). Assessing Asymptomatic Malaria Carriage of Plasmodium falciparum and Non-falciparum Species in Children Resident in Nkolbisson, Yaoundé, Cameroon. *Children*, *8*(11), Art. 11. https://doi.org/10.3390/children8110960

al-Khedery, B., Barnwell, J. W., & Galinski, M. R. (1999). Antigenic variation in malaria : A 3' genomic alteration associated with the expression of a P. knowlesi variant antigen. *Molecular Cell*, *3*(2), 131-141. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80304-4

Allen, S., O'Donnell, A., Alexander, E., Alpers, député, Péto, T., Clegg, J., & Weatherall, D. (1997). A+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(26), 14736-14741. https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14736

Allison, A. C. (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malareal infection. *British Medical Journal*, *1*(4857), 290-294. https://doi.org/10.1136/bmj.1.4857.290

Allison, A. C., & Clyde, D. F. (1961). Malaria in African Children with Deficient Erythrocyte Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. *British Medical Journal*, *1*(5236), 1346-1349.

Amoah, L. E., Abagna, H. B., Ayanful-Torgby, R., Blankson, S. O., & Aryee, N. A. (2019). Diversity and immune responses against Plasmodium falciparum gametocytes in non-febrile school children living in Southern Ghana. *Malaria Journal*, *18*(1), 265. https://doi.org/10.1186/s12936-019-2895-7

Amoah, L. E., Acquah, F. K., Nyarko, P. B., Cudjoe, E., Donu, D., Ayanful-Torgby, R., Sey, F., Williamson, K. C., & Awandare, G. A. (2020). Comparative analysis of asexual and sexual stage Plasmodium falciparum development in different red blood cell types. *Malaria Journal*, *19*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1186/s12936-020-03275-9

Anderson, T. J. C., Haubold, B., Williams, J. T., Estrada-Franco§, J. G., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I. D., Brockman, A. H., Nosten, F., Ferreira, M. U., & Day, K. P. (2000). Microsatellite Markers Reveal a Spectrum of Population Structures in the Malaria Parasite Plasmodium falciparum. *Molecular Biology and Evolution*, *17*(10), 1467-1482. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026247

Andrade, C. M., Fleckenstein, H., Thomson-Luque, R., Doumbo, S., Lima, N. F., Anderson, C., Hibbert, J., Hopp, C. S., Tran, T. M., Li, S., Niangaly, M., Cisse, H., Doumtabe, D., Skinner, J., Sturdevant, D., Ricklefs, S., Virtaneva, K., Asghar, M., Homann, M. V., … Portugal, S. (2020). Increased circulation time of Plasmodium falciparum underlies persistent asymptomatic infection in the dry season. *Nature Medicine*, *26*(12), Art. 12. https://doi.org/10.1038/s41591-020-1084-0

Aniweh, Y., Gao, X., Hao, P., Meng, W., Lai, S. K., Gunalan, K., Chu, T. T., Sinha, A., Lescar, J., Chandramohanadas, R., Li, H. Y., Sze, S. K., & Preiser, P. R. (2017). P. falciparum RH5-Basigin interaction induces changes in the cytoskeleton of the host RBC. *Cellular Microbiology*, *19*(9). https://doi.org/10.1111/cmi.12747

Annan, Z., Durand, P., Ayala, F. J., Arnathau, C., Awono-Ambene, P., Simard, F., Razakandrainibe, F. G., Koella, J. C., Fontenille, D., & Renaud, F. (2007). Population genetic structure of Plasmodium falciparum in the two main African vectors, Anopheles gambiae and Anopheles funestus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(19), 7987-7992. https://doi.org/10.1073/pnas.0702715104

Antonio-Nkondjio, C., Awono-Ambene, P., Toto, J.-C., Meunier, J.-Y., Zebaze-Kemleu, S., Nyambam, R., Wondji, C. S., Tchuinkam, T., & Fontenill, D. (2002). High malaria transmission intensity in a village close to Yaounde, the capital city of Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, *39*(2), 350-355. https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.2.350

Antonio-Nkondjio, C., Kerah, C. H., Simard, F., Awono-Ambene, P., Chouaibou, M., Tchuinkam, T., & Fontenille, D. (2006). Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon : Contribution of secondary vectors to malaria transmission. *Journal of Medical Entomology*, *43*(6), 1215-1221. https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[1215:cotmvs]2.0.co;2

Antonio-Nkondjio, C., Ndo, C., Njiokou, F., Bigoga, J. D., Awono-Ambene, P., Etang, J., Ekobo, A. S., & Wondji, C. S. (2019a). Review of malaria situation in Cameroon : Technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination. *Parasites & Vectors*, *12*. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3753-8

Antonio-Nkondjio, C., Ndo, C., Njiokou, F., Bigoga, J. D., Awono-Ambene, P., Etang, J., Ekobo, A. S., & Wondji, C. S. (2019b). Review of malaria situation in Cameroon : Technical viewpoint on challenges and prospects for disease elimination. *Parasites & Vectors*, *12*. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3753-8

Antonio-Nkondjio, C., & Simard, F. (2013). Highlights on Anopheles nili and Anopheles moucheti, Malaria Vectors in Africa. In S. Manguin (Éd.), *Anopheles Mosquitoes : New Insights into Malaria Vectors*. InTech. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK402331/

Aravind, L., & Landsman, D. (1998). AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research*, *26*(19), 4413-4421.

Archer, N. M., Petersen, N., Clark, M. A., Buckee, C. O., Childs, L. M., & Duraisingh, M. T. (2018). Resistance to Plasmodium falciparum in sickle cell trait erythrocytes is driven by oxygen-dependent growth inhibition. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, *115*(28), 7350-7355. https://doi.org/10.1073/pnas.1804388115

Armistead, J. S., Morlais, I., Mathias, D. K., Jardim, J. G., Joy, J., Fridman, A., Finnefrock, A. C., Bagchi, A., Plebanski, M., Scorpio, D. G., Churcher, T. S., Borg, N. A., Sattabongkot, J., & Dinglasan, R. R. (2014). Antibodies to a Single, Conserved Epitope in Anopheles APN1 Inhibit Universal Transmission of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax Malaria. *Infection and Immunity*, *82*(2), 818-829. https://doi.org/10.1128/IAI.01222-13

Ashley, E. A., Dhorda, M., Fairhurst, R. M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J. M., Mao, S., Sam, B., Sopha, C., Chuor, C. M., Nguon, C., Sovannaroth, S., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chotivanich, K., Chutasmit, K., Suchatsoonthorn, C., … Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC). (2014). Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *The New England Journal of Medicine*, *371*(5), Art. 5. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1314981

Ashorobi, D., Ramsey, A., Yarrarapu, S. N. S., & Bhatt, R. (2022). Sickle Cell Trait. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537130/

Atangana, J., Fomena, A., Tamesse, J. L., & Fondjo, E. (2012). Pratiques agricoles et épidémiologie du paludisme en zone soudano-sahélienne du Cameroun. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, *105*(1), 23-29. https://doi.org/10.1007/s13149-011-0202-4

Atkinson, S. C., Armistead, J. S., Mathias, D. K., Sandeu, M. M., Tao, D., Borhani-Dizaji, N., Tarimo, B. B., Morlais, I., Dinglasan, R. R., & Borg, N. A. (2015). The Anopheles-midgut APN1 structure reveals a new malaria transmission-blocking vaccine epitope. *Nature Structural & Molecular Biology*, *22*(7), 532-539. https://doi.org/10.1038/nsmb.3048

Ayi, K., Turrini, F., Piga, A., & Arese, P. (2004). Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes : A common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood*, *104*(10), 3364-3371. https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3820

Bachmann, A., Petter, M., Tilly, A.-K., Biller, L., Uliczka, K. A., Duffy, M. F., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2012). Temporal Expression and Localization Patterns of Variant Surface Antigens in Clinical Plasmodium falciparum Isolates during Erythrocyte Schizogony. *PLOS ONE*, *7*(11), e49540. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049540

Baker, D. A. (2010). Malaria gametocytogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *172*(2), Art. 2. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019

Balaji, S., Babu, M. M., Iyer, L. M., & Aravind, L. (2005). Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Research*, *33*(13), 3994-4006. https://doi.org/10.1093/nar/gki709

Bancells, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., Kafsack, B. F. C., & Cortés, A. (2019a). Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature microbiology*, *4*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0291-7

Bancells, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., Kafsack, B. F. C., & Cortés, A. (2019b). Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature microbiology*, *4*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0291-7

Bancells, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., Kafsack, B. F. C., & Cortés, A. (2019c). Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature microbiology*, *4*(1), 144-154. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0291-7

Band, G., Leffler, E. M., Jallow, M., Sisay-Joof, F., Ndila, C. M., Macharia, A. W., Hubbart, C., Jeffreys, A. E., Rowlands, K., Nguyen, T., Gonçalves, S., Ariani, C. V., Stalker, J., Pearson, R. D., Amato, R., Drury, E., Sirugo, G., d'Alessandro, U., Bojang, K. A., … Kwiatkowski, D. P. (2022). Malaria protection due to sickle haemoglobin depends on parasite genotype. *Nature*, *602*(7895), Art. 7895. https://doi.org/10.1038/s41586-021-04288-3

Band, G., Leffler, E. M., Jallow, M., Sisay-Joof, F., Ndila, C. M., Macharia, A. W., Hubbart, C., Jeffreys, A. E., Rowlands, K., Nguyen, T., Goncalves, S. M., Ariani, C. V., Stalker, J., Pearson, R. D., Amato, R., Drury, E., Sirugo, G., D'Alessandro, U., Bojang, K. A., … Kwiatkowski, D. P. (2021). *The protective effect of sickle cell haemoglobin against severe malaria depends on parasite genotype* (p. 2021.03.30.437659). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2021.03.30.437659

Banerjee, R., Khandelwal, S., Kozakai, Y., Sahu, B., & Kumar, S. (2015). CD47 regulates the phagocytic clearance and replication of the Plasmodium yoelii malaria parasite.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *112*(10), 3062-3067. https://doi.org/10.1073/pnas.1418144112

Barbazan, P., Baldet, T., Darriet, F., Escaffre, H., Djoda, D. H., & Hougard, J. M. (1998). Impact of treatments with Bacillus sphaericus on Anopheles populations and the transmission of malaria in Maroua, a large city in a savannah region of Cameroon. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *14*(1), 33-39.

Barnwell, J. W., Howard, R. J., Coon, H. G., & Miller, L. H. (1983). Splenic requirement for antigenic variation and expression of the variant antigen on the erythrocyte membrane in cloned Plasmodium knowlesi malaria. *Infection and Immunity*, *40*(3), 985-994.

Barry, A., Bradley, J., Stone, W., Guelbeogo, M. W., Lanke, K., Ouedraogo, A., Soulama, I., Nébié, I., Serme, S. S., Grignard, L., Patterson, C., Wu, L., Briggs, J. J., Janson, O., Awandu, S. S., Ouedraogo, M., Tarama, C. W., Kargougou, D., Zongo, S., … Bousema, T. (2021). Higher gametocyte production and mosquito infectivity in chronic compared to incident Plasmodium falciparum infections. *Nature Communications*, *12*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/s41467-021-22573-7

Bashey, F. (2015). Within-host competitive interactions as a mechanism for the maintenance of parasite diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1675), 20140301. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0301

Baum, J., Chen, L., Healer, J., Lopaticki, S., Boyle, M., Triglia, T., Ehlgen, F., Ralph, S. A., Beeson, J. G., & Cowman, A. F. (2009). Reticulocyte-binding protein homologue 5—An essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by Plasmodium falciparum. *International Journal for Parasitology*, *39*(3), 371-380. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.10.006

Beavogui, A. H. (2010). *Rôle de l'apoptose dans la transmission de Plasmodium falciparum*. 231.

Bechtsi, D. P., & Waters, A. P. (2017a). Genomics and epigenetics of sexual commitment in Plasmodium. *International Journal for Parasitology*, *47*(7), Art. 7. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.03.002

Bechtsi, D. P., & Waters, A. P. (2017b). Genomics and epigenetics of sexual commitment in Plasmodium. *International Journal for Parasitology*, *47*(7), 425-434. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.03.002

Beet, E. A. (1949). The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe. *Annals of Eugenics*, *14*(4), 279-284. https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1947.tb02402.x

BEN-HAREL, S. (1923). STUDIES OF BIRD MALARIA IN RELATION TO THE MECHANISM OF RELAPSE*. *American Journal of Epidemiology*, *3*(6), 652-685. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118961

Bhattacharjee, P., Dubey, S., Gupta, V. K., Agarwal, P., & Mahato, M. P. (2013). The Clinicopathologic Manifestations of Plasmodium Vivax Malaria in Children : A Growing Menace. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, *7*(5), 861-867. https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5652.2960

Billo, M. A., Johnson, E. S., Doumbia, S. O., Poudiougou, B., Sagara, I., Diawara, S. I., Diakité, M., Diallo, M., Doumbo, O. K., Tounkara, A., Rice, J., James, M. A., & Krogstad, D. J. (2012). Sickle cell trait protects against Plasmodium falciparum infection. *American Journal of Epidemiology*, *176 Suppl 7*, S175-185. https://doi.org/10.1093/aje/kws323

Bonnet, S., Paul, R. E. l., Gouagna, C., Safeukui, I., Meunier, J.-Y., Gounoue, R., & Boudin, C. (2002). Level and dynamics of malaria transmission and morbidity in an equatorial area of South Cameroon. *Tropical Medicine & International Health*, *7*(3), 249-256. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00861.x

Boudin, C., Diop, A., Gaye, A., Gadiaga, L., Safeukui, I., & Bonnet, S. (2005). Plasmodium falciparum transmission blocking immunity in three areas with perennial or seasonal endemicity and different levels of transmission. *Am J Trop Med Hyg*.

Boudin, C., Van Der Kolk, M., Tchuinkam, T., Gouagna, C., Bonnet, S., Safeukui, I., Mulder, B., Meunier, J. Y., & Verhave, J. P. (2004). Plasmodium falciparum transmission blocking immunity under conditions of low and high endemicity in Cameroon. *Parasite Immunology*, *26*(2), 105-110. https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00689.x

Bourgouin, C., & Paul, R. (2021). Autant en emporte le vent—Comment les anophèles recolonisent les régions arides du Sahel pour y transmettre le paludisme. *médecine/sciences*, *37*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1051/medsci/2020249

Bousema, J. T., Drakeley, C. J., Kihonda, J., Hendriks, J. C. M., Akim, N. I. J., Roeffen, W., & Sauerwein, R. W. (2007). A longitudinal study of immune responses to Plasmodium falciparum sexual stage antigens in Tanzanian adults. *Parasite Immunology*, *29*(6), 309-317. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00948.x

Bousema, J. T., Gouagna, L. C., Drakeley, C. J., Meutstege, A. M., Okech, B. A., Akim, I. N. J., Beier, J. C., Githure, J. I., & Sauerwein, R. W. (2004). Plasmodium falciparum gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. *Malaria Journal*, *3*, 18. https://doi.org/10.1186/1475-2875-3-18

Bousema, T., & Drakeley, C. (2011). Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(2), 377-410. https://doi.org/10.1128/CMR.00051-10

Bousema, T., Okell, L., Felger, I., & Drakeley, C. (2014). Asymptomatic malaria infections : Detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews. Microbiology*, *12*(12), 833-840. https://doi.org/10.1038/nrmicro3364

Bousema, T., Sutherland, C. J., Churcher, T. S., Mulder, B., Gouagna, L. C., Riley, E. M., Targett, G. A. T., & Drakeley, C. J. (2011). Human immune responses that reduce the transmission of Plasmodium falciparum in African populations. *International Journal for Parasitology*, *41*(3-4), Art. 3-4. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.09.008

Bouyer, G., Barbieri, D., Dupuy, F., Marteau, A., Sissoko, A., N'Dri, M.-E., Neveu, G., Bedault, L., Khodabux, N., Roman, D., Houzé, S., Siciliano, G., Alano, P., Martins, R. M., Lopez-Rubio, J.-J., Clain, J., Duval, R., Egée, S., & Lavazec, C. (2020). Plasmodium falciparum sexual parasites regulate infected erythrocyte permeability. *Communications Biology*, *3*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01454-7

Bouyer, J., & Lefrançois, T. (2014). Boosting the sterile insect technique to control mosquitoes. *Trends in Parasitology*, *30*(6), 271-273. https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.002

Bradley, J., Stone, W., Da, D. F., Morlais, I., Dicko, A., Cohuet, A., Guelbeogo, W. M., Mahamar, A., Nsango, S., Soumaré, H. M., Diawara, H., Lanke, K., Graumans, W., Siebelink-Stoter, R., van de Vegte-Bolmer, M., Chen, I., Tiono, A., Gonçalves, B. P., Gosling, R., … Bousema, T. (2018). Predicting the likelihood and intensity of mosquito infection from sex specific Plasmodium falciparum gametocyte density. *eLife*, *7*, e34463. https://doi.org/10.7554/eLife.34463

Brancucci, N. M. B., Bertschi, N. L., Zhu, L., Niederwieser, I., Chin, W. H., Wampfler, R., Freymond, C., Rottmann, M., Felger, I., Bozdech, Z., & Voss, T. S. (2014). Heterochromatin protein 1 secures survival and transmission of malaria parasites. *Cell Host & Microbe*, *16*(2), 165-176. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.004

Brancucci, N. M. B., De Niz, M., Straub, T. J., Ravel, D., Sollelis, L., Birren, B. W., Voss, T. S., Neafsey, D. E., & Marti, M. (2018). Probing Plasmodium falciparum sexual commitment at the single-cell level. *Wellcome Open Research*, *3*. https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14645.4

Brancucci, N. M. B., Gerdt, J. P., Wang, C., De Niz, M., Philip, N., Adapa, S. R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S. D., Laffitte, M.-C., Clark, M. A., Grüring, C., Ravel, D., Blancke Soares, A., Demas, A., Bopp, S., Rubio-Ruiz, B., Conejo-Garcia, A., … Marti, M. (2017). Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum. *Cell*, *171*(7), Art. 7. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.020

Buziarsist, S., Chiapparo, G., Choi, X., Kadima, H., Ongourou, P., & Rzajeva, A. (2007). *MUTATIONS ET MALADIES GENETIQUES: Cherchez l'aiguille dans la botte de foin!* 1.

Carayon, K., Chaoui, K., Ronzier, E., Lazar, I., Bertrand-Michel, J., Roques, V., Balor, S., Terce, F., Lopez, A., Salomé, L., & Joly, E. (2011). Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(39), 34426-34439. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257444

Carlton, J. M., Adams, J. H., Silva, J. C., Bidwell, S. L., Lorenzi, H., Caler, E., Crabtree, J., Angiuoli, S. V., Merino, E. F., Amedeo, P., Cheng, Q., Coulson, R. M. R., Crabb, B. S., del Portillo, H. A., Essien, K., Feldblyum, T. V., Fernandez-Becerra, C., Gilson, P. R., Gueye, A. H., … Fraser-Liggett, C. M. (2008). Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax. *Nature*, *455*(7214), Art. 7214. https://doi.org/10.1038/nature07327

Carnevale, P., & Robert, V. (Éds.). (2009). *Les anophèles : Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. IRD Éditions. https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.10374

Carnevale, P., Robert, V., Molez, J.-F., & Baudon, D. (1987). *Epidémiologie générale : Faciès épidémiologiques des paludismes en Afrique subsaharienne*. 12.

Carter, R., & Chen, D. H. (1976). Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria parasite. *Nature*, *263*(5572), Art. 5572. https://doi.org/10.1038/263057a0

Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G., & Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery*, *3*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.71

Chaccour, C., Lines, J., & Whitty, C. J. M. (2010). Effect of Ivermectin on Anopheles gambiae Mosquitoes Fed on Humans : The Potential of Oral Insecticides in Malaria Control. *The Journal of Infectious Diseases*, *202*(1), 113-116. https://doi.org/10.1086/653208

Chang, K.-H., Tam, M., & Stevenson, M. M. (2004). Modulation of the Course and Outcome of Blood-Stage Malaria by Erythropoietin-Induced Reticulocytosis. *The Journal of Infectious Diseases*, *189*(4), 735-743. https://doi.org/10.1086/381458

Chaumeau, V. (2017). *Déterminants entomologiques de la transmission du paludisme dans la zone transfrontalière entre la Thaïlande et le Myanmar dans un contexte d'élimination de Plasmodium falciparum* [Médecine humaine et pathologie., Université Montpellier,]. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01684277. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01684277/document

Chaumeau, V., Fustec, B., Nay Hsel, S., Montazeau, C., Naw Nyo, S., Metaane, S., Sawasdichai, S., Kittiphanakun, P., Phatharakokordbun, P., Kwansomboon, N., Andolina, C., Cerqueira, D., Chareonviriyaphap, T., Nosten, F. H., & Corbel, V. (2019). Entomological determinants of malaria transmission in Kayin state, Eastern Myanmar : A 24-month longitudinal study in four villages. *Wellcome Open Research*, *3*, 109. https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14761.4

Chauvet, M., Chhuon, C., Lipecka, J., Dechavanne, S., Dechavanne, C., Lohezic, M., Ortalli, M., Pineau, D., Ribeil, J.-A., Manceau, S., Le Van Kim, C., Luty, A. J. F., Migot-Nabias, F., Azouzi, S., Guerrera, I. C., & Merckx, A. (2021). Sickle Cell Trait Modulates the Proteome and Phosphoproteome of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 181. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.637604

Chen, I., Clarke, S. E., Gosling, R., Hamainza, B., Killeen, G., Magill, A., O'Meara, W., Price, R. N., & Riley, E. M. (2016). "Asymptomatic" Malaria : A Chronic and Debilitating Infection That Should Be Treated. *PLoS Medicine*, *13*(1), e1001942. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001942

Chen, K., Liu, J., Heck, S., Chasis, J. A., An, X., & Mohandas, N. (2009). Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(41), 17413-17418. https://doi.org/10.1073/pnas.0909296106

Chin, W., Contacos, P. G., Coatney, G. R., & Kimball, H. R. (1965). A Naturally Acquired Quotidian-Type Malaria in Man Transferable to Monkeys. *Science*, *149*(3686), 865-865. https://doi.org/10.1126/science.149.3686.865.a

Cholera, R., Brittain, N. J., Gillrie, M. R., Lopera-Mesa, T. M., Diakité, S. A. S., Arie, T., Krause, M. A., Guindo, A., Tubman, A., Fujioka, H., Diallo, D. A., Doumbo, O. K., Ho,

M., Wellems, T. E., & Fairhurst, R. M. (2008). Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(3), 991-996. https://doi.org/10.1073/pnas.0711401105

Chouvalova, E. (1984). *Les maladies tropicales*.

Chu, T. T. T., Sinha, A., Malleret, B., Suwanarusk, R., Park, J. E., Naidu, R., Das, R., Dutta, B., Ong, S. T., Verma, N. K., Chan, J. K., Nosten, F., Rénia, L., Sze, S. K., Russell, B., & Chandramohanadas, R. (2018a). Quantitative mass spectrometry of human reticulocytes reveal proteome-wide modifications during maturation. *British Journal of Haematology*, *180*(1), 118-133. https://doi.org/10.1111/bjh.14976

Chu, T. T. T., Sinha, A., Malleret, B., Suwanarusk, R., Park, J. E., Naidu, R., Das, R., Dutta, B., Ong, S. T., Verma, N. K., Chan, J. K., Nosten, F., Rénia, L., Sze, S. K., Russell, B., & Chandramohanadas, R. (2018b). Quantitative mass spectrometry of human reticulocytes reveal proteome-wide modifications during maturation. *British Journal of Haematology*, *180*(1), 118-133. https://doi.org/10.1111/bjh.14976

Churcher, T. S., Bousema, T., Walker, M., Drakeley, C., Schneider, P., Ouédraogo, A. L., & Basáñez, M.-G. (2013). Predicting mosquito infection from Plasmodium falciparum gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *ELife*, *2*, e00626. https://doi.org/10.7554/eLife.00626

Chwatt, L. J. (1948). Infection of Reticulocytes by Plasmodium Falciparum and Plasmodium Malariae in Hyperendemic Indigenous Malaria. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *42*(1), 101-112. https://doi.org/10.1080/00034983.1948.11685353

Coetzee, M., Craig, M., & le Sueur, D. (2000). Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the Anopheles gambiae complex. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, *16*(2), 74-77. https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01563-x

Coetzee, M., Hunt, R. H., Wilkerson, R., Della Torre, A., Coulibaly, M. B., & Besansky, N. J. (2013). Anopheles coluzzii and Anopheles amharicus, new members of the Anopheles gambiae complex. *Zootaxa*, *3619*, 246-274.

Coleman, B. I., Skillman, K. M., Jiang, R. H. Y., Childs, L. M., Altenhofen, L. M., Ganter, M., Leung, Y., Goldowitz, I., Kafsack, B. F. C., Marti, M., Llinás, M., Buckee, C. O., & Duraisingh, M. T. (2014). A Plasmodium falciparum Histone Deacetylase Regulates Antigenic Variation and Gametocyte Conversion. *Cell host & microbe*, *16*(2), 177-186. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.014

Collins, F. H., Sakai, R. K., Vernick, K. D., Paskewitz, S., Seeley, D. C., Miller, L. H., Collins, W. E., Campbell, C. C., & Gwadz, R. W. (1986). Genetic selection of a Plasmodium-refractory strain of the malaria vector Anopheles gambiae. *Science (New York, N.Y.)*, *234*(4776), 607-610. https://doi.org/10.1126/science.3532325

Cortés, A., & Deitsch, K. W. (2017). Malaria Epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(7), a025528. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025528

Cowman, A. F., Tonkin, C. J., Tham, W.-H., & Duraisingh, M. T. (2017). The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host & Microbe*, *22*(2), 232-245. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.003

Cromer, D., Evans, K. J., Schofield, L., & Davenport, M. P. (2006). Preferential invasion of reticulocytes during late-stage Plasmodium berghei infection accounts for reduced circulating reticulocyte levels. *International Journal for Parasitology*, *36*(13), 1389-1397. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.07.009

Crompton, P. D., Traore, B., Kayentao, K., Doumbo, S., Ongoiba, A., Diakite, S. A. S., Krause, M. A., Doumtabe, D., Kone, Y., Weiss, G., Huang, C., Doumbia, S., Guindo, A., Fairhurst, R. M., Miller, L. H., Pierce, S. K., & Doumbo, O. K. (2008). Sickle Cell Trait Is Associated with a Delayed Onset of Malaria : Implications for Time-to-Event Analysis in Clinical Studies of Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, *198*(9), 1265-1275. https://doi.org/10.1086/592224

Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D. P., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C., & Wright, G. J. (2011). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *Nature*, *480*(7378), 534-537. https://doi.org/10.1038/nature10606

Da, D. F., Churcher, T. S., Yerbanga, R. S., Yaméogo, B., Sangaré, I., Ouedraogo, J. B., Sinden, R. E., Blagborough, A. M., & Cohuet, A. (2015). Experimental study of the relationship between Plasmodium gametocyte density and infection success in mosquitoes; implications for the evaluation of malaria transmission-reducing interventions. *Experimental Parasitology*, *149*, 74-83. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.12.010

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., Early, A. M., Ubaida-Mohien, C., Lemgruber, L., Campo, J. J., Teng, A. A., Le, T. Q., Walker, C. L., Hermand, P., Deterre, P., … Marti, M. (2019). Naturally acquired immunity against immature

Plasmodium falciparum gametocytes. *Science translational medicine*, *11*(495), Art. 495. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav3963

Das, S., Muleba, M., Stevenson, J. C., Pringle, J. C., & Norris, D. E. (2017). Beyond the entomological inoculation rate : Characterizing multiple blood feeding behavior and Plasmodium falciparum multiplicity of infection in Anopheles mosquitoes in northern Zambia. *Parasites & Vectors*, *10*(1), 45. https://doi.org/10.1186/s13071-017-1993-z

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., Huttenhower, C., Mitchell, J. R., Martinelli, R., Frischknecht, F., Seydel, K. B., Taylor, T., Milner, D., Heussler, V. T., & Marti, M. (2018). Plasmodium gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. *Science Advances*, *4*(5), eaat3775. https://doi.org/10.1126/sciadv.aat3775

Dearnley, M. K., Yeoman, J. A., Hanssen, E., Kenny, S., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Tilley, L., & Dixon, M. W. A. (2012). Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of Plasmodium falciparum gametocytes. *Journal of Cell Science*, *125*(Pt 8), 2053-2063. https://doi.org/10.1242/jcs.099002

de Back, D., Kostova, E., van Kraaij, M., van den Berg, T., & Van Bruggen, R. (2014). Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Frontiers in Physiology*, *5*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00009

de Jong, R. M., Tebeje, S. K., Meerstein-Kessel, L., Tadesse, F. G., Jore, M. M., Stone, W., & Bousema, T. (2020a). Immunity against sexual stage Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax parasites. *Immunological Reviews*, *293*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1111/imr.12828

de Jong, R. M., Tebeje, S. K., Meerstein-Kessel, L., Tadesse, F. G., Jore, M. M., Stone, W., & Bousema, T. (2020b). Immunity against sexual stage Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax parasites. *Immunological Reviews*, *293*(1), 190-215. https://doi.org/10.1111/imr.12828

Depond, M., Henry, B., Buffet, P., & Ndour, P. A. (2020). Methods to Investigate the Deformability of RBC During Malaria. *Frontiers in Physiology*, *10*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.01613

Diakite, S. A. S. (2015). *Polymorphismes érythrocytaires et protections contre le paludisme a Plasmodium falciparum : Exploration de mécanismes innés*. 190.

Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C.-T., & Suresh, S. (2010). Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS bulletin / Materials Research Society*, *35*(5), 382-388.

Digitale, J. C., Callaway, P. C., Martin, M., Nelson, G., Viard, M., Rek, J., Arinaitwe, E., Dorsey, G., Kamya, M., Carrington, M., Rodriguez-Barraquer, I., & Feeney, M. E. (2021). HLA Alleles B*53:01 and C*06:02 Are Associated With Higher Risk of P. falciparum Parasitemia in a Cohort in Uganda. *Frontiers in Immunology*, *12*, 650028. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.650028

Dimopoulos, G., Richman, A., Müller, H. M., & Kafatos, F. C. (1997). Molecular immune responses of the mosquito Anopheles gambiae to bacteria and malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(21), 11508-11513. https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11508

Dinglasan, R. R., Kalume, D. E., Kanzok, S. M., Ghosh, A. K., Muratova, O., Pandey, A., & Jacobs-Lorena, M. (2007). Disruption of Plasmodium falciparum development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(33), 13461-13466. https://doi.org/10.1073/pnas.0702239104

Djamouko-Djonkam, L., Mounchili-Ndam, S., Kala-Chouakeu, N., Nana-Ndjangwo, S. M., Kopya, E., Sonhafouo-Chiana, N., Talipouo, A., Ngadjeu, C. S., Doumbe-Belisse, P., Bamou, R., Toto, J. C., Tchuinkam, T., Wondji, C. S., & Antonio-Nkondjio, C. (2019). Spatial distribution of Anopheles gambiae sensu lato larvae in the urban environment of Yaoundé, Cameroon. *Infectious Diseases of Poverty*, *8*(1), 84. https://doi.org/10.1186/s40249-019-0597-6

Djeutchouang Sayang, C. (2010). *Intérêt de l'utilisation des tests de diagnostic rapide du paludisme sur le coût et l'efficacité de la prise en charge des patienst fébriles à Yaoundé,Cameroun*. Aix Marseille 2.

Drakeley, C., Sutherland, C., Bousema, J. T., Sauerwein, R. W., & Targett, G. A. T. (2006). The epidemiology of Plasmodium falciparum gametocytes : Weapons of mass dispersion. *Trends in Parasitology*, *22*(9), 424-430. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.07.001

Druilhe, P., Trape, J. F., Leroy, J. P., Godard, C., & Gentilini, M. (1980). [Two accidental human infections by Plasmodium cynomolgi bastianellii. A clinical and serological study]. *Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale*, *60*(4), 349-354.

Duong, T. H., & Richard-Lenoble, D. (2008). *Diagnostic des parasitoses à parasites sanguicoles*. https://doi.org/10.1016/S1773-035X(08)70180-1

Duraisingh, M. T., Maier, A. G., Triglia, T., & Cowman, A. F. (2003). Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in Plasmodium falciparum utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(8), 4796-4801. https://doi.org/10.1073/pnas.0730883100

Dvorin, J. D., Bei, A. K., Coleman, B. I., & Duraisingh, M. T. (2010). Functional diversification between two related Plasmodium falciparum merozoite invasion ligands is determined by changes in the cytoplasmic domain. *Molecular microbiology*, *75*(4), 990-1006. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07040.x

Eaton, P. (1934). *Susceptibility of Red Cells to Malaria. A Preliminary Note.* https://doi.org/10.4269/AJTMH.1934.S1-14.431

Eksi, S., Morahan, B. J., Haile, Y., Furuya, T., Jiang, H., Ali, O., Xu, H., Kiattibutr, K., Suri, A., Czesny, B., Adeyemo, A., Myers, T. G., Sattabongkot, J., Su, X., & Williamson, K. C. (2012). Plasmodium falciparum Gametocyte Development 1 (Pfgdv1) and Gametocytogenesis Early Gene Identification and Commitment to Sexual Development. *PLoS Pathogens*, *8*(10), e1002964. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002964

Elguero, E., Délicat-Loembet, L. M., Rougeron, V., Arnathau, C., Roche, B., Becquart, P., Gonzalez, J.-P., Nkoghe, D., Sica, L., Leroy, E. M., Durand, P., Ayala, F. J., Ollomo, B., Renaud, F., & Prugnolle, F. (2015). Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(22), 7051-7054. https://doi.org/10.1073/pnas.1505665112

el Hassan, A. M., Saeed, A. M., Fandrey, J., & Jelkmann, W. (1997). Decreased erythropoietin response in Plasmodium falciparum malaria-associated anaemia. *European Journal of Haematology*, *59*(5), 299-304. https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1997.tb01690.x

Essangui, E., Eboumbou Moukoko, C. E., Nguedia, N., Tchokwansi, M., Banlanjo, U., Maloba, F., Fogang, B., Donkeu, C., Biabi, M., Cheteug, G., Kemleu, S., Elanga-Ndille, E., Lehman, L., & Ayong, L. (2019). Demographical, hematological and serological risk factors for Plasmodium falciparum gametocyte carriage in a high stable transmission zone in Cameroon. *PLoS ONE*, *14*(4), e0216133. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216133

Eyles, D. (1960). The exoerythrocytic cycle of Plasmodium cynomolgi and P. cynomolgi bastianellii in the rhesus monkey. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. https://doi.org/10.4269/AJTMH.1960.9.543

Fankam, J. (2015). *Drépanocytose : Le dépistage néonatal sera systématisé*.

Farid, R., Dixon, M. W., Tilley, L., & McCarthy, J. S. (2017). Initiation of gametocytogenesis at very low parasite density in Plasmodium falciparum infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *215*(7), 1167-1174. https://doi.org/10.1093/infdis/jix035

Fernandez-Pol, S., Slouka, Z., Bhattacharjee, S., Fedotova, Y., Freed, S., An, X., Holder, A. A., Campanella, E., Low, P. S., Mohandas, N., & Haldar, K. (2013). A Bacterial Phosphatase-Like Enzyme of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum Possesses Tyrosine Phosphatase Activity and Is Implicated in the Regulation of Band 3 Dynamics during Parasite Invasion. *Eukaryotic Cell*, *12*(9), 1179-1191. https://doi.org/10.1128/EC.00027-13

Ferreira, A., Marguti, I., Bechmann, I., Jeney, V., Chora, Â., Palha, N. R., Rebelo, S., Henri, A., Beuzard, Y., & Soares, M. P. (2011). Sickle Hemoglobin Confers Tolerance to Plasmodium Infection. *Cell*, *145*(3), 398-409. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.049

Ferru, E., Giger, K., Pantaleo, A., Campanella, E., Grey, J., Ritchie, K., Vono, R., Turrini, F., & Low, P. S. (2011). Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood*, *117*(22), 5998-6006. https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-317024

Filarsky, M., Fraschka, S. A., Niederwieser, I., Brancucci, N. M. B., Carrington, E., Carrió, E., Moes, S., Jenoe, P., Bártfai, R., & Voss, T. S. (2018). GDV1 induces sexual commitment of malaria parasites by antagonizing HP1-dependent gene silencing. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6381), Art. 6381. https://doi.org/10.1126/science.aan6042

Flick, K., Scholander, C., Chen, Q., Fernandez, V., Pouvelle, B., Gysin, J., & Wahlgren, M. (2001). Role of nonimmune IgG bound to PfEMP1 in placental malaria. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5537), 2098-2100. https://doi.org/10.1126/science.1062891

Flueck, C., Bartfai, R., Volz, J., Niederwieser, I., Salcedo-Amaya, A. M., Alako, B. T. F., Ehlgen, F., Ralph, S. A., Cowman, A. F., Bozdech, Z., Stunnenberg, H. G., & Voss, T. S. (2009). Plasmodium falciparum Heterochromatin Protein 1 Marks Genomic Loci

Linked to Phenotypic Variation of Exported Virulence Factors. *PLOS Pathogens*, *5*(9), e1000569. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000569

Fogang, B., Biabi, M. F., Megnekou, R., Maloba, F. M., Essangui, E., Donkeu, C., Cheteug, G., Kapen, M., Keumoe, R., Kemleu, S., Nsango, S., Eboumbou, C., Lamb, T. J., & Ayong, L. (2021). High Prevalence of Asymptomatic Malarial Anemia and Association with Early Conversion from Asymptomatic to Symptomatic Infection in a Plasmodium falciparum Hyperendemic Setting in Cameroon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *106*(1), 293-302. https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0316

Fogang, B., Biabi, M. F., Megnekou, R., Maloba, F. M., Essangui, E., Donkeu, C., Cheteug, G., Kapen, M., Keumoe, R., Kemleu, S., Nsango, S., Eboumbou, C., Lamb, T. J., & Ayong, L. (2022). High Prevalence of Asymptomatic Malarial Anemia and Association with Early Conversion from Asymptomatic to Symptomatic Infection in a Plasmodium falciparum Hyperendemic Setting in Cameroon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *106*(1), 293-302. https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0316

Fondjo, E. (1996). *Etude du comportement du complexe Anophèlegambiae et la transmission du paludisme dans deux faciès éco-climatiques au Mali et au Cameroun.* (Thèse Doctorat 3ème cycle.Min. Ens. Sec.Sup. Rech. Sc). ISFRA.

Fontenille, D., Cohuet, A., Awono-Ambene, P., Antonio-Nkondjio, C., Wondji, C., Kengne, P., Dia, I., Boccolini, D., Duchemin, J. B., Rajanonarivelo, V., DABIRE, R., Adja-Akre, M., Ceainu, C., Le Goff, G., & Frédéric, S. (2003). Systématique et biologie des Anopheles vecteurs de Plasmodium en Afrique, données récentes en 2003. *Medecine et sante tropicales*, *63*(3), 247-253.

Fontenille, D., & Simard, F. (2004). Unravelling complexities in human malaria transmission dynamics in Africa through a comprehensive knowledge of vector populations. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *27*(5), 357-375. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.005

Foquet, L., Hermsen, C. C., van Gemert, G.-J., Van Braeckel, E., Weening, K. E., Sauerwein, R., Meuleman, P., & Leroux-Roels, G. (2014). Vaccine-induced monoclonal antibodies targeting circumsporozoite protein prevent Plasmodium falciparum infection. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(1), 140-144. https://doi.org/10.1172/JCI70349

Foulon, S. (2019). *Développement du séquençage ARN ciblé sur cellules uniques en microfluidique de gouttes et applications*. 305.

Fru-Cho, J., Bumah, V. V., Safeukui, I., Nkuo-Akenji, T., Titanji, V. P., & Haldar, K. (2014). Molecular typing reveals substantial Plasmodium vivax infection in asymptomatic adults in a rural area of Cameroon. *Malaria Journal*, *13*(1), 170. https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-170

Galinski, M. R., & Corredor, V. (2004). Variant antigen expression in malaria infections : Posttranscriptional gene silencing, virulence and severe pathology. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *134*(1), 17-25. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.09.013

Gao, X., Gunalan, K., Yap, S. S. L., & Preiser, P. R. (2013). Triggers of key calcium signals during erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *Nature Communications*, *4*, 2862. https://doi.org/10.1038/ncomms3862

Gao, X., Yeo, K. P., Aw, S. S., Kuss, C., Iyer, J. K., Genesan, S., Rajamanonmani, R., Lescar, J., Bozdech, Z., & Preiser, P. R. (2008). Antibodies Targeting the PfRH1 Binding Domain Inhibit Invasion of Plasmodium falciparum Merozoites. *PLOS Pathogens*, *4*(7), e1000104. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000104

Garnhám, P. C. C. (1959). A New Sub-Species of Plasmodium cynomolgi. *Rivista di Parassitologia*, *20*(4), 273-278.

Gautier, E.-F., Leduc, M., Cochet, S., Bailly, K., Lacombe, C., Mohandas, N., Guillonneau, F., El Nemer, W., & Mayeux, P. (2018). Absolute proteome quantification of highly purified populations of circulating reticulocytes and mature erythrocytes. *Blood Advances*, *2*(20), 2646-2657. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018023515

Gautret, P., Miltgen, F., Gantier, J. C., Chabaud, A. G., & Landau, I. (1996). Enhanced gametocyte formation by Plasmodium chabaudi in immature erythrocytes : Pattern of production, sequestration, and infectivity to mosquitoes. *The Journal of Parasitology*, *82*(6), 900-906.

Gilberger, T.-W., Thompson, J. K., Triglia, T., Good, R. T., Duraisingh, M. T., & Cowman, A. F. (2003). A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from Plasmodium falciparum defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(16), 14480-14486. https://doi.org/10.1074/jbc.M211446200

Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2009). Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by Plasmodium falciparum merozoites. *International Journal for Parasitology*, *39*(1), 91-96. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.007

Giovannini, D., Späth, S., Lacroix, C., Perazzi, A., Bargieri, D., Lagal, V., Lebugle, C., Combe, A., Thiberge, S., Baldacci, P., Tardieux, I., & Ménard, R. (2011). Independent Roles of Apical Membrane Antigen 1 and Rhoptry Neck Proteins during Host Cell Invasion by Apicomplexa. *Cell Host & Microbe*, *10*(6), 591-602. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.012

Goel, S., Palmkvist, M., Moll, K., Joannin, N., Lara, P., Akhouri, R. R., Moradi, N., Öjemalm, K., Westman, M., Angeletti, D., Kjellin, H., Lehtiö, J., Blixt, O., Ideström, L., Gahmberg, C. G., Storry, J. R., Hult, A. K., Olsson, M. L., von Heijne, G., … Wahlgren, M. (2015). RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria. *Nature Medicine*, *21*(4), 314-317. https://doi.org/10.1038/nm.3812

Gold, L., Ayers, D., Bertino, J., Bock, C., Bock, A., Brody, E. N., Carter, J., Dalby, A. B., Eaton, B. E., Fitzwater, T., Flather, D., Forbes, A., Foreman, T., Fowler, C., Gawande, B., Goss, M., Gunn, M., Gupta, S., Halladay, D., … Zichi, D. (2010). Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery. *PLoS ONE*, *5*(12), Art. 12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015004

Gomes, P. S., Bhardwaj, J., Rivera-Correa, J., Freire-De-Lima, C. G., & Morrot, A. (2016). Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01617

Gonçalves, B. P., Sagara, I., Coulibaly, M., Wu, Y., Assadou, M. H., Guindo, A., Ellis, R. D., Diakite, M., Gabriel, E., Prevots, D. R., Doumbo, O. K., & Duffy, P. E. (2017). Hemoglobin variants shape the distribution of malaria parasites in human populations and their transmission potential. *Scientific Reports*, *7*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14627-y

Gong, L., Maiteki-Sebuguzi, C., Rosenthal, P. J., Hubbard, A. E., Drakeley, C. J., Dorsey, G., & Greenhouse, B. (2012). Evidence for both innate and acquired mechanisms of protection from Plasmodium falciparum in children with sickle cell trait. *Blood*, *119*(16), 3808-3814. https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371062

Gong, L., Parikh, S., Rosenthal, P. J., & Greenhouse, B. (2013). Biochemical and immunological mechanisms by which sickle cell trait protects against malaria. *Malaria Journal*, *12*, 317. https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-317

Gonzales, S. J., Reyes, R. A., Braddom, A. E., Batugedara, G., Bol, S., & Bunnik, E. M. (2020). Naturally Acquired Humoral Immunity Against Plasmodium falciparum Malaria.

Frontiers in Immunology, *11*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.594653

Gouagna, L. C., Bancone, G., Yao, F., Costantini, C., Ouedraogo, J.-B., & Modiano, D. (2010). Impact of protective haemoglobins C and S on P. falciparum malaria transmission in endemic area. *Malaria Journal*, *9*(2), Art. 2. https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-S2-O17

Gouagna, L. C., Ferguson, H. M., Okech, B. A., Killeen, G. F., Kabiru, E. W., Beier, J. C., Githure, J. I., & Yan, G. (2004). Plasmodium falciparum malaria disease manifestations in humans and transmission to Anopheles gambiae : A field study in Western Kenya. *Parasitology*, *128*(Pt 3), 235-243. https://doi.org/10.1017/s003118200300444x

Grange, L., Loucoubar, C., Telle, O., Tall, A., Faye, J., Sokhna, C., Trape, J.-F., Sakuntabhai, A., Bureau, J.-F., & Paul, R. (2015). Risk factors for Plasmodium falciparum gametocyte positivity in a longitudinal cohort. *PloS One*, *10*(4), e0123102. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123102

Grewal, S. I. S., & Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nature Reviews. Genetics*, *8*(1), 35-46. https://doi.org/10.1038/nrg2008

Grigorakaki, C. (2018). *Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inhibition de l'érythropoïèse par la cytokine pro-inflammatoire Tumor necrosis factor (TNF)-alpha*. 219.

Gruszczyk, J., Kanjee, U., Chan, L.-J., Menant, S., Malleret, B., Lim, N. T. Y., Schmidt, C. Q., Mok, Y.-F., Lin, K.-M., Pearson, R. D., Rangel, G., Smith, B. J., Call, M. J., Weekes, M. P., Griffin, M. D. W., Murphy, J. M., Abraham, J., Sriprawat, K., Menezes, M. J., … Tham, W.-H. (2018). Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6371), 48-55. https://doi.org/10.1126/science.aan1078

Guindo, A., Traore, K., Diakite, S., Wellems, T. E., Doumbo, O. K., & Diallo, D. A. (2011). An evaluation of concurrent G6PD (A−) deficiency and sickle cell trait in Malian populations of children with severe or uncomplicated P. falciparum malaria. *American journal of hematology*, *86*(9), 795-796. https://doi.org/10.1002/ajh.22093

Gunalan, K., Gao, X., Liew, K. J. L., & Preiser, P. R. (2011). Differences in Erythrocyte Receptor Specificity of Different Parts of the Plasmodium falciparum Reticulocyte Binding Protein Homologue 2a. *Infection and Immunity*. https://doi.org/10.1128/IAI.00201-11

Gunalan, K., Lo, E., Hostetler, J. B., Yewhalaw, D., Mu, J., Neafsey, D. E., Yan, G., & Miller, L. H. (2016). Role of Plasmodium vivax Duffy-binding protein 1 in invasion of Duffy-null Africans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(22), 6271-6276. https://doi.org/10.1073/pnas.1606113113

Gunalan, K., Niangaly, A., Thera, M. A., Doumbo, O. K., & Miller, L. H. (2018). Plasmodium vivax infections of Duffy-negative erythrocytes : Historically undetected or a recent adaptation? *Trends in parasitology*, *34*(5), 420-429. https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.006

Haldane, J. B. S. (1949). *He rate of mutation of human genes. Proceedings of the VIIIth International Congress of Genetics* . [Google search]. https://www.google.cm/search?tbm=bks&hl=en&q=Haldane%2C+J.+B.+S.+%28194 9%29.+He+rate+of+mutation+of+human+genes.+Proceedings+of+the+VIIIth+Interna tional+Congress+of+Genetics.+Hereditas%2C+35%2C+267-73.

Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, *97*(2), 329-339. https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329

Harris, C. T., Tong, X., Campelo, R., Marreiros, I. M., Vanheer, L. N., Nahiyaan, N., Zuzarte-Luís, V. A., Deitsch, K. W., Mota, M. M., Rhee, K. Y., & Kafsack, B. F. C. (2022). *Metabolic competition between lipid metabolism and histone methylation regulates sexual differentiation in human malaria parasites* [Preprint]. Systems Biology. https://doi.org/10.1101/2022.01.18.476397

Harris, K. S., Casey, J. L., Coley, A. M., Karas, J. A., Sabo, J. K., Tan, Y. Y., Dolezal, O., Norton, R. S., Hughes, A. B., Scanlon, D., & Foley, M. (2009). Rapid optimization of a peptide inhibitor of malaria parasite invasion by comprehensive N-methyl scanning. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(14), 9361-9371. https://doi.org/10.1074/jbc.M808762200

Hayakawa, T., Satta, Y., Gagneux, P., Varki, A., & Takahata, N. (2001). Alu-mediated inactivation of the human CMP- N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(20), 11399-11404. https://doi.org/10.1073/pnas.191268198

Heaton, H., Talman, A. M., Knights, A., Imaz, M., Gaffney, D., Durbin, R., Hemberg, M., & Lawniczak, M. (2019). *souporcell : Robust clustering of single cell RNAseq by genotype*

and ambient RNA inference without reference genotypes [Preprint]. Bioinformatics. https://doi.org/10.1101/699637

Hentzschel, F., Gibbins, M. P., Attipa, C., Beraldi, D., Moxon, C. A., Otto, T. D., & Marti, M. (2022). Host cell maturation modulates parasite invasion and sexual differentiation in Plasmodium berghei. *Science Advances*, *8*(17), eabm7348. https://doi.org/10.1126/sciadv.abm7348

Hill, A. V., Allsopp, C. E., Kwiatkowski, D., Anstey, N. M., Twumasi, P., Rowe, P. A., Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A. J., & Greenwood, B. M. (1991). Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, *352*(6336), 595-600. https://doi.org/10.1038/352595a0

Hoffmann, J. A., & Reichhart, J.-M. (2002). Drosophila innate immunity : An evolutionary perspective. *Nature Immunology*, *3*(2), 121-126. https://doi.org/10.1038/ni0202-121

Hougard, J. M., Darriet, F., & Bakayoko, S. (1983). Evaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de Bacillus thuringiensis sérotype H-14 sur Culex quinquefasciatus Say,1823 et Anopheles gambiae Giles,1902 s.l. (Diptera:Culicidae) en Afrique de l'Ouest. *Méd et parasitol*, 111-117.

Howard, R. J., Barnwell, J. W., & Kao, V. (1983). Antigenic variation of Plasmodium knowlesi malaria : Identification of the variant antigen on infected erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(13), 4129-4133.

Howick, V. M., Russell, A. J. C., Andrews, T., Heaton, H., Reid, A. J., Natarajan, K., Butungi, H., Metcalf, T., Verzier, L. H., Rayner, J. C., Berriman, M., Herren, J. K., Billker, O., Hemberg, M., Talman, A. M., & Lawniczak, M. K. N. (2019). The Malaria Cell Atlas : Single parasite transcriptomes across the complete *Plasmodium* life cycle. *Science*, *365*(6455), eaaw2619. https://doi.org/10.1126/science.aaw2619

Huff, C. G., Marchbank, D. F., & Shiroishi, T. (1958). Changes in infectiousness of malarial gametocytes. II. Analysis of the possible causative factors. *Experimental Parasitology*, *7*(4), 399-417. https://doi.org/10.1016/0014-4894(58)90036-5

Igbeneghu, C., Olisekodiaka, M. J., Akinola F, F. S., & Odaibo A, B. (2015). Impact Of Haemoglobin Variants AS And AC On Asymptomatic Falciparum Malaria Among Adults In Iwo, Southwestern Nigeria. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, *3*(Issue 1), 17-20.

Imwong, M., Nguyen, T. N., Tripura, R., Peto, T. J., Lee, S. J., Lwin, K. M., Suangkanarat, P., Jeeyapant, A., Vihokhern, B., Wongsaen, K., Van Hue, D., Dong, L. T., Nguyen, T.-U.,

Lubell, Y., von Seidlein, L., Dhorda, M., Promnarate, C., Snounou, G., Malleret, B., … Nosten, F. (2015). The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia : Findings from cross-sectional surveys in Thailand–Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. *Malaria Journal*, *14*, 381. https://doi.org/10.1186/s12936-015-0906-x

Imwong, M., Stepniewska, K., Tripura, R., Peto, T. J., Lwin, K. M., Vihokhern, B., Wongsaen, K., von Seidlein, L., Dhorda, M., Snounou, G., Keereecharoen, L., Singhasivanon, P., Sirithiranont, P., Chalk, J., Nguon, C., Day, N. P. J., Nosten, F., Dondorp, A., & White, N. J. (2016). Numerical Distributions of Parasite Densities During Asymptomatic Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, *213*(8), 1322-1329. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv596

Introini, V., Marin-Menendez, A., Nettesheim, G., Lin, Y.-C., Kariuki, S. N., Smith, A. L., Jean, L., Brewin, J. N., Rees, D. C., Cicuta, P., Rayner, J. C., & Penman, B. S. (2022). The erythrocyte membrane properties of beta thalassaemia heterozygotes and their consequences for Plasmodium falciparum invasion. *Scientific Reports*, *12*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/s41598-022-12060-4

Jean Mouchet, Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., Richard-Lenoble, D., & Sircoulon, J. (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. *J. Libbey*, 428.

Jeninga, M. D., Quinn, J. E., & Petter, M. (2019). ApiAP2 Transcription Factors in Apicomplexan Parasites. *Pathogens*, *8*(2), 47. https://doi.org/10.3390/pathogens8020047

Ji, P., Murata-Hori, M., & Lodish, H. F. (2011). Formation of mammalian erythrocytes : Chromatin condensation and enucleation. *Trends in cell biology*, *21*(7), 409-415. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.04.003

Joice, R., Nilsson, S. K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K. B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K. C., Duraisingh, M. T., Taylor, T. E., Milner, D. A., & Marti, M. (2014). Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Science translational medicine*, *6*(244), 244re5. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008882

Jonsdottir, T. K., Gabriela, M., Crabb, B. S., F de Koning-Ward, T., & Gilson, P. R. (2021). Defining the Essential Exportome of the Malaria Parasite. *Trends in Parasitology*, *37*(7), 664-675. https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.009

Josling, G. A., & Llinás, M. (2015). Sexual development in Plasmodium parasites : Knowing when it's time to commit. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(9), 573-587. https://doi.org/10.1038/nrmicro3519

Josling, G. A., Russell, T. J., Venezia, J., Orchard, L., van Biljon, R., Painter, H. J., & Llinás, M. (2020). Dissecting the role of PfAP2-G in malaria gametocytogenesis. *Nature Communications*, *11*(1), 1503. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15026-0

Josling, G. A., Venezia, J., Orchard, L., Russell, T. J., Painter, H. J., & Llinás, M. (2019). *Regulation of sexual differentiation is linked to invasion in malaria parasites* (p. 533877). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/533877

Josling, G. A., Williamson, K. C., & Llinás, M. (2018a). Regulation of Sexual Commitment and Gametocytogenesis in Malaria Parasites. *Annual Review of Microbiology*, *72*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062712

Josling, G. A., Williamson, K. C., & Llinás, M. (2018b). Regulation of Sexual Commitment and Gametocytogenesis in Malaria Parasites. *Annual review of microbiology*, *72*, 501-519. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062712

Kafsack, B. F. C., Rovira-Graells, N., Clark, T. G., Bancells, C., Crowley, V. M., Campino, S. G., Williams, A. E., Drought, L. G., Kwiatkowski, D. P., Baker, D. A., Cortés, A., & Llinás, M. (2014). A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in human malaria parasites. *Nature*, *507*(7491), 248-252. https://doi.org/10.1038/nature12920

Kappe, S. H., Vaughan, A. M., Boddey, J. A., & Cowman, A. F. (2010). That Was Then But This Is Now : Malaria Research in the Time of an Eradication Agenda. *Science*, *328*(5980), 862-866. https://doi.org/10.1126/science.1184785

Kapulu, M. C., Da, D. F., Miura, K., Li, Y., Blagborough, A. M., Churcher, T. S., Nikolaeva, D., Williams, A. R., Goodman, A. L., Sangare, I., Turner, A. V., Cottingham, M. G., Nicosia, A., Straschil, U., Tsuboi, T., Gilbert, S. C., Long, C. A., Sinden, R. E., Draper, S. J., … Biswas, S. (2015). Comparative Assessment of Transmission-Blocking Vaccine Candidates against Plasmodium falciparum. *Scientific Reports*, *5*. https://doi.org/10.1038/srep11193

Kariuki, S. N., Marin-Menendez, A., Introini, V., Ravenhill, B. J., Lin, Y.-C., Macharia, A., Makale, J., Tendwa, M., Nyamu, W., Kotar, J., Carrasquilla, M., Rowe, J. A., Rockett, K., Kwiatkowski, D., Weekes, M. P., Cicuta, P., Williams, T. N., & Rayner, J. C. (2020).

Red blood cell tension protects against severe malaria in the Dantu blood group. *Nature*, *585*(7826), Art. 7826. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2726-6

Kavishe, R. A., Koenderink, J. B., & Alifrangis, M. (2017). Oxidative stress in malaria and artemisinin combination therapy : Pros and Cons. *The FEBS Journal*, *284*(16), 2579-2591. https://doi.org/10.1111/febs.14097

Kemleu, S., Guelig, D., Moukoko, C. E., Essangui, E., Diesburg, S., Mouliom, A., Melingui, B., Manga, J., Donkeu, C., Epote, A., Texier, G., LaBarre, P., Burton, R., & Ayong, L. (2016). A Field-Tailored Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Assay for High Sensitivity Detection of Plasmodium falciparum Infections. *PLOS ONE*, *11*(11), e0165506. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165506

Kengne-Ouafo, J. A., Sutherland, C. J., Binka, F. N., Awandare, G. A., Urban, B. C., & Dinko, B. (2019). Immune Responses to the Sexual Stages of Plasmodium falciparum Parasites. *Frontiers in Immunology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00136

Kent, R. S., Modrzynska, K. K., Cameron, R., Philip, N., Billker, O., & Waters, A. P. (2018). Inducible developmental reprogramming redefines commitment to sexual development in the malaria parasite Plasmodium berghei. *Nature Microbiology*, *3*(11), 1206-1213. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0223-6

Kiselev, V. Y., Yiu, A., & Hemberg, M. (2018). scmap : Projection of single-cell RNA-seq data across data sets. *Nature Methods*, *15*(5), 359-362. https://doi.org/10.1038/nmeth.4644

Kreuels, B., Kreuzberg, C., Kobbe, R., Ayim-Akonor, M., Apiah-Thompson, P., Thompson, B., Ehmen, C., Adjei, S., Langefeld, I., Adjei, O., & May, J. (2010). Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth. *Blood*, *115*(22), 4551-4558. https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-241844

Kurtzhals, J. A., Rodrigues, O., Addae, M., Commey, J. O., Nkrumah, F. K., & Hviid, L. (1997). Reversible suppression of bone marrow response to erythropoietin in Plasmodium falciparum malaria. *British Journal of Haematology*, *97*(1), 169-174. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.82654.x

Kwiatkowski, D. P. (2005). How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria. *American Journal of Human Genetics*, *77*(2), 171-192.

L, D.-D., Dl, N., E, K., A, T., Cs, N., P, D.-B., R, B., P, A.-A., T, T., Cs, W., & C, A.-N. (2020). *Implication of Anopheles Funestus in Malaria Transmission in the City of Yaoundé, Cameroon*. Parasite (Paris, France); Parasite. https://doi.org/10.1051/parasite/2020005

Labie, D. (2010). Les relations complexes entre hémoglobinopathies et paludisme. *médecine/sciences*, *26*(8-9), 685-687. https://doi.org/10.1051/medsci/2010268-9685

Ladda, R., & Lalli, F. (1966). The Course of Plasmodium berghei Infection in the Polycythemic Mouse. *The Journal of Parasitology*, *52*(2), 383-385. https://doi.org/10.2307/3276505

Laishram, D. D., Sutton, P. L., Nanda, N., Sharma, V. L., Sobti, R. C., Carlton, J. M., & Joshi, H. (2012). The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria Journal*, *11*(1), 29. https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-29

Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Normand, B. V.-L., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.-F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., & Lebrun, M. (2011). The RON2-AMA1 Interaction is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites. *PLOS Pathogens*, *7*(2), e1001276. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276

Langhorne, J., Ndungu, F. M., Sponaas, A.-M., & Marsh, K. (2008). Immunity to malaria : More questions than answers. *Nature Immunology*, *9*(7), Art. 7. https://doi.org/10.1038/ni.f.205

Lanzillotti, R., & Coetzer, T. L. (2006). The 10 kDa domain of human erythrocyte protein 4.1 binds the Plasmodium falciparum EBA-181 protein. *Malaria Journal*, *5*(1), 100. https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-100

Lavazec, C. (2017). Molecular mechanisms of deformability of Plasmodium-infected erythrocytes. *Current Opinion in Microbiology*, *40*, 138-144. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.011

Lavazec, C., Boudin, C., Lacroix, R., Bonnet, S., Diop, A., Thiberge, S., Boisson, B., Tahar, R., & Bourgouin, C. (2007). Carboxypeptidases B of Anopheles gambiae as Targets for a Plasmodium falciparum Transmission-Blocking Vaccine. *Infection and Immunity*, *75*(4), 1635-1642. https://doi.org/10.1128/IAI.00864-06

Lavazec, C., & Bourgouin, C. (2008). Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting Plasmodium development. *Microbes and Infection*, *10*(8), 845-849. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.05.004

Lee, E., Choi, H. S., Hwang, J. H., Hoh, J. K., Cho, Y.-H., & Baek, E. J. (2014). The RNA in reticulocytes is not just debris : It is necessary for the final stages of erythrocyte

formation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *53*(1), 1-10. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2014.02.009

Lee, W.-C., Russell, B., & Rénia, L. (2019). Sticking for a Cause : The Falciparum Malaria Parasites Cytoadherence Paradigm. *Frontiers in Immunology*, *10*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01444

Lell, B., May, J., Schmidt-Ott, R. J., Lehman, L. G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Schmid, D., Herbich, K., Mockenhaupt, F. P., Meyer, C. G., Bienzle, U., & Kremsner, P. G. (1999). The Role of Red Blood Cell Polymorphisms in Resistance and Susceptibility to Malaria. *Clinical Infectious Diseases*, *28*(4), 794-799. https://doi.org/10.1086/515193

Lell, B., Mordmüller, B., Dejon Agobe, J.-C., Honkpehedji, J., Zinsou, J., Mengue, J. B., Loembe, M. M., Adegnika, A. A., Held, J., Lalremruata, A., Nguyen, T. T., Esen, M., Kc, N., Ruben, A. J., Chakravarty, S., Lee Sim, B. K., Billingsley, P. F., James, E. R., Richie, T. L., … Kremsner, P. G. (2018). Impact of Sickle Cell Trait and Naturally Acquired Immunity on Uncomplicated Malaria after Controlled Human Malaria Infection in Adults in Gabon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *98*(2), 508-515. https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0343

Lennon, S. E., Miranda, A., Henao, J., Vallejo, A. F., Perez, J., Alvarez, A., Arévalo-Herrera, M., & Herrera, S. (2016). Malaria elimination challenges in Mesoamerica : Evidence of submicroscopic malaria reservoirs in Guatemala. *Malaria Journal*, *15*(1), 441. https://doi.org/10.1186/s12936-016-1500-6

Leong, Y. W., Lee, E. Q. H., Rénia, L., & Malleret, B. (2021). Rodent Malaria Erythrocyte Preference Assessment by an Ex Vivo Tropism Assay. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 622. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.680136

Li, H., Lu, L., Li, X., Buffet, P. A., Dao, M., Karniadakis, G. E., & Suresh, S. (2018). Mechanics of diseased red blood cells in human spleen and consequences for hereditary blood disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(38), 9574-9579. https://doi.org/10.1073/pnas.1806501115

Li, X., Marinkovic, M., Russo, C., McKnight, C. J., Coetzer, T. L., & Chishti, A. H. (2012). Identification of a specific region of Plasmodium falciparum EBL-1 that binds to host receptor glycophorin B and inhibits merozoite invasion in human red blood cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *183*(1), 23-31. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.01.002

Lindblade, K. A., Steinhardt, L., Samuels, A., Kachur, S. P., & Slutsker, L. (2013). The silent threat : Asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *11*(6), 623-639. https://doi.org/10.1586/eri.13.45

Liu, J., Guo, X., Mohandas, N., Chasis, J. A., & An, X. (2010). Membrane remodeling during reticulocyte maturation. *Blood*, *115*(10), 2021-2027. https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-241182

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Llorà-Batlle, O., Michel-Todó, L., Witmer, K., Toda, H., Fernández-Becerra, C., Baum, J., & Cortés, A. (2020). Conditional expression of PfAP2-G for controlled massive sexual conversion in Plasmodium falciparum. *Science Advances*, *6*(24), Art. 24. https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz5057

Lo, E., Yewhalaw, D., Zhong, D., Zemene, E., Degefa, T., Tushune, K., Ha, M., Lee, M.-C., James, A. A., & Yan, G. (2015). Molecular epidemiology of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum malaria among Duffy-positive and Duffy-negative populations in Ethiopia. *Malaria Journal*, *14*, 84. https://doi.org/10.1186/s12936-015-0596-4

Lobo, C.-A., Rodriguez, M., Reid, M., & Lustigman, S. (2003). Glycophorin C is the receptor for the Plasmodium falciparum erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). *Blood*, *101*(11), 4628-4631. https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3076

Lopaticki, S., Maier, A. G., Thompson, J., Wilson, D. W., Tham, W.-H., Triglia, T., Gout, A., Speed, T. P., Beeson, J. G., Healer, J., & Cowman, A. F. (2011). Reticulocyte and Erythrocyte Binding-Like Proteins Function Cooperatively in Invasion of Human Erythrocytes by Malaria Parasites. *Infection and Immunity*, *79*(3), 1107-1117. https://doi.org/10.1128/IAI.01021-10

Lux, S. E., IV. (2016). Anatomy of the red cell membrane skeleton : Unanswered questions. *Blood*, *127*(2), 187-199. https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772

Luzzatto, L. (1979). Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood*, *54*(5), 961-976.

Luzzatto, L., Nwachuku-Jarrett, E. S., & Reddy, S. (1970). Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. *Lancet (London, England)*, *1*(7642), 319-321. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(70)90700-2

Mackinnon, M. J., Li, J., Mok, S., Kortok, M. M., Marsh, K., Preiser, P. R., & Bozdech, Z. (2009). Comparative Transcriptional and Genomic Analysis of Plasmodium falciparum

Field Isolates. *PLOS Pathogens*, *5*(10), e1000644. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000644

Maier, A. G., Baum, J., Smith, B., Conway, D. J., & Cowman, A. F. (2009). Polymorphisms in Erythrocyte Binding Antigens 140 and 181 Affect Function and Binding but Not Receptor Specificity in Plasmodium falciparum. *Infection and Immunity*, *77*(4), 1689-1699. https://doi.org/10.1128/IAI.01331-08

Malleret, B., El Sahili, A., Tay, M. Z., Carissimo, G., Ong, A. S. M., Novera, W., Lin, J., Suwanarusk, R., Kosaisavee, V., Chu, T. T. T., Sinha, A., Howland, S. W., Fan, Y., Gruszczyk, J., Tham, W.-H., Colin, Y., Maurer-Stroh, S., Snounou, G., Ng, L. F. P., … Rénia, L. (2021). Plasmodium vivax binds host CD98hc (SLC3A2) to enter immature red blood cells. *Nature Microbiology*, *6*(8), 991-999. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00939-3

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., Ng, M. L., Ginhoux, F., Ng, L. G., Lim, C. T., Nosten, F., Snounou, G., Rénia, L., & Russell, B. (2015). Plasmodium vivax : Restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. *Blood*, *125*(8), 1314-1324. https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-596015

Malleret, B., Xu, F., Mohandas, N., Suwanarusk, R., Chu, C., Leite, J. A., Low, K., Turner, C., Sriprawat, K., Zhang, R., Bertrand, O., Colin, Y., Costa, F. T. M., Ong, C. N., Ng, M. L., Lim, C. T., Nosten, F., Rénia, L., & Russell, B. (2013). Significant Biochemical, Biophysical and Metabolic Diversity in Circulating Human Cord Blood Reticulocytes. *PLoS ONE*, *8*(10), e76062. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076062

Mbenda, H. G. N., & Das, A. (2014). Molecular Evidence of Plasmodium vivax Mono and Mixed Malaria Parasite Infections in Duffy-Negative Native Cameroonians. *PLOS ONE*, *9*(8), e103262. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103262

Meibalan, E., & Marti, M. (2017). Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(3), Art. 3. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025452

Ménard, D., Barnadas, C., Bouchier, C., Henry-Halldin, C., Gray, L. R., Ratsimbasoa, A., Thonier, V., Carod, J.-F., Domarle, O., Colin, Y., Bertrand, O., Picot, J., King, C. L., Grimberg, B. T., Mercereau-Puijalon, O., & Zimmerman, P. A. (2010). Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(13), 5967-5971. https://doi.org/10.1073/pnas.0912496107

Mendes, A. M., Schlegelmilch, T., Cohuet, A., Awono-Ambene, P., De Iorio, M., Fontenille, D., Morlais, I., Christophides, G. K., Kafatos, F. C., & Vlachou, D. (2008). Conserved Mosquito/Parasite Interactions Affect Development of Plasmodium falciparum in Africa. *PLoS Pathogens*, *4*(5), e1000069. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000069

Mendes, C., Dias, F., Figueiredo, J., Mora, V. G., Cano, J., de Sousa, B., do Rosário, V. E., Benito, A., Berzosa, P., & Arez, A. P. (2011). Duffy negative antigen is no longer a barrier to Plasmodium vivax—Molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(6), e1192. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001192

Méndez, F., Herrera, S., Murrain, B., Gutiérrez, A., Moreno, L. A., Manzano, M., Muñoz, A., & Plowe, C. V. (2007). Selection of antifolate-resistant Plasmodium falciparum by sulfadoxine-pyrimethamine treatment and infectivity to Anopheles mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *77*(3), 438-443.

Mensah, B. A., Myers-Hansen, J. L., Obeng Amoako, E., Opoku, M., Abuaku, B. K., & Ghansah, A. (2021). Prevalence and risk factors associated with asymptomatic malaria among school children : Repeated cross-sectional surveys of school children in two ecological zones in Ghana. *BMC Public Health*, *21*(1), 1697. https://doi.org/10.1186/s12889-021-11714-8

Messina, V., Valtieri, M., Rubio, M., Falchi, M., Mancini, F., Mayor, A., Alano, P., & Silvestrini, F. (2018). 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*, *8*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00050

Metoh, T. N., Chen, J.-H., Fon-Gah, P., Zhou, X., Moyou-Somo, R., & Zhou, X.-N. (2020). Genetic diversity of Plasmodium falciparum and genetic profile in children affected by uncomplicated malaria in Cameroon. *Malaria Journal*, *19*. https://doi.org/10.1186/s12936-020-03161-4

Migot-Nabias, F., Pelleau, S., Watier, L., Guitard, J., Toly, C., De Araujo, C., Ngom, M. I., Chevillard, C., Gaye, O., & Garcia, A. (2006). Red blood cell polymorphisms in relation to Plasmodium falciparum asymptomatic parasite densities and morbidity in Senegal. *Microbes and Infection*, *8*(9-10), 2352-2358. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.03.021

Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X., & Wellems, T. E. (2013). Malaria biology and disease pathogenesis : Insights for new treatments. *Nature Medicine*, *19*(2), 156-167. https://doi.org/10.1038/nm.3073

Miller, L. H., Aikawa, M., Johnson, J. G., & Shiroishi, T. (1979). Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *Journal of Experimental Medicine*, *149*(1), 172-184. https://doi.org/10.1084/jem.149.1.172

Miller, L. H., Mason, S. J., Clyde, D. F., & McGinniss, M. H. (1976). The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *The New England Journal of Medicine*, *295*(6), 302-304. https://doi.org/10.1056/nejm197608052950602

Miller, M. J. (1958). Observations on the natural history of malaria in the semi-resistant West African. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *52*(2), 152-168. https://doi.org/10.1016/0035-9203(58)90036-1

MINSANTE, & OMS. (2019). *Rapport de suivi des 100 indicateurs clés de Santé du Cameroun en 2019. Yaoundé Catalogage à la source*. http://apps.who.int/iris ; http://onsp.minsante.com

Mitchell, G. H., Thomas, A. W., Margos, G., Dluzewski, A. R., & Bannister, L. H. (2004). Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infection and Immunity*, *72*(1), 154-158. https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.154-158.2004

Mitri, C., Thiery, I., Bourgouin, C., & Paul, R. E. L. (2009a). Density-dependent impact of the human malaria parasite Plasmodium falciparum gametocyte sex ratio on mosquito infection rates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *276*(1673), Art. 1673. https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0962

Mitri, C., Thiery, I., Bourgouin, C., & Paul, R. E. L. (2009b). Density-dependent impact of the human malaria parasite Plasmodium falciparum gametocyte sex ratio on mosquito infection rates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *276*(1673), 3721-3726. https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0962

Miura, K., Takashima, E., Deng, B., Tullo, G., Diouf, A., Moretz, S. E., Nikolaeva, D., Diakite, M., Fairhurst, R. M., Fay, M. P., Long, C. A., & Tsuboi, T. (2013). Functional Comparison of Plasmodium falciparum Transmission-Blocking Vaccine Candidates by

the Standard Membrane-Feeding Assay. *Infection and Immunity*, *81*(12), 4377-4382. https://doi.org/10.1128/IAI.01056-13

Mohandas, N., & An, X. (2012). Malaria and Human Red Blood Cells. *Medical microbiology and immunology*, *201*(4), 593-598. https://doi.org/10.1007/s00430-012-0272-z

Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane : Past, present, and future. *Blood*, *112*(10), 3939-3948. https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166

Molina-Franky, J., Patarroyo, M. E., Kalkum, M., & Patarroyo, M. A. (2022). The Cellular and Molecular Interaction Between Erythrocytes and Plasmodium falciparum Merozoites. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2022.816574

Moras, M., Lefevre, S. D., & Ostuni, M. A. (2017). From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells : Organelle Clearance in Mammals. *Frontiers in Physiology*, *8*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.01076

Morlais, I., Nsango, S. E., Toussile, W., Abate, L., Annan, Z., Tchioffo, M. T., Cohuet, A., Awono-Ambene, P. H., Fontenille, D., Rousset, F., & Berry, A. (2015). Plasmodium falciparum Mating Patterns and Mosquito Infectivity of Natural Isolates of Gametocytes. *PLOS ONE*, *10*(4), Art. 4. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123777

Mosnier, E., Douine, M., Epelboin, L., Pelleau, S., Pommier de Santi, V., Dangel, Y., Demar, M. P., Mutricy, R., Guarmit, B., Nacher, M., Brousse, P., Davy, D., Djossou, F., & Musset, L. (2017). Portage asymptomatique de plasmodies dans le quartier Blondin de Saint-Georges-de-l'Oyapock, Guyane. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, *110*(4), 265-269. https://doi.org/10.1007/s13149-017-0572-z

Mouchet, J., & Carnevale, P. (s. d.). *Les vecteurs et la transmission*. 28.

Moura, P. L. (2020). *Investigating the Process of Reticulocyte Maturation to Erythrocytes in Vitro*. University of Bristol.

Moyou. (1977). Les aspects actuels du paludisme au Cameroun.Thèse de Médecine, Bordeaux, Paris.OMS (1998a). In *Évaluation de la santé, In Rapport sur la santé dans le monde. La vie au 21èmesiècle, une perspective pour tous.* (p. 52-61).

Mpimbaza, A., Walakira, A., Ndeezi, G., Katahoire, A., Karamagi, C., Nsobya, S. L., Tukwasibwe, S., Asua, V., & Rosenthal, P. J. (2018). Associations between erythrocyte polymorphisms and risks of uncomplicated and severe malaria in Ugandan children : A case control study. *PLOS ONE*, *13*(9), e0203229. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203229

Müller, S. (2004). Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Molecular Microbiology*, *53*(5), 1291-1305. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04257.x

Naidu, R., Chu, T. T., Tripathi, J., Hu, Y., Subramanian, G., Tong, J. X., Tripathi, P., Fang, K., Tan, K. S., Lim, C. T., Chan, J. K. Y., Bozdech, Z., & Chandramohanadas, R. (2019). Reticulocyte Infection Leads to Altered Behaviour, Drug Sensitivity and Host Cell Remodelling by Plasmodium falciparum. *BioRxiv*, 862169. https://doi.org/10.1101/862169

Neveu, G., & Lavazec, C. (2019). Erythrocyte Membrane Makeover by Plasmodium falciparum Gametocytes. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02652

Neveu, G., Richard, C., Dupuy, F., Behera, P., Volpe, F., Subramani, P. A., Marcel-Zerrougui, B., Vallin, P., Andrieu, M., Minz, A. M., Azar, N., Martins, R. M., Lorthiois, A., Gazeau, F., Lopez-Rubio, J.-J., Mazier, D., Silva, A. K. A., Satpathi, S., Wassmer, S. C., … Lavazec, C. (2020). Plasmodium falciparum sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis. *Blood*, *136*(12), 1381-1393. https://doi.org/10.1182/blood.2019004746

Ngassa Mbenda, H. G., Gouado, I., & Das, A. (2016). An additional observation of Plasmodium vivax malaria infection in Duffy-negative individuals from Cameroon. *Journal of Infection in Developing Countries*, *10*(6), 682-686. https://doi.org/10.3855/jidc.7554

Ngwa, C. J., Farrukh, A., & Pradel, G. (2021). Zinc finger proteins of Plasmodium falciparum. *Cellular Microbiology*, *23*(12), e13387. https://doi.org/10.1111/cmi.13387

Ngwa, C. J., Rosa, T. F. de A., & Pradel, G. (2016). The Biology of Malaria Gametocytes. In A. J. Rodriguez-Morales (Éd.), *Current Topics in Malaria*. InTech. https://doi.org/10.5772/65464

Niang, M., Bei, A. K., Madnani, K. G., Pelly, S., Dankwa, S., Kanjee, U., Gunalan, K., Amaladoss, A., Yeo, K. P., Bob, N. S., Malleret, B., Duraisingh, M. T., & Preiser, P. R. (2014). STEVOR is a Plasmodium falciparum erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. *Cell Host & Microbe*, *16*(1), 81-93. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.004

Niang, M., Thiam, L. G., Sow, A., Loucoubar, C., Bob, N. S., Diop, F., Diouf, B., Niass, O., Mansourou, A., Varela, M. L., Perraut, R., Sall, A. A., & Toure-Balde, A. (2015). A molecular survey of acute febrile illnesses reveals Plasmodium vivax infections in

Kedougou, southeastern Senegal. *Malaria Journal*, *14*, 281. https://doi.org/10.1186/s12936-015-0808-y

Niangaly, A., Karthigayan Gunalan, null, Amed Ouattara, null, Coulibaly, D., Sá, J. M., Adams, M., Travassos, M. A., Ferrero, J., Laurens, M. B., Kone, A. K., Thera, M. A., Plowe, C. V., Miller, L. H., & Doumbo, O. K. (2017). Plasmodium vivax Infections over 3 Years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *97*(3), 744-752. https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0254

Nkhoma, S. C., Trevino, S. G., Gorena, K. M., Nair, S., Khoswe, S., Jett, C., Garcia, R., Daniel, B., Dia, A., Terlouw, D. J., Ward, S. A., Anderson, T. J. C., & Cheeseman, I. H. (2020). Co-transmission of Related Malaria Parasite Lineages Shapes Within-Host Parasite Diversity. *Cell Host & Microbe*, *27*(1), 93-103.e4. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.12.001

Noor, A. M., Kinyoki, D. K., Mundia, C. W., Kabaria, C. W., Mutua, J. W., Alegana, V. A., Fall, I. S., & Snow, R. W. (2014). The changing risk of Plasmodium falciparum malaria infection in Africa : 2000–10: a spatial and temporal analysis of transmission intensity. *The Lancet*, *383*(9930), 1739-1747. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62566-0

Nsango, S. E., Abate, L., Thoma, M., Pompon, J., Fraiture, M., Rademacher, A., Berry, A., Awono-Ambene, P. H., Levashina, E. A., & Morlais, I. (2012). Genetic clonality of Plasmodium falciparum affects the outcome of infection in Anopheles gambiae. *International Journal for Parasitology*, *42*(6), Art. 6. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.03.008

Oduma, C. O., Ogolla, S., Atieli, H., Ondigo, B. N., Lee, M.-C., Githeko, A. K., Dent, A. E., Kazura, J. W., Yan, G., & Koepfli, C. (2021). Increased investment in gametocytes in asymptomatic Plasmodium falciparum infections in the wet season. *BMC Infectious Diseases*, *21*(1), 44. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05761-6

Oehring, S. C., Woodcroft, B. J., Moes, S., Wetzel, J., Dietz, O., Pulfer, A., Dekiwadia, C., Maeser, P., Flueck, C., Witmer, K., Brancucci, N. M., Niederwieser, I., Jenoe, P., Ralph, S. A., & Voss, T. S. (2012). Organellar proteomics reveals hundreds of novel nuclear proteins in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Genome Biology*, *13*(11), R108. https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-11-r108

Organisation mondiale de la Santé. (2015). *Approche épidémiologique de la lutte contre le paludisme*. Organisation mondiale de la Santé. https://apps.who.int/iris/handle/10665/153917

Otto, T. D., Wilinski, D., Assefa, S., Keane, T. M., Sarry, L. R., Böhme, U., Lemieux, J., Barrell, B., Pain, A., Berriman, M., Newbold, C., & Llinás, M. (2010). New insights into the blood-stage transcriptome of Plasmodium falciparum using RNA-Seq. *Molecular Microbiology*, *76*(1), 12-24. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07026.x

Ouédraogo, A. L., Bastiaens, G. J. H., Tiono, A. B., Guelbéogo, W. M., Kobylinski, K. C., Ouédraogo, A., Barry, A., Bougouma, E. C., Nebie, I., Ouattara, M. S., Lanke, K. H. W., Fleckenstein, L., Sauerwein, R. W., Slater, H. C., Churcher, T. S., Sirima, S. B., Drakeley, C., & Bousema, T. (2015). Efficacy and safety of the mosquitocidal drug ivermectin to prevent malaria transmission after treatment : A double-blind, randomized, clinical trial. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *60*(3), 357-365. https://doi.org/10.1093/cid/ciu797

Ouédraogo, A. L., Gonçalves, B. P., Gnémé, A., Wenger, E. A., Guelbeogo, M. W., Ouédraogo, A., Gerardin, J., Bever, C. A., Lyons, H., Pitroipa, X., Verhave, J. P., Eckhoff, P. A., Drakeley, C., Sauerwein, R., Luty, A. J. F., Kouyaté, B., & Bousema, T. (2016). Dynamics of the Human Infectious Reservoir for Malaria Determined by Mosquito Feeding Assays and Ultrasensitive Malaria Diagnosis in Burkina Faso. *The Journal of Infectious Diseases*, *213*(1), 90-99. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv370

Padley, D., Moody, A. H., Chiodini, P. L., & Saldanha, J. (2003). Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, *97*(2), 131-137. https://doi.org/10.1179/000349803125002977

Pain, A., Böhme, U., Berry, A. E., Mungall, K., Finn, R. D., Jackson, A. P., Mourier, T., Mistry, J., Pasini, E. M., Aslett, M. A., Balasubrammaniam, S., Borgwardt, K., Brooks, K., Carret, C., Carver, T. J., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clark, T. G., Galinski, M. R., … Berriman, M. (2008). The genome of the simian and human malaria parasite Plasmodium knowlesi. *Nature*, *455*(7214), Art. 7214. https://doi.org/10.1038/nature07306

Painter, H. J., Campbell, T. L., & Llinás, M. (2011). The Apicomplexan AP2 family : Integral factors regulating Plasmodium development. *Molecular and biochemical parasitology*, *176*(1), 1-7. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.014

Pamplona, A., Ferreira, A., Balla, J., Jeney, V., Balla, G., Epiphanio, S., Chora, A., Rodrigues, C. D., Gregoire, I. P., Cunha-Rodrigues, M., Portugal, S., Soares, M. P., & Mota, M. M. (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nature Medicine*, *13*(6), 703-710. https://doi.org/10.1038/nm1586

Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro : Selective externalization of the receptor. *Cell*, *33*(3), 967-978. https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5

Paskewitz, S. M., Brown, M. R., Collins, F. H., & Lea, A. O. (1989). Ultrastructural localization of phenoloxidase in the midgut of refractory Anopheles gambiae and association of the enzyme with encapsulated Plasmodium cynomolgi. *The Journal of Parasitology*, *75*(4), 594-600.

Paskewitz, S. M., & Riehle, M. (1998). A Factor Preventing Melanization of Sephadex CM C-25 Beads inPlasmodium-Susceptible and RefractoryAnopheles gambiae. *Experimental Parasitology*, *90*(1), 34-41. https://doi.org/10.1006/expr.1998.4305

Pasvol, G., Weatherall, D. J., & Wilson, R. J. M. (1980). The Increased Susceptibility of Young Red Cells to Invasion by the Malarial Parasite Plasmodium falciparum. *British Journal of Haematology*, *45*(2), 285-295. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1980.tb07148.x

Paul, A. S., Egan, E. S., & Duraisingh, M. T. (2015). Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. *Current opinion in hematology*, *22*(3), 220-226. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000135

Paul, R. E., Coulson, T. N., Raibaud, A., & Brey, P. T. (2000). Sex determination in malaria parasites. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5450), Art. 5450. https://doi.org/10.1126/science.287.5450.128

Paul, R. E. L., Brey, P. T., & Robert, V. (2002). Plasmodium sex determination and transmission to mosquitoes. *Trends in Parasitology*, *18*(1), 32-38. https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02122-5

Pauling, L., & Itano, H. A. (1949). Sickle cell anemia a molecular disease. *Science (New York, N.Y.)*, *110*(2865), 543-548. https://doi.org/10.1126/science.110.2865.543

Pesciotta, E. N., Sriswasdi, S., Tang, H.-Y., Mason, P. J., Bessler, M., & Speicher, D. W. (2012). A label-free proteome analysis strategy for identifying quantitative changes in erythrocyte membranes induced by red cell disorders. *Journal of Proteomics*, *76 Spec No.*, 194-202. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.08.010

Peter Klinken, S. (2002). Red blood cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *34*(12), 1513-1518. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00087-0

Peterson, D. S., & Wellems, T. E. (2000). EBL-1, a putative erythrocyte binding protein of Plasmodium falciparum, maps within a favored linkage group in two genetic crosses. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *105*(1), 105-113. https://doi.org/10.1016/s0166-6851(99)00173-5

Phillips, R. E., Looareesuwan, S., Warrell, D. A., Lee, S. H., Karbwang, J., Warrell, M. J., White, N. J., Swasdichai, C., & Weatherall, D. J. (1986). The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria : Role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *The Quarterly Journal of Medicine*, *58*(227), 305-323.

Pichon, G., Awono-Ambene, H. P., & Robert, V. (2000). High heterogeneity in the number of Plasmodium falciparum gametocytes in the bloodmeal of mosquitoes fed on the same host. *Parasitology*, *121*(2), 115-120. https://doi.org/10.1017/S0031182099006277

Piel, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Williams, T. N., Weatherall, D. J., & Hay, S. I. (2010). Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nature Communications*, *1*(1), 104. https://doi.org/10.1038/ncomms1104

Piel, F. B., Steinberg, M. H., & Rees, D. C. (2017). Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, *376*(16), 1561-1573. https://doi.org/10.1056/NEJMra1510865

Piva, E., Brugnara, C., Spolaore, F., & Plebani, M. (2015). Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clinics in Laboratory Medicine*, *35*(1), 133-163. https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.10.004

PNLP. (2016). *Rapport d'activités du programme national de lutte contre le paludisme en 2015*.

PNLP. (2020). *Rapport d'activités 2019 du Programme Nationale de lutte contre le paludisme*.

Poirier, P., Doderer-Lang, C., Atchade, P. S., Lemoine, J.-P., de l'Isle, M.-L. C., Abou-bacar, A., Pfaff, A. W., Brunet, J., Arnoux, L., Haar, E., Filisetti, D., Perrotey, S., Chabi, N. W., Akpovi, C. D., Anani, L., Bigot, A., Sanni, A., & Candolfi, E. (2016). The hide and seek of Plasmodium vivax in West Africa : Report from a large-scale study in Beninese

asymptomatic subjects. *Malaria Journal*, *15*, 570. https://doi.org/10.1186/s12936-016-1620-z

Ponnudurai, T., Lensen, A. H. W., Gemert, G. J. A. V., Bensink, M. P. E., Bolmer, M., & Meuwissen, J. H. E. T. (1989). Infectivity of cultured Plasmodium falciparum gametocytes to mosquitoes. *Parasitology*, *98*(2), 165-173. https://doi.org/10.1017/S0031182000062065

Poran, A., Nötzel, C., Aly, O., Mencia-Trinchant, N., Harris, C. T., Guzman, M. L., Hassane, D. C., Elemento, O., & Kafsack, B. F. C. (2017). Single-cell RNA-seq reveals a signature of sexual commitment in malaria parasites. *Nature*, *551*(7678), 95-99. https://doi.org/10.1038/nature24280

Portugaliza, H. P., Miyazaki, S., Geurten, F. J., Pell, C., Rosanas-Urgell, A., Janse, C. J., & Cortés, A. (2020). Artemisinin exposure at the ring or trophozoite stage impacts Plasmodium falciparum sexual conversion differently. *eLife*, *9*, e60058. https://doi.org/10.7554/eLife.60058

Prajapati, S. K., Ayanful-Torgby, R., Pava, Z., Barbeau, M. C., Acquah, F. K., Cudjoe, E., Kakaney, C., Amponsah, J. A., Obboh, E., Ahmed, A. E., Abuaku, B. K., McCarthy, J. S., Amoah, L. E., & Williamson, K. C. (2020). The transcriptome of circulating sexually committed Plasmodium falciparum ring stage parasites forecasts malaria transmission potential. *Nature Communications*, *11*(1), 6159. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19988-z

Prajapati, S. K., Culleton, R., & Singh, O. P. (2014). Protein trafficking in Plasmodium falciparum-infected red cells and impact of the expansion of exported protein families. *Parasitology*, 1-11. https://doi.org/10.1017/S0031182014000948

PSLP. (2019). *Plan stratégique National de lutte contre le paludisme au Cameroun 2019-2023*.

Rai, D., Wilson, A. M., & Moosavi, L. (2022). Histology, Reticulocytes. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542172/

Ravenhill, B. J., Kanjee, U., Ahouidi, A., Nobre, L., Williamson, J., Goldberg, J. M., Antrobus, R., Dieye, T., Duraisingh, M. T., & Weekes, M. P. (2019). Quantitative comparative analysis of human erythrocyte surface proteins between individuals from two genetically distinct populations. *Communications Biology*, *2*, 350. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0596-y

Rea, E., Le Roch, K. G., & Tewari, R. (2018). Sex in Plasmodium falciparum : Silence Play between GDV1 and HP1. *Trends in parasitology*, *34*(6), 450-452. https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.04.006

Reece, S. E., Drew, D. R., & Gardner, A. (2008a). Sex ratio adjustment and kin discrimination in malaria parasites. *Nature*, *453*(7195), Art. 7195. https://doi.org/10.1038/nature06954

Reece, S. E., Drew, D. R., & Gardner, A. (2008b). Sex ratio adjustment and kin discrimination in malaria parasites. *Nature*, *453*(7195), Art. 7195. https://doi.org/10.1038/nature06954

Reece, S. E., Duncan, A. B., West, S. A., & Read, A. F. (2005). Host cell preference and variable transmission strategies in malaria parasites. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *272*(1562), 511-517. https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2972

Reid, A. J., Talman, A. M., Bennett, H. M., Gomes, A. R., Sanders, M. J., Illingworth, C. J. R., Billker, O., Berriman, M., & Lawniczak, M. K. (2018). Single-cell RNA-seq reveals hidden transcriptional variation in malaria parasites. *ELife*, *7*, e33105. https://doi.org/10.7554/eLife.33105

Ribaut, C., Berry, A., Chevalley, S., Reybier, K., Morlais, I., Parzy, D., Nepveu, F., Benoit-Vical, F., & Valentin, A. (2008). Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human Plasmodium species. *Malaria Journal*, *7*(1), 45. https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-45

Rihet, P. (2012). *Sélection naturelle de variants génétiques conférant une résistance au paludisme dans les populations humaines*. 16.

Robert, V., & Boudin, C. (2003). *Biologie de la transmission homme-moustique du Plasmodium.*

Robert, V., Tchuinkam, T., Mulder, B., Bodo, J. M., Verhave, J. P., Carnevale, P., & Nagel, R. L. (1996a). Effect of the sickle cell trait status of gametocyte carriers of Plasmodium falciparum on infectivity to anophelines. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *54*(2), 111-113. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.111

Robert, V., Tchuinkam, T., Mulder, B., Bodo, J. M., Verhave, J. P., Carnevale, P., & Nagel, R. L. (1996b). Effect of the sickle cell trait status of gametocyte carriers of Plasmodium falciparum on infectivity to anophelines. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *54*(2), Art. 2. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.111

Rodriguez-Barraquer, I., Arinaitwe, E., Jagannathan, P., Kamya, M. R., Rosenthal, P. J., Rek, J., Dorsey, G., Nankabirwa, J., Staedke, S. G., Kilama, M., Drakeley, C., Ssewanyana, I., Smith, D. L., & Greenhouse, B. (2018). Quantification of anti-parasite and anti-

disease immunity to malaria as a function of age and exposure. *eLife*, *7*, e35832. https://doi.org/10.7554/eLife.35832

Roesch, C. (2020). *Invasion et développement de Plasmodium vivax dans les réticulocytes humains : Association phénotype -génotype de la réponse aux inhibiteurs* [Université de Montpellier]. https://www.theses.fr/244367272

Rogier, C., Commenges, D., & Trape, J. F. (1996). Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of Plasmodium falciparum parasitemia in highly endemic populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *54*(6), 613-619. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.613

Roth, E. F., Friedman, M., Ueda, Y., Tellez, I., Trager, W., & Nagel, R. L. (1978). Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with Plasmodium falciparum malaria. *Science (New York, N.Y.)*, *202*(4368), 650-652. https://doi.org/10.1126/science.360396

Rovira-Vallbona, E., Contreras-Mancilla, J. J., Ramirez, R., Guzmán-Guzmán, M., Carrasco-Escobar, G., Llanos-Cuentas, A., Vinetz, J. M., Gamboa, D., & Rosanas-Urgell, A. (2017). Predominance of asymptomatic and sub-microscopic infections characterizes the Plasmodium gametocyte reservoir in the Peruvian Amazon. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(7), e0005674. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005674

Russo, G., Faggioni, G., Paganotti, G. M., Djeunang Dongho, G. B., Pomponi, A., De Santis, R., Tebano, G., Mbida, M., Sanou Sobze, M., Vullo, V., Rezza, G., & Lista, F. R. (2017). Molecular evidence of Plasmodium vivax infection in Duffy negative symptomatic individuals from Dschang, West Cameroon. *Malaria Journal*, *16*(1), 74. https://doi.org/10.1186/s12936-017-1722-2

Rutledge, L., Ward, R., & Gould, D. (1964). Studies on the feeding réponse des moustiques aux solutions nutritives dans un nouveau mangeur membranaire. *Mosquito News*, *24*(4), 407-419.

Saelens, J. W., Petersen, J. E. V., Freedman, E., Moseley, R. C., Konaté, D., Diakité, S. A. S., Traoré, K., Vance, N., Fairhurst, R. M., Diakité, M., Haase, S. B., & Taylor, S. M. (2021). Impact of Sickle Cell Trait Hemoglobin on the Intraerythrocytic Transcriptional Program of Plasmodium falciparum. *MSphere*, *6*(5), e0075521. https://doi.org/10.1128/mSphere.00755-21

Saiki, R. K., Chang, C. an, Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H., & Erlich, H. A. (1988). Diagnosis of Sickle Cell Anemia and β-Thalassemia with Enzymatically Amplified DNA and Nonradioactive Allele-Specific Oligonucleotide

Probes. *New England Journal of Medicine*, *319*(9), Art. 9. https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190903

Saito, F., Hirayasu, K., Satoh, T., Wang, C. W., Lusingu, J., Arimori, T., Shida, K., Palacpac, N. M. Q., Itagaki, S., Iwanaga, S., Takashima, E., Tsuboi, T., Kohyama, M., Suenaga, T., Colonna, M., Takagi, J., Lavstsen, T., Horii, T., & Arase, H. (2017). Immune evasion of Plasmodium falciparum by RIFIN via inhibitory receptors. *Nature*, *552*(7683), 101-105. https://doi.org/10.1038/nature24994

Salanti, A., Dahlbäck, M., Turner, L., Nielsen, M. A., Barfod, L., Magistrado, P., Jensen, A. T. R., Lavstsen, T., Ofori, M. F., Marsh, K., Hviid, L., & Theander, T. G. (2004). Evidence for the Involvement of VAR2CSA in Pregnancy-associated Malaria. *The Journal of Experimental Medicine*, *200*(9), 1197-1203. https://doi.org/10.1084/jem.20041579

Salomao, M., Zhang, X., Yang, Y., Lee, S., Hartwig, J. H., Chasis, J. A., Mohandas, N., & An, X. (2008). Protein 4.1R-dependent multiprotein complex : New insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(23), 8026-8031. https://doi.org/10.1073/pnas.0803225105

Sampaio, N. G., Eriksson, E. M., & Schofield, L. (2017). Plasmodium falciparum PfEMP1 Modulates Monocyte/Macrophage Transcription Factor Activation and Cytokine and Chemokine Responses. *Infection and Immunity*, *86*(1), e00447-17. https://doi.org/10.1128/IAI.00447-17

Sanders, P. R., Kats, L. M., Drew, D. R., O'Donnell, R. A., O'Neill, M., Maier, A. G., Coppel, R. L., & Crabb, B. S. (2006). A Set of Glycosylphosphatidyl Inositol-Anchored Membrane Proteins of Plasmodium falciparum Is Refractory to Genetic Deletion. *Infection and Immunity*, *74*(7), 4330-4338. https://doi.org/10.1128/IAI.00054-06

Sandeu, M. M., Bayibéki, A. N., Tchioffo, M. T., Abate, L., Gimonneau, G., Awono-Ambéné, P. H., Nsango, S. E., Diallo, D., Berry, A., Texier, G., & Morlais, I. (2017). Do the venous blood samples replicate malaria parasite densities found in capillary blood? A field study performed in naturally-infected asymptomatic children in Cameroon. *Malaria Journal*, *16*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1186/s12936-017-1978-6

Sass, M. D., Vorsanger, E., & Spear, P. W. (1964). Enzyme activity as an indicator of red cell age. *Clinica Chimica Acta*, *10*(1), 21-26. https://doi.org/10.1016/0009-8981(64)90210-4

Satchwell, T. J. (2016). Erythrocyte invasion receptors for Plasmodium falciparum : New and old. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, *26*(2), 77-88. https://doi.org/10.1111/tme.12280

Schofield, L., & Mueller, I. (2006). Clinical immunity to malaria. *Current Molecular Medicine*, *6*(2), 205-221. https://doi.org/10.2174/156652406776055221

Sergent, E., & Sergent, E. (1952). *Recherches expérimentales sur l'infection latent et la prémunition dans le paludisme*. *30*(3), 203-239. Institut Pasteur d'Algérie.

Silvestrini, F., Tibúrcio, M., Bertuccini, L., & 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*(2), e31567. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031567

Singer, I. (1953). The effect of x irradiation on infections with Plasmodium berghei in the white mouse. *The Journal of Infectious Diseases*, *92*(1), 97-104. https://doi.org/10.1093/infdis/92.1.97

Singh, B., Kim Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S. G., Cox-Singh, J., Thomas, A., & Conway, D. J. (2004). A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet (London, England)*, *363*(9414), 1017-1024. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15836-4

Singh, J. K., & van Attikum, H. (2021). DNA double-strand break repair : Putting zinc fingers on the sore spot. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *113*, 65-74. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.09.003

Singh, S., Alam, M. M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J. A., & Chitnis, C. E. (2010). Distinct External Signals Trigger Sequential Release of Apical Organelles during Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *PLOS Pathogens*, *6*(2), e1000746. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000746

Sinha, A., Hughes, K. R., Modrzynska, K. K., Otto, T. D., Pfander, C., Dickens, N. J., Religa, A. A., Bushell, E., Graham, A. L., Cameron, R., Kafsack, B. F. C., Williams, A. E., Llinas, M., Berriman, M., Billker, O., & Waters, A. P. (2014). A cascade of DNA binding proteins for sexual commitment and development in Plasmodium. *Nature*, *507*(7491), 253-257. https://doi.org/10.1038/nature12970

Slater, H. C., Foy, B. D., Kobylinski, K., Chaccour, C., Watson, O. J., Hellewell, J., Aljayyoussi, G., Bousema, T., Burrows, J., D'Alessandro, U., Alout, H., Ter Kuile, F. O., Walker, P. G. T., Ghani, A. C., & Smit, M. R. (2020). Ivermectin as a novel

complementary malaria control tool to reduce incidence and prevalence : A modelling study. *The Lancet. Infectious Diseases*, *20*(4), 498-508. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30633-4

Slater, H. C., Ross, A., Felger, I., Hofmann, N. E., Robinson, L., Cook, J., Gonçalves, B. P., Björkman, A., Ouedraogo, A. L., Morris, U., Msellem, M., Koepfli, C., Mueller, I., Tadesse, F., Gadisa, E., Das, S., Domingo, G., Kapulu, M., Midega, J., … Okell, L. C. (2019). Author Correction : The temporal dynamics and infectiousness of subpatent Plasmodium falciparum infections in relation to parasite density. *Nature Communications*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-019-10790-0

Slater, H. C., Ross, A., Ouédraogo, A. L., White, L. J., Nguon, C., Walker, P. G. T., Ngor, P., Aguas, R., Silal, S. P., Dondorp, A. M., La Barre, P., Burton, R., Sauerwein, R. W., Drakeley, C., Smith, T. A., Bousema, T., & Ghani, A. C. (2015). Assessing the impact of next-generation rapid diagnostic tests on Plasmodium falciparum malaria elimination strategies. *Nature*, *528*(7580), S94-101. https://doi.org/10.1038/nature16040

Smith, J. D., Craig, A. G., Kriek, N., Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagen, T., Pinches, R., Baruch, D. I., Newbold, C. I., & Miller, L. H. (2000). Identification of a Plasmodium falciparum intercellular adhesion molecule-1 binding domain : A parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(4), 1766-1771. https://doi.org/10.1073/pnas.040545897

Sondo, P., Derra, K., Rouamba, T., Nakanabo Diallo, S., Taconet, P., Kazienga, A., Ilboudo, H., Tahita, M. C., Valéa, I., Sorgho, H., Lefèvre, T., & Tinto, H. (2020). Determinants of Plasmodium falciparum multiplicity of infection and genetic diversity in Burkina Faso. *Parasites & Vectors*, *13*, 427. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04302-z

Song, Y., Fahs, A., Feldman, C., Shah, S., Gu, Y., Wang, Y., Machado, R. F., Wunderink, R. G., & Chen, J. (2013). A reliable and effective method of DNA isolation from old human blood paper cards. *SpringerPlus*, *2*, 616. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-616

Srinivasan, P., Beatty, W. L., Diouf, A., Herrera, R., Ambroggio, X., Moch, J. K., Tyler, J. S., Narum, D. L., Pierce, S. K., Boothroyd, J. C., Haynes, J. D., & Miller, L. H. (2011). Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(32), 13275-13280. https://doi.org/10.1073/pnas.1110303108

Srivastava, A., Creek, D. J., Evans, K. J., De Souza, D., Schofield, L., Müller, S., Barrett, M. P., McConville, M. J., & Waters, A. P. (2015). Host Reticulocytes Provide Metabolic

Reservoirs That Can Be Exploited by Malaria Parasites. *PLOS Pathogens*, *11*(6), Art. 6. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004882

Stanisic, D. I., Fowkes, F. J. I., Koinari, M., Javati, S., Lin, E., Kiniboro, B., Richards, J. S., Robinson, L. J., Schofield, L., Kazura, J. W., King, C. L., Zimmerman, P., Felger, I., Siba, P. M., Mueller, I., & Beeson, J. G. (2015). Acquisition of Antibodies against Plasmodium falciparum Merozoites and Malaria Immunity in Young Children and the Influence of Age, Force of Infection, and Magnitude of Response. *Infection and Immunity*, *83*(2), 646-660. https://doi.org/10.1128/IAI.02398-14

Stevens-Hernandez, C. J., & Bruce, L. J. (2022). Reticulocyte Maturation. *Membranes*, *12*(3), Art. 3. https://doi.org/10.3390/membranes12030311

Stone, W., Gonçalves, B. P., Bousema, T., & Drakeley, C. (2015). Assessing the infectious reservoir of falciparum malaria : Past and future. *Trends in Parasitology*, *31*(7), Art. 7. https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.04.004

Stone, W. J. R., Campo, J. J., Ouédraogo, A. L., Meerstein-Kessel, L., Morlais, I., Da, D., Cohuet, A., Nsango, S., Sutherland, C. J., van de Vegte-Bolmer, M., Siebelink-Stoter, R., van Gemert, G.-J., Graumans, W., Lanke, K., Shandling, A. D., Pablo, J. V., Teng, A. A., Jones, S., de Jong, R. M., … Jore, M. M. (2018). Unravelling the immune signature of Plasmodium falciparum transmission-reducing immunity. *Nature Communications*, *9*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02646-2

Su, X. Z., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P., Guinet, F., Herrfeldt, J. A., Peterson, D. S., Ravetch, J. A., & 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*(1), 89-100. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90055-1

Sumari, D., Mwingira, F., Selemani, M., Mugasa, J., Mugittu, K., & Gwakisa, P. (2017). Malaria prevalence in asymptomatic and symptomatic children in Kiwangwa, Bagamoyo district, Tanzania. *Malaria Journal*, *16*(1), 222. https://doi.org/10.1186/s12936-017-1870-4

Ta, T. H., Hisam, S., Lanza, M., Jiram, A. I., Ismail, N., & Rubio, J. M. (2014). First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. *Malaria Journal*, *13*, 68. https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-68

Tabue, R. N., Awono-Ambene, P., Etang, J., Atangana, J., C, A.-N., Toto, J. C., Patchoke, S., Leke, R. G. F., Fondjo, E., Mnzava, A. P., Knox, T. B., Tougordi, A., Donnelly, M. J.,

& Bigoga, J. D. (2017). Role of Anopheles (Cellia) rufipes (Gough, 1910) and other local anophelines in human malaria transmission in the northern savannah of Cameroon : A cross-sectional survey. *Parasites & Vectors*, *10*(1), 22. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1933-3

Tadesse, F. G., Meerstein-Kessel, L., Gonçalves, B. P., Drakeley, C., Ranford-Cartwright, L., & Bousema, T. (2019). Gametocyte Sex Ratio : The Key to Understanding Plasmodium falciparum Transmission? *Trends in Parasitology*, *35*(3), 226-238. https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.12.001

Tadesse, F. G., Slater, H. C., Chali, W., Teelen, K., Lanke, K., Belachew, M., Menberu, T., Shumie, G., Shitaye, G., Okell, L. C., Graumans, W., van Gemert, G.-J., Kedir, S., Tesfaye, A., Belachew, F., Abebe, W., Mamo, H., Sauerwein, R., Balcha, T., … Bousema, T. (2018). The Relative Contribution of Symptomatic and Asymptomatic Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum Infections to the Infectious Reservoir in a Low-Endemic Setting in Ethiopia. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *66*(12), 1883-1891. https://doi.org/10.1093/cid/cix1123

Talman, A. M., Domarle, O., McKenzie, F. E., Ariey, F., & Robert, V. (2004). Gametocytogenesis : The puberty of Plasmodium falciparum. *Malaria Journal*, *3*, 24. https://doi.org/10.1186/1475-2875-3-24

Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B. B., Siddiqui, A., Lao, K., & Surani, M. A. (2009). MRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature Methods*, *6*(5), 377-382. https://doi.org/10.1038/nmeth.1315

Tchuinkam, T., Mulder, B., Dechering, K., Stoffels, H., Verhave, J. P., Cot, M., Carnevale, P., Meuwissen, J. H., & Robert, V. (1993). Experimental infections of Anopheles gambiae with Plasmodium falciparum of naturally infected gametocyte carriers in Cameroon : Factors influencing the infectivity to mosquitoes. *Tropical Medicine and Parasitology: Official Organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft Fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, *44*(4), 271-276.

Tham, W.-H., Healer, J., & Cowman, A. F. (2012). Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of Plasmodium falciparum. *Trends in Parasitology*, *28*(1), 23-30. https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.10.002

Tham, W.-H., Wilson, D. W., Lopaticki, S., Schmidt, C. Q., Tetteh-Quarcoo, P. B., Barlow, P. N., Richard, D., Corbin, J. E., Beeson, J. G., & Cowman, A. F. (2010). Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for Plasmodium falciparum PfRh4 invasion ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(40), 17327-17332. https://doi.org/10.1073/pnas.1008151107

The RTS,S Clinical Trials Partnership (2014). (2014). Efficacy and Safety of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination : A Phase 3 Randomized, Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites. *PLoS Medicine*, *11*(7), e1001685. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001685

Thomson-Luque, R., Adams, J. H., Kocken, C. H. M., & Pasini, E. M. (2019). From marginal to essential : The golden thread between nutrient sensing, medium composition and Plasmodium vivax maturation in in vitro culture. *Malaria Journal*, *18*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1186/s12936-019-2949-x

Thomson-Luque, R., & Bautista, J. M. (2021). Home Sweet Home : Plasmodium vivax-Infected Reticulocytes—The Younger the Better? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.675156

Thomson-Luque, R., Wang, C., Ntumngia, F. B., Xu, S., Szekeres, K., Conway, A., Adapa, S. R., Barnes, S. J., Adams, J. H., & Jiang, R. H. Y. (2018). In-depth phenotypic characterization of reticulocyte maturation using mass cytometry. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *72*, 22-33. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2018.06.004

Tibúrcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P. A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P. H., Hardeman, M., Vernick, K. D., Sauerwein, R. W., Preiser, P. R., Mercereau-Puijalon, O., Buffet, P., Alano, P., & Lavazec, C. (2012a). A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. *Blood*, *119*(24), Art. 24. https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-414557

Tibúrcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P. A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P. H., Hardeman, M., Vernick, K. D., Sauerwein, R. W., Preiser, P. R., Mercereau-Puijalon, O., Buffet, P., Alano, P., & Lavazec, C. (2012b). A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages. *Blood*, *119*(24), e172-e180. https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-414557

Tibúrcio, M., Silvestrini, F., Bertuccini, L., Sander, A. F., Turner, L., Lavstsen, T., & Alano, P. (2013). Early gametocytes of the malaria parasite Plasmodium falciparum specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. *Cellular Microbiology*, *15*(4), 647-659. https://doi.org/10.1111/cmi.12062

Tishkoff, S. A., Varkonyi, R., Cahinhinan, N., Abbes, S., Argyropoulos, G., Destro-Bisol, G., Drousiotou, A., Dangerfield, B., Lefranc, G., Loiselet, J., Piro, A., Stoneking, M., Tagarelli, A., Tagarelli, G., Touma, E. H., Williams, S. M., & Clark, A. G. (2001). Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD : Recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5529), 455-462. https://doi.org/10.1126/science.1061573

Tonkin, M. L., Roques, M., Lamarque, M. H., Pugnière, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., & Boulanger, M. J. (2011). Host cell invasion by apicomplexan parasites : Insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science (New York, N.Y.)*, *333*(6041), 463-467. https://doi.org/10.1126/science.1204988

Trager, W., & Gill, G. S. (1992). Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by Plasmodium falciparum in vitro. *The Journal of Protozoology*, *39*(3), 429-432. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1992.tb01476.x

Trager, W., Gill, G. S., Lawrence, C., & Nagel, R. L. (1999). Plasmodium falciparum : Enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. *Experimental Parasitology*, *91*(2), 115-118. https://doi.org/10.1006/expr.1998.4347

Triglia, T., Healer, J., Caruana, S. R., Hodder, A. N., Anders, R. F., Crabb, B. S., & Cowman, A. F. (2000). Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species. *Molecular Microbiology*, *38*(4), 706-718. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02175.x

Tripathi, A. K., Oakley, M. S., Verma, N., Mlambo, G., Zheng, H., Meredith, S. M., Essuman, E., Puri, A., Skelton, R. A., Takeda, K., Majam, V., Quakyi, I. A., Locke, E., Morin, M., Miura, K., Long, C. A., & Kumar, S. (2021). *Plasmodium falciparum* Pf77 and male development gene 1 as vaccine antigens that induce potent transmission-reducing antibodies. *Science Translational Medicine*, *13*(597), eabg2112. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abg2112

Tuedom, A. G. B., Sarah-Matio, E. M., Moukoko, C. E. E., Feufack-Donfack, B. L., Maffo, C. N., Bayibeki, A. N., Awono-Ambene, H. P., Ayong, L., Berry, A., Abate, L., Morlais, I., & Nsango, S. E. (2021). Antimalarial drug resistance in the Central and Adamawa

regions of Cameroon : Prevalence of mutations in P. falciparum crt, Pfmdr1, Pfdhfr and Pfdhps genes. *PLOS ONE*, *16*(8), e0256343. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256343

Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S. S., Wang, C. W., Petersen, J. E. V., Avril, M., Brazier, A. J., Freeth, J., Jespersen, J. S., Nielsen, M. A., Magistrado, P., Lusingu, J., Smith, J. D., Higgins, M. K., & Theander, T. G. (2013). Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*, *498*(7455), 502-505. https://doi.org/10.1038/nature12216

Usui, M., Prajapati, S. K., Ayanful-Torgby, R., Acquah, F. K., Cudjoe, E., Kakaney, C., Amponsah, J. A., Obboh, E. K., Reddy, D. K., Barbeau, M. C., Simons, L. M., Czesny, B., Raiciulescu, S., Olsen, C., Abuaku, B. K., Amoah, L. E., & Williamson, K. C. (2019). Plasmodium falciparum sexual differentiation in malaria patients is associated with host factors and GDV1-dependent genes. *Nature Communications*, *10*, 2140. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10172-6

Vafa, M., Troye-Blomberg, M., Anchang, J., Garcia, A., & Migot-Nabias, F. (2008). Multiplicity of Plasmodium falciparum infection in asymptomatic children in Senegal : Relation to transmission, age and erythrocyte variants. *Malaria Journal*, *7*(1), 17. https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-17

Venugopal, K., Hentzschel, F., Valkiūnas, G., & Marti, M. (2020). Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(3), Art. 3. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0306-2

Vigário, A. M., Belnoue, E., Cumano, A., Marussig, M., Miltgen, F., Landau, I., Mazier, D., Gresser, I., & Rénia, L. (2001). Inhibition of Plasmodium yoelii blood-stage malaria by interferon α through the inhibition of the production of its target cell, the reticulocyte. *Blood*, *97*(12), 3966-3971. https://doi.org/10.1182/blood.V97.12.3966

Villeval, J. L., Lew, A., & Metcalf, D. (1990). Changes in hemopoietic and regulator levels in mice during fatal or nonfatal malarial infections. I. Erythropoietic populations. *Experimental Parasitology*, *71*(4), 364-374. https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90062-h

Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T. Y., Whitehead, L. W., Chen, L., Lampe, M., Tham, W.-H., Wilson, D., Nebl, T., Marapana, D., Triglia, T., Wong, W., Rogers, K. L., & Cowman, A. F. (2016). Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during Plasmodium falciparum Invasion of

Erythrocytes. *Cell Host & Microbe*, *20*(1), 60-71. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.004

Walldorf, J. A., Cohee, L. M., Coalson, J. E., Bauleni, A., Nkanaunena, K., Kapito-Tembo, A., Seydel, K. B., Ali, D., Mathanga, D., Taylor, T. E., Valim, C., & Laufer, M. K. (2015). School-Age Children Are a Reservoir of Malaria Infection in Malawi. *PLOS ONE*, *10*(7), e0134061. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134061

Waugh, R. E., Mantalaris, A., Bauserman, R. G., Hwang, W. C., & Wu, J. H. D. (2001). Membrane instability in late-stage erythropoiesis. *Blood*, *97*(6), 1869-1875. https://doi.org/10.1182/blood.V97.6.1869

Weiss, G. E., Crabb, B. S., & Gilson, P. R. (2016). Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion. *Trends in Parasitology*, *32*(4), 284-295. https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.007

Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W.-H., Jong, N. W. M. de, Harvey, K. L., Fowkes, F. J. I., Barlow, P. N., Rayner, J. C., Wright, G. J., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2015). Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *PLOS Pathogens*, *11*(2), e1004670. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004670

WHO. (2016). *World malaria report 2016*.

WHO. (2019a). *World malaria report 2019*. 232.

WHO. (2019b). *World malaria report 2019*. 232.

WHO. (2020). *World malaria report 2020*. https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791

WHO. (2021). *World malaria report 2021* (p. 322). World Health Organization. https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021

Williams, T. N. (2006). Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Current Opinion in Microbiology*, *9*(4), 388-394. https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.009

Williams, T. N., Mwangi, T. W., Wambua, S., Alexander, N. D., Kortok, M., Snow, R. W., & Marsh, K. (2005). Sickle Cell Trait and the Risk of Plasmodium falciparum Malaria and Other Childhood Diseases. *The Journal of Infectious Diseases*, *192*(1), 178-186. https://doi.org/10.1086/430744

Wilson, M. C., Trakarnsanga, K., Heesom, K. J., Cogan, N., Green, C., Toye, A. M., Parsons, S. F., Anstee, D. J., & Frayne, J. (2016). Comparison of the Proteome of Adult and Cord

Erythroid Cells, and Changes in the Proteome Following Reticulocyte Maturation. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *15*(6), 1938-1946. https://doi.org/10.1074/mcp.M115.057315

Wilson, R. J. M., Pasvol, G., & Weatherall, D. J. (1977). Invasion and growth of Plasmodium falciparum in different types of human erythrocyte. *Bulletin of the World Health Organization*, *55*(2-3), 179-186.

Wondji, C., Simard, F., Petrarca, V., Etang, J., Santolamazza, F., Torre, A. D., & Fontenille, D. (2005). Species and Populations of the Anopheles gambiae Complex in Cameroon with Special Emphasis on Chromosomal and Molecular Forms of Anopheles gambiae s.s. *Journal of Medical Entomology*, *42*(6), 998-1005. https://doi.org/10.1093/jmedent/42.6.998

World SCD 2021 : Le Nigeria, épicentre mondial de la drépanocytose, ne fait pas assez pour lutter contre la maladie. (2021, juin 19). https://www.premiumtimesng.com/news/headlines/468767-world-scd-2021-nigeria-global-epicentre-of-sickle-cell-not-doing-enough-to-tackle-disease.html

Wright, G. J., & Rayner, J. C. (2014). Plasmodium falciparum Erythrocyte Invasion : Combining Function with Immune Evasion. *PLOS Pathogens*, *10*(3), e1003943. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003943

Wu, Y., Ellis, R. D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E. M., Mahanty, S., Fay, M. P., Narum, D., Rausch, K., Miles, A. P., Aebig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., … Durbin, A. P. (2008). Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PloS One*, *3*(7), e2636. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002636

Zhou, G., Yewhalaw, D., Lo, E., Zhong, D., Wang, X., Degefa, T., Zemene, E., Lee, M., Kebede, E., Tushune, K., & Yan, G. (2016). Analysis of asymptomatic and clinical malaria in urban and suburban settings of southwestern Ethiopia in the context of sustaining malaria control and approaching elimination. *Malaria Journal*, *15*(1), 250. https://doi.org/10.1186/s12936-016-1298-2

Zuckerman, A. (1957). Blood Loss and Replacement in Plasmodial Infections I. Plasmodium Berghei in Untreated Rats of Varying Age and in Adult Rats with Erythropoietic Mechanisms Manipulated before Inoculation. *The Journal of Infectious Diseases*, *100*(2), 172-206. https://doi.org/10.1093/infdis/100.2.172

ANNEXE

Liste des présentations

Poster: Christelle M. Ngou, Albert N. Bayibéki, Luc Abate, Olesula S. Makinde, Lionel B. Feufack-Donfack, Elangwe M. Sarah-Matio, Gaelle A. Bouopda, Paul Taconet, Parfait H. Awono-Ambéné, Arthur Talman, Lawrence Ayong, Antoine Berry,Sandrine E. Nsango and Isabelle Morlais avec pour thème « Influence of sickle cell trait on *Plasmodium falciparum* transmission in naturally infected gametocyte carriers » présentéeà l'école d'été RIVE « one health » le 07 Septembre 2022 dans le hall du batiment 36 campus Triolet.

Présentation orale à la conférence BioMalPar XVIII à l'EMBL de Heidelberg en Allemagne du 23-25 Mai 2022 sous le thème « Host cell preference of asexual and sexual malaria parasites in naturally-infected carriers **».**

Présentation orale lors de la journée GDRI-SUD IRD-GRAVIR (Groupement de Recherche sur les Arthropodes Vecteurs en afrIque centRale) du 27 Octobre 2021 au Centre Pasteur du Cameroun sous le thème « Determination of factors associated with sexual commitment rings **».**

Poster: **Christelle Maffo Ngou**, Alejandro Marin-Menendez, Ange Tchakounte, Luc Abate, Lawrence Ayong, Sandrine Nsango, Isabelle Morlais, Arthur Talman avec pour thème « Determination of factors associated with sexual commitment rings **»** présentée à l'école d'été RIVE « Santé Globale **»** à l'institut botanique de Montpellier le 08 Septembre 2021.

Poster et présentation orale au Symposium scientifique pour les 60 ans du Centre Pasteur du Cameroun au Palais de Congrès de Yaoundé intitulé « Les avancées scientifiques au service du contrôle des maladies infectieuses **»** du 14-15 Novembre 2019**.**

Liste des publications sur la période de la thèse

En collaboration

Mairet-khedim, M., Nsango, S., **Ngou, C.,** Menard, S., Roesh, C., Khim, N., Srun, S., Iriart, X., Lanot, T.…Berry, A. (2021). Efficacy of dihydroartemisinin/piperaquine in patients with non-complicated *Plasmodium falciparum* malaria in Yaoundé, Cameroon. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 76 (Issue11), 3037-3044.

Tuedom, A.G., Sarah-Matio, E.M., Moukoko, C., Feufack-Donfack, B., **Ngou, C**., Bayibeki, A …Nsango, E.S. (2021). Antimalarial drug resistance in the Central and Adamawa regions of Cameroon: Prevalence of mutations in *P. falciparum* crt, Pfmdr1, Pfdhfr and Pfdhps genes. *Plos ONE*, 16(8).

Feufack-Donfack, B., Sarah-Matio, E.M., Abate, L., Tuedom, A.G., Bayibeki, A., **Ngou, C**.… Nsango, E.S. (2021).Epidemiological and entomological studies of malaria transmission in Tibati, Adamawa region of Cameroon 6 years following the introduction of long-lasting insecticide nets. Parasite & Vectors, 14, 247.

Sarah-Matio SM, Guillochon E, Nsango SE, Abate L, **Ngou CM**, Bouopda GA, Feufack-Donfack LB, Bayibeki AN, M. TT, Talman AM, Marin-Menendez A, Ayong A, Claessens A, Lefevre T, Berry A, Morlais I. (2022). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and distribution of anti-malarial drug resistance mutations in symptomatic and asymptomatic infections. *Antimicrob Agents Chemother*. *2022*

En cours de publication

Christelle M. Ngou,Albert N. Bayibéki, Luc Abate, Olesula S. Makinde, Lionel B. Feufack-Donfack, Elangwe M. Sarah-Matio, Gaelle A. Bouopda, Paul Taconet, Parfait H. Awono-Ambéné, Arthur Talman, Lawrence Ayong, Antoine Berry, Sandrine E. Nsango, and Isabelle Morlais. Influence of sickle cell trait on *Plasmodium falciparum* transmission in naturally infected gametocyte carriers. En cours de revision à BMJ (2022)

Ngou MC, Marin-Menendez A, Abate L, Delorme Q, Cassan C, Tchakounte A, Cheteug NG, Tuedom GA, Feufack-Donfack LB, Sarah-Matio E, Ayong L, Dechavanne C, Poinsignon A, Heaton H, Howick VM, Nsango SE , Morlais I, Talman AM. *Plasmodium falciparum* preferentially invades and commits to sex in younger erythrocytes. En cours de soumission à Science advances (2022)