NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
Le 28 mars 2025 par

Mathieu ADJEMOUT

Prédisposition génétique au paludisme : Profils génomiques et transcriptionnels pour l'identification de variants régulateurs spécifiques de types cellulaires

Discipline
Sciences du Vivant

Spécialité
Génomique et Bioinformatique

École doctorale
Ecole Doctorale 658 – Sciences du Vivant

Laboratoire de recherche
TAGC – Theories and Approaches of Genomic Complexity

Composition du jury

Emmanuelle GENIN DR - GGB	Rapporteuse
David COURTIN CR - IRD	Rapporteur
Mickaël MENAGER DR - Imagine	Examinateur
Christophe CHEVILLARD DR - TAGC	Président du jury
Sandrine MARQUET CR - TAGC	Directrice de thèse
Pascal RIHET Pr Emérite - TAGC	Co-directeur de thèse

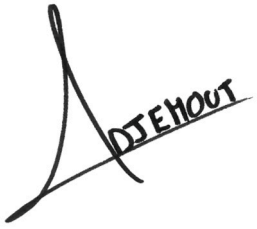
Affidavit

Je soussigné, Mathieu ADJEMOUT, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Sandrine MARQUET et Pascal RIHET, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 23 janvier 2025

Mathieu ADJEMOUT



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste De Publications Et Participation Aux Conférences

I. Liste Des Publications Réalisées Dans Le Cadre Du Projet De Thèse

Adjemout, M., Nisar, S., Escandell, A., Huu, H. T. N., Torres, M., Thiam, A., Manosalva, I., Mbengue, B., Dieye, A., Spicuglia, S., Rihet, P., & Marquet, S. (2024). Unraveling a novel dual-function regulatory element showing epistatic interaction with a variant that escapes genome-wide association studies. **bioRxiv**. https://doi.org/10.1101/2024.03.18.585566

Adjemout, M., Gallardo, F., Torres, M., Thiam, A., Mbengue, B., Dieye, A., Marquet, S., & Rihet, P. (2024). From genome-wide association studies to functional variants: ARL14 Cis-regulatory variants are associated with severe malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, 230(3), e743-e752.

Adjemout, M., Pouvelle, B., Thiam, F., Thiam, A., Torres, M., Nisar, S., Mbengue, B., Dieye, A., Rihet, P., & Marquet, S. (2023). Concurrent PIEZO1 activation and ATP2B4 blockade effectively reduce the risk of cerebral malaria and inhibit in vitro Plasmodium falciparum multiplication in red blood cells. **Genes & Diseases**, 10(6), 2210-2214.

Dieppois, C., **Adjemout, M.,** Cretin, J., Gallardo, F., Torres, M., Picard, C., Sawadogo, S. A., Rihet, P., & Paul, P. (2024). An expression quantitative trait locus of Fc gamma receptor genes is associated with anti-malarial IgG responses and infection levels in Burkinabe families. **The Journal of Infectious Diseases**. https://doi.org/10.1093/infdis/jiae528

Cretin, J., **Adjemout, M.,** Dieppois, C., Gallardo, F., Torres, M., Merard, Z., Sawadogo, S. A., Picard, C., Rihet, P., & Paul, P. (2023). A non-coding Fc gamma receptor Cis-regulatory variant within the 1q23 gene cluster is associated with Plasmodium falciparum infection in children residing in Burkina Faso**. International Journal of Molecular Sciences**, 24(21), 15711.

Thiam, A., Nisar, S., **Adjemout, M.,** Gallardo, F., Ka, O., Mbengue, B., Diop, G., Dieye, A., Marquet, S., & Rihet, P. (2023). ATP2B4 regulatory genetic variants are associated with mild malaria. **Malaria Journal**, 22(1), 68.

II. Participation Aux Conférences Et Ecoles D'été Au Cours De La Période De Thèse

Chromatin Meets South - 2024

Présentation oral

Titre: Unraveling a novel dual-function regulatory element showing epistatic interaction with a variant that escapes GWAS

MarMaRa Annual Symposium - Rare Diseases and Beyond: Navigating the Societal and Environmental Challenges - 2024

Présentation poster

Titre: From GWAS to functional variants: ARL14 cis-regulatory variants are associated with severe malaria

EMBO Workshop - Enhanceropathies: Understanding enhancer function to understand human disease - 2023

Présentation poster

Titre: From GWAS to functional variants: ARL14 cis-regulatory variants are associated with severe malaria

MarMaRa Annual Symposium - 2022

Présentation Oral

Titre: Characterization of the functional role of Piezo1 coding variant associated with the most severe clinical manifestations of malaria infection

Résumé

Le paludisme est responsable de nombreux décès chaque année, principalement causés par *Plasmodium falciparum*. Les études de gènes candidats et les études d'association pangénomique ont montré l'association de plusieurs variants génétiques avec la résistance ou la susceptibilité au paludisme, révélant ainsi le rôle clé des facteurs génétiques de l'hôte. Aujourd'hui, le défi réside dans l'identification des variants génétiques causaux, souvent en déséquilibre de liaison avec les tagSNPs.

Mon travail de thèse a permis d'identifier de nouveaux variants régulateurs et de décrypter des mécanismes aux niveaux moléculaire et cellulaire pouvant expliquer en partie le contrôle de l'infection et la susceptibilité aux formes cliniques. En adoptant une approche intégrative combinant bioinformatique, génétique et analyses fonctionnelles, mes recherches ont permis de mettre en lumière un nouvel élément régulateur et des mécanismes complexes résultant de l'interaction de plusieurs variants génétiques.

J'ai également exploré l'effet de ces interactions sur les réseaux de régulations multigéniques en montrant comment ils modulent l'expression génique et altèrent certains processus physiologiques dans des types cellulaires particuliers.

Ainsi, ces découvertes m'ont permis d'apporter de nouvelles connaissances dans la compréhension des mécanismes biologiques tels que, l'homéostasie calcique et l'activation de cellules immunitaires dans le contexte des infections palustres. Ce travail propose des pistes prometteuses pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques et préventives contre le paludisme grave, contribuant ainsi à un champ de recherche en pleine évolution.

Mots-clés : Génome-scan, Paludisme, Variants Régulateurs, Transcriptomique, Cellule Unique

Abstract

Malaria is responsible for numerous deaths each year, primarily caused by *Plasmodium falciparum*. Candidate gene studies and genome-wide association studies have identified several genetic variants associated with resistance or susceptibility to malaria, highlighting the key role of host genetic factors. Today, the challenge lies in identifying causal genetic variants, which are often in linkage disequilibrium with tagSNPs.

My PhD work has led to the identification of novel regulatory variants and the elucidation of molecular and cellular mechanisms that partially explain infection control and susceptibility to clinical forms. By adopting an integrative approach that combines bioinformatics, genetics, and functional analyses, my research has uncovered a novel regulatory element and complex mechanisms resulting from the interaction of multiple genetic variants.

I have also explored the effect of these interactions on multigenic regulatory networks, demonstrating how they modulate gene expression and alter specific physiological processes in particular cell types.

These discoveries have provided new insights into biological mechanisms such as calcium homeostasis and immune cell activation in the context of malaria infections. This work offers promising avenues for the development of novel therapeutic and preventive approaches against severe malaria, thereby contributing to a rapidly evolving field of research.

Keywords: Genome-wide scan, Malaria, Regulatory Variants, Transcriptomics, Single-cell

Remerciements

C'est le cœur serré que je commence à écrire cette partie que sont les remerciements. Elle acte la fin de mes 3 ans et demi de thèse, qui ont été pour moi une aventure incroyable. Elles m'auront apporté énormément d'un point de vue professionnel, dans lequel j'ai pu évoluer et prendre mon indépendance dans un travail qui me passionne. Mais aussi personnel, en rencontrant des gens incroyables et qui, pour certains, continueront à m'accompagner, je l'espère, pour le reste de ma vie.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres de mon jury pour le temps et l'attention qu'ils ont consacrés à l'évaluation de mon travail, ainsi que pour leur déplacement jusqu'à Marseille afin de partager leur expertise et leurs précieuses connaissances.

Je tiens également à remercier Marmara pour leur soutien, qui m'a permis de poursuivre ma thèse pendant six mois et de rédiger ce manuscrit dans les meilleures conditions. Je suis également reconnaissant de l'opportunité qui m'a été offerte de prolonger mes recherches et de mener à bien les analyses Single Cell qui me tenaient particulièrement à cœur. Mais aussi Je remercie également le CNRS, qui m'a permis de réaliser des formations importantes pour ma carrière.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à mon comité de suivi de thèse, composé de Lydie et Pierre, pour leur précieux accompagnement tout au long de mes projets de recherche. Leur soutien et leurs conseils m'ont été d'une grande aide pour progresser efficacement. Je remercie aussi chaleureusement Lionel pour son apport dans les analyses Single Cell, ainsi que pour l'opportunité qu'il m'a offert d'enrichir mes compétences en bioinformatique.

Je voudrais bien sûr remercier mes encadrants de thèse, Sandrine et Pascal, qui m'ont soutenue. Merci Pascal de m'avoir enseigné la génétique, d'abord en cours, puis en thèse. Merci Sandrine de m'avoir poussée à me dépasser pendant ma thèse et à donner le maximum de moi-même pour être fière de mon travail. Merci à vous deux, cette réussite est aussi grâce à vous.

Par la suite, j'aimerais remercier d'abord l'intégralité du TAGC de manière générale. Mais plus particulièrement Magali et Frédéric pour leur aide au tout début, quand je suis arrivé en 2022, d'abord en master 2, puis en thèse. Mais aussi Bruno, qui m'a supporté pendant tout ce temps dans le bureau, et avec qui je ne compte plus le nombre de fois où il m'a dit "à tes souhaits" avec mes éternuements à répétition. Et bien sûr, à Gaël, et depuis peu Louis, qui ont su me supporter dans toutes mes plaintes (merci pour le chocolat, je te dois une tablette). Bien sûr, je n'oublie pas de remercier une personne qui a été présentée dans le bureau, Marie, qui m'a beaucoup aidé lors de mon arrivée en thèse.

Vient maintenant le moment où je dois remercier certaines personnes qui me sont chères dans un ordre précis. Mais si je mets l'un avant l'autre, ça risque de râler. Du coup, je ne sais pas... Qui mettre en premier ? Qui citer en premier ? Alors, ne m'en voulez pas pour l'ordre, j'ai décidé de procéder par ancienneté. Au moins, comme ça, il n'y aura pas de jaloux.

Et bien sûr, je voudrais commencer par la personne que je connais depuis le plus longtemps au labo : Juliette. Avant d'être une de mes meilleures amies, tu étais ma prof en TP ! Ensuite,

tu es devenue quelqu'un qui m'a beaucoup accompagné ces dernières années, et que je tiens à remercier du fond du cœur. Tu as toujours été là pour moi, dans toutes mes folies. N'oublie pas de m'appeler pour te déboîter (le dos bien sûr !). Je tiens à te remercier pour toutes ces fois où tu m'as accompagné en PCC avec gros costaud et Nikos.

Ainsi, je voudrais te dire merci Pauline. Toutes les trois, nous avons formé une petite équipe de choc pendant ces moments de ménage, et c'était vraiment super cool.

Par la suite, il y a quelqu'un qui est arrivé au labo en même temps que moi pour la thèse : Katell. Je voudrais remercier ma MJ préférée, avec qui nous avons passé de nombreuses heures à nous battre avec nullité alias l'araignée mais aussi pour se battre avec R. Je me souviens encore de ma réaction en découvrant son pipeline d'analyse…Une folie !

En tout cas, je tiens à la remercier énormément pour tous ces moments que nous avons partagés tous les trois avec Juliette Katell. À nous trois, on forme un cerveau… Et c'est déjà pas mal !

Je voudrais aussi remercier JC... alias Jean-Christophe. Ou est-ce l'inverse ? Je ne sais plus. En tout cas, je tiens à te remercier pour toutes ces fois où tu es venu me rendre fou dans mon bureau. Mais c'est de bonne guerre, je pense que ça a été réciproque. Merci pour ton aide et on sait tous les deux que lorsqu'il s'agit de faire une blague qui glisse... on sait où chercher, n'est-ce pas ?

Après, je voudrais bien entendu remercier une personne qui m'a accompagné lors de ma première année de monitorat : Samantha. Tu es aujourd'hui devenue l'une de mes amies les plus chères, avec qui j'ai énormément ri face à toutes ces histoires folles. Je te jure, un jour, tu devrais écrire un livre... ou même une série ! Franchement, Netflix l'achèterait tout de suite.

Bien entendu, merci à vous, Benoît et Nathalie. Je m'excuse d'avance, Benoît, de continuer à te rendre fou encore pour les prochains mois. Et merci, Nathalie, d'avoir été là pour me soutenir face aux expressions marseillaises que j'emploie, et que tu sembles être la seule, avec Benoît, à comprendre.

Merci à Julie, tu m'as soutenue ces derniers mois comme personne. Je partage énormément de temps maintenant avec toi et merci de supporter ma folie et mes plans foireux. Et merci de m'avoir aidée pour mon travail avec les deux seuls "single-cellistes" du TAGC. Ah ! D'ailleurs…

Ensuite, il y a tellement de personnes que je voudrais remercier, avec qui j'ai passé un peu moins de temps, mais que j'ai tout autant apprécié. Que ce soit Pierre, l'homme du Nord qui habite à Avignon, les stagiaires… euh, les doctorantes, Mathilde, qui a encaissé toutes mes remarques limites, et Lou, avec ton paquet de cartes ! Mais aussi Pauline Brochet, mon ancienne prof de GWAS, avec qui on s'est battu pour les dépendances R. Et aussi Lorena, Gaëlle, Hélléa, Thomas (Rosnet et Wolverine), merci d'avoir été présentes et de m'avoir soutenue.

Dans un cadre un peu moins formel, je voudrais remercier toute ma promo de master BSG. La meilleure promo avec les meilleures personnes que j'ai rencontrées, qui m'ont poussée à faire une thèse. Je ne peux pas vous citer toutes et tous, mais le groupe des Cassos se reconnaîtra !

Je voudrais aussi te remercier, Julie Bertaux. Merci de m'avoir accompagnée et soutenue durant toutes ces années. Je n'oublierai pas, tout de même, que tu m'as frappée en TP bio ! Nos chemins se sont séparés aujourd'hui, mais je te suis reconnaissante pour tout ce que tu m'as apporté durant ces années. Merci au combien tu as été là pendant tout ce temps.

Je voudrais aussi remercier le groupe OM Athlétisme, qui a été mon échappatoire et mon moment pour me défouler et dépenser mon énergie.

Je voudrais aussi remercier mes meilleurs amis Flo, alias le poteau. On se connaît depuis le CE2, et maintenant, interdiction de se perdre de vue. Merci de m'avoir aidée, tu fais partie des gens qui m'ont fait devenir la personne que je suis. Merci aussi à Yann pour tous tes précieux conseils et ton soutien avant et pendant ma thèse. Et bien sûr, merci aux Corses, Nico et Léa, pour tout et me supporter avec Flo et nos conneries.

Et bien sûr, je voudrais remercier toute ma famille, car grâce à vous, je ne serais pas là où je suis. Merci Papa et Maman pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je sais que vous allez dire que c'est normal, mais vous avez été les meilleurs parents. Merci de m'avoir transmis vos valeurs et d'avoir fait de moi la personne que je suis. J'ai enfin hâte de pouvoir venir plus souvent à Ancelle, ma maison. Merci ma sœur de m'avoir aidée toutes ces années, tu as été la meilleure, même si je devais ranger derrière toi. Tu m'as toujours protégée et soutenue dans mes projets. Merci Bof aussi, de m'avoir aidé et fait découvrir plein de choses, mais aussi de m'avoir montré à quel point faire un chantier avec toi, c'est dangereux ! Merci aussi à Mamie Bunny, tu m'as apporté beaucoup de sagesse, mais aussi des mots marseillais que pas tout le monde comprend au labo. Et j'ai une pensée pour toi Doli tu resteras à jamais de la famille.

Alors, merci à vous tous qui m'avez accompagnée tout au long de ces trois années de thèse.

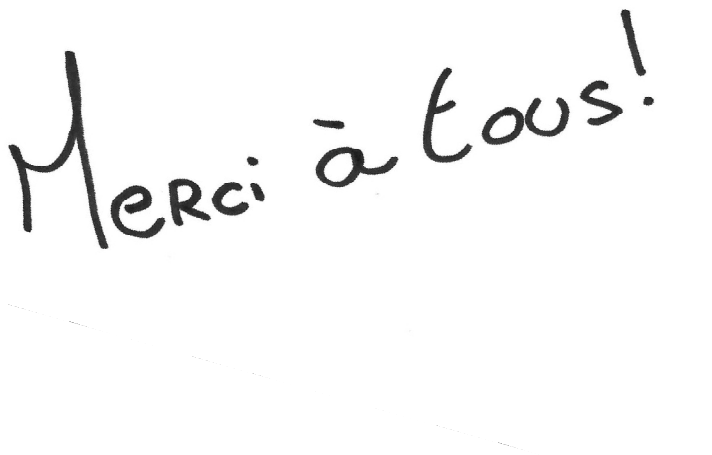


Table des Matières

AFFIDAVIT **1**

LISTE DE PUBLICATIONS ET PARTICIPATION AUX CONFERENCES **2**

I. LISTE DES PUBLICATIONS REALISEES DANS LE CADRE DU PROJET DE THESE **2**

II. PARTICIPATION AUX CONFERENCES ET ECOLES D'ETE AU COURS DE LA PERIODE DE THESE **3**

RESUME **4**

ABSTRACT **5**

REMERCIEMENTS **6**

TABLE DES MATIERES **9**

TABLE DES FIGURES **12**

INTRODUCTION **14**

I. PALUDISME : HISTOIRE, ÉVOLUTION ET DEFIS CONTEMPORAINS **14**

I.1. Histoire du Paludisme 14
I.2. Évolution Épidémiologique à l'Échelle Mondiale 15
I.3. Traitement et Prévention Actuels 18
I.4. Conséquence du Réchauffement Climatique 20

II. INFECTION PAR *PLASMODIUM FALCIPARUM* **21**

II.1. Cycle du Parasite 21
II.2. Formes Cliniques Associées au Paludisme 22
II.2.1. Formes Asymptomatique et Simple 23
II.2.2. Formes Graves 24
II.2.2.1. Le Neuropaludisme 25
II.2.2.2. L'Anémie Sévère 26
II.2.2.3. Le Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë 27
II.2.2.4. Les Autres Formes Cliniques 27

III. FACTEURS INFLUANT LE DEVENIR DE L'INFECTION **28**

III.1. Facteurs Socio-Économiques et Environnementaux 29
III.2. Facteurs de Virulence Parasite 30
III.3. Facteurs de l'Hôte 32
III.3.1. Facteur Immunitaire de l'Hôte 32
III.3.1.1. Phase Infectieuse Pré-hépatique 33
III.3.1.2. Phase Infectieuse Hépatique 34
III.3.1.3. Phase Infectieuse Erythrocytaire 36
III.3.2. Facteur Génétique de l'Hôte 42
III.3.2.1. Approche Gène Candidat 42
III.3.2.2. Approches Génome Entier 59

IV. IMPACT DES SNPS SUR LA REGULATION DE L'EXPRESSION GENETIQUE **74**

IV.1. Régulation de l'Expression des Gènes 74
IV.1.1. Mécanisme d'Ouverture de la Chromatine 74
IV.1.2. Éléments Régulateurs 77
IV.1.2.1. Promoteur 77
IV.1.2.2. Enhancer 78
IV.1.2.3. Silencer 78
IV.1.3. Interaction Promoteur-Enhancer-Silencer 79
IV.2. Rôles des SNPs Dans La Régulation De L'Expression 81

V. HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE 85

RESULTATS 87

I. IDENTIFICATION ET ANALYSE FONCTIONNELLE DES SNPS ASSOCIES AU PALUDISME GRAVE A PARTIR DES DONNEES DE GWAS 88

Article 1: From Genome-wide Association Studies to Functional Variants: ARL14 Cis-regulatory Variants Are Associated With Severe Malaria 88
Résultat Complémentaire Article 1 : Absence D'association Détectée Entre Les Variants De La Région De *KLHL3* Et Le Paludisme Grave 89

II. IMPACT DE VARIANTS MODIFIANT L'HOMEOSTASIE DU CALCIUM DANS LES GLOBULES ROUGES SUR LA SUSCEPTIBILITE AU PALUDISME 91

Article 2: ATP2B4 Regulatory Genetic Variants Are Associated With Mild Malaria 91
Article 3: Concurrent PIEZO1 Activation And ATP2B4 Blockade Effectively Reduce The Risk Of Cerebral Malaria And Inhibit *In Vitro Plasmodium Falciparum* Multiplication In Red Blood Cells 93

III. DECHIFFRAGE D'UN ELEMENT CIS-REGULATEUR DUAL PRESENT DANS UN LOCUS ASSOCIE AU PALUDISME GRAVE 94

Article 4: Unraveling an enhancer-silencer regulatory element showing epistatic interaction with a variant that escaped genome-wide association studies 94

IV. IDENTIFICATION DE VARIANTS REGULATEURS DES RECEPTEURS FC GAMMA PAR UNE APPROCHE GENE CANDIDAT 96

Article 5: A Non-Coding Fc Gamma Receptor Cis-Regulatory Variant Within The 1q23 Gene Cluster Is Associated With Plasmodium Falciparum Infection In Children Residing In Burkina Faso 96
Article 6: An Expression Quantitative Trait Locus Of Fc Gamma Receptor Genes Is Associated With Anti-Malarial IgG Responses And Infection Levels In Burkinabe Families. 98

V. OPTIMISATION DE L'APPROCHE SCRNA-SEQ POUR ÉTUDIER LA REPONSE IMMUNITAIRE DANS LE PALUDISME 99

V.1. Méthodes 101
V.1.1. Information Clinique 101
V.1.2. Détail Expérimental 102
V.1.2.1. Isolation Des Cellules Mononucléaire Périphérique 102
V.1.2.2. Préparation Des Cellules Pour Single-Cell RNA-Seq 102
V.1.2.3. Single-Cell RNA-Seq Avec La Technique Next GEM Flex (Fixed RNA Profiling) 102
V.1.3. Analyses Des Données Et Statistique 103
V.1.3.1. Traitement Des Données Single-Cell RNA-Seq (Alignement, Attribution Des Codes-Barres) 103
V.1.3.2. Clustering Non-Supervisé 104
V.1.3.3. Analyses Des Marqueurs Des Clusters Et Annotation Des Types Cellulaire 104
V.1.3.4. Intégration, Analyse Des Gènes Exprimés Différemment (Degs) Et Enrichissement GO 105
V.2. Résultats 105
V.2.1. Obtention De Résultats Robustes Et De Haute Qualité Pour L'analyse Des Mécanismes D'infection Par *Plasmodium* 105

V.2.2. Réponse Différentielle Et Augmentation Des Monocytes Au Cours Des Stades De L'infection Par Plasmodium 109
V.3. Discussion 112

DISCUSSION 115

I. IDENTIFICATION D'UN VARIANT CAUSAL INFLUENÇANT L'IMMUNITE MEDIEE PAR LES RECEPTEURS FC GAMMA DES IGGS DANS LE CONTEXTE DU PALUDISME 117

II. IDENTIFICATION DE VARIANTS REGULATEURS DU GENE *ARL14* ET LEUR POTENTIEL IMPACT SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE A L'INFECTION PALUSTRE 118

III. EFFET REGULATEUR MEDIE PAR L'INTERACTION DE PLUSIEURS VARIANTS EN CIS OU EN TRANS DANS LES GLOBULES ROUGES ET LES LYMPHOCYTES T 120

IV. IMPACT DES VARIANTS GENETIQUES SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DU PALUDISME 126

IV.1. Rôle Des Variants Dans La Protection Contre Le Parasite Au Stade Hépatique 128
IV.2. Rôle Dual Des Variants Sur La Susceptibilité Au Paludisme Liée A La Réponse Immune Dirigée Contre Le Parasite Au Stade Erythrocytaire 130

PERSPECTIVES : UTILISATION D'APPROCHES MULTI-OMIQUES A L'ECHELLE DES CELLULES UNIQUES 132

CONCLUSION 134

BIBLIOGRAPHIE 135

Table des Figures

Figure 1 : Illustration réalisée par Alphonse Laveran, représentant les différents stades des parasites du paludisme. 15
Figure 2 : Répartition mondiale du paludisme en 2022. 16
Tableau 1 : *Évolution annuelle des cas et décès estimés liés au paludisme (2000-2022)* 17
Figure 3 : Évolution de l'éradication du paludisme entre 1960 et 2019. 19
Figure 4 : Cycle de vie du parasite Plasmodium falciparum. 22
Figure 5 : Relations entre l'âge, l'intensité de la transmission et les manifestations cliniques majeures du paludisme sévère 23
Tableau 2 : Critères de l'OMS pour définir les formes graves de paludisme. 24
Figure 6 : Mécanismes d'adhérence des globules rouges infectés aux récepteurs humains dans les micro-vaisseaux et leurs implications dans le neuropaludisme. 26
Figure 7 : Répartition et chevauchement des formes graves du paludisme 27
Figure 8 : Cheminement de l'infection par *P. falciparum* et points d'interventions des facteurs influençant son évolution clinique 28
Figure 9 : Carte des zones et périodes favorables à la transmission du paludisme en Afrique 30
Figure 10 : Principaux antigènes de surface variables de *P. falciparum* exprime à la surface des érythrocytes 31
Figure 11 : Structure et domaine d'adhésion des protéines PfEMP1 32
Figure 12 : Les premières étapes de la réponse immunitaire contre l'infection par *P. falciparum* 34
Figure 13 : Migration des sporozoïtes vers le foie et leur infiltration dans les hépatocytes. ..35
Figure 14 : Mécanismes immunitaires médiés par les variants antigéniques de surface du *Plasmodium falciparum* 36
Figure 15 : Réponse immunitaire lors de l'infection par Plasmodium médié par les lymphocytes T 38
Figure 16 : Modulation immunitaire lors des infections palustres asymptomatiques et symptomatiques 39
Figure 17 : Mécanisme immunitaire du neuropaludisme 40
Figure 18 : Mécanismes immunitaires médiés par les anticorps et les réponses associés ...41
Figure 19 : Test de déséquilibre de transmission (TDT) 44
Figure 20 : Structure de l'hémoglobine 45
Figure 21 : Répartition géographique de la thalassémie et du paludisme dans les années 1940 46
Figure 22 : Impact de la pression sélective du paludisme sur la distribution géographique des mutations HbS en Afrique 47
Tableau 3 : Gènes impliqués dans la physiologie des globules rouges associés au paludisme par approche gène candidat 50
Tableau 4 : Gènes impliqués dans la cytoadhérence des globules rouges associés au paludisme par approche gène candidat 52
Tableau 5 : Gènes impliqués dans la réponse immunitaire associés au paludisme par approche gène candidat 55
Figure 23 : Localisation des SNP du *TNF* associés au paludisme. 56

Tableau 6 : Synthèse des études de liaison génétique dans les population humaine 59
Figure 24 : Schéma illustrant une liaison génétique.....60
Figure 25 : Principe de la liaison génétique 60
Figure 26 : Représentation des pics de liaison la région 5q31-q33 62
Figure 27 : Étape d'analyse d'association pangénomique 64
Figure 28 : Représentation du déséquilibre de liaison entre le tagSNP et le variant génétique causal 66
Tableau 7 : Liste des études GWAS sur le paludisme sévère 67
Figure 29 : Variation structurale créant des gènes hybrides de glycophorines est associée à une protection contre le paludisme grave. 69
Figure 30 : Effet des haplotypes de PMCA4 sur la concentration intracellulaire en calcium et l'infection par Plasmodium falciparum 70
Figure 31 : Réponse transcriptomique de l'hôte au paludisme chez l'humain et la souris. 72
Figure 32 : Technique pour évaluer l'accessibilité de la chromatine par ATAC-seq et DNase-seq.....75
Figure 33 : Modifications post-traductionnelles des histones H2A, H2B, H3 et H4.....76
Figure 34 : Description de la technique de ChIP-seq 77
Figure 35 : Organisation spatiale des interactions entre promoteurs, enhancers et silencers régulée par les insulateurs 79
Figure 36 : *Exploration des interactions tridimensionnelles de la chromatine par les méthodes de 3C et ces dérivés* (Sanborn *et al.*, 2015).....80
Figure 37 : Impact des SNPs sur la régulation de l'expression génique 82
Figure 38 : Effet d'un variant associé à l'expression génique (eQTL) 83
Figure 39 : Impact des variants non codants spécifiques aux types cellulaires sur l'expression génique et la susceptibilité au paludisme 84
Figure résultat.1 : Design du recrutement de la cohorte du Cameroun 101
Figure résultat.2 : Design expérimental des expériences de scRNA-seq 103
Figure résultat.3 : Stratégie de filtrage des cellules et identification des doublons 107
Figure résultat.4 : Analyse approfondie des types cellulaires et identification de sous-populations spécifiques 108
Figure résultat.5 : Intégration des jeux de données T1 et T2 du même individu et analyse de l'homogénéité cellulaire 110
Figure résultat.6 : Analyse comparative des profils cellulaires et transcriptionnels entre états asymptomatique et symptomatique du paludisme 112
Figure 40 : stratégie d'analyse développée au cours de ma thèse 116
Figure 41 : modèle de régulation des gènes FCGR2B/3A par le variant structural rs1771575 118
Figure 42 : Modèle hypothétique de régulation de *LAX1* et *ATP2B4* dans la susceptibilité au paludisme 122
Figure 43 : Influence des variants *ATP2B4* et *PIEZO1* sur la réinvasion des globules rouges par *Plasmodium falciparum*.....125
Figure 44 : Impact probable des variants génétiques sur les mécanismes physiopathologiques de l'infection par *Plasmodium falciparum*.....127
Figure 45 : Régulation de l'activation des lymphocytes T par les gènes *PIEZO1*, *ATP2B4* et *LAX1*.....129

Introduction

I. Paludisme : Histoire, Évolution et Défis Contemporains

I.1. Histoire du Paludisme

Le paludisme, également appelé malaria en anglais, est une maladie infectieuse causée par des parasites du genre *Plasmodium*. Le terme paludisme provient du latin *palus*, « marais », tandis que le terme malaria dérive de l'italien *mal'aria*, « mauvais air ». Les parasites *Plasmodium* sont transmis à l'homme par la piqûre de moustiques infectés du genre *Anopheles*. Le paludisme est causé par plusieurs espèces de *Plasmodium* qui peuvent infecter plusieurs espèces différentes allant des reptiles aux oiseaux, en passant par des mammifères comme les rongeurs et les primates. Chez l'homme, cinq espèces différentes de parasites existent : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*. Ce dernier, est connu à l'origine pour infecter les macaques à longue queue, mais depuis quelques années des cas humains sont recensés dans le monde. Les preuves de paludisme remontent à l'Antiquité. Les Égyptiens et les Grecs avaient des descriptions de symptômes ressemblant à ceux du paludisme. Le paludisme a influencé de nombreux événements historiques et entraîné la mort de millions de personnes, touchant des leaders, rois ou empereurs (Toutânkhamon, Alexandre le Grand, Genghis Khan), des papes (Léon X, Urbain VII) ainsi que des artistes (Dante, Caravaggio).

Les progrès dans la compréhension du paludisme ont commencé en 1880 après la découverte, par Charles Louis Alphonse Laveran, d'érythrocytes infectés par des « hématozoaires du paludisme » dont il dessinera les différents stades du parasite tels qu'ils apparaissent dans le sang frais d'un patient infecté (Fig. 1). En 1897, en Inde, le chirurgien de l'armée britannique Ronald Ross a découvert que le parasite était transmis par des moustiques. Un an plus tard, les scientifiques italiens Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami et Giuseppe Bastianelli ont fourni la preuve formelle que le *Plasmodium* pouvait être transmis d'homme à homme via les moustiques du genre *Anopheles*. Dans les deux années suivant cette découverte, ils ont décrit le cycle complet de *P. vivax*, *P. falciparum* et *P. malariae* chez le moustique. Henry Shortt et Cyril Garnham ont permis de mieux comprendre le cycle du parasite en démontrant la présence de schizontes pré-érythrocytaires dans le foie de singe. Il aura ainsi fallu plus d'un siècle de recherches menées par des centaines de scientifiques pour comprendre en partie l'un des plus grands fléaux de l'humanité. Cependant, malgré ces avancées, le paludisme reste une maladie d'actualité, affectant des millions de personnes dans de nombreuses régions du globe. Les défis épidémiologiques, couplés à des facteurs socio-économiques et environnementaux, continuent de favoriser la propagation de cette infection dans les zones les plus vulnérables.

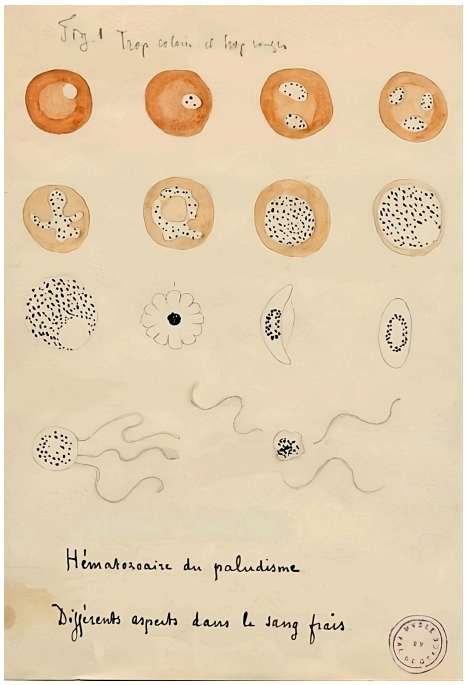


Figure 1 : Illustration réalisée par Alphonse Laveran, représentant les différents stades des parasites du paludisme.

Cette illustration, réalisée par le médecin français Alphonse Laveran, montre les différentes formes et stades des parasites du paludisme observés dans du sang frais, notamment les formes trophozoïtes, schizontes, et gamétocytes. Laveran, pionnier dans la découverte du paludisme, a été le premier à observer ces parasites dans le sang humain, ce qui a été fondamental pour comprendre le cycle de vie du parasite.

I.2. Évolution Épidémiologique à l'Échelle Mondiale

Il y a encore 200 ans, le paludisme était une maladie présente dans toute l'Europe. Mais des travaux d'assèchement des marais ont permis de réduire drastiquement le nombre de cas en France et partout en Europe. Durant les deux guerres mondiales, le nombre de cas a de nouveau augmenté. Il faudra attendre les années 60 pour voir disparaître en France les deux derniers foyers (la Corse et la Camargue). Aujourd'hui, le paludisme est endémique dans 85 pays, principalement dans les régions tropicales et subtropicales (Venkatesan, 2024). Les parasites sont présents de façon différente selon les régions du globe. *Plasmodium falciparum* est principalement retrouvé en Afrique et est responsable de la majorité des cas de paludisme grave et des décès, en particulier chez les jeunes enfants de moins de cinq ans. En 2022, la région Africaine représentait environ 93,6 % des cas et 95,4 % des décès (Fig. 2). La deuxième espèce la plus répandue dans le monde est *Plasmodium vivax*, prévalent en Asie, en Amérique latine et dans certaines parties de l'Afrique. Ce parasite est connu pour sa capacité à rester endormi dans le foie et provoquer des rechutes des mois ou même des années après l'infection initiale. Le nombre de cas recensés pour les trois dernières espèces est beaucoup plus faible et cause principalement des cas bénins, même si des formes graves peuvent être recensées.

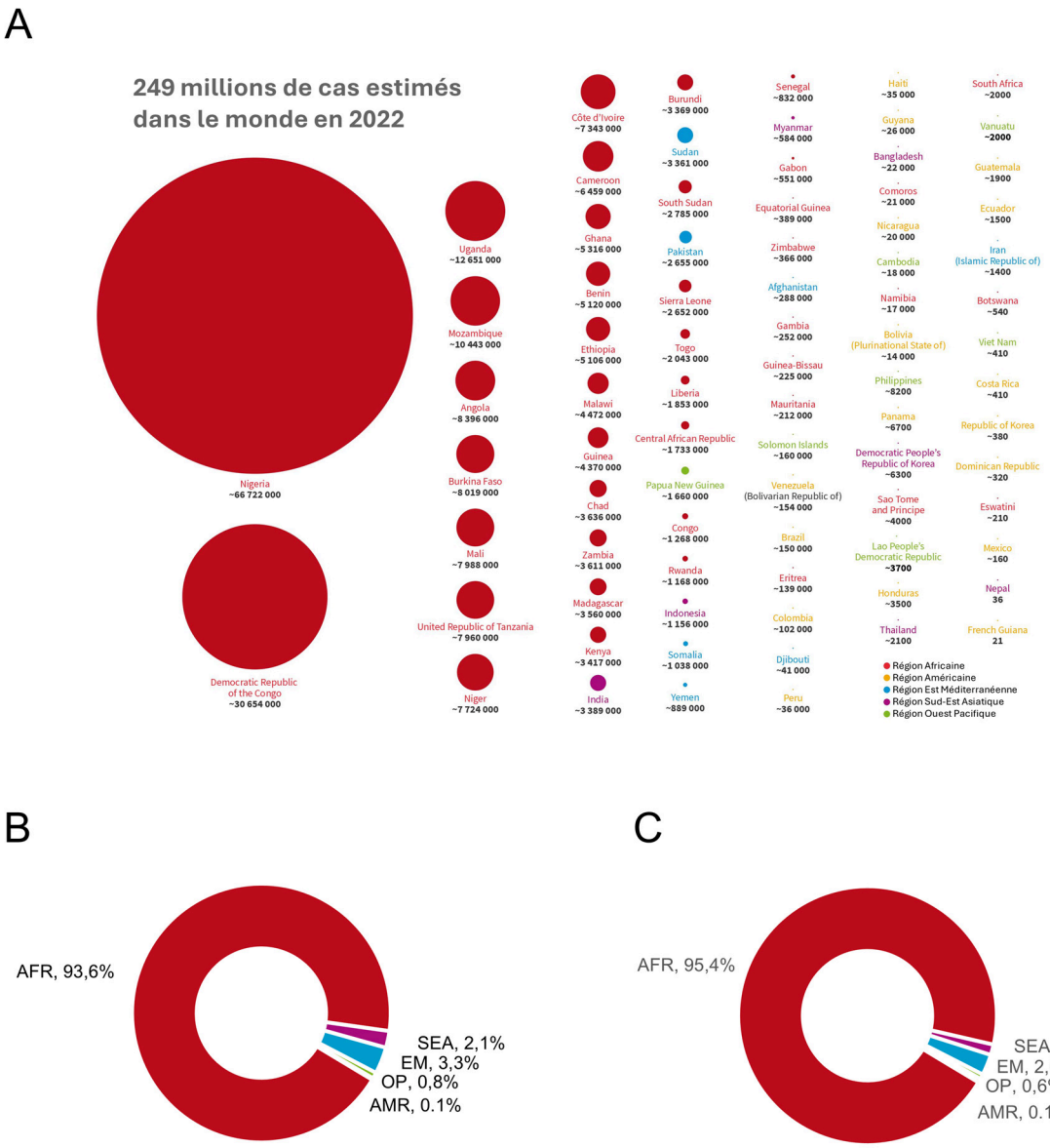


Figure 2 : Répartition mondiale du paludisme en 2022.

(A) Nombre de cas de paludisme enregistrés dans le monde par pays et par région en 2022. Quatre pays concentrent près de 50 % des cas mondiaux de paludisme : le Nigeria, la République Démocratique du Congo, l'Ouganda et le Mozambique.
(B) Pourcentage des cas de paludisme dans les cinq grandes régions du monde en 2022.
(C) Pourcentage des décès dus au paludisme dans les cinq grandes régions du monde en 2022, mettant en évidence l'impact majeur de la maladie sur l'Afrique.
Les données de cette figure sont adaptées du rapport annuel de l'OMS sur le paludisme (Venkatesan, 2024).

En 2022, on a enregistré 249 millions de cas de paludisme dans 85 pays, soit une augmentation de 5 millions par rapport à 2021. Entre 2000 et 2014, le nombre de cas avait globalement diminué, passant de 243 à 230 millions. Cependant, depuis 2015, une tendance à la hausse s'est amorcée, avec une augmentation notable de 11 millions de cas entre 2019 et 2020 pendant la crise de la COVID-19. La région africaine de l'OMS a été la plus touchée par cette recrudescence. En ce qui concerne les décès, ceux-ci ont diminué de 864 000 en

2000 à 576 000 en 2019. Cependant, en 2020, les perturbations liées à la COVID-19 ont entraîné une hausse des décès, qui ont atteint 631 000. Depuis, on observe une légère baisse avec 610 000 décès en 2021 et 608 000 en 2022 (Tab. 1). Les décès concernent principalement les enfants de moins de 5 ans, bien que leur pourcentage parmi les victimes soit passé de 86,8 % en 2000 à 76 % en 2022. En 2022, quatre pays représentaient près de la moitié des cas mondiaux : le Nigéria, la République démocratique du Congo, l'Ouganda et le Mozambique (Fig. 2). Ces chiffres ont permis de mettre en lumière les fragilités des systèmes de santé et la facilité à perturber les programmes de lutte contre le paludisme en période de crise, ce qui rend impératif la poursuite des recherches pour identifier des traitements innovants et des remèdes potentiels en complémentaire à ceux existant.

Année	Cas estimés (000)	Variation des cas (%)	Décès estimés	Variation des décès (%)
2000	243000	-	864000	-
2001	248000	+2.06%	873000	+1.04%
2002	245000	-1.21%	841000	-3.67%
2003	249000	+1.63%	813000	-3.33%
2004	250000	+0.40%	808000	-0.62%
2005	249000	-0.40%	770000	-4.70%
2006	244000	-2.01%	776000	+0.78%
2007	240000	-1.64%	754000	-2.84%
2008	239000	-0.42%	716000	-5.04%
2009	245000	+2.51%	726000	+1.40%
2010	247000	+0.82%	703000	-3.17%
2011	241000	-2.43%	665000	-5.41%
2012	237000	-1.66%	619000	-6.92%
2013	232000	-2.11%	591000	-4.52%
2014	230000	-0.86%	588000	-0.51%
2015	231000	+0.43%	586000	-0.34%
2016	232000	+0.43%	582000	-0.68%
2017	219000	-5.60%	580000	-0.34%
2018	232000	+5.94%	581000	+0.17%
2019	233000	+0.43%	576000	-0.86%
2020	244000	+4.72%	631000	+9.55%
2021	244000	+0.00%	610000	-3.33%
2022	249000	+2.05%	608000	-0.33%

Tableau 1 : ***Évolution annuelle des cas et décès estimés liés au paludisme (2000-2022)***

I.3. Traitement et Prévention Actuels

La lutte contre le paludisme remonte bien avant la découverte du parasite par Alphonse Laveran. En 1630, le missionnaire jésuite Juan Lopez est guéri des fièvres intermittentes par une poudre préparée à partir de l'écorce de « l'arbre à fièvres », le quinquina. Ce n'est qu'en 1820 que deux jeunes pharmaciens français, Pelletier et Caventou, parviennent à isoler et caractériser la quinine, transformant ainsi le traitement en un véritable médicament. Pendant la Première Guerre mondiale, la production limitée de quinine ne suffit pas à prévenir les ravages du paludisme. En réponse, l'Allemagne découvre la Pamaquine en 1924 (qui donnera la Primaquine un analogue plus largement utilisé aujourd'hui), puis la Mépacrine en 1930 (également connu sous le nom de Quinacrine), et en 1934 la première amino-4-quinoléine, précurseur de la Chloroquine. La guerre du Vietnam voit l'émergence pour la première fois de résistances aux antipaludiques, menant au développement de nouveaux médicaments comme la Méfloquine et l'Halofantrine. Ces médicaments seront massivement utilisés pendant la guerre, entraînant une résistance à ces molécules avant leur mise sur le marché au grand public. Plus tard, un nouveau traitement alternatif prometteur provenant de la médecine traditionnelle chinoise est l'artémisinine, extraite de l'*Artemisia annua*. L'industrie pharmaceutique occidentale développe des dérivés comme l'artésunate, actuellement les antipaludiques les plus efficaces.

En 1939, la découverte des propriétés insecticides du DDT révolutionne la lutte contre le paludisme en permettant l'élimination des moustiques. Malgré des succès initiaux, l'utilisation excessive du DDT provoque des résistances et des perturbations environnementales, ternissant sa réputation. L'OMS recommande récemment un usage équilibré du DDT. Les chercheurs développent une méthode efficace et adaptée localement : les moustiquaires imprégnées d'insecticides. Cette méthode simple, mais efficace, réduit significativement la mortalité infantile (Lengeler, 2004). À partir des années 2000, de plus en plus de pays sont considérés par l'OMS comme certifiés "Malaria Free" (Fig. 3). Entre 2000 et 2019, 2,2 milliards de moustiquaires, 2,7 milliards de tests et 3,1 milliards de traitements ont été livrés aux pays endémiques.

Mais depuis 2017, la lutte stagne de nouveau, quand elle ne régresse pas à certains endroits. La cause est l'apparition à la fois de parasite *P. falciparum* et de moustique résistant aux traitements et aux insecticides (Fançony, Brito and Gil, 2016; Suh *et al.*, 2023). Les parasites parviennent même à échapper aux tests de diagnostic rapide ayant une délétion des gènes codant pour HRP-2 et HRP-3 utilisée pour leur détection, entraînant une augmentation des faux négatifs (Mekonen *et al.*, 2024). Avec les multiples mécanismes de résistance développés par les parasites et les défis liés à l'échappement aux tests rapides de diagnostic, il devient évident que les approches actuelles de lutte contre le paludisme restent insuffisantes. Dans ce contexte, l'idée de développer un vaccin efficace contre le paludisme apparaissait comme une stratégie prometteuse et durable pour réduire la morbidité et la mortalité liées à cette maladie.

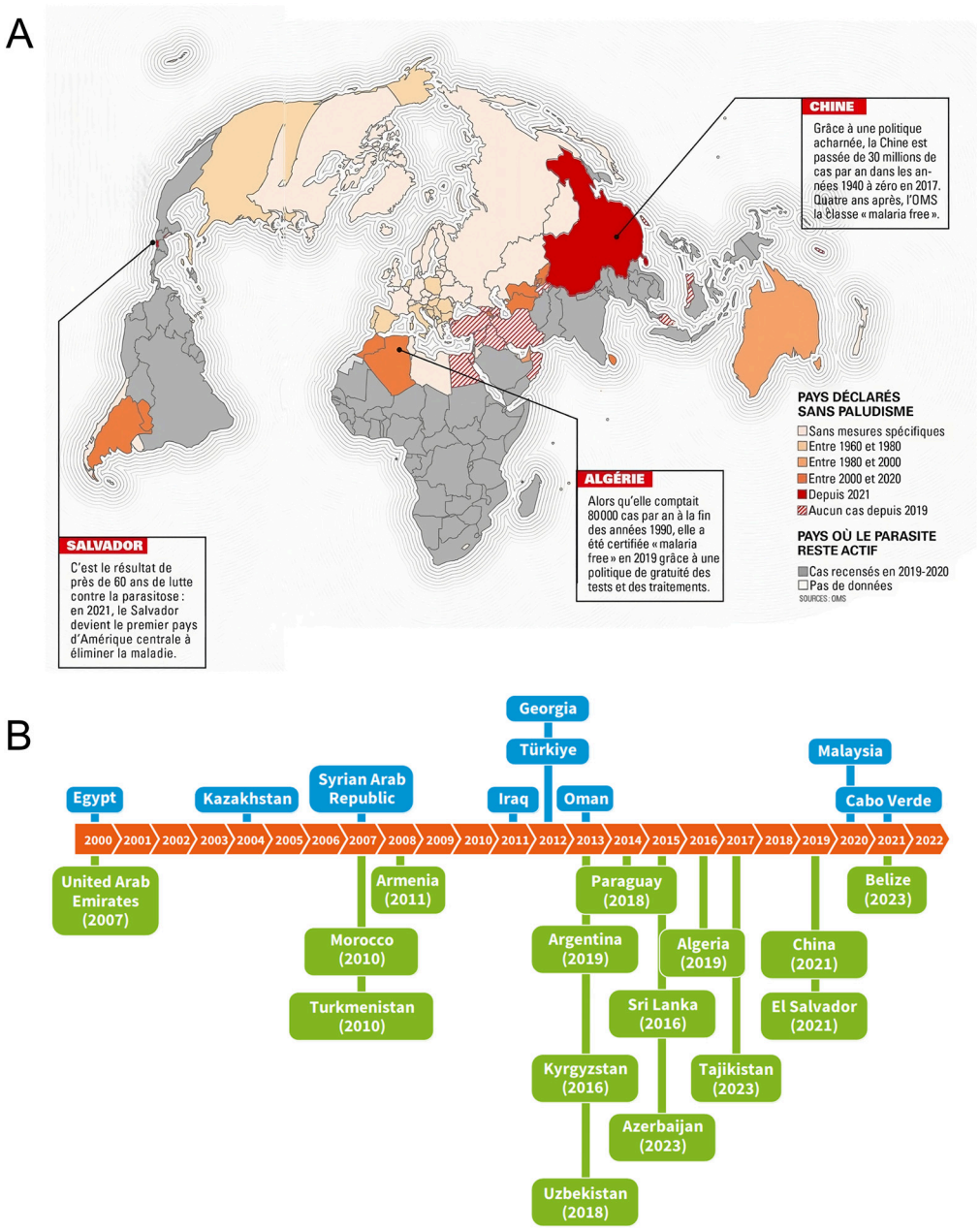


Figure 3 : Évolution de l'éradication du paludisme entre 1960 et 2019.

(A) Carte mondiale représentant les pays ayant éradiqué le paludisme de leur territoire entre 1960 et 2019. Grâce à des efforts drastiques de lutte contre la maladie, de nombreux pays, tels que le Salvador et la Chine, ont réussi à éliminer les cas de paludisme sur leur territoire. (Pihen, no date)

(B) Graphique montrant l'évolution des pays ayant atteint zéro cas de paludisme (en bleu) et ceux certifiés par l'OMS comme "Malaria Free" (en vert), avec l'année d'obtention de la certification. Les données proviennent du rapport annuel de l'OMS sur le paludisme.(Venkatesan, 2024)

Après des décennies de recherche, le premier vaccin contre le paludisme, le RTS,S/AS01 (Mosquirix), a été recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour une utilisation à grande échelle chez les enfants en Afrique en 2021. En octobre 2023, un deuxième vaccin, le R21/Matrix M (R21), a été recommandé pour prévenir le paludisme chez les enfants vivant dans des zones à risque. Cependant l'efficacité à long terme des vaccins est sujette à débat. En effet, le RTS,S/AS01 montre, dans un essai de phase 3, une efficacité initiale de 74 % chez les enfants âgés de 5 à 17 mois, mais cette efficacité diminue à 28 % après un an, puis à 9 % après cinq ans. Chez les enfants de 6 à 12 semaines, l'efficacité, initialement estimée à 63 %, tombe à 11 % après un an et à 3 % après cinq ans (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015). Quant au nouveau vaccin R21/Matrix M, les résultats dans un essai de phase 3 indiquent une tendance similaire, avec une efficacité qui diminue au cours de la première année, passant de 80 % au début à 67 % après 1 an dans les sites saisonniers, et de 79 % à 63 % pour les autres sites (Datoo *et al.*, 2024). La campagne de vaccination contre le paludisme en Afrique est également un défi considérable, notamment en raison de la complexité de l'administration du vaccin, qui nécessite trois doses initiales et une dose de rappel après un an.

Face à ces résultats décevants, il est impératif de poursuivre la recherche fondamentale pour comprendre les mécanismes sous-jacents à la réponse immunitaire permettant de mettre au point des traitements plus efficaces et plus faciles à administrer. Cette amélioration est essentielle pour atteindre l'objectif de l'OMS : l'éradication du paludisme pour 2030. De plus, la prévention du paludisme, au-delà de l'Afrique, est cruciale pour éviter la résurgence de la maladie à l'échelle mondiale En effet, le paludisme, autrefois perçu comme un problème exclusivement africain, pourrait redevenir une menace dans les pays plus occidentaux en raison des changements climatiques et de l'augmentation des flux migratoires.

I.4. Conséquence du Réchauffement Climatique

Ces dernières années, le réchauffement climatique est devenu une évidence avec une récente accélération : 2024 est l'année la plus chaude jamais enregistrée, avec des températures mondiales dépassant la limite de +1,5 °C (*Copernicus: 2024 is the first year to exceed 1.5°C above pre-industrial level*, no date). Plusieurs conséquences sur la propagation du paludisme risquent d'être observées prochainement, influençant divers aspects de la transmission de la maladie.

Premièrement, le réchauffement climatique peut rendre des régions auparavant non propices au paludisme favorables à la survie des moustiques vecteurs et au développement des parasites. Cela inclut des zones plus tempérées et même des altitudes plus élevées où la maladie n'était pas endémique auparavant. Une expansion rapide de l'aire de répartition des moustiques vecteurs a déjà été observée, l'espèce s'étant déplacée de 4,7 km par an (Carlson *et al.*, 2023). Les États-Unis ont d'ailleurs connu le premier cas autochtone en août 2023, une première depuis plus de 20 ans. Même si aucun cas n'a été enregistré sur le sol français métropolitain, environ 5 500 cas d'importation sont recensés chaque année, ce qui pourrait relancer l'infection sur le territoire. L'augmentation des transmissions autochtones d'autres maladies tropicales, comme les 45 cas de dengue identifiés en 2023 en Hexagone, laisse

envisager un scénario similaire pour le paludisme, soulignant ainsi la nécessité d'une vigilance accrue.

Le réchauffement climatique entraîne aussi une augmentation des événements climatiques extrêmes comme les inondations et les sécheresses, pouvant augmenter le risque d'épidémie de manière indirecte et rendre plus difficile l'accès aux soins pour les populations touchées. Un exemple est le cas du Pakistan en 2022. Le pays a connu des pluies torrentielles et des inondations qui ont multiplié par cinq le nombre de cas de paludisme par rapport à 2021.

En résumé, le réchauffement climatique pose un défi majeur à la lutte contre le paludisme en modifiant les conditions environnementales qui influencent la transmission de la maladie. Pour faire face à ces défis, il est essentiel de renforcer les stratégies de surveillance, de prévention et de contrôle du paludisme, en tenant compte des impacts du changement climatique.

II. Infection par *Plasmodium falciparum*

Le cycle parasitaire entre les lignées de *Plasmodium* est largement conservé. Cependant, des différences dans le cycle de vie des espèces de *Plasmodium* positionnent *P. falciparum* comme le parasite le plus pathogène. Dans le cadre de mon projet, je me suis concentré exclusivement sur les infections causées par *P. falciparum*, en raison de sa virulence accrue et de sa prévalence mondiale. Ainsi, dans la suite de mon introduction, je détaillerai uniquement les caractéristiques de ce parasite.

II.1. Cycle du Parasite

Plasmodium falciparum est transmis à l'espèce humaine lors d'une piqûre infectante de moustiques femelles du genre *Anopheles*. Les parasites à l'état de sporozoïtes pénètrent dans la circulation sanguine, ce qui leur permet d'atteindre le foie et de pénétrer à l'intérieur des hépatocytes. Une fois à l'intérieur des hépatocytes, le parasite se différencie dans une première phase de réplication asexuée. Les sporozoïtes se transforment en schizontes adultes contenant des milliers de mérozoïtes (Fig. 4). Cette phase de réplication asexuée, dite "pré-érythrocytaire", est asymptomatique. Les mérozoïtes sont ensuite libérés dans la circulation sanguine et infectent les globules rouges, où le parasite se multiplie dans une deuxième phase de réplication asexuée (Fig. 4). À travers des cycles répétés d'invasion et de croissance, le parasite établit des infections aiguës et, à terme, chroniques entraînant l'apparition de symptômes (frissons, fièvre, maux de tête), notamment en raison de la libération de parasites et molécules parasitaires lors de la destruction des globules rouges. Dans les globules rouges, les mérozoïtes se développent en trophozoïtes annulaires puis en schizontes et enfin en mérozoïtes pouvant infecter de nouveaux globules rouges (Fig. 4). Le cycle sexué est initié lorsqu'une petite proportion de trophozoïtes se différencient en gamétocytes mâles et femelles. La moelle osseuse est le site du développement du stade sexué du parasite, où les formes trophozoïtes se transforment en gamétocytes (Fig. 4). Après 9 à 12 jours, les gamétocytes matures de *P. falciparum* passent dans la circulation sanguine. Les gamétocytes matures peuvent circuler dans le sang humain pendant plusieurs jours, maximisant ainsi leur chance de transmission aux moustiques. Lors d'une piqûre, le moustique anophèle ingère ces gamétocytes mâles et femelles, qui se différencient en microgamètes et macrogamètes respectivement (Fig. 4). Ils fusionnent ensuite pour donner des zygotes qui se transforment en

ookinetes, traversent la couche épithéliale de la paroi médiane de l'intestin pour former des oocystes, où ils subissent une réplication asexuée pour produire des milliers de sporozoïtes qui sont libérés dans l'hémolymphe. Enfin, les sporozoïtes rejoignent les glandes salivaires du moustique, où ils restent jusqu'à ce qu'ils soient transmis à un nouvel hôte (Fig. 4).

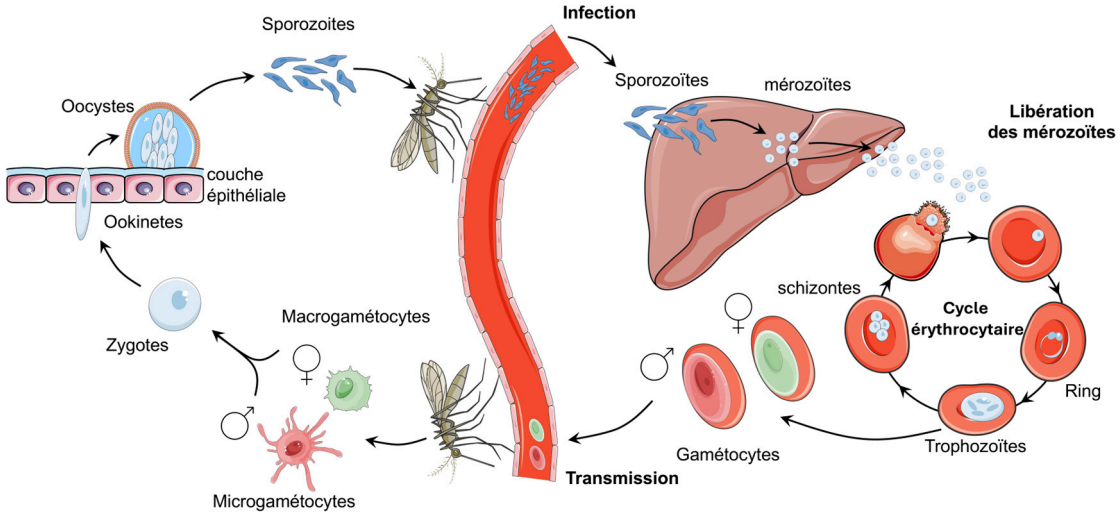


Figure 4 : Cycle de vie du parasite Plasmodium falciparum.

Le cycle de vie du parasite *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme, se déroule en deux hôtes : l'homme et le moustique *Anopheles*. Lorsqu'un moustique infecté pique une personne, il injecte des sporozoïtes dans le sang, qui migrent vers le foie, où ils se transforment en trophozoïtes et se multiplient, formant des schizontes. Ces derniers libèrent des mérozoïtes qui infectent les globules rouges, où ils poursuivent leur développement, causant la destruction des cellules et les symptômes caractéristiques du paludisme. Certains mérozoïtes se différencient en gamétocytes, les formes sexuées du parasite. Lorsque le moustique pique à nouveau une personne infectée, il ingère des gamétocytes. Ces derniers se transforment en gamètes qui se fécondent, formant un zygote (ookinète). Ce dernier pénètre la paroi de l'estomac du moustique et se transforme en oocyste, dans lequel de nouveaux sporozoïtes se forment. Ces sporozoïtes migrent ensuite vers les glandes salivaires du moustique, le rendant capable de transmettre à nouveau le parasite à un humain lors d'une piqûre, perpétuant ainsi le cycle de transmission du paludisme.

Comme mentionné précédemment, la phase érythrocytaire du cycle parasitaire est celle où les symptômes du paludisme apparaissent. Cette phase est associée à une large diversité de formes cliniques. Ces manifestations cliniques sont le résultat de processus complexes d'interaction entre le parasite, les cellules sanguines et la réponse immunitaire de l'hôte.

II.2. Formes Cliniques Associées au Paludisme

Les infections palustres présentent une large gamme de manifestations cliniques, allant des cas bénins avec fièvre et maux de tête à des formes graves comme le neuropaludisme ou l'anémie sévère pouvant être mortelle. La prévalence du paludisme grave varie considérablement selon les régions géographiques et les groupes d'âge (Fig. 5). Les enfants de moins de cinq ans sont particulièrement vulnérables, représentant environ 90 % des décès imputables au paludisme comme nous avons pu déjà le voir (cf. Évolution Épidémiologique à

l'Échelle Mondiale) (Venkatesan, 2024). Dans les zones d'endémie, une proportion importante des infections demeure asymptomatique, en particulier chez les individus ayant acquis une certaine immunité au fil du temps. Lorsque des symptômes apparaissent, la fièvre et les vomissements sont les manifestations les plus courantes (Elnour *et al.*, 2019). Environ 1 à 2 % des cas peuvent évoluer vers des formes graves nécessitant une intervention médicale rapide afin de prévenir des complications potentiellement fatales.

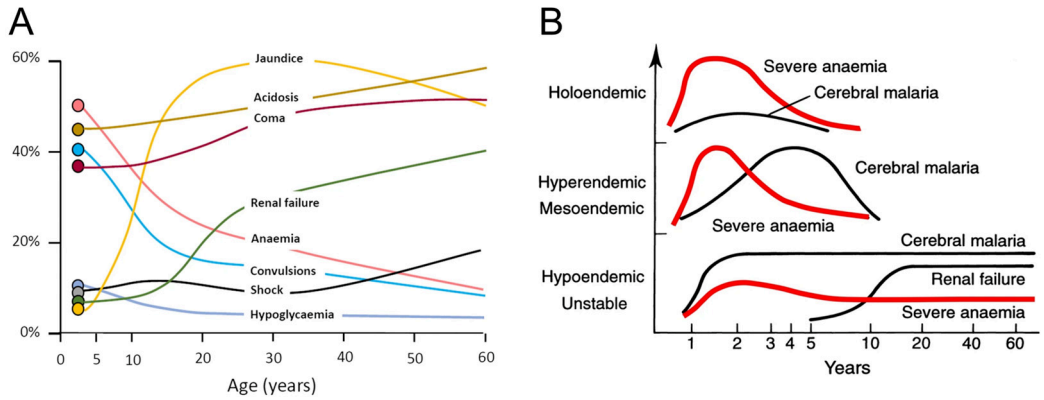


Figure 5 : Relations entre l'âge, l'intensité de la transmission et les manifestations cliniques majeures du paludisme sévère

(A) Proportions de syndromes cliniques chez les adultes et les enfants atteints de paludisme grave, basées sur des études prospectives menées en Asie du Sud-Est et en Afrique par la Mahidol Oxford Research Unit (von Seidlein *et al.*, 2012; White, 2022).
(B) Cette figure montre comment les complications du paludisme (comme l'anémie sévère, le neuropaludisme et l'insuffisance rénale) varient selon le niveau d'endémicité de la maladie. En zone holoendémique, où la transmission du paludisme est très élevée, l'anémie sévère est fréquente chez les jeunes enfants, et le neuropaludisme atteint un pic avant de diminuer avec le développement de l'immunité. En zones hyperendémiques et mésoendémiques, des niveaux de transmission intermédiaire, les cas graves diminuent progressivement à mesure que l'immunité s'installe. En zones hypoendémiques ou instables, où la transmission est faible et souvent saisonnière, les adultes sont plus vulnérables aux formes graves, notamment au neuropaludisme dû à un manque d'immunité (White, 2018).

II.2.1. Formes Asymptomatique et Simple

Les formes asymptomatiques sont les manifestations les plus courantes, mais les critères pour définir ces formes ne sont pas parfaitement établis. Un consensus couramment utilisé inclut l'absence d'anémie et de fièvre (hémoglobine > 7 g/dL, température axillaire < 37,5 °C) malgré la présence de parasites dans le sang (Tran *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2020). De plus, les formes asymptomatiques sont moins étudiées en raison de la difficulté à identifier les individus (Ibrahim *et al.*, 2023).

Les formes simples de paludisme se développent généralement chez les individus incapables de contrôler leur niveau de parasitémie. En effet, bien qu'il ait été démontré que la densité parasitaire peut varier (de 10 à 200 000 parasites/ml de sang), les formes simples apparaissent souvent avec une parasitémie de *P. falciparum* supérieure au seuil pyrogène de 10 000 parasites/ml de sang (Gatton and Cheng, 2002). Cependant, le seuil pyrogène peut varier en fonction de l'intensité de la transmission, de l'âge du sujet ainsi que de la souche de *P.*

falciparum (Rogier, Commenges and Trape, 1996; Boisier *et al.*, 2002; Gatton and Cheng, 2002). Ces variations influencent donc sur l'apparition des formes simples de la maladie, qui se manifestent par des symptômes comme la fièvre, les frissons, les sueurs, les maux de tête, ainsi que des troubles gastro-intestinaux tels que vomissements et diarrhée, souvent accompagnés d'anémie bénigne et de splénomégalie (gonflement de la rate).

II.2.2. Formes Graves

Les formes graves de paludisme, notamment causées par *Plasmodium falciparum*, sont plus fréquentes en Afrique subsaharienne, où l'incidence globale du paludisme est la plus élevée. Chez les enfants, les formes graves sont particulièrement fréquentes en raison de l'immaturité de leur système immunitaire (Farrington *et al.*, 2017). Avec les enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes sont les plus vulnérables aux complications graves du paludisme. Néanmoins, les complications de la grossesse sont souvent exclues des événements attribués au paludisme et ne figurent généralement pas dans les rapports annuels, ce qui complique l'évaluation de l'impact de ces infections (Taylor and Ter Kuile, 2017). Le paludisme grave comprend des manifestations cliniques dont les plus courantes sont le neuropaludisme, l'anémie sévère, et la détresse respiratoire qui peuvent se produire séparément ou en combinaison (Tab. 2) (World Health Organization, 2015).

Forme clinique	Critères de gravité selon l'OMS
Neuropaludisme	Altération de la conscience, confusion ou coma (Blantyre inférieur à 3 ou Glasgow inférieur à 11)
Anémie sévère	Hémoglobine < 5 g/dL ou hématocrite < 15 % chez les enfants de moins de 12 ans (< 7 g/dL et < 20 % chez les adultes) avec parasitémie > 10 000/µL
Paludisme avec insuffisance rénale	Créatinine plasmatique > 265 µmol/L (3 mg/dL) ou urée sanguine > 20 mmol/L
Œdème pulmonaire	Confirmé radiologiquement ou saturation en oxygène < 92 % avec fréquence respiratoire > 30/min, souvent accompagné de tirage thoracique et crépitations
Hypoglycémie	Glycémie < 2,2 mmol/L (40 mg/dL), causée par la consommation de glucose par le parasite ou la production accrue d'insuline, fréquente chez les enfants.
Choc septique	Remplissage capillaire ≥ 3 s ou gradient de température sur la jambe sans hypotension (choc compensé), ou pression systolique < 70 mm Hg (enfants) / < 80 mm Hg (adultes) avec hypoperfusion.
Paludisme avec hémorragies	Saignements anormaux (gencives, tube digestif) avec risque de coagulation intravasculaire disséminée, dus aux dysfonctionnements de la coagulation.
Hyperparasitémie	Plus de 10 % des globules rouges infectés
Ictère (Jaunisse)	Bilirubine > 50 µmol/L, souvent liée à une hépatopathie ou à une hémolyse massive, surtout en cas de multiples infections.
Acidose métabolique	Bicarbonate plasmatique < 15 mmol/L ou signes de respiration profonde et rapide, résultant d'une accumulation de actate plasmatique > 5 mmol/L.

Tableau 2 : Critères de l'OMS pour définir les formes graves de paludisme.

II.2.2.1. Le Neuropaludisme

Le neuropaludisme est l'une des complications les plus sévères de l'infection par *Plasmodium falciparum* avec un taux de mortalité de 100 % s'il n'est pas traité et une mortalité de 15 à 25 % malgré les traitements antipaludiques de première ligne actuellement disponibles (Seydel *et al.*, 2015). L'OMS définit le neuropaludisme comme une forme grave de paludisme caractérisée par un coma profond, avec une incapacité à réagir à un stimulus douloureux, avec un score de Blantyre inférieur à 3 chez les enfants (0 indiquant un coma profond, tandis que le maximum est de 5, indiquant un état de conscience normal), et un score de Glasgow inférieur à 11 chez les adultes (3 étant un coma profond à 15 les personnes parfaitement conscientes) (Tab. 2). Pour échapper à l'élimination par la rate, les globules rouges infectés adhèrent aux parois des vaisseaux sanguins dans plusieurs organes dont le cerveau (Hviid and Jensen, 2015). PfEMP1 (Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1) est une protéine majeure de surface exprimée par le parasite *Plasmodium falciparum*, qui permet aux globules rouges infectés de se lier aux cellules endothéliales, via des interactions avec des molécules d'adhésion spécifiques des vaisseaux sanguins, facilitant leur séquestration dans des organes. Dans la plupart des parasites, PfEMP1 n'est pas exprimé seul, mais en combinaison avec des protéines comme RIFIN (repetitive interspersed family), et/ou STEVOR (sub-telomeric variable open reading frame). Parmi les molécules d'adhésion endothéliales de l'hôte, la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) a longtemps été suggérée comme principal point d'ancrage pour PfEMP1 (Berendt *et al.*, 1989). Cependant, le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) et le CD36 ont été identifiés comme des sites de liaison possible (Turner *et al.*, 2013; Bernabeu *et al.*, 2016). Bien que CD36 ait montré un rôle dans le neuropaludisme (Omi *et al.*, 2003), il semblerait qu'il ne soit pas déterminant, car des souris déficientes en CD36 continuent à développer des formes cérébrales de la maladie (Franke-Fayard *et al.*, 2005). Cette observation suggère que d'autres mécanismes ou récepteurs pourraient compenser l'absence de CD36 pour favoriser l'apparition de complications cérébrales. Des études ont mis en évidence l'importance de PfEMP1 dans la liaison au récepteur du complément 1 (CR1) (Franke-Fayard *et al.*, 2005) ainsi qu'aux héparanes sulfate (Chen, Barragan, *et al.*, 1998) entraînant la formation de rosette, amas de globules rouges infectés par *P. falciparum* qui se lient à des globules rouges non infectés (Fig. 6). Ces formations de rosettes et l'accumulation de globules infectés et non infectés causent une obstruction des micro-vaisseaux cérébraux avec, pour conséquence, un manque d'irrigation sanguine et une hypoxie tissulaire (manque d'oxygène dans les tissus) (Fig 6). En plus des phénomènes mécaniques, l'obstruction des micro-vaisseaux entraîne une réaction inflammatoire. En effet, l'adhésion des érythrocytes infectés aux cellules endothéliales et la formation de rosettes augmentent le relâchement de cytokines pro-inflammatoires, ce qui active les cellules endothéliales et provoque des lésions de la barrière hémato-encéphalique conduisant à un œdème cérébral et, dans certains cas, à un coma.

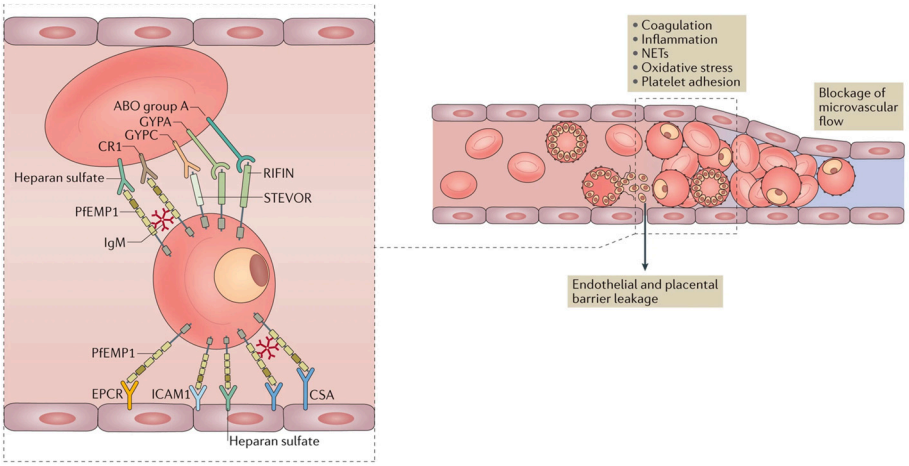


Figure 6 : Mécanismes d'adhérence des globules rouges infectés aux récepteurs humains dans les micro-vaisseaux et leurs implications dans le neuropaludisme.

L'adhérence des globules rouges infectés aux récepteurs des cellules endothéliales dans les micro-vaisseaux entraîne leur séquestration, l'activation de l'endothélium et l'obstruction du flux sanguin, provoquant une hypoxie tissulaire. Chez les patients atteints de paludisme sévère, notamment ceux des groupes sanguins A, B ou AB, les globules rouges infectés forment des rosettes en s'agrégeant aux globules rouges non infectés. Cette interaction est médiée par les protéines parasitaires RIFIN, STEVOR et PfEMP1. PfEMP1 se lie à divers récepteurs tels que le sulfate d'héparane, le CSA, le CR1, l'EPCR et l'ICAM-1, tandis que RIFIN cible l'antigène du groupe sanguin A et la GYPA, et STEVOR interagit avec la GYPC. L'adhérence des érythrocytes infectés aux cellules endothéliales et la formation de rosettes favorisent la libération de cytokines pro-inflammatoires, endommageant la barrière hémato-encéphalique et pouvant entraîner un œdème cérébral, voire un coma. (Wahlgren, Goel and Akhouri, 2017).

II.2.2.2. L'Anémie Sévère

L'anémie sévère causée par *Plasmodium falciparum* est définie par une concentration d'hémoglobine inférieure à 5 g/dl ou un hématocrite inférieur à 15 % chez les enfants de moins de 12 ans (moins de 7 g/dl et moins de 20 % respectivement chez les adultes) (Tab. 2) (World Health Organization, 2015). Elle résulte principalement de la destruction massive des globules rouges, qu'ils soient infectés ou sains. Cette destruction s'opère par plusieurs mécanismes, notamment la lyse des globules rouges infectés à la fin du cycle érythrocytaire, provoquée par la rupture des schizontes (Phillips and Pasvol, 1992). En parallèle, les globules rouges infectés sont éliminés par phagocytose, principalement par les macrophages et les neutrophiles (Buffet *et al.*, 2011). En outre, la production de nouveaux globules rouges (érythropoïèse) est fortement perturbée. Sous des conditions normales, l'érythropoïèse se produit dans la moelle osseuse sous l'action de l'érythropoïétine, une hormone produite principalement par les reins. Cependant, lors d'une infection palustre sévère, la réponse des précurseurs érythrocytaires à l'érythropoïétine est inhibée en raison d'un déséquilibre dans les cytokines pro- et anti-inflammatoires.

II.2.2.3. Le Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë associé au paludisme (SDRA) est une complication rare, mais souvent mortelle de l'infection palustre. Il est caractérisé par un œdème pulmonaire sévère et une altération des échanges gazeux, provoqués par une infiltration inflammatoire abondante de cellules mononucléaires et par la séquestration des parasites dans les poumons (Taylor *et al.*, 2012; Van den Steen *et al.*, 2013). La pathogénie du SDRA est principalement due à l'inflammation, avec des cellules mononucléaires jouant un rôle central, plutôt que les neutrophiles. Bien que les modèles murins soient utilisés pour étudier les mécanismes de cette pathologie et tester des interventions anti-inflammatoires, les traitements actuels chez les patients se limitent aux antipaludiques combinés à une ventilation mécanique.

II.2.2.4. Les Autres Formes Cliniques

De nombreuses autres manifestations cliniques peuvent se présenter en association avec un paludisme sévère (Fig. 7). Outre le neuropaludisme, l'anémie sévère et la détresse respiratoire, des complications telles que l'hypoglycémie, le choc septique, l'insuffisance rénale aiguë, l'ictère (jaunisse) et des saignements spontanés peuvent également survenir. Par ailleurs, le paludisme gestationnel présente des risques spécifiques pour la mère et le fœtus, augmentant le risque de décès maternel, d'anémie maternelle sévère ainsi que de mortalité fœtale et néonatale (Xiong *et al.*, 2000; Fried and Duffy, 2017). De plus, les mécanismes de séquestration des érythrocytes infectés par le parasite entraînent diverses complications, favorisent une réponse inflammatoire accrue et provoquent des dommages aux cellules placentaires (Fried *et al.*, 1998; Sharma and Shukla, 2017).

Il est important de noter que les formes cliniques du paludisme varient considérablement en fonction de divers facteurs, tels que les conditions environnementales, socio-économiques et la virulence de *Plasmodium falciparum*. De plus, les facteurs génétiques de l'hôte jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire et le pronostic de l'infection.

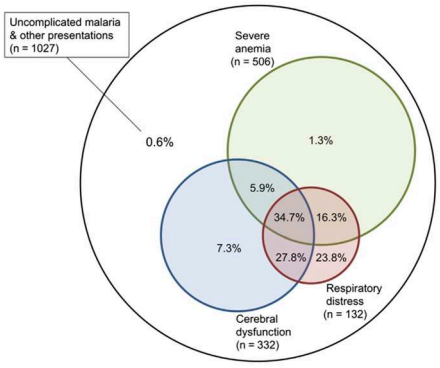


Figure 7 : Répartition et chevauchement des formes graves du paludisme

Les pourcentages indiquent la mortalité hospitalière des enfants traités à la quinine, selon l'étude de Marsh et al. (1995)(Marsh *et al.*, 1995). Ces données reflètent les formes les plus courantes de paludisme sévère en zone de forte transmission, où plusieurs symptômes peuvent coexister. Adapté de Cheng et Yansouni (2013) (Cheng and Yansouni, 2013).

III. Facteurs Influant le Devenir de l'Infection

Les diverses formes cliniques du paludisme présentent un développement et une sévérité qui varient largement d'un individu à l'autre (Fig. 8). En effet, elles sont fortement influencées par une combinaison complexe de facteurs. D'une part, des facteurs environnementaux, tels que le climat, les conditions socio-économiques, peuvent jouer un rôle crucial en influençant la transmission du parasite. Et d'autre part, la virulence du parasite lui-même, déterminée par des caractéristiques spécifiques de *Plasmodium falciparum*, contribue à la diversité des réponses cliniques observées. Enfin, les caractéristiques propres à chaque hôte, notamment des facteurs génétiques, modulent également la réponse immunitaire contre l'infection et peuvent déterminer le pronostic de la maladie.

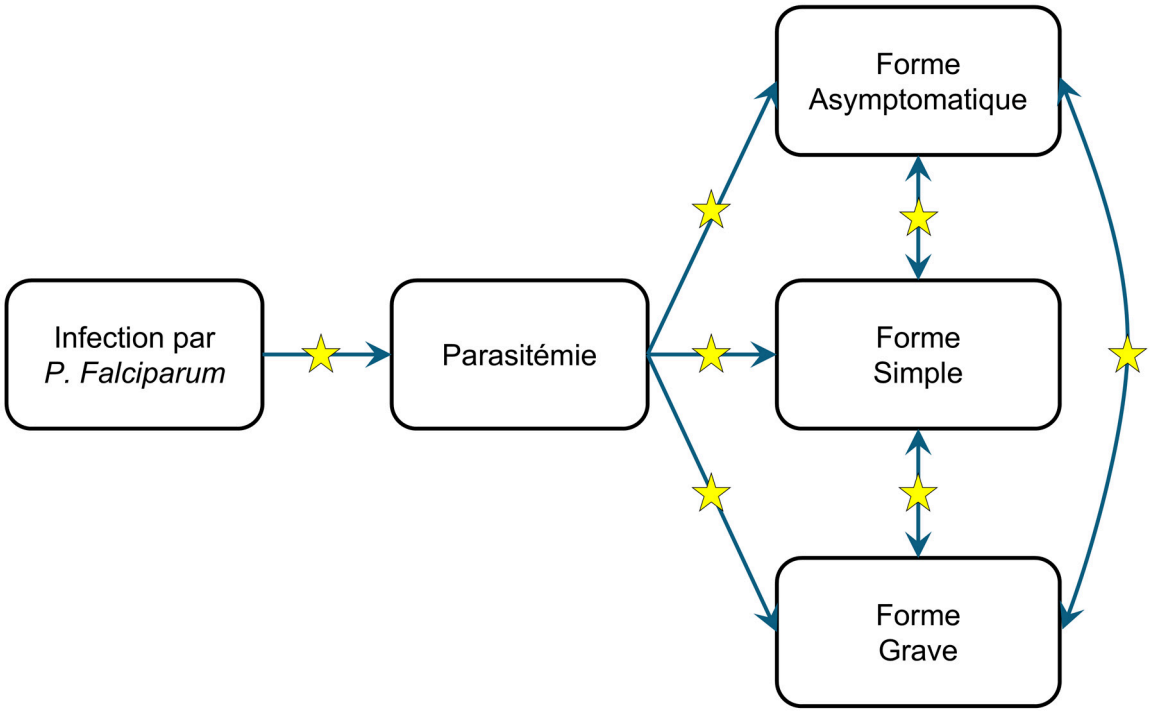


Figure 8 : Cheminement de l'infection par *P. falciparum* et points d'interventions des facteurs influençant son évolution clinique

Schéma illustrant le cheminement de l'infection par *P. falciparum* en passant par la parasitémie vers les différentes formes cliniques. Les transitions représentent des étapes clés où le processus peut s'interrompre (étoiles), influencé par divers facteurs, notamment les facteurs socio-économiques, environnementaux, parasitaires et les facteurs génétiques de l'hôte. Ces facteurs ne sont pas exclusifs et peuvent agir à plusieurs niveaux simultanément. Adapté de (Milet *et al.*, 2019)

III.1. Facteurs Socio-Économiques et Environnementaux

Le paludisme sévit dans des régions économiquement pauvres, entraînant un risque accru de décès. En effet, la majorité des familles vivant dans les zones défavorisées n'ont pas accès aux méthodes de prévention, telles que les moustiquaires et les insecticides, ni aux soins médicaux et aux traitements antipaludiques (Sachs and Malaney, 2002). Pourtant l'utilisation de moustiquaires et d'autres mesures de protection, joue un rôle clé dans la prévention de l'infection en diminuant le niveau d'exposition au vecteur.

Le niveau d'exposition au vecteur est un facteur clé influençant le risque d'infection et de développement de la maladie. L'incidence du paludisme grave est plus élevée dans les zones de forte transmission (Paton *et al.*, 2021). La prolifération du moustique, vecteur de la maladie, est étroitement liée aux conditions climatiques telles que les précipitations, la température et l'humidité avec des transmissions pouvant varier de façon saisonnière dans certaines régions en fonction des cycles climatiques (Fig. 9) (Reiner *et al.*, 2015; Mohammadkhani *et al.*, 2016). En général, l'urbanisation est perçue comme un facteur majeur de la diminution du paludisme (Tatem *et al.*, 2013), et les zones urbaines connaissent généralement une transmission plus faible par rapport aux zones rurales (Doumbe-Belisse *et al.*, 2021). Cependant, certains centres urbains affichent des taux d'inoculation élevés, probablement en raison de divers facteurs tels qu'un drainage insuffisant, ou la déforestation à proximité (Multini *et al.*, 2020; Doumbe-Belisse *et al.*, 2021). Il y a aussi des différences locales liées à des facteurs tels que l'environnement immédiat de la maison, la proximité d'un cours d'eau, le type de sol et le type de végétation (Cottrell *et al.*, 2012). De plus, les moustiques Anophèles ont su s'adapter pour se reproduire dans les environnements urbains, notamment dans les eaux polluées et celles traitées aux insecticides (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2011).

Parallèlement, *Plasmodium falciparum*, l'espèce la plus virulente, a aussi montré une capacité d'adaptation remarquable, notamment en développant une diversité génétique importante. Cette diversité se traduit par l'existence de multiples souches, chacune ayant des profils de virulence distincts. Ces variations influencent la gravité des infections et la réponse de l'hôte, rendant le traitement et le contrôle de la maladie encore plus complexe.

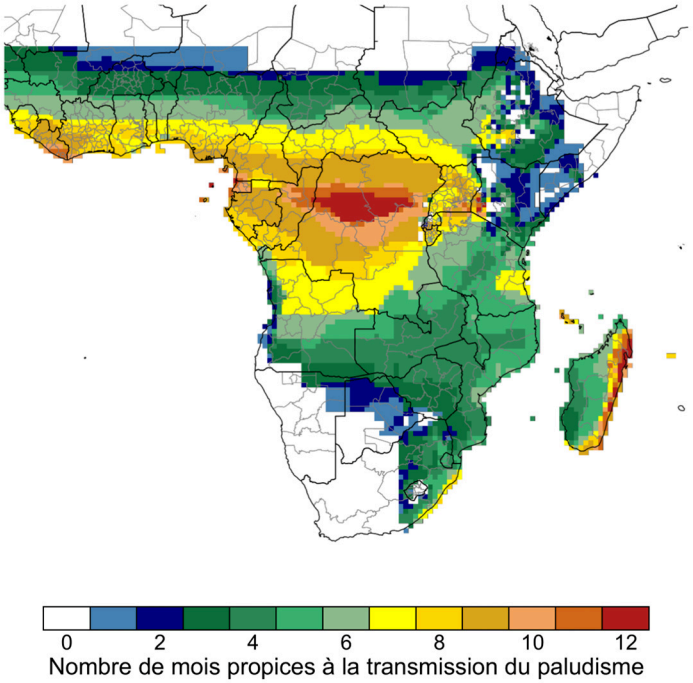


Figure 9 : Carte des zones et périodes favorables à la transmission du paludisme en Afrique

La carte montre le nombre de mois propices à la transmission du paludisme en Afrique, selon un modèle théorique basé sur des moyennes climatiques mensuelles. Les conditions favorables incluent des précipitations >80 mm, des températures de 18-32°C, et une humidité relative >60%. Ces seuils approximatifs reflètent les exigences du parasite *P. falciparum* et de son vecteur moustique pour leur développement et le cycle de vie (Grover-Kopec *et al.*, 2006; *Seasonal Climatic Suitability for Malaria Transmission*, no date).

III.2. Facteurs de Virulence Parasite

La virulence de *Plasmodium falciparum* est liée à sa capacité à envahir les globules rouges et à adhérer aux parois des vaisseaux sanguins, principalement grâce à des protéines exprimées à la surface des érythrocytes. Les antigènes de surface variables sont cruciaux dans la pathogénie du paludisme à *P. falciparum*. Pendant la phase érythrocytaire, *P. falciparum* exprime plusieurs antigènes de surface variables dont trois grandes familles : PfEMP1, RIFINs et STEVOR (Fig. 10).

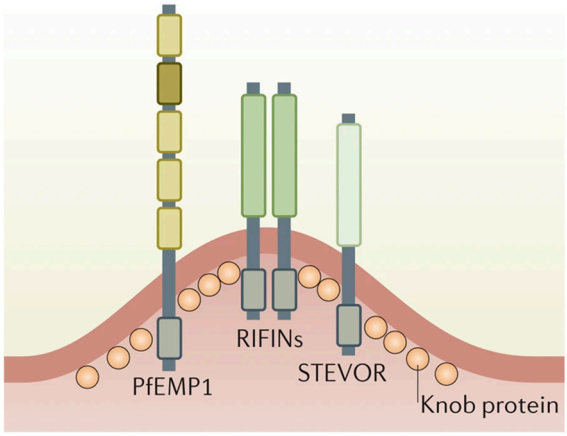


Figure 10 : Principaux antigènes de surface variables de *P. falciparum* exprime à la surface des érythrocytes

Les protéines PfEMP1, RIFINs et STEVORs, qui sont les principaux antigènes de surface variables de P. falciparum, sont codés respectivement par les gènes *var*, *rif* et *stevor* et sont exportés de la vacuole parasitophore vers la surface des érythrocytes. La protéine de "knob" (KP ou KAHRP) forme une structure dense sous-membranaire, contribuant à l'augmentation de l'affinité des érythrocytes parasités pour les cellules des micro-vaisseaux (Wahlgren, Goel and Akhouri, 2017).

PfEMP1 est codée par environ 60 gènes *var* (Su *et al.*, 1995; Gardner *et al.*, 2002) et a été l'un des premiers antigènes de surface variables identifiés dans *P. falciparum* (Baruch *et al.*, 1995). En général, un seul variant de PfEMP1 est exprimé à la surface de l'érythrocyte infecté à un moment donné en raison de l'exclusion allélique (un mécanisme par lequel une cellule exprime seulement une copie d'un gène parmi plusieurs allèles disponibles)(Chen, Fernandez, *et al.*, 1998). Cela contribue à l'évolution génétique du parasite et permet une variation antigénique constante, aidant le parasite à échapper au système immunitaire de l'hôte.

L'expression des gènes *var* est contrôlée par les régions non codantes en 5', classées en trois groupes : UpsA, UpsB et UpsC (Ups -Upstream). Les études sur l'expression des gènes *var* lors d'infections ont révélé une association entre l'expression du groupe de gène *var* UpsA et les formes graves de la maladie, tandis que les transcrits de UpsC étaient principalement détectés dans les cas de paludisme non compliqué chez les enfants plus âgés (Kaestli *et al.*, 2004; Kyriacou *et al.*, 2006; Rottmann *et al.*, 2006; Falk *et al.*, 2009). Les gènes *var* permettent la construction de PfEMP1, constituées de deux classes de domaines : les Domaines DBL (Duffy Binding-Like) et Domaines CIDR (Cysteine-Rich Interdomain Region) (Fig 11). Les domaines DBL, nommée DBLα, DBLβ, DBLγ, etc., varient selon les gènes *var* exprimés et interagissent avec des récepteurs spécifiques. Par exemple, DBLα peut lier le récepteur CD36, tandis que d'autres domaines comme DBLβ peuvent cibler ICAM-1, jouant un rôle clé dans l'attachement aux parois vasculaires (Smith *et al.*, 1998, 2000). Les domaines CIDR interagissent également avec des récepteurs comme CD36 ou EPCR, contribuant à la séquestration dans les vaisseaux sanguins. Le domaine CIDRα est crucial dans les formes sévères de paludisme en facilitant la liaison avec l'EPCR, qui est impliqué dans des complications graves comme le neuropaludisme (Shabani *et al.*, 2017). Il existe aussi des groupes de variantes atypiques, *var1csa*, *var2csa*, connu pour coder à une famille PfEMP1 spécifiquement utile pour l'adhésion du parasite au CSA (chondroïtine sulfate A) dans le placenta (Gardner *et al.*, 2002).

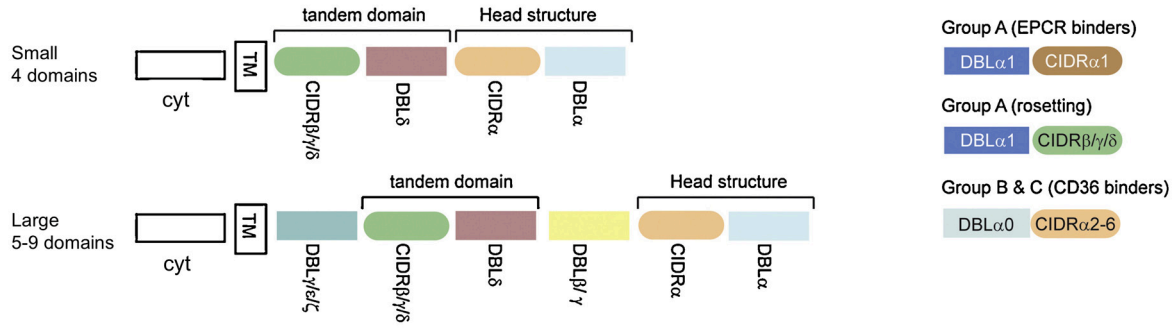


Figure 11 : Structure et domaine d'adhésion des protéines PfEMP1

La classification des domaines d'adhésion de PfEMP1 révèle une organisation complexe avec des arrangements en tandem préférentiels de domaines DBL et CIDR (DBLα-CIDRα et DBLδ-CIDRβ/γ/δ). Ces arrangements sont présents dans les protéines PfEMP1 petites (4 domaines) et grandes (5 domaines ou plus), mais les grandes protéines contiennent des sous-types DBL (β ou γ) absents des petites. Les structures de tête PfEMP1 sont organisées en groupe de domaines d'adhésion ; A, B, C (UpsA, UpsB et UpsC) et permettent de différencier les fonctions des protéines de chaque groupe. TM désigne la partie transmembranaire, et cyt désigne la queue cytoplasmique (Gardner *et al.*, 2002).

Le parasite *P. falciparum* n'est pas le seul à s'adapter à son environnement ; l'hôte, lui aussi, a développé des mécanismes de défense pour lutter contre l'infection. Ces stratégies incluent non seulement des réponses comportementales, telles que l'évitement des piqûres de moustiques, mais aussi des adaptations génétiques qui ont évolué au fil du temps pour conférer une certaine résistance à la malaria. Ces mécanismes de défense jouent un rôle crucial dans la modulation de la sévérité de l'infection et l'évolution clinique de la maladie.

III.3. Facteurs de l'Hôte

La variabilité interindividuelle de la sévérité du paludisme peut être expliquée par une série de facteurs complexes. Nous avons pu voir les facteurs socio-économiques, environnementaux et de virulence du parasite. Mais cette variabilité est aussi due, en grande partie à des éléments liés à l'hôte, notamment l'âge, le système immunitaire, ainsi que des facteurs génétiques spécifiques. La réponse immunitaire, par exemple, varie non seulement en fonction de l'âge, mais aussi du nombre d'expositions antérieures au parasite, contribuant ainsi à une protection partielle contre les formes graves. En outre, des facteurs génétiques jouent également un rôle crucial, notamment ceux liés aux gènes de l'immunité qui influencent la capacité de l'hôte à répondre à l'infection. Ces gènes peuvent déterminer, entre autres, l'efficacité de la réponse immunitaire, influençant ainsi la gravité des symptômes chez les individus porteurs de certaines variantes génétiques.

III.3.1. Facteur Immunitaire de l'Hôte

L'immunité joue un rôle déterminant dans la susceptibilité à l'infection par le paludisme. Les individus n'ayant jamais été exposés au parasite, tels que les voyageurs ou les nouveaux arrivants dans les zones endémiques, courent un risque plus élevé de développer une forme

grave de la maladie. En revanche, l'immunité acquise au fil des expositions précédentes offre une protection partielle. Les jeunes enfants, en particulier ceux de moins de cinq ans, sont particulièrement vulnérables, car leur système immunitaire est encore en développement, les exposant à un risque accru de formes sévères. De plus, la diversité des souches de *Plasmodium falciparum* ralentit le processus d'immunisation, rendant la protection contre les différentes souches plus difficile. La réponse immunitaire face à *P. falciparum* s'intensifie avec l'âge et le nombre d'expositions ; ainsi, la production d'anticorps est étroitement liée à ces facteurs (Chan *et al.*, 2012; Kanoi *et al.*, 2018). Les personnes vivant dans des régions endémiques développent donc une immunité partielle qui atténue la gravité des infections futures. Enfin, les femmes enceintes représentent un groupe particulièrement vulnérable, car les modifications immunitaires et physiologiques liées à la grossesse augmentent leur susceptibilité à des formes graves du paludisme, telles que le paludisme placentaire, avec des risques graves pour la mère et l'enfant. Ces processus immunitaires complexes sont essentiels pour comprendre la dynamique du paludisme, ses manifestations cliniques et les différents stades de l'infection.

III.3.1.1. Phase Infectieuse Pré-hépatique

Lors de l'injection des sporozoïtes par les moustiques chez l'homme, le parasite met seulement 2 à 30 minutes pour atteindre le foie, laissant peu de temps à la réponse immunitaire pour bloquer l'infection. Malgré tout, une partie des parasites est retenue dans la peau, et on les retrouve dans les ganglions lymphatiques drainants de la peau, où ils sont captés par les cellules dendritiques et activent les lymphocytes T CD8+ (Mac-Daniel *et al.*, 2014; Radtke *et al.*, 2015). Il a été démontré chez la souris que les cellules dendritiques cDC1 jouent un rôle crucial dans l'activation des lymphocytes T CD8+ (Fig. 12) (Montagna *et al.*, 2015). De plus, une élévation de molécules telles que CXCL9, CXCL10, granzyme B et IFN-γ a été observée, montrant déjà une réponse précoce à l'infection (Mac-Daniel *et al.*, 2014).

Le rôle des anticorps est également crucial dès le début de l'infection. D'abord démontré chez la souris (Nussenzweig *et al.*, 1967), puis confirmé chez l'homme (Rieckmann *et al.*, 1979), l'induction d'anticorps neutralisants contre les sporozoïtes cible des antigènes comme TRAP, CSP et LSA1. Bien que les anticorps seuls ne permettent pas d'éliminer totalement l'infection, ils favorisent l'opsonisation, conduisant à l'élimination des sporozoïtes par phagocytose avant qu'ils n'atteignent les hépatocytes, et en bloquant l'invasion des cellules hépatiques par le parasite (Fig. 12) (John *et al.*, 2005, 2008).

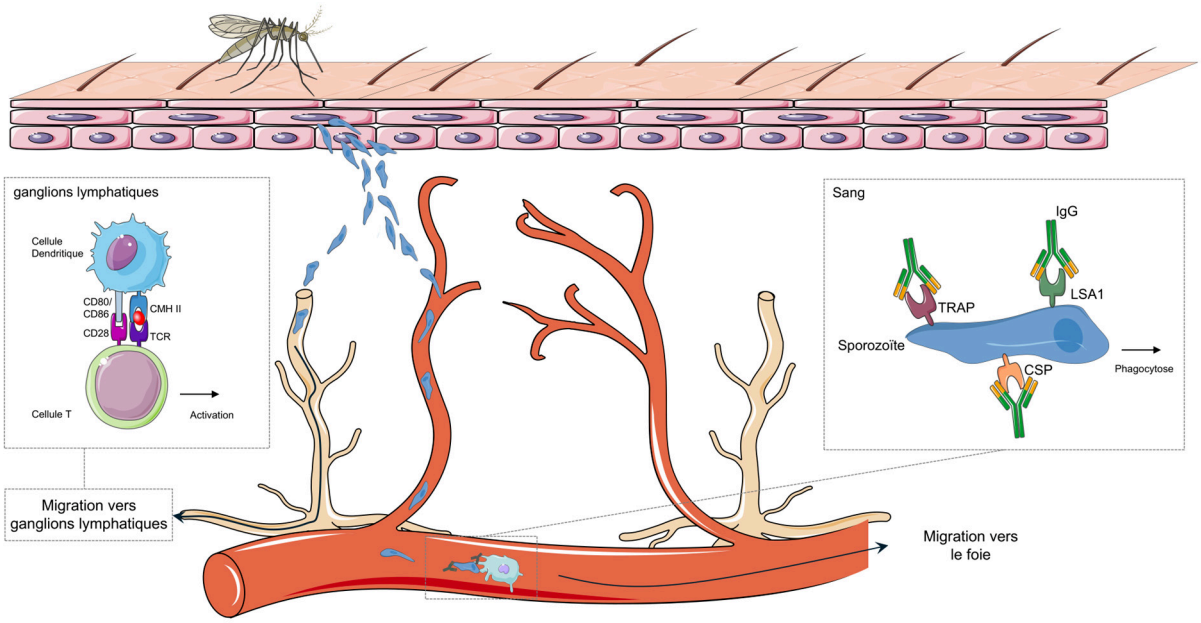


Figure 12 : Les premières étapes de la réponse immunitaire contre l'infection par *P. falciparum*

Après l'injection des sporozoïtes par les moustiques, ceux-ci atteignent rapidement le foie (en 2 à 30 minutes), limitant la possibilité d'une réponse immunitaire. Cependant, certains parasites sont capturés dans la peau et transportés vers les ganglions lymphatiques, où les cellules dendritiques cDC1 activent les lymphocytes T CD8+. Cette activation précoce induit une réponse immunitaire marquée par l'élévation de molécules telles que CXCL9, CXCL10, granzyme B et IFN-γ. Par ailleurs, les anticorps neutralisants dirigés contre des antigènes comme TRAP, CSP et LSA1 jouent également un rôle clé en favorisant l'opsonisation et la phagocytose des sporozoïtes avant leur arrivée dans les hépatocytes, contribuant ainsi à limiter l'invasion hépatique du parasite.

III.3.1.2. Phase Infectieuse Hépatique

Les sporozoïtes qui quittent la peau migrent ensuite vers le foie, où ils pénètrent dans les cellules hépatiques pour se différencier en mérozoïtes. Cependant, le mécanisme précis d'infiltration des sporozoïtes dans les hépatocytes n'est pas encore complètement élucidé. Pour atteindre les hépatocytes, les sporozoïtes doivent traverser une barrière composée de cellules endothéliales et de cellules de Kupffer (Garcia, Puentes and Patarroyo, 2006). Les cellules endothéliales possèdent de petites fenestrations, insuffisantes pour le passage direct des sporozoïtes.

À l'origine, il a été proposé que les sporozoïtes passent principalement par les cellules de Kupffer, des macrophages du foie, selon ce qui a été nommé le "gateway model" (Fig. 13) (Frevert *et al.*, 2006). Dans ce modèle, les parasites traversent les cellules de Kupffer sans rupture de la membrane plasmique, formant une vacuole protectrice, malgré le rôle phagocytaire de ces cellules, qui devraient éliminer les pathogènes (Pradel and Frevert, 2001; Baer *et al.*, 2007).

Cependant, des études plus récentes ont montré que les sporozoïtes peuvent également traverser entre ou à travers les cellules endothéliales, sans médiation des cellules de Kupffer, dans environ 40 % des cas (Fig. 13) (Tavares *et al.*, 2013). La traversée des cellules

endothéliales par les sporozoïtes active néanmoins les cellules de Kupffer, qui présentent les antigènes du parasite aux lymphocytes T CD4+, induisant ainsi la production d'IFN-γ (Fig. 13) (Tweedell *et al.*, 2018).

Les lymphocytes T CD8+ jouent un rôle essentiel dans la protection contre le paludisme pendant la phase hépatocytaire. En effet, ces lymphocytes cytotoxiques sont capables de tuer directement les hépatocytes infectés et produisent par ailleurs de l'IFN-γ, qui est associé à la synthèse d'oxyde nitrique (ON), un composé capable d'éliminer le parasite (Hafalla, Cockburn and Zavala, 2006). De plus, des études ont montré que des souris naïves infectées par *Plasmodium*, mais recevant des lymphocytes T CD8+ provenant de souris immunisées, bénéficient d'une protection accrue (Tsuji and Zavala, 2003). L'IFN-γ favorise également le recrutement des cellules NK (Natural Killer), contribuant ainsi à la diminution de la charge parasitaire dans le foie.

Si l'infection n'est pas maîtrisée par l'hôte à ce stade, les sporozoïtes se transforment en mérozoïtes et migrent dans le système sanguin, ce qui peut provoquer des symptômes, comme décrit précédemment.

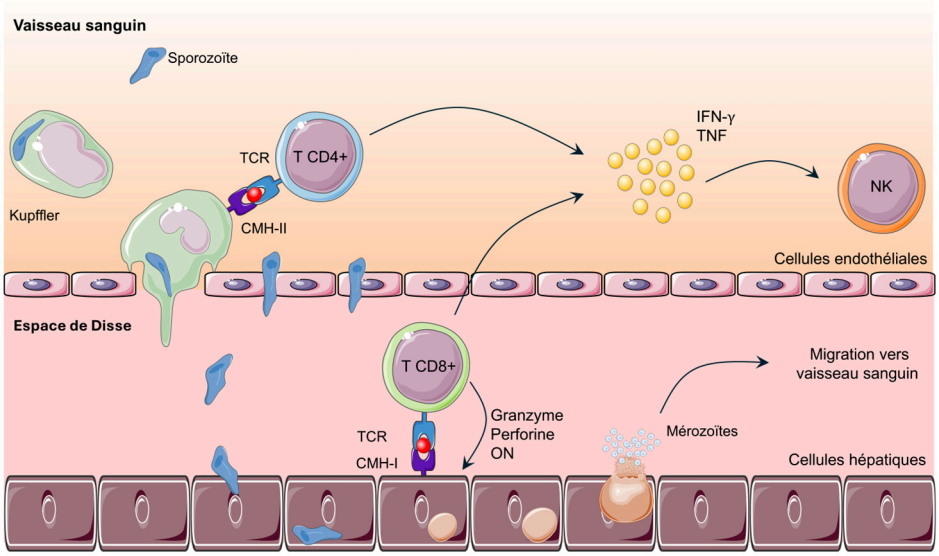


Figure 13 : Migration des sporozoïtes vers le foie et leur infiltration dans les hépatocytes.

Les sporozoïtes quittent la peau et migrent vers le foie, où ils traversent une barrière composée de cellules endothéliales et de cellules de Kupffer. Selon le "gateway model", les sporozoïtes passent par les cellules de Kupffer sans provoquer de phagocytose, formant une vacuole protectrice. Cependant, des études récentes montrent qu'environ 40 % des sporozoïtes peuvent également franchir directement les cellules endothéliales sans passer par les cellules de Kupffer. Cette traversée active les cellules de Kupffer, qui présentent les antigènes du parasite aux lymphocytes T CD4+, induisant la production d'IFN-γ. Les lymphocytes T CD8+ jouent également un rôle crucial dans la protection en éliminant les hépatocytes infectés et en produisant de l'IFN-γ, ce qui stimule la production d'oxyde nitrique (ON) de granzyme et perforine.

III.3.1.3. Phase Infectieuse Erythrocytaire

Les sporozoïtes, après avoir atteint le foie, se transforment en mérozoïtes qui migrent ensuite vers les vaisseaux sanguins et pénètrent ensuite dans les globules rouges. Ces mérozoïtes se multiplient de manière asexuée, entraînant la destruction des globules rouges infectés. À partir de ce moment, plusieurs mécanismes d'échappement au système immunitaire s'enclenchent simultanément. Les premiers mécanismes qui se mettent en place sont l'expression des variants antigéniques de surface tels que PfEMP1, RIFIN et SETVOR à la surface des globules rouges infectés. Même si PfEMP1 est plus largement étudié, il a été démontré que RIFIN joue un rôle important dans l'immunité en interagissant avec LAIR1 (Tan *et al.*, 2016), LILRB1 (Harrison *et al.*, 2020) et LILRB2 (Sakoguchi *et al.*, 2021). Ces trois variants antigéniques de surface sont reconnus par les récepteurs de l'immunité innée (Pattern Recognition Receptor-PRR) et inhibent l'activation de certaines cellules telles que les lymphocytes B, T et les cellules NK (Daëron *et al.*, 2008).

Un mécanisme similaire a été démontré dans les cellules dendritiques. PfEMP1 interagit via le CD36 avec les cellules dendritiques, ce qui conduit à une diminution de leur activation médiée par le LPS et à une réduction de la sécrétion de cytokines (Urban *et al.*, 1999). Cependant, les cellules dendritiques qui ne sont pas inhibées par les globules rouges infectés s'activent, migrent vers la rate, expriment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMH I et CMH II) tout en sécrétant de l'IL-12, et activent les lymphocytes T CD8+ et CD4+ (Fig. 14).

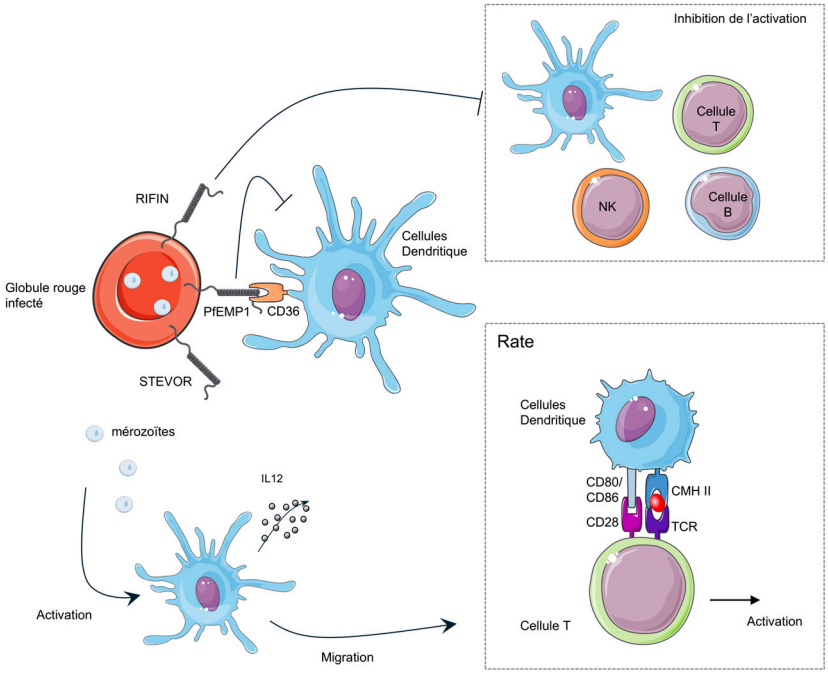


Figure 14 : Mécanismes immunitaires médiés par les variants antigéniques de surface du *Plasmodium falciparum*

Une fois à l'intérieur des globules rouges, les parasites expriment des protéines antigéniques de surface comme PfEMP1, RIFIN et STEVOR, qui inhibent l'activation des lymphocytes B, T et NK via les récepteurs LAIR1, LILRB1 et LILRB2. PfEMP1 interagit également avec CD36 sur les cellules dendritiques, réduisant leur activation. Cependant, les cellules dendritiques non inhibées migrent vers la rate, où elles activent les lymphocytes T via le CMH de classe I et II, et la sécrétion d'IL-12.

Après l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ au début de l'infection dans les ganglions lymphatiques, le foie et la rate, ces cellules expriment diverses cytokines telles que l'IFN-γ et le TNF (Fig. 15.1/2/3). En présence d'IL-12 sécrétées par les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4+ se différencient en cellules T helper 1 (Th1) (Macatonia *et al.*, 1995), extrêmement importantes dans la réponse immunitaire contre l'infection palustre (Fig. 15.4). Chez les souris déficientes en *Tbx21* (gène codant pour le facteur de transcription T-bet spécifique des Th1), une diminution de la production d'IFN-γ est observée, accompagnée d'une augmentation de la charge parasitaire (Oakley *et al.*, 2014). Les cellules Th1 expriment également le facteur CSF1 (*M-CSF*), nécessaire à l'activation et à la différenciation des monocytes en macrophages, essentiels pour la réponse immunitaire (Fontana *et al.*, 2016). Cependant, les cellules Th1 peuvent jouer un rôle pathogène. En effet, l'IFN-γ est associé à la formation de cellules B atypiques (Obeng-Adjei *et al.*, 2017). Dans des modèles murins, une réponse excessive des Th1, et donc une augmentation de l'IFN-γ, conduit à une aggravation de l'anémie sévère (Rivera-Correa *et al.*, 2017).

Les cellules T helper 2 (Th2), bien qu'en plus petit nombre comparé aux Th1, jouent un rôle dont la nature exacte n'est pas encore complètement élucidée. Les Th2 expriment spécifiquement le facteur GATA3 et sécrètent des cytokines comme l'IL-4 (Walker and McKenzie, 2018). L'IL-4 est particulièrement importante pour favoriser la différenciation des cellules B et des macrophages (Kumaratilake and Ferrante, 1992; Shimoda *et al.*, 1996) (Fig. 15.5).

Les infections répétées induisent la formation de cellules T folliculaires helper (Tfh), au niveau des organes lymphoïdes et la rate, caractérisées par l'expression de CXCL5, BCL-6 et l'inhibition de PD1 (Vinuesa and Cyster, 2011). La différence entre les Tfh et les Th1 se manifeste assez tôt et est favorisée par l'IL-6 et l'IL-21 (Lönnberg *et al.*, 2017; Sebina *et al.*, 2017). Les Tfh jouent un rôle central dans la formation de cellules B mémoires et de plasmocytes en sécrétant de l'IL-21 (Perez-Mazliah and Langhorne, 2014) et en exprimant le récepteur ICOS (Sebina *et al.*, 2016; Figueiredo *et al.*, 2017) (Fig. 15.6).

En présence d'IL-6, d'IL-23 et de TGF-β, les lymphocytes T CD4+ peuvent être reprogrammés via l'activation de RORγt, un facteur de transcription régulant l'expression de l'IL-17, ce qui favorise la formation de cellules T helper 17 (Th17). Les Th17 sont cruciales pour le recrutement des neutrophiles, des macrophages (Sandquist and Kolls, 2018) (Fig. 15.7). De plus, les cellules Th17 peuvent exprimer de l'IL-21, ce qui facilite la différenciation des cellules B (Wei *et al.*, 2007). Elles produisent également de l'IL-22, une cytokine associée à la protection contre l'inflammation hépatique chez la souris (Mastelic *et al.*, 2012).

Il existe aussi des lymphocytes exprimant des chaînes de récepteurs distinctes, appelées TCRγ et TCRδ, formant les cellules Tγδ. Cependant, leur rôle dans l'immunité antipaludique reste mal compris. Chez la souris, des modèles expérimentaux montrent que les cellules Tγδ contribuent à la production d'IL-21, ce qui soutient les réponses des cellules Tfh (Inoue *et al.*, 2018). Ces cellules jouent également un rôle dans l'activation des monocytes grâce à leur production de CSF1 (Inoue *et al.*, 2018) (Fig. 15.8). Les cellules Tγδ sont aussi connues pour être des effecteurs précoces dans la défense contre les infections, stimulant ou réprimant les réponses immunitaires selon le contexte. Lors des infections primaires à *Plasmodium*, ces cellules produisent des médiateurs tels que l'IFN-γ et le TNF, et pourraient également tuer directement les mérozoïtes en phase érythrocytaire, mais exacerber la réponse, causant des formes cliniques. Les études suggèrent que la diminution des cellules Tγδ après plusieurs expositions au paludisme pourrait être une réponse adaptative visant à limiter les dommages immunopathologiques (Jagannathan *et al.*, 2014).

Une régulation immunitaire est également nécessaire pour protéger l'hôte contre les dommages potentiellement causés par les cellules T cytotoxiques. Ce rôle est joué par les cellules T régulatrices (Treg), caractérisées par l'expression du facteur FOXP3, du CD25, et la répression de CD45RB (Fig 15.9). Cependant, dans les régions endémiques, il a été montré qu'une diminution des cellules Treg protège contre une charge parasitaire élevée (Walther *et al.*, 2005), alors qu'une augmentation des cellules Treg est souvent associée à des formes cliniques plus graves de l'infection palustre (Fig. 16) (Kurup *et al.*, 2017).

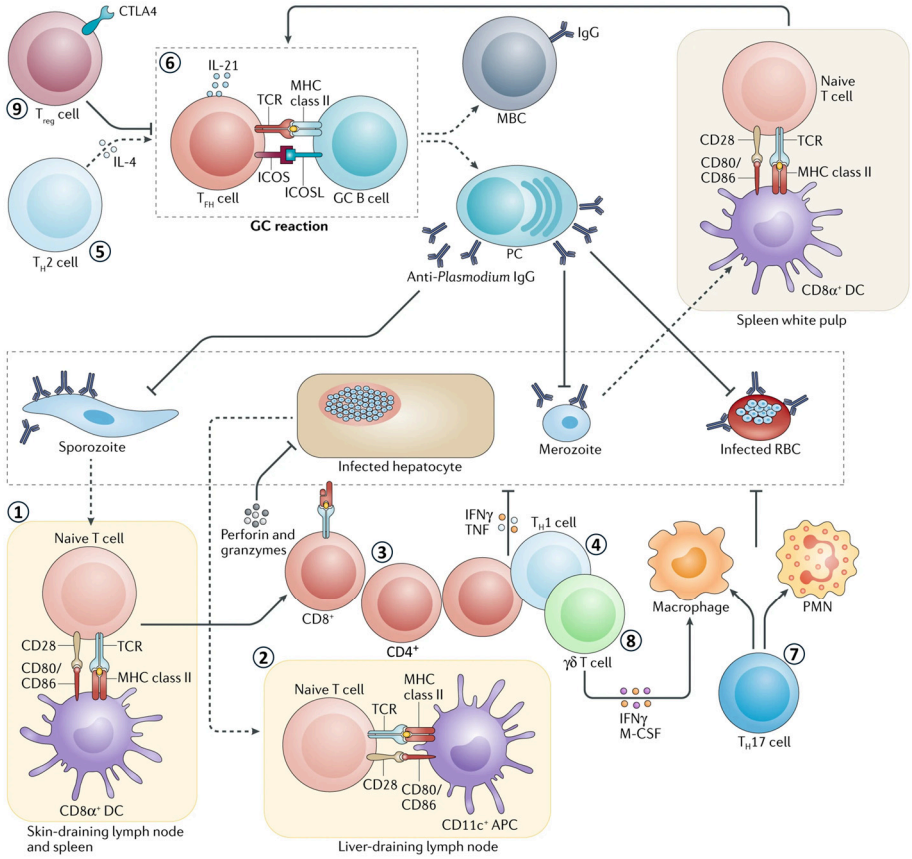


Figure 15 : Réponse immunitaire lors de l'infection par Plasmodium médié par les lymphocytes T

Après l'activation des lymphocytes CD4+ et CD8+ dans les ganglions lymphatiques, le foie et la rate, ces cellules expriment diverses cytokines, telles que l'IFN-γ et le TNF (1-3). En présence de l'IL-12 sécrétée par les cellules dendritiques, les cellules CD4+ se différencient en cellules T helper 1 (Th1) (4). Parallèlement, les cellules T helper 2 (Th2), en plus petit nombre, produisent des cytokines comme l'IL-4 et l'IL-12, ce qui aide à la différenciation des cellules B et des macrophages (5). Les cellules T folliculaires helper (Tfh), formées lors d'infections répétées, sont essentielles pour la formation de cellules B mémoires et de plasmocytes, grâce à l'IL-21 et l'expression de ICOS (6). De plus, les cellules T helper 17 (Th17) sont activées en présence d'IL-6, IL-23 et TGF-β, et produisent de l'IL-21 pour favoriser la différenciation des cellules B et le recrutement de neutrophiles et de macrophages (7). Les cellules Tγδ, contribuent à la production d'IL-21 et à l'activation des monocytes via CSF1 (8). Enfin, les cellules T régulatrices (Treg), exprimant FOXP3, régulent la réponse immunitaire pour éviter des dommages excessifs. (9) (Kurup, Butler and Harty, 2019).

L'équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est essentiel pour prévenir les accès palustres sévères (Fig. 16). Par exemple, dans les régions endémiques, les personnes développent souvent une immunité adaptative en raison des expositions répétées à l'infection, ce qui modifie la réponse immunitaire. Une étude réalisée chez des enfants a montré que la production de cytokines par les cellules T CD4+ et leur prolifération étaient influencées par les expositions antérieures aux infections. Les enfants plus exposés produisaient plus d'IL-10, tandis que ceux moins exposés produisaient davantage de TNF-α, favorisant l'inflammation. Des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN-γ et le TNF-α, peuvent aussi inhiber l'érythropoïèse, exacerbant l'anémie sévère (Perkins, Weinberg and Kremsner, 2000; Lyke *et al.*, 2004). Enfin, chez les enfants atteints d'anémie sévère, des niveaux accrus de monoxyde d'azote et d'espèces réactives de l'oxygène contribuent directement à l'inhibition de l'érythropoïèse (Perkins *et al.*, 2011).

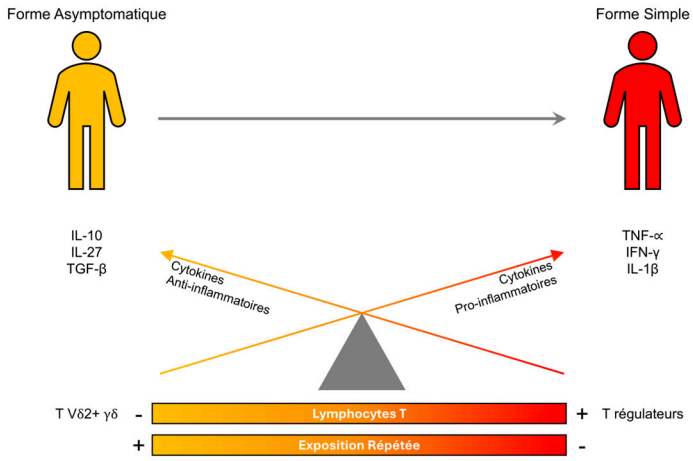


Figure 16 : Modulation immunitaire lors des infections palustres asymptomatiques et symptomatiques

L'issue d'une infection palustre dépend de l'équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Une production élevée (+) de cytokines pro-inflammatoires (ex. : IFN-γ, TNF-α) et une augmentation des cellules immunitaires (ex. : Tregs) accompagnées d'une diminution (–) des expositions répétées au paludisme favorisent l'apparition de formes cliniques symptomatiques. De manière opposée, des expositions répétées au paludisme modifient l'équilibre immunitaire et se déplacent vers une production accrue de cytokines anti-inflammatoires, conduisant à des infections asymptomatiques. Adapté de (Kimenyi, Wamae and Ochola-Oyier, 2019).

On pense que les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques contribuent peu au contrôle du stade sanguin de l'infection palustre, notamment parce que les globules rouges, dépourvus de HLA de classe I à leur surface, ne peuvent pas présenter les antigènes du parasite aux cellules T CD8+. En conséquence, ces dernières ne peuvent pas les cibler efficacement, contrairement aux hépatocytes et aux cellules endothéliales, qui expriment le CMH de classe I et permettent une reconnaissance directe par les lymphocytes T CD8+. Cependant, au stade érythrocytaire les cellules T CD8+ jouent un rôle central dans le développement du neuropaludisme, hautement mortel chez l'humain, d'après des études parallèles menées sur des modèles murins (Fig. 17) (Belnoue *et al.*, 2002; Swanson *et al.*, 2016). En effet, la séquestration des globules rouges infectés entraîne une réponse pro-inflammatoire dans le cerveau. Plusieurs cytokines médient cette inflammation, avec l'IFN-γ libéré par les lymphocytes T CD4+, CD8+, les cellules NK, ainsi que les lymphocytes Tγδ. Cependant, l'IFN-γ induit également une

activation des cellules endothéliales, augmentant l'expression des molécules d'adhésion (Dunst, Kamena and Matuschewski, 2017) et initiant la phagocytose des mérozoïtes libre (Howland, Poh and Rénia, 2015) ou bien en fusionnant avec des vésicules contenant des antigènes plasmodiaux (Razakandrainibe *et al.*, 2012). En conséquence, les cellules endothéliales commencent à exprimer à leur surface les antigènes parasitaires via le CMH I et sécrètent la chimiokine CXCL10. Cette dernière, via les récepteurs CXCR3, recrute les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Les cellules T CD8+ reconnaissent les CMH I présents à la surface des cellules endothéliales, ce qui déclenche l'apoptose des cellules endothéliales, un mécanisme médié par l'expression de granzyme B et de perforine entraînant la rupture de la barrière hémato-encéphalique, pouvant conduire à un œdème cérébral et un coma (Riggle *et al.*, 2020).

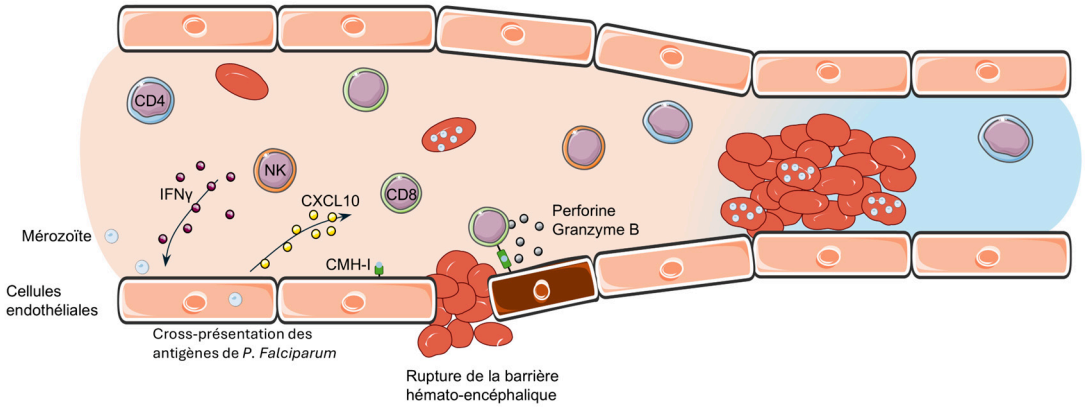


Figure 17 : Mécanisme immunitaire du neuropaludisme

La séquestration des globules rouges infectés induit une réponse pro-inflammatoire dans le cerveau, avec la libération d'IFN-γ par les cellules T CD4+, CD8+, NK. Cette cytokine active les cellules endothéliales, augmentant l'expression de molécules d'adhésion et le recrutement de lymphocytes via la chimiokine CXCL10. Les cellules T CD8+ reconnaissent les antigènes parasitaires présentés par les molécules CMH I sur les cellules endothéliales, déclenchant leur apoptose via la perforine et le granzyme B. Ce processus provoque la rupture de la barrière hémato-encéphalique, conduisant à des complications graves telles qu'un œdème cérébral.

Les lymphocytes B jouent également un rôle clé dans la réponse à l'infection, notamment dans la production d'anticorps. Comme mentionné plus tôt, les globules rouges infectés expriment des variants antigéniques de surface, et PfEMP1 est la principale cible des anticorps, en particulier des IgG1 et des IgG3, permettant ainsi la mise en place de la neutralisation et de l'opsonisation (Megnekou *et al.*, 2005; Tornyigah *et al.*, 2021). La neutralisation par les anticorps permet d'interrompre ou de bloquer l'interaction entre un ligand dérivé d'un pathogène et un récepteur dérivé de l'hôte. Dans le paludisme, les anticorps peuvent interférer avec l'invasion des mérozoïtes dans les érythrocytes ou avec l'adhésion des érythrocytes infectés aux récepteurs vasculaires.

L'opsonisation, quant à elle, permet d'engager et d'activer des cellules telles que les monocytes et les cellules NK via les mécanismes ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps) et ADCP (phagocytose cellulaire dépendante des anticorps), médiés par les récepteurs Fc gamma (Fig. 18). Via les récepteurs FcγRIII, les cellules Tγδ, les neutrophiles et les cellules NK sont activées. Il a été démontré l'importance des cellules NK dans

l'élimination des globules rouges infectés, opsonisés par des IgG in vitro (Arora *et al.*, 2018) et in vivo (Hart *et al.*, 2019) via l'ADCC.

Parallèlement, les monocytes différenciés en macrophages permettent la phagocytose des globules rouges infectés, en reconnaissant les IgG via leurs récepteurs FcγRI et FcγRIIIA dans la rate (Nagelkerke *et al.*, 2018), ce qui permet leur élimination par ADCP. Leur rôle ne s'arrête pas là : lors de la rupture des schizontes, la libération de l'hématozoïne, une forme polymérisée de l'hème, et d'autres endotoxines solubles stimule directement les macrophages à produire du TNF-α via la phagocytose de l'hématozoïne (Nagao *et al.*, 1996).

Les monocytes jouent un rôle important aussi dans l'inhibition du développement des mérozoïtes grâce à un mécanisme d'inhibition cellulaire dépendante des anticorps (ADCI) (Fig. 18). Les IgG reconnaissent des épitopes spécifiques des mérozoïtes, notamment la protéine MSP3. Cependant, au lieu de simplement neutraliser le parasite, ces anticorps collaborent avec les monocytes pour inhiber le développement et la multiplication du parasite en libérant du TNF (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990, 1995; Rodríguez *et al.*, 2005). Le mécanisme ADCI serait déclenché par l'activation conjointe des récepteurs FcγRIIA et FcγRIIIA présents sur les monocytes, lorsque ceux-ci se lient aux anticorps spécifiques fixés sur MSP3. Cette activation coordonnée facilite l'inhibition du parasite par les monocytes. Récemment il a été montré que l'activité ADCI des anticorps IgG est liée à une réduction du risque de paludisme simple chez les enfants. Les enfants ayant les niveaux les plus élevés d'activité ADCI présentaient un délai avant leur premier épisode de paludisme, indiquant un effet protecteur de cette réponse immunitaire (Tiendrebeogo *et al.*, 2015).

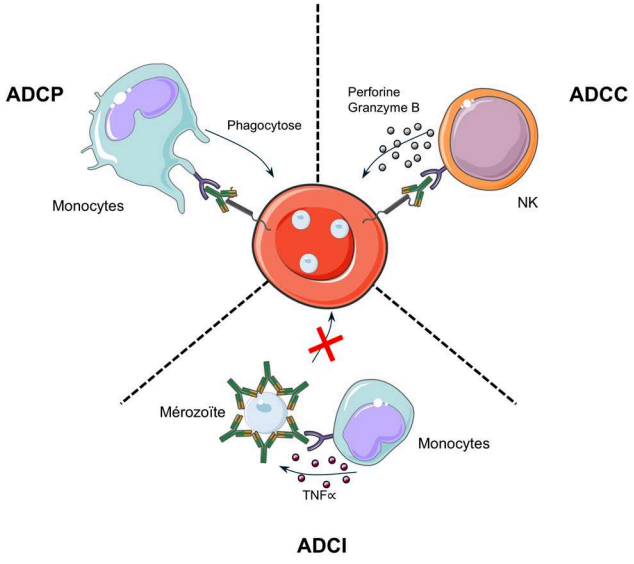


Figure 18 : Mécanismes immunitaires médiés par les anticorps et les réponses associés

Les anticorps jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire contre *Plasmodium* via trois mécanismes principaux. (1) ADCP (phagocytose cellulaire dépendante des anticorps) : les monocytes et macrophages reconnaissent les érythrocytes infectés via les récepteurs FcγRI et FcγRIIIA, favorisant leur phagocytose, notamment dans la rate. (2) ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps) : les cellules NK, les neutrophiles et les lymphocytes T reconnaissent les érythrocytes infectés opsonisés par des IgG via leurs récepteurs FcγRIII, induisant leur destruction. (3) ADCI (inhibition cellulaire dépendante des anticorps) : les monocytes interagissent avec les IgG fixées sur des antigènes parasitaires (ex. : MSP3) via les récepteurs FcγRIIA et FcγRIIIA, inhibant le développement des mérozoïtes grâce à la libération de TNF-α. Ces mécanismes collaborent pour neutraliser et éliminer les parasites, réduisant la charge parasitaire et le risque de paludisme clinique.

III.3.2. Facteur Génétique de l'Hôte

La sévérité de l'infection varie considérablement d'un individu à l'autre, soulignant l'importance des facteurs intrinsèques de l'hôte dans la réponse au parasite. La lutte contre cette infection repose sur une réponse immunitaire sophistiquée, orchestrée par des gènes qui régulent les mécanismes de défense.

Cependant, des variations génétiques peuvent perturber cet équilibre, en modifiant l'expression ou la fonction de ces gènes essentiels. Par exemple, les variations génétiques affectant des molécules clés comme les récepteurs des cytokines, les marqueurs de surface cellulaire, ou les voies de signalisation immunitaire, façonnent les différences interindividuelles dans la susceptibilité au paludisme ou dans la protection contre ses formes graves (Penha-Gonçalves, 2019).

L'étude des facteurs génétiques de l'hôte repose sur l'analyse des variations génomiques et leur association avec la susceptibilité ou la résistance au paludisme. Historiquement, les premières approches ont utilisé des études ciblées sur des gènes candidats. Ces études se basent sur des hypothèses précises, formulées à partir des connaissances biologiques disponibles ou d'observations épidémiologiques. Par exemple, l'hémoglobine S (HbS) a d'abord été identifiée comme une mutation potentiellement avantageuse grâce à des observations épidémiologiques liant sa présence à une résistance accrue au paludisme. Cette hypothèse, fondée sur des corrélations épidémiologiques frappantes, a été solidement confirmée par des approches ciblées sur le gène candidat, établissant la mutation HbS comme un exemple emblématique de l'adaptation génétique humaine aux pressions environnementales.

Les études de liaison génétique et l'analyse familiale sont venues compléter les approches gène candidat, et ont permis de mieux comprendre l'héritabilité des traits liés à la résistance au paludisme. Ce type d'analyse a aidé à identifier des régions du génome liées aux réponses immunitaires, en utilisant des marqueurs génétiques pour suivre la transmission de ces traits dans les familles exposées au paludisme (Garcia, Marquet, *et al.*, 1998; Rihet, Traoré, *et al.*, 1998).

Avec les avancées technologiques, les approches génétiques se sont diversifiées et généralisées. Les études d'association pangénomique (*genome-wide association studies*, GWAS) permettent aujourd'hui de scanner l'ensemble du génome pour identifier des régions associées au paludisme sans hypothèse a priori. Initialement, ces études s'appuyaient sur des puces à ADN (microarrays), qui permettaient de génotyper rapidement et à moindre coût des millions de polymorphismes nucléotidiques (SNPs) préalablement identifiés.

Avec les progrès récents en séquençage à haut débit, les GWAS évoluent vers une approche plus complète grâce au séquençage de génomes entiers (*Whole Genome Sequencing*, WGS). Cette transition permet de détecter non seulement des SNPs rares mais aussi d'autres types de variants structurels, comme les insertions, délétions et réarrangements chromosomiques.

III.3.2.1. Approche Gène Candidat

L'approche gène candidat se focalise sur des gènes spécifiques, sélectionnés en fonction de leur rôle biologique présumé ou de données préalables, pour explorer leur implication dans une pathologie donnée. Cette méthode peut être appliquée dans le cadre d'études par cas-témoins, qui comparent la fréquence des variants génétiques entre individus atteints et non

atteints, ou d'études familiales, qui examinent la transmission des variants au sein des familles affectées (cf. encadré 1).

Encadré 1 Analyse d'Association et l'Etude Familiale

Les analyses génétiques permettent d'identifier les variants associés aux maladies ou traits complexes. Elles incluent principalement les études cas-témoins, qui comparent la fréquence des variants entre 2 groupes, et les études familiales, basées sur des analyses de liaison génétique pour identifier les régions génomiques cohéritées avec un trait ou une maladie.

Les études cas-témoins sont des approches courantes en génétique pour évaluer l'association entre des variants génétiques (comme des SNPs) et un trait ou une maladie. Elles consistent à comparer les fréquences des allèles ou des génotypes entre un groupe de cas (individus atteints) et un groupe de témoins (individus non atteints). Le groupe témoin doit être sélectionné de manière aléatoire et représenter fidèlement la population générale. Afin d'assurer cette représentativité, il est primordial que le groupe de contrôle respecte l'équilibre de Hardy-Weinberg. L'équilibre de Hardy-Weinberg est une condition théorique selon laquelle, dans une population suffisamment grande et sans forces évolutives, les fréquences alléliques et génotypiques restent constantes d'une génération à l'autre. Les témoins doivent respecter cet équilibre pour deux raisons principales : absence de biais dans le génotypage et représentativité de la population générale. De plus, les témoins doivent provenir de la même population que les cas pour éviter les problèmes de stratification de population, qui pourraient fausser les résultats de l'étude en introduisant des sous-groupes génétiquement distincts ayant des fréquences alléliques différentes.

Sous l'équilibre de Hardy-Weinberg, les fréquences génotypiques attendues sont données par les proportions suivantes :

$$1 = p^2 + 2pq + q^2$$

Pour vérifier si la population est en équilibre, on compare les effectifs génotypiques observés aux effectifs attendus, à l'aide d'un test du Khi2 de conformité. Ce test permet d'évaluer si la distribution observée des génotypes s'écarte de celle attendue sous l'hypothèse d'équilibre.

Après avoir vérifié l'équilibre de Hardy-Weinberg, le test couramment utilisé pour vérifier l'association entre génotype et un trait est le test du Khi2 d'homogénéité, qui permet de comparer les fréquences alléliques ou génotypiques entre cas et témoins. Le test du Khi2 compare deux hypothèses :

- H0 (hypothèse nulle) : Les fréquences sont identiques entre cas et témoins.
- H1 (hypothèse alternative) : Les fréquences diffèrent entre les deux groupes.

Le Khi2 est défini comme :

$$\chi^2 = \Sigma \frac{(Obs - Att)^2}{Att}$$

Où Obs et Att sont les fréquences observées et attendues, respectivement.

L'hypothèse nulle (H0) est rejetée lorsqu'il existe une association significative entre les variables étudiées. En pratique, cela dépend du seuil de significativité choisi (α généralement égale 0,05). Enfin Odds Ratio (OR), fait partie des coefficients de taille d'effet utilisés pour quantifier l'association entre génotypes et le trait, généralement dans le cadre d'une étude de cas-témoins ou d'une étude de cohorte. Il représente le rapport des cotes (odds) de la

survenue d'un événement dans un groupe par rapport aux cotes de la survenue de cet événement dans un autre groupe et est défini par :

$$OR = \frac{(a/c)}{(b/d)} = \frac{(a \times d)}{(b \times c)}$$

- a = cas avec l'allèle ou génotype,
- b = cas sans l'allèle ou génotype,
- c = témoins avec l'allèle ou génotype,
- d = témoins sans l'allèle ou génotype.

Enfin, pour ajuster l'analyse en tenant compte des variables confondantes (âge, sexe, origine ethnique) les analyses de régression logistique peuvent être utilise :

$$log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta 0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \cdots + \beta_n X_n$$

Où p est la probabilité d'être cas, X les variants génétiques, et βi leur effet estimé.

Les études familiales visent à identifier les facteurs génétiques impliqués dans certaines pathologies en analysant la transmission des variants au sein des familles. Elles reposent sur l'étude de la co-ségrégation des allèles avec le phénotype d'intérêt, ce qui permet de déterminer si un variant génétique spécifique est systématiquement hérité par les individus atteints et absent chez les individus non affectés d'une même famille (Fig. 19).Parmi ces approches, les études d'association familiales, connues sous le nom de tests de déséquilibre de transmission (TDT), combinent les analyses de liaison génétique et d'association des gènes candidats en examinant les individus affectés et leurs parents. Contrairement aux études cas-témoins, le TDT est insensible à la stratification de la population, ce qui en fait une méthode robuste dans des contextes génétiquement hétérogènes. De plus, il ne requiert pas de groupe témoin distinct, éliminant ainsi les biais de sélection associés à leur identification. Le test du déséquilibre de transmission (TDT) compare les fréquences avec lesquelles un allèle particulier est transmis par un parent hétérozygote à l'enfant atteint. Il compare donc la fréquence de cet allèle parmi les allèles transmis et les allèles non transmis. La signification de l'association est testée, dans le test historique, par un test de Khi2 particulier, le test de Mac Nemar (Spielman, McGinnis and Ewens, 1993). Si l'allèle est associé à la maladie, un excès de transmission de cet allèle sera observé dans plus de la moitié des cas (Fig. 19).

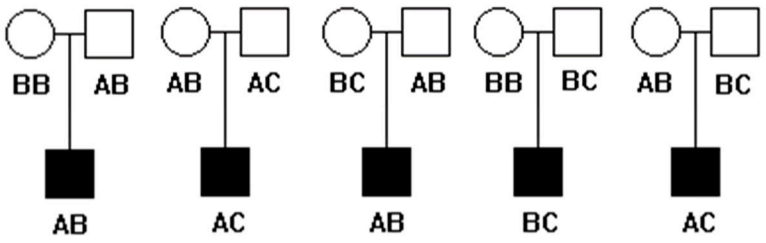


Figure 19 : Test de déséquilibre de transmission (TDT)

Pour vérifier si un allèle marqueur présente un déséquilibre de transmission avec une maladie, les parents des sujets atteints sont observés. Si les parents hétérozygotes pour l'allèle le transmettent aux sujets atteints dans plus de 50 % des cas, cela prouve l'existence d'un lien et d'un déséquilibre de liaison entre le marqueur et les loci de la maladie. Dans ce cas l'allèle A est transmis à la descendance atteinte quatre fois sur cinq.

Malgré ses avantages, le test de déséquilibre de transmission (TDT) présente certaines limites. Tout d'abord, sa puissance statistique pour détecter une association est restreinte, car il nécessite que l'un des parents soit hétérozygote pour l'allèle étudié afin d'être appliqué. Ensuite, son utilisation reste limitée dans la recherche, principalement en raison des difficultés logistiques liées à la constitution de cohortes comprenant un grand nombre de familles nucléaires. Ces contraintes réduisent son utilisation malgré sa robustesse face aux biais de sélection de la population.

Premières Découvertes : les Mutations de l'Hémoglobine

Le globule rouge est la cellule clé de la reproduction asexuée de *Plasmodium falciparum*, offrant au parasite un environnement protégé et les ressources nécessaires à sa prolifération rapide au cours de la phase érythrocytaire. Toute altération de la structure ou de la composition des globules rouges peut profondément affecter l'efficacité de l'invasion parasitaire et sa survie. Ces cellules sont spécialisées dans le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone, dépourvu de noyaux et avec une forme biconcave. Les érythrocytes sont constitués d'hémoglobine, une protéine riche en fer qui se lie à l'oxygène et au dioxyde de carbone. L'hémoglobine est une protéine composée de quatre sous-unités, chacune contenant une molécule de groupe hème et une chaîne de globine alpha (α) ou chaînes bêta (β). L'hémoglobine A (HbA) représente environ 95 % des molécules d'hémoglobines chez l'adulte, constituée de deux chaînes α et de deux chaînes β (Fig. 20). Les variations génétiques touchant ces composantes, comme dans les cas de thalassémie ou de drépanocytose, influencent non seulement les propriétés biologiques des globules rouges mais aussi leur interaction avec *P. falciparum*, modulant ainsi la progression de l'infection.

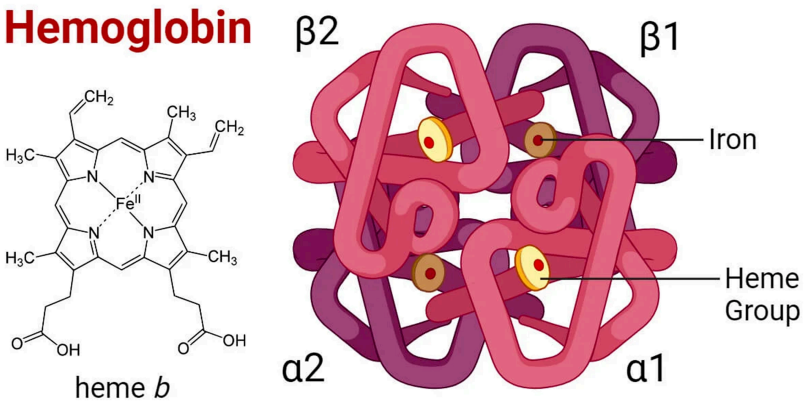


Figure 20 : Structure de l'hémoglobine

Représentation de la structure de l'hémoglobine, une protéine tétramérique composée de deux sous-unités alpha et deux sous-unités bêta. Chaque sous-unité contient un groupement hème qui fixe une molécule d'oxygène.

En 1949, J.B.S. Haldane propose la "*Malaria Hypothesis*", selon laquelle la thalassémie serait plus fréquente dans le sud de l'Europe (Italie, Grèce, Chypre) en raison de son avantage évolutif conféré contre le paludisme (Fig. 21) (Haldane, 2010).

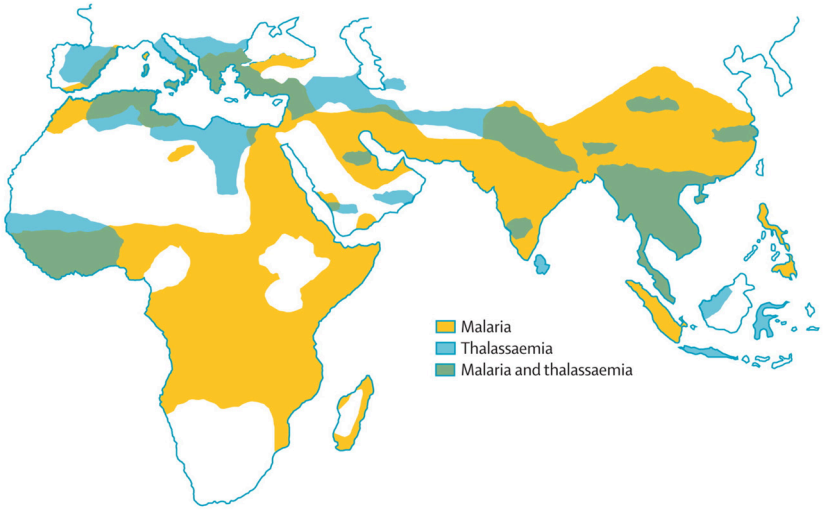


Figure 21 : Répartition géographique de la thalassémie et du paludisme dans les années 1940

Cette carte illustre le chevauchement géographique entre les zones à forte prévalence de thalassémie et les régions touchées par le paludisme avant les grandes campagnes d'éradication en Europe. La thalassémie, avantage adaptatif contre le paludisme, était principalement présente dans les régions endémiques du bassin méditerranéen, de l'Afrique subsaharienne, du Moyen-Orient et de l'Asie du Sud-Est. (Vento, Cainelli and Cesario, 2006)

La β-thalassémie et l'α-thalassémie sont causées par des mutations entraînant une substitution d'un seul nucléotide, de petites délétions ou insertions au sein des gènes de la β-globine ou de l'α-globine, ou, dans de rares cas, par des délétions importantes (Piel and Weatherall, 2014; Taher, Musallam and Cappellini, 2021). Les α-thalassémies sont les troubles génétiques les plus courants chez l'homme. Cette altération génétique entraîne une réduction progressive de la production d'α-globine, provoquant une anémie dont la sévérité augmente avec le nombre de gènes supprimés. Lorsque deux gènes sont absents (α0-thalassémie), les effets sont plus graves qu'en cas de perte d'un seul gène (α+-thalassémie).

La thalassémie induit des modifications significatives de la physiologie et des propriétés des globules rouges, ce qui, selon Haldane, pourrait constituer un mécanisme de protection contre le paludisme. Cette hypothèse a été confirmée des années plus tard par Allen, O'Donnell et al. en 1997 (Allen *et al.*, 1997), montrant dans une population de Papouasie Nouvelle-Guinée, que la thalassémie à l'état homozygote (−α/−α) offrait une protection contre diverses manifestations graves du paludisme, à l'exception du coma et de l'hypoglycémie. Les individus homozygotes porteurs de la mutation présentaient un risque réduit de 2,5 fois de développer des formes graves (P-value = 0,003 ; Odds Ratio (OR) = 0,40 ; Intervalle de Confiance (IC) = 0,22-0,74) (Allen *et al.*, 1997). D'autres études menées ultérieurement ont confirmé cette association, notamment en Afrique. Une étude au Ghana a révélé une protection pour les hétérozygotes (−α/αα) seulement (P-value = 0,008 ; OR = 0,65 ; IC = 0,47-0,90) (Mockenhaupt *et al.*, 2004) alors q'une autre étude réalisée au Kenya a montré une protection aussi bien pour les hétérozygotes (P-value = 0,02 ; OR = 0,76 ; IC = 0,59-0,96) que pour les homozygotes (P-value = 0,004 ; OR = 0,60 ; IC = 0,44-0,85). D'autres études sont venues depuis confirmer ce

résultat protecteur pour les homozygotes et hétérozygotes (Wambua *et al.*, 2006; Enevold *et al.*, 2007; May *et al.*, 2007).

À la même période que Haldane propose la "Malaria Hypothesis", Anthony Clifford Allison suggère que la pression sélective exercée par le paludisme pourrait également expliquer la forte fréquence de la drépanocytose, une pathologie modifiant la forme et la fonction des globules rouges, dans les régions endémiques du paludisme (Fig. 22).

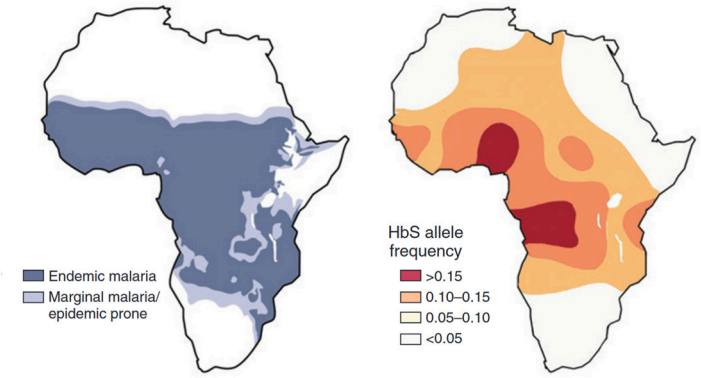


Figure 22 : Impact de la pression sélective du paludisme sur la distribution géographique des mutations HbS en Afrique

La première carte montre les zones d'endémicité du paludisme, où la transmission est forte (bleu foncé) ou marginale (bleu clair). La deuxième carte présente la fréquence allélique de la mutation HbS, avec des concentrations maximales (>15 %, rouge foncé) dans les zones à forte transmission palustre. Cette mutation confère une protection contre le paludisme aux individus hétérozygotes (HbAS), bien qu'elle soit associée à une drépanocytose sévère chez les homozygotes (HbSS) (Wellems and Fairhurst, 2005).

Anthony Clifford Allison confirme son hypothèse en démontrant que le trait drépanocytaire (HbAS) confère une protection significative contre le paludisme à *Plasmodium falciparum*, montrant une prévalence réduite de la parasitémie chez les Ougandais porteurs de l'HbAS par rapport à ceux porteurs de l'HbAA (Allison, 1954). De nombreuses études cas-témoins ont solidement confirmé l'association entre l'allèle HbS et la protection contre le paludisme grave (Gilles *et al.*, 1967; Hill *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 2005; May *et al.*, 2007). Elles rapportent une réduction spectaculaire du risque, estimée entre un facteur 6 et 12, en fonction des populations et des méthodologies utilisées. À ce jour, l'association entre l'allèle HbS et la protection contre le paludisme continue d'être validée dans des études d'association pangénomique (cf. III.3.2.1 Approches génome entier). Cette robustesse contraste avec la majorité des mutations identifiées par des approches basées sur des gènes candidats, dont les résultats sont souvent plus limités ou spécifiques à certaines populations.

À la suite des découvertes d'Allison, d'autres anomalies des globules rouges présentant des fréquences anormalement élevées dans les régions endémiques du paludisme ont été étudiées (Nagel and Roth, 1989). Ces anomalies incluent deux autres variants du gène *HBB* : HbE (Flatz, 1967) et HbC (Pagnier *et al.*, 1984). Des variants impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *HBB* et *HBA* ont également été identifiés, menant respectivement à la β-thalassémie et à l'α-thalassémie. Ces mutations, bien que potentiellement délétères chez les homozygotes, offrent un avantage adaptatif dans les populations touchées par le paludisme.

Haldane a avancé l'idée que certains allèles, bien qu'associés à des effets délétères chez les homozygotes, peuvent persister dans une population grâce à un avantage adaptatif conféré aux hétérozygotes comme c'est le cas pour HbS ou l'α-thalassémie (Allison, 1964; Flint *et al.*, 1986). Ce mécanisme, connu sous le nom de sélection équilibrée, illustre comment des pressions sélectives environnementales, telles que le paludisme, façonnent la dynamique évolutive en favorisant des mutations spécifiques, garantissant ainsi leur maintien dans la population. D'autres mutations affectant les protéines des globules rouges, telles que celles liées aux variants présents dans la *Glucose-6-phosphate dehydrogenase* (*G6PD*) ou bien *PIEZO1*, peuvent également être soumises à une sélection équilibrée, en offrant une protection contre le paludisme chez les porteurs hétérozygotes tout en maintenant leur fréquence dans les populations endémiques malgré les risques pour les homozygotes (Verrelli *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2021). Ainsi, à la suite des découvertes des polymorphismes pour des protéines exprimées dans globules rouges, de nombreuses études d'association basées sur des approches gènes candidates ont été menées pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans la résistance aux différentes formes de paludisme.

Gènes Liés à la Physiologie des Globules Rouges

Après les nombreuses études portant sur l'hémoglobine, d'autres gènes impliqués dans la susceptibilité au paludisme ont été identifiés en lien avec le globules rouges (Tab. 3). Une déficience du gène *G6PD* enzyme qui est impliquée dans la résistance des globules rouges au stress oxydatif, a montré une résistance au développement du parasite *in vitro* (Allison and Clyde, 1961). Cependant, contrairement au trait drépanocytaire, dont l'effet protecteur contre le paludisme a été relativement facile à démontrer, le rôle protecteur de la déficience en *G6PD* contre le paludisme s'est avéré difficile à confirmer. Plusieurs raisons peuvent expliquer cela. Le gène codant pour la *G6PD* est localisé sur le Chromosome X entraînant une transmission selon un mode d'héritage lié au sexe. De plus, la déficience en G6PD est caractérisée par une importante diversité génétique, avec l'existence de nombreux variants alléliques. Dans certaines populations, plusieurs de ces variants déficients coexistent. Cette hétérogénéité complique l'évaluation des effets spécifiques de chaque variant sur la susceptibilité ou la protection contre la maladie. Malgré tout, une forme majoritaire est présente en Afrique, le variant A (202A/376G) de *G6PD* caractérisé par deux mutations non synonymes situées aux positions 202 et 376 de la séquence codante du gène. Il a quand même pu être montré que les fréquences des hommes porteurs de l'allèle G6PD A et des femmes hétérozygotes G6PD A– /B étaient plus faibles chez les enfants atteints de paludisme, suggérant que ces génotypes sont protecteurs contre la maladie (Bienzle, Effiong and Luzzatto, 1976). En complément des observations sur la déficience en *G6PD* et sa relation avec la susceptibilité au paludisme, une étude menée dans la région de Niakhar au Sénégal a mis en évidence une association entre le variant G6PD A- et une modulation des réponses immunitaires humorales dirigées contre les antigènes de *Plasmodium falciparum* (Courtin *et al.*, 2011). Les enfants porteurs de ce variant présentaient des niveaux d'IgG3 spécifiques de MSP2 (allèles FC27 et 3D7) significativement plus faibles à la fin de la saison de transmission que les non-porteurs. Cette diminution des IgG3 suggère une exposition réduite aux antigènes parasitaires, possiblement due à un mécanisme protecteur intrinsèque des globules rouges affectés, limitant la multiplication intra-érythrocytaire du parasite.

Outre *G6PD*, des mutations affectant d'autres protéines des globules rouges sont également impliquées. Une étude récente a identifié une mutation de gain de fonction (E756del) dans le canal mécanosensible PIEZO1, présente chez un tiers de la population africaine, soutenant une possible sélection équilibrante. *PIEZO1* code pour un canal ionique situé au niveau des érythrocytes, permettant l'entrée de calcium dans les globules rouges gérant l'hydratation du

globule rouge. Dans un modèle murin, cette mutation a rendu plus difficile l'infection des globules rouges par *Plasmodium* (Ma *et al.*, 2018). Une étude récente a suggéré une association entre les personnes hétérozygotes pour la mutation E756del de *PIEZO1* et la protection contre le paludisme grave (Nguetse *et al.*, 2020). Les personnes hétérozygotes étaient protégées d'un facteur 2 de développer des formes graves (P-value = 0.005; OR = 0,50 ; IC = 0,31-0,81). Un mécanisme pouvant expliquer cette résistance est la déshydratation modérée des globules rouges due à une augmentation de la fonction de PIEZO1. En effet, une étude a démontré que l'activation pharmacologique de PIEZO1 par Yoda1 empêche l'infection des globules rouges humains par *Plasmodium falciparum*. L'activation de PIEZO1 induit une déshydratation rapide des globules rouges, ce qui inhibe l'invasion des parasites sans affecter leur croissance ou leur division intra-érythrocytaire. Le traitement par Yoda1 diminue significativement l'attachement des mérozoïtes et la déformation des globules rouges, augmentant ainsi la résistance à l'invasion du paludisme (Lohia *et al.*, 2023).

Enfin, il existe plusieurs groupes sanguins associés à une protection contre le paludisme, comme le groupe sanguin ABO. Selon Rowe et al. (Rowe *et al.*, 2007), les individus ayant le groupe sanguin O sont mieux protégés contre les formes graves de paludisme, notamment contre la formation de rosettes. Moins connu que le système ABO, le groupe sanguin Diego peut être affecté par un variant du gène *SLC4A1*, qui code pour une protéine appelée Bande 3. Cette mutation provoque une maladie appelée ovalocytose (une déformation des globules rouges), pouvant conférer une résistance partielle au paludisme (Genton *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1999). Pour finir, on peut mentionner le polymorphisme DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines), également connu sous le nom de FY ou groupe sanguin Duffy, comme un facteur important dans la susceptibilité au paludisme, en particulier pour les espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme non *falciparum*, comme *Plasmodium vivax* (Miller *et al.*, 1976). Toutefois, une étude récente a montré que ce polymorphisme, conduisant à la suppression du récepteur Duffy à la surface des globules rouges, pourrait protéger contre les formes graves et les hospitalisations chez les personnes infectées par *Plasmodium falciparum* (Gai *et al.*, 2019).

Locus	Rôle dans le paludisme	Références
ABO	Le groupe sanguin O est associé à une réduction du risque de paludisme grave	(Rowe *et al.*, 2007)
ACKR1	Associé à la résistance au paludisme, notamment par le rôle du récepteur Duffy	(Gai *et al.*, 2019)
G6PD	Défaut enzymatique conférant une protection contre le paludisme sévère	(Gilles *et al.*, 1967; Bienzle, Effiong and Luzzatto, 1976)
HBA	Les thalassémies α réduisent la sévérité du paludisme	(Weatherall and Clegg, 2001)
HBB (HbC)	L'hémoglobine C réduit la sévérité et la prévalence du paludisme	(Modiano *et al.*, 2001)
HBB (HbS)	Le trait drépanocytaire protège contre le paludisme grave	(Allison, 1954; Hill *et al.*, 1991)
HBB (HbE)	L'hémoglobine E est associée à une protection modérée contre le paludisme	(Hutagalung *et al.*, 1999)
HP	L'haptoglobine est associée à une protection au paludisme grave	(Elagib *et al.*, 1998)
PIEZO1	La mutation E756Del est associée à une protection contre le neuropaludisme via la modulation de l'homéostasie calcique	(Ma *et al.*, 2018; Nguetse *et al.*, 2020)
SLC4A1	Les mutations causant l'ovalocytose réduisent l'invasion des globules rouges par les parasites	(Genton *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1999)

Tableau 3 : Gènes impliqués dans la physiologie des globules rouges associés au paludisme par approche gène candidat

Ainsi, au-delà des mutations touchant directement l'hémoglobine, l'étude d'autres gènes et systèmes sanguins révèle une diversité de mécanismes moléculaires participant à la protection contre le paludisme. Cependant, ces mutations et variants ne sont pas les seuls facteurs déterminants dans la susceptibilité ou la résistance à la maladie. Les érythrocytes possèdent à leur surface de nombreuses protéines impliquées dans la cytoadhérence des globules rouges, un processus clé dans la pathogénie du paludisme sévère, qui pourrait également jouer un rôle central dans la protection contre l'infection et les formes cliniques.

Gènes Impliqués dans la Cytoadhérence des Globules Rouges Infectés

La sévérité du paludisme est en partie attribuée à la cytoadhérence et la séquestration des globules rouges infectés par *P. falciparum* dans les petits vaisseaux sanguins, comme décrit précédemment dans le cas du neuropaludisme. Du côté de l'hôte, différentes molécules d'adhésion exprimées à la surface des globules rouges servent de récepteurs de liaison pour PfEMP1. Plusieurs études génétiques ont été menées pour déterminer si certains polymorphismes de ces gènes peuvent être impliqués dans la susceptibilité ou la résistance au paludisme (Tab. 4).

En 1997, deux polymorphismes majeurs liés au paludisme ont été identifiés, respectivement dans les gènes *ICAM-1* et *CR1*, mettant en lumière leur rôle dans la pathogénie de la maladie. Fernandez-Reyes et al. (Fernandez-Reyes *et al.*, 1997) ont démontré que le variant M29 d'*ICAM-1* (CD54), localisé dans le domaine N-terminal, est significativement plus fréquent dans les populations africaines. Ce polymorphisme confère une affinité accrue pour les globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum*, favorisant leur cytoadhérence et augmentant ainsi le risque de développer un neuropaludisme. Cette découverte souligne l'importance cruciale d'ICAM-1 dans les complications neurologiques graves du paludisme.

En parallèle, Rowe et al. (Rowe *et al.*, 1997) ont identifié une faible expression du récepteur CR1 sur les globules rouges comme un facteur protecteur contre la formation de rosettes, un mécanisme pathogène clé de *P. falciparum*. Cette diminution de la rosette formation réduit le risque de formes sévères de la maladie, bien que son impact soit moins spécifique au neuropaludisme que celui d'ICAM-1.

Par ailleurs, en 2001, Pain et al. (Pain *et al.*, 2001) ont rapporté l'implication de mutations dans le gène *CD36* (glycoprotéine plaquettaire 4). Ces variants, qui entraînent un phénotype nul avec absence de la glycoprotéine, sont associés à une réduction de la séquestration parasitaire et à une protection contre le paludisme grave. Cependant, l'impact de CD36 apparaît secondaire par rapport à ICAM-1 dans le contexte du neuropaludisme, soulignant que ce dernier joue un rôle prépondérant dans les formes neurologiques sévères de la maladie.

Enfin, bien qu'une étude ait suggéré une association entre les polymorphismes de *CD31*, codée par le gène *PECAM-1*, et la résistance ou la susceptibilité au paludisme (Treutiger *et al.*, 1997; Kikuchi *et al.*, 2001), les résultats restent contradictoires, et son implication exacte dans la pathogenèse de l'infection n'est pas encore totalement élucidée (Casals-Pascual *et al.*, 2001).

Après avoir largement étudié les gènes impliqués dans la physiologie et la cytoadhérence des globules rouges et leur rôle dans la susceptibilité au paludisme, l'attention s'est aussi portée vers les gènes régulant la réponse immunitaire. Comme évoqué précédemment, l'immunité joue un rôle central dans la protection contre le paludisme, en influençant non seulement la clairance des parasites, mais aussi la gravité des symptômes. L'étude des mécanismes immunitaires a permis d'identifier de nouveaux acteurs génétiques.

Locus	Rôle dans le paludisme	Références
CD36	Réduction de la séquestration parasitaire et à une protection contre le paludisme grave.	(Pain *et al.*, 2001)
CR1	Réduction de la séquestration parasitaire et à une protection contre le paludisme grave.	(Rowe *et al.*, 2002)
ICAM1	Augmention de la séquestration parasitaire et à une protection contre le paludisme grave	(Fernandez-Reyes *et al.*, 1997)
PECAM-1	Résultats contradictoires à la fois associé à la résistance et la susceptibilité au paludisme	(Treutiger *et al.*, 1997; Kikuchi *et al.*, 2001)

Tableau 4 : Gènes impliqués dans la cytoadhérence des globules rouges associés au paludisme par approche gène candidat

Gènes Impliqués dans la Réponse Immunitaire

De nombreuses études ont exploré les variations génétiques impliquées dans la susceptibilité *Plasmodium falciparum*, en particulier en utilisant des approches basées sur des gènes candidats liés à l'immunité. Ces études ont identifié plusieurs variants génétiques dans des gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative (tableau 5). Voici quelques exemples des principaux gènes et leurs variants associés à la susceptibilité au paludisme, principalement à travers des études de gènes candidats et pour lesquelles nous avons pu voir leur importance dans la réponse immunitaire (*cf. III.3.1 Facteur Immunitaire de l'Hôte*) et pour lesquelles un nombre important d'études cas-témoins ont été publiées.

Gène	Nombre de publications	Fonction	Référence
TNF	46	Cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la réponse immunitaire, l'inflammation, et la régulation de l'apoptose.	(McGuire *et al.*, 1994)
FCGR2A	29	Récepteur des IgG, favorise la phagocytose et active les macrophages et neutrophiles.	(Shi *et al.*, 2001)
IL10	25	Cytokine anti-inflammatoire, régule la réponse immunitaire pour éviter les dommages tissulaires.	(Wilson *et al.*, 2005)
IL4	21	Rôle clé dans la différenciation des lymphocytes T en Th2 et dans la production d'anticorps IgE.	(Verra *et al.*, 2004)
TLR4	21	Reconnaît les lipopolysaccharides des bactéries Gram-négatives et active la réponse immunitaire innée.	(Mockenhaupt *et al.*, 2005)

TLR9	15	Reconnaît l'ADN riche en motifs CpG des pathogènes, stimulant la réponse immunitaire innée.	(Mockenhaupt *et al.*, 2006)
HLA-B	14	CMH de classe I, présente les antigènes aux lymphocytes T CD8+.	(Hill *et al.*, 1991)
HLA-DRB1	14	CMH de classe II, présente les antigènes exogènes aux lymphocytes T CD4+.	(Hill *et al.*, 1991)
TLR2	14	Reconnaît les composants bactériens Gram-positifs et active la réponse immunitaire.	(Greene *et al.*, 2012)
HLA-A	13	CMH de classe I, présente des peptides antigéniques aux cellules T cytotoxiques.	(Lyke *et al.*, 2011)
LTA	13	Cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la signalisation immunitaire et le développement des tissus lymphoïdes.	(Barbier *et al.*, 2008)
NOS2	13	Produit de l'oxyde nitrique (NO) pour défendre contre les pathogènes intracellulaires.	(Kun *et al.*, 1998)
IFNG	12	Cytokine essentielle pour l'immunité innée et adaptative, stimule les macrophages contre les infections virales et intracellulaires.	(Koch *et al.*, 2005)
IL12B	11	Favorise la différenciation des cellules T en cellules Th1 et stimule la production d'interféron gamma (IFN-γ).	(Morahan *et al.*, 2002)
IL13	9	Régule l'inflammation et favorise la production d'anticorps, impliqué dans les réponses Th2 et l'immunité parasitaire.	(Naka *et al.*, 2009)
MBL2	9	Produit une lectine liant les mannoses, activant la voie du complément et jouant un rôle dans l'immunité innée.	(Boldt *et al.*, 2006)
HLA-DQB1	8	CMH de classe II, présente les antigènes aux lymphocytes T CD4+, essentiel pour la reconnaissance antigénique.	(Hill *et al.*, 1991)
HMOX1	8	Catalyse la dégradation de l'hème pour produire du fer, du monoxyde de carbone, et de la biliverdine, offrant une protection antioxydante.	(Takeda *et al.*, 2005)
CD40LG	7	Ligand du CD40, essentiel pour l'activation des cellules B et la formation des centres germinatifs dans les ganglions lymphatiques.	(Sabeti *et al.*, 2002)
IL1A	7	Cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle dans la réponse immunitaire, en particulier dans les maladies auto-immunes et inflammatoires.	(Dunstan *et al.*, 2012)

TIRAP	6	Protéine adaptatrice dans la signalisation TLR, essentielle pour activer les réponses inflammatoires médiées par les récepteurs TLR.	(Khor *et al.*, 2007)
FCGR3B	5	Récepteur des IgG qui facilite la phagocytose et le nettoyage des complexes immuns par les neutrophiles.	(Omi *et al.*, 2002)
IRF1	5	Facteur de transcription régulant les réponses antivirales et les mécanismes immunitaires.	(Mangano *et al.*, 2008)
PROCR	5	Régule la coagulation et l'inflammation, impliqué dans les réponses vasculaires et dans le paludisme cérébral.	(Naka *et al.*, 2014)
TLR1	5	Reconnaît les ligands bactériens, en particulier les lipoprotéines, et active la réponse immunitaire innée.	(Leoratti *et al.*, 2008)
CRP	4	Protéine de phase aiguë, marqueur de l'inflammation systémique, impliquée dans l'opsonisation des pathogènes.	(Israelsson *et al.*, 2009)
FOXO3	4	Facteur de transcription impliqué dans la régulation du stress cellulaire, l'apoptose, et la longévité.	(Lee *et al.*, 2013)
HLA-C	4	CMH de classe I, impliqué dans la présentation antigénique aux lymphocytes T et dans la reconnaissance par les cellules NK.	(Norman *et al.*, 2013)
IGHG3	4	Code pour une sous-classe d'immunoglobuline G (IgG3), importante dans la réponse humorale.	(Kyei-Baafour *et al.*, 2022)
IL4R	4	Récepteur de l'IL4, impliqué dans la signalisation des cellules T, B et dans la réponse Th2.	(Ariff *et al.*, 2023)
IL8	4	Cytokine pro-inflammatoire, un puissant chimiotactique pour les neutrophiles.	(Mahanta, Kakati and Baruah, 2013)
NCR3	4	Récepteur activateur des cellules NK, joue un rôle dans la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées ou tumorales.	(Delahaye *et al.*, 2007)
IFNAR1	3	Sous-unité du récepteur d'interféron de type I, essentiel pour la signalisation antivirale.	(Aucan *et al.*, 2003)
IFNGR1	3	Sous-unité du récepteur d'interféron gamma, joue un rôle clé dans la médiation des réponses antimicrobiennes.	(Koch *et al.*, 2002)
IL10RA	3	Récepteur de l'IL10, régule les réponses inflammatoires et limite les dommages immunitaires.	(Koukouikila-Koussounda *et al.*, 2013)

IL12A	3	Code pour une sous-unité de l'IL12, essentielle pour la réponse des lymphocytes T aux infections.	(Marquet *et al.*, 2008)
IL1RN	3	Inhibe l'activité de l'IL1 en bloquant ses récepteurs, régule l'inflammation.	(Gyan *et al.*, 2002)
IL22	3	Cytokine impliquée dans la défense des muqueuses et dans la régénération des tissus épithéliaux.	(Koch *et al.*, 2005)
MIF	3	Facteur inhibiteur de la migration des macrophages, régule les réponses inflammatoires et immunitaires.	(Awandare *et al.*, 2006)

Tableau 5 : Gènes impliqués dans la réponse immunitaire associés au paludisme par approche gène candidat

Ce tableau répertorie les gènes associés au paludisme par des études utilisant une approche gène candidat. Les gènes listés ont été impliqués dans la réponse immunitaire et confirmés dans au moins trois études indépendantes.

Le facteur de nécrose tumorale (TNF) est un puissant médiateur pro-inflammatoire impliqué dans diverses étapes des réponses immunitaires. Il est reconnu depuis longtemps que le TNF joue un rôle clé dans la lutte contre *Plasmodium*, favorisant la destruction des parasites intra-érythrocytaires et réduisant la parasitémie (Clark *et al.*, 1981). Plusieurs études ont également mis en évidence l'implication de certains polymorphismes (SNPs) dans le contrôle du niveau de l'infection et le paludisme sévère (Fig. 23). Par exemple, une étude cas-témoins a suggéré que le TNF joue un rôle dans la régulation de la densité parasitaire et la susceptibilité aux formes plus légères de paludisme, avec des polymorphismes tels que *TNF*-1031A (rs3093664) et *TNF*-244A (rs673) identifiés comme influençant la réponse immunitaire (Aidoo *et al.*, 2001; Flori *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2017). De plus, une étude l'allèle *TNF*-238A a été associée à l'anémie sévère et au paludisme grave en Gambie (McGuire *et al.*, 1999). Enfin, une étude en Gambie a révélé que l'allèle *TNF*-308A (rs1800629), un variant du promoteur du gène *TNF*, augmentait le risque de décès lié au neuropaludisme en raison de son influence sur la production de TNF (McGuire *et al.*, 1994). Mais les résultats des associations ne sont pas toujours cohérents voir contradictoires. Le variant rs1800629 illustre bien l'incertitude concernant son rôle dans la gravité du paludisme, en raison de la taille limitée des échantillons et d'une faible puissance statistique des études individuelles (McGuire *et al.*, 1994; Hananantachai *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002). Pour clarifier ces résultats, des méta-analyses ont été réalisées afin de synthétiser les données provenant de plusieurs études sur ce polymorphisme (Kongjam *et al.*, 2023; Sarangi *et al.*, 2023). La première méta-analyse a révélé une association significative entre le variant rs1800629 et la gravité du paludisme à *P. falciparum* (OR = 1,769). La deuxième méta-analyse a précisé que ce polymorphisme influence particulièrement le risque de paludisme sévère chez les individus d'origine asiatique, mettant en évidence la sensibilité des résultats des études d'association à l'hétérogénéité des populations.

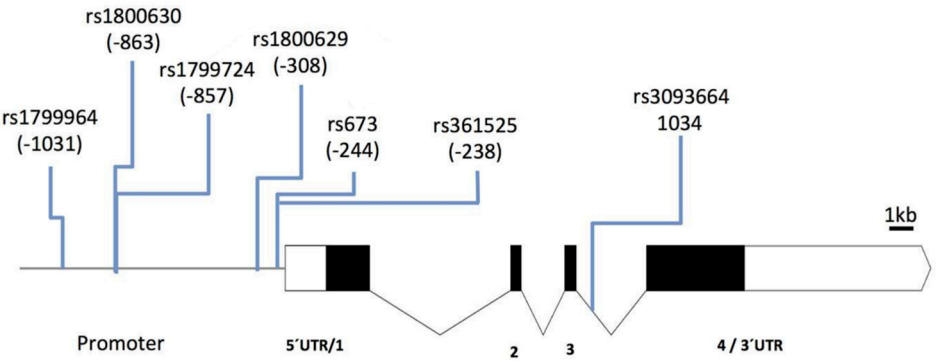


Figure 23 : Localisation des SNP du *TNF* associés au paludisme.

Les polymorphismes identifiés influencent la réponse inflammatoire en modulant l'expression du *TNF* ou modifiant la protéine, contribuant ainsi à la susceptibilité ou à la protection contre les formes du paludisme. Les positions des SNP sont indiquées par rapport à leur emplacement génomique du gène *TNF* (Penha-Gonçalves, 2019).

Les récepteurs Fcγ (Fc gamma receptors, FCGR) sont des protéines de surface des cellules immunitaires qui se lient aux anticorps de type IgG, jouant ainsi un rôle clé dans la réponse immunitaire contre *Plasmodium falciparum*. Les gènes FCGR sont regroupés sur le chromosome 1q23 et codent pour des récepteurs FcγR activateurs (FcγRI/CD64, FcγRIIA/CD32a, FcγRIIC/CD32c, FcγRIIIA/CD16a et FcγRIIIB/CD16b) portant un motif d'activation basé sur une tyrosine des immunorécepteurs (ITAM) (Nagelkerke *et al.*, 2019). Les récepteurs activateurs FcγRIIA/CD32a et FcγRIIIB/CD16b peuvent faciliter l'activation précoce de la ADCP des sporozoïtes ou l'élimination des érythrocytes infectés par *P. falciparum* via les monocytes FcγRIIA/CD32a (Anania *et al.*, 2019). Le gène *FCGR2B* est très homologue aux gènes *FCGR2A/FCGR2C*, mais il code pour un isoforme inhibiteur FcγRIIB (CD32b) avec un motif inhibiteur basé sur une tyrosine des immunorécepteurs (ITIM) (Nagelkerke *et al.*, 2019). Divers polymorphismes ont été identifiés dans les gènes codant ces récepteurs activateurs, et certains sont associés à une susceptibilité ou à une résistance au paludisme dans diverses populations endémiques. Le gène *FCGR2A* présente une substitution de nucléotide importante (G à A) qui modifie le résidu d'acide aminé à la position 131 du domaine immunoglobuline connue sous le nom de H131R ou rs1801274. Des études d'association ont examiné l'influence des SNP sur le contrôle du paludisme, mais les résultats restent contradictoires. Certaines recherches indiquent que l'allèle H131 pourrait offrir une protection contre les formes cliniques (Brouwer *et al.*, 2004; Nasr *et al.*, 2009), tandis que d'autres l'associent à des formes sévères de la maladie (Omi *et al.*, 2002; Cooke *et al.*, 2003), et l'allèle R131 a été lié à une faible parasitémie au Kenya (Brouwer *et al.*, 2004). D'autres SNPs ont été identifiés dans le gène *FCGR2B*, notamment le rs1050501, qui semble être soumis à une pression de sélection exercée par le paludisme (Willcocks *et al.*, 2010). Cette mutation codante, remplaçant une isoleucine par une thréonine en position 232, supprime l'effet inhibiteur du récepteur FcγRIIb, augmentant ainsi la phagocytose des parasites par les macrophages (Clatworthy *et al.*, 2007). Une étude de cohorte portant sur des enfants kenyans a révélé que les individus homozygotes pour l'allèle FCGR2B-T232 présentaient une susceptibilité réduite au paludisme sévère (Willcocks *et al.*, 2010). Cette tendance a été confirmée in vivo dans un modèle murin, où les souris déficientes en récepteur FcγRIIb ont montré en moyenne des niveaux de parasitémie plus faibles et une anémie moins sévère (Clatworthy *et al.*, 2007).

L'interleukine-10 (IL-10) est l'une des principales cytokines T régulatrices, inhibant la présentation d'antigènes, l'activation et la prolifération des cellules T, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires (Sabat *et al.*, 2010). Le rôle des SNP régulateurs reste incertain et même contradictoire. Des études sur le SNP rs1800896, situé dans la région promotrice de l'*IL-10*, ont rapporté un risque possible d'infection palustre (Natama *et al.*, 2021), tandis que d'autres ont montré une diminution du risque de neuropaludisme (da Silva Santos *et al.*, 2012). D'autres variants, comme rs3024500, sont associés à un risque accru de développer des formes sévères de la maladie (Zhang *et al.*, 2012), alors que rs1800890, qui augmente l'expression d'IL-10, est associé à une protection contre les formes graves (Apinjoh *et al.*, 2013).

Les récepteurs Toll-like (TLR) sont une famille de protéines transmembranaires qui jouent un rôle clé dans l'immunité innée. Ils détectent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) présents sur les bactéries, virus, champignons et parasites, ainsi que les signaux de dommages cellulaires. Différentes combinaisons TLR sont exprimées par divers sous-ensembles de cellules immunitaires et non immunitaires, telles que les monocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, cellules B, cellules T, fibroblastes, cellules endothéliales et cellules épithéliales. Les voies de signalisation activées en aval de ces molécules adaptatrices induisent l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, IL-1β, TNF- α, IL-6, IL-8, IL-1, ainsi que d'interférons de type I et III. Bien que les TLR protègent contre une grande variété de pathogènes comme le *plasmodium*, une activation inappropriée ou non régulée de la signalisation TLR peut conduire à des modifications de la réponse immunitaire. Des recherches ont montré que certains variants génétiques des *TLR* et de leurs molécules adaptatrices peuvent influencer la régulation de la charge parasitaire (par exemple, *TLR9*, rs187084 situé dans le promoteur) (Leoratti *et al.*, 2008), augmenter la susceptibilité aux formes graves du paludisme (*TLR1*, non-synonyme SNP rs4833095-Asn248Ser, *TLR4*, rs4986790-Asp299Gly, rs5030719-Gln510His) (Manning *et al.*, 2016; Rani *et al.*, 2018; Ariff *et al.*, 2023). Comme pour les polymorphismes du *TNF*, des méta-analyses ont été réalisées pour mieux comprendre le rôle des variants des récepteurs TLRs dans le paludisme au sein de différentes populations. Ces études ont examiné trois aspects majeurs : la susceptibilité, la gravité et la parasitémie. Concernant la susceptibilité, aucun lien global significatif n'a été identifié entre les TLR et le risque de contracter le paludisme. Toutefois, des résultats divergents ont été observés pour certains variants spécifiques, comme ceux de TLR1 et TLR6, qui semblent influencer la susceptibilité dans populationnels distincts. En ce qui concerne la gravité, les polymorphismes de *TLR2* sont montrés comme protecteur contre les formes sévères (OR : 12.94, 95% CI : 1.04–160.75), tandis que les polymorphismes de *TLR6* ont été associés à un risque accru de formes graves (OR : 0.62, 95% CI : 0.47–0.83), particulièrement chez les enfants africains. De plus, les variants de *TLR9* ont également été corrélés à des formes graves, notamment en Asie et en Afrique. Pour la parasitémie, les polymorphismes de *TLR1* et *TLR9* ont été liés à une charge parasitaire élevée dans certaines populations africaines et asiatiques, alors que les polymorphismes de *TLR4* semblent offrir une protection contre une parasitémie élevée, bien que cette association soit influencée par la variabilité génétique des populations étudiées. Ces résultats mettent en lumière le rôle critique des TLRs dans la réponse immunitaire au paludisme, tout en soulignant l'importance des différences génétiques et géographiques dans l'immunopathogenèse.

Les HLA (Human Leukocyte Antigen) sont des molécules du CMH chez l'humain, essentielles à la régulation du système immunitaire. Localisés sur le chromosome 6, les gènes *HLA* jouent un rôle crucial dans la présentation des antigènes aux cellules immunitaires, facilitant ainsi la reconnaissance et la destruction des cellules infectées. Ils se divisent en deux

classes : les *HLA* de classe I (HLA-A, -B, -C), présents sur la plupart des cellules et impliqués dans la destruction des cellules infectées, et les *HLA* de classe II (HLA-DP, -DQ, -DR), principalement sur les cellules présentatrices d'antigènes, facilitant une réponse immunitaire adaptative. Les variants génétiques associés à la susceptibilité au paludisme impliquent fréquemment CMH, ou HLA, dont les gènes jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire. Des études ont identifié plusieurs polymorphismes au sein des gènes *HLA* associés à des formes graves et simples de paludisme. Par exemple, les allèles HLA-B53 et HLA-DRB1*1302 ont été associés à une protection contre le paludisme sévère en Afrique de l'Ouest, probablement en facilitant une réponse immunitaire efficace contre *Plasmodium falciparum*, l'agent pathogène du paludisme (Hill *et al.*, 1991; Hill, 1992).

De plus, certains variants au sein de la région *HLA* sont associés à une susceptibilité accrue au paludisme. Par exemple, l'allèle HLA-A0201 a été lié à une augmentation du risque de paludisme grave dans des populations spécifiques, suggérant un rôle dans la modulation de la présentation antigénique de *P. falciparum* (Hill *et al.*, 1991). Une autre étude a mis en évidence que l'allèle HLA-B5801 est associée à une susceptibilité accrue au paludisme sévère, notamment dans des populations africaines, bien que les mécanismes sous-jacents restent à clarifier (Hirayasu *et al.*, 2012). Plus récemment, des haplotypes *HLA* ont été mis en évidence et associés au contrôle de l'infection par *P. falciparum* (Garcia *et al.*, 2013). En complément des associations précédemment décrites pour les allèles HLA-A0201 et HLA-B5801, une étude menée chez les enfants Toffin au Bénin a mis en évidence un rôle des polymorphismes dans les gènes *HLA-F* et *HLA-G* dans la susceptibilité au paludisme. Le variant rs183540921 dans le promoteur de *HLA-F* a été associé une augmentation des épisodes asymptomatiques chez les porteurs de l'allèle G. Par ailleurs, l'haplotype HLA-G UTR-03 a été corrélé à un risque accru d'épisodes symptomatiques, accompagné d'une réponse IgG2 plus faible contre les antigènes de *P. falciparum*. Ces résultats soulignent l'importance des régions régulatrices des gènes *HLA* dans la modulation de la réponse immunitaire contre le paludisme (Sonon *et al.*, 2021).

L'approche par gène candidat, bien qu'elle ait largement contribué à notre compréhension des associations génétiques avec des maladies comme le paludisme, présente plusieurs limitations majeures. Premièrement, cette approche repose sur des hypothèses préalables concernant les gènes impliqués dans le paludisme, ce qui limite l'exploration aux gènes déjà connus ou supposés être pertinents. Cette section a mis en évidence que les gènes identifiés codent pour des protéines de surface interagissant avec les antigènes variables du parasite, influençant la structure du globule rouge et les mécanismes immunitaires. Par ailleurs, les approches basées sur des gènes candidats, qui examinent un nombre limité de gènes à la fois, s'avèrent peu efficaces pour étudier des maladies multigéniques ou complexes, caractérisées par des interactions complexes entre de multiples loci. Dans le cas du paludisme, la réponse immunitaire et la pathogénicité du parasite résultent d'une interaction complexe entre plusieurs gènes, illustrant ainsi la nature polygénique et multifactorielle de cette maladie. Ce résultat est en opposition avec d'autres maladies parasitaires, telles que la schistosomiase (Abel *et al.*, 1991), où des analyses de ségrégation ont révélé le rôle déterminant d'un gène majeur dans la régulation de la susceptibilité ou de la résistance à l'infection, ce qui n'a pas été le cas pour le paludisme (Garcia, Cot, *et al.*, 1998; Rihet, Abel, *et al.*, 1998). Les limites de l'approche par gène candidat ont conduit au développement d'approches plus globales à l'échelle du génome. Ces approches permettent d'explorer l'ensemble du génome sans hypothèse préalable, identifiant ainsi des régions ou des gènes inattendus impliqués dans le paludisme.

III.3.2.2. Approches Génome Entier

Les approches génome entier, constituées principalement des études de liaison génétique et des études d'association pangénomique, sont des outils puissants pour identifier les régions chromosomiques associées à des traits complexes tels que la susceptibilité au paludisme. Contrairement aux approches de gènes candidats, qui nécessitent des hypothèses fonctionnelles préalables, les approches génome entier permettent d'explorer l'ensemble du génome pour découvrir de nouveaux loci associés à la maladie, sans a priori.

Les études de liaison génétique nécessitent des familles et cherchent à localiser des régions du génome transmises avec la maladie au fil des générations. En revanche, les GWAS sont largement utilisées pour identifier des variants communs associés à des maladies complexes dans des populations à grande échelle. Cette méthode repose sur l'analyse de plusieurs milliers de marqueurs génétiques à travers le génome pour trouver des associations statistiques entre certains polymorphismes (SNPs) et la présence de la maladie.

Liaison Génétique

Les études de liaison génétique sont essentielles pour détecter de nouvelles régions du génome impliquées dans la susceptibilité au paludisme. Elles se basent sur la transmission d'allèles au sein de familles, en particulier entre les membres atteints et non atteints (cf. encadré 2). De nombreuses études se sont concentrées sur les niveaux d'infection (quantité de parasites dans le sang/uL) et des formes simples de paludisme (Table 6).

Population étudiée	Locus	Taille de l'échantillon	Références
Liaison génétique avec le niveau d'infection			
Cameroun	5q31-33	26 paires de jumeaux	(Garcia, Marquet, *et al.*, 1998)
Burkina Faso (urbain)	5q31-33	153 paires de jumeaux	(Rihet, Traoré, *et al.*, 1998)
Burkina Faso (rural)	5q31-33	178 paires de jumeaux	(Flori *et al.*, 2003)
Sénégal	5q31	878 individus	(Sakuntabhai *et al.*, 2008)
Sénégal	5q31-33	626 individus	(Milet *et al.*, 2010)
Burkina Faso	17p12	118 familles	(Brisebarre *et al.*, 2014)
Liaison génétique avec le paludisme simple			
Gambie	6p21-p23	217 paires de jumeaux	(Jepson *et al.*, 1997)
Burkina Faso	6p21-23	34 familles	(Flori *et al.*, 2003)
Ghana	10p15	68 familles	(Timmann *et al.*, 2007)
Sénégal	6p25.1 12q22	626 individus	(Milet *et al.*, 2010)
Ghana	5q31-33	1015 individus	(Meyer *et al.*, 2011)
Burkina Faso	6p21.3	63 familles	(Brisebarre *et al.*, 2014)

Tableau 6 : Synthèse des études de liaison génétique dans les population humaine

Encadré 2 Analyses de Liaison Génétique

Une étude de liaison génétique est une méthode utilisée pour identifier des régions spécifiques du génome qui pourraient contenir des gènes impliqués dans une maladie ou un trait particulier (Fig. 24). Elle repose sur l'idée que des gènes proches sur un même chromosome ont tendance à être transmis ensemble au fil des générations. Ces études cherchent donc à déterminer si un locus (emplacement d'un marqueur génétique) est lié à un ou plusieurs gènes d'intérêt (par exemple, un gène responsable d'une maladie).

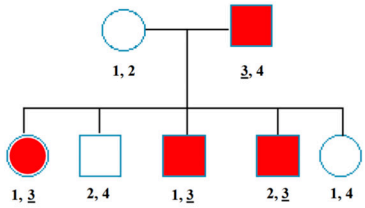


Figure 24 : Schéma illustrant une liaison génétique

Représentation d'une liaison génétique montrant la ségrégation d'un allèle spécifique (ici, l'allèle 3) avec une maladie dans une famille. Les individus porteurs de l'allèle 3 associé à la maladie sont colorés en rouge, soulignant une corrélation entre cet allèle et le phénotype pathologique.

La méthode du LOD score (Logarithm of the Odds) est une technique statistique utilisée en génétique pour estimer la probabilité qu'un gène ou un marqueur soit lié à une maladie ou un trait particulier. Elle permet de déterminer si deux loci sur un chromosome sont assez proches pour être transmis ensemble, plutôt que séparément. Historiquement, il a été principalement appliqué aux maladies monogéniques dans des familles, où les modèles de transmission sont bien définis des adaptations et des méthodes dérivées peuvent être utilisées dans le contexte de maladie complexe. La liaison dépend d'un phénomène biologique survenant lors de la méiose, appelé recombinaison intra-chromosomique ou "crossing-over", qui peut séparer deux loci. Cependant, si deux loci sont très proches physiquement sur un chromosome, il est rare qu'un événement de recombinaison les sépare (Fig. 25)

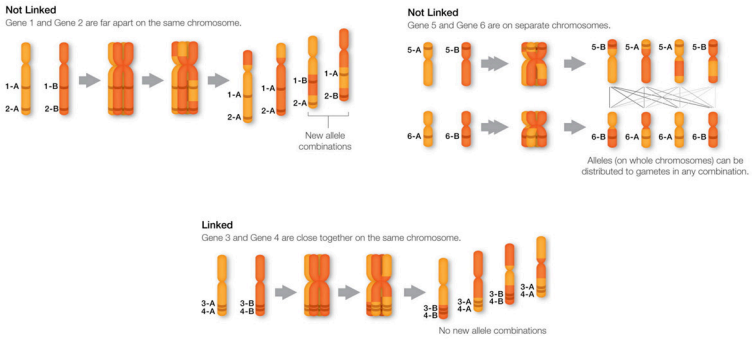


Figure 25 : Principe de la liaison génétique

Les gènes 1 et 2, éloignés sur le même chromosome, subissent souvent des événements de recombinaison, générant de nouvelles combinaisons d'allèles (par exemple, 1-B avec 2-A). Les gènes 5 et 6, situés sur des chromosomes différents, sont indépendants et leurs allèles se séparent de manière aléatoire dans les gamètes. Les gènes 3 et 4, proches l'un de l'autre sur le même chromosome, sont moins susceptibles de subir une recombinaison. Ils sont donc souvent transmis ensemble, indiquant une liaison génétique (*Genetic Linkage*, no date).

L'analyse de liaison utilise la fraction de recombinaison θ, qui mesure la probabilité qu'un événement de méiose sépare deux loci. Cette distance est exprimée en centiMorgan (cM) : 1 cM correspond à 1 % de recombinaison. θ=0 : liaison parfaite (0 cM, loci toujours transmis ensemble) ; θ=0.5 : transmission indépendante (loci sur des chromosomes différents ou éloignés >50). Le LOD score compare deux hypothèses :

1. **H0 (hypothèse nulle)** : Les deux loci (marqueur et gène) sont indépendants (pas de liaison génétique, probabilité de liaison = 0,5).

2. **H1 (hypothèse alternative)** : Les deux loci sont liés avec une fréquence de recombinaison spécifique (θ).

Le LOD score est défini comme (Morton, 1955) :

$$LOD\ score = \ Z(\theta) \ = log\left(\frac{P(\theta)}{P(0{,}5)}\right)$$

- P(θ) : Probabilité des données observées si les loci sont liés avec un certain degré de recombinaison (θ).

- P(0.5) : Probabilité des données observées si les loci ne sont pas liés.

Classiquement, l'hypothèse d'indépendance est rejetée lorsque le score Z(θ) est supérieur à 3 (correspondant à une valeur de P = 10^-4) pour les maladies monogéniques, ce qui indique une liaison génétique entre le marqueur et la maladie. L'hypothèse de liaison est rejetée si Z(θ) est inférieur à -2, suggérant que des événements de recombinaison ont eu lieu entre le marqueur et le locus de la maladie. Si le score Z(θ) se situe entre ces deux valeurs, il n'est pas possible de conclure à une liaison ou à une absence de liaison, et il faut analyser d'autres familles et additionner les LOD scores. Dans le cadre d'un "Genome-Wide Scan" pour une maladie complexe, le seuil est porté à 3,6 pour conclure à une liaison avec une probabilité de P = 0,05 (Lander and Kruglyak, 1995).

L'analyse de liaison non paramétrique, ou méthode des paires de germains, est une approche génétique utilisée pour identifier des régions du génome liées à des traits complexes ou des maladies sans faire d'hypothèses sur le mode de transmission. Cette méthode se concentre sur des paires de frères et sœurs affectés par le même trait ou la même pathologie, en évaluant le partage d'allèles identiques par descendance (IBD) dans différentes régions génomiques. Si une région spécifique est impliquée dans la condition étudiée, les germains atteints partageront ces allèles plus souvent que ne le prédit le hasard. Cette méthode est particulièrement utile pour les traits à héritabilité complexe, où l'effet de multiples variants génétiques doit être évalué.

La région 5q31-q33 est apparue comme un locus crucial dans les niveaux d'infection au paludisme dans les premières analyses de liaison génétique. Un lien initial entre cette région et le niveau d'infection a été établi au Cameroun d'abord sur une cohorte réduite (Garcia, Marquet, *et al.*, 1998), puis confirmé dans des populations urbaines et rurales du Burkina Faso (Rihet, Traoré, *et al.*, 1998; Flori *et al.*, 2003) et aussi sur une population du Sénégal (Sakuntabhai *et al.*, 2008). Ce locus semble être tellement important dans le contrôle de l'infection qu'il a été répliqué chez la souris infectée par *Plasmodium chabaudi* (Hernandez-Valladares *et al.*, 2004). Cette région abrite de nombreux gènes candidats codant pour des protéines immunologiques, telles que des cytokines, des facteurs de croissance et leurs

récepteurs. Plusieurs de ces gènes ont été déjà identifiés grâce à des approches de gènes candidats, notamment *IRF1*, *IL4*, *IL13* et *IL12B* comme vu précédemment (cf. III.3.2.1 Approche Gène Candidat). Cependant, ces analyses ont également révélé de nouveaux gènes encore inexplorés, comme *ARHGAP26* (rs830532), qui a été associé au niveau d'infection, soulignant l'importance cruciale de cette région sa susceptibilité à la maladie (Milet *et al.*, 2010).

La région présente deux pics d'intérêt assez larges, comprenant de nombreux gènes (Fig. 26) (Garcia, Marquet, *et al.*, 1998; Rihet, Traoré, *et al.*, 1998; Flori *et al.*, 2003). Cependant, l'une des premières limitations réside dans la taille de cette région, qui est si vaste que plusieurs polymorphismes, affectant divers gènes, pourraient être impliqués pour expliquer ce lien génétique. Par conséquent, pour mieux comprendre ces associations, des études basées sur l'approche des gènes candidats doivent être réalisées à nouveau. Néanmoins, des pistes intéressantes demeurent à explorer dans cette région, notamment des gènes comme *CSF1R*, qui code pour un récepteur de CSF1, une cytokine régulant la production, la différenciation et la fonction des macrophages. Le gène *NDST1*, impliqué dans la synthèse des héparanes sulfates, se trouve également au sommet de l'un des pics de liaison. Il a d'ailleurs été montré chez la souris que le niveau de sulfatation des protéoglycanes de sulfate d'héparane influe sur l'infection des sporozoïtes dans les cellules de la peau et de l'endothélium (Coppi *et al.*, 2007). Ces deux gènes apparaissent comme des candidats clés pour approfondir les recherches même si de nombreux gènes codant pour des gènes de l'immunité sont aussi présents dans la région.

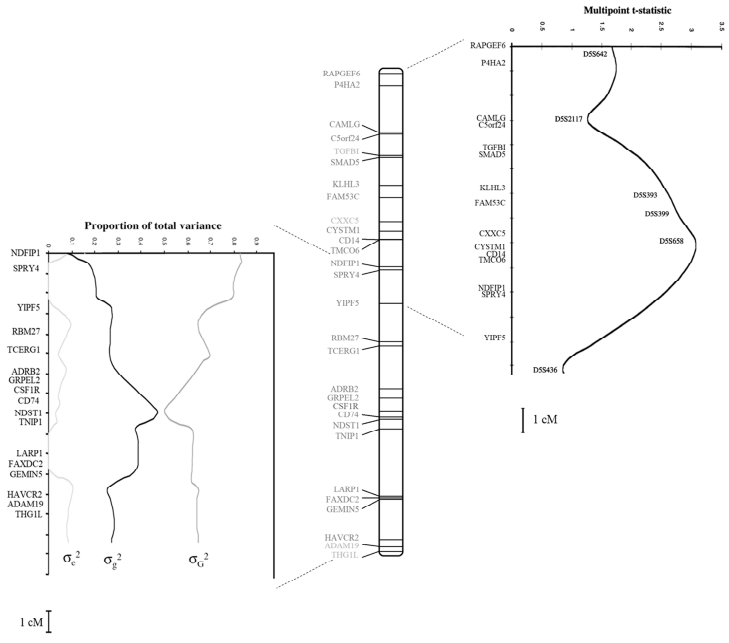


Figure 26 : Représentation des pics de liaison la région 5q31-q33

Le pic 1, compris entre les gènes *RAPGEF6* et *YIPF5*, a montré une liaison génétique avec les niveaux d'infection à *Plasmodium falciparum* dans l'étude (Rihet, Traoré, *et al.*, 1998). Le pic 2, compris entre les gènes NDFIP1 et THGL1 a montré une liaison génétique avec le niveau d'infection à *Plasmodium falciparum* dans l'étude (Flori *et al.*, 2003).

D'autres régions ont été montrées comme liées au niveau d'infection, une liaison a été observée de façon suggestive entre la densité parasitaire et la région 20p11-q11, sans qu'aucun polymorphisme causal n'ait encore été trouvé (Milet *et al.*, 2010). De plus, une étude

au Burkina Faso a révélé une liaison significative entre la parasitémie asymptomatique et la région chromosomique 17p12 (Brisebarre *et al.*, 2014). Cette région comporte plusieurs gènes, dont deux gènes *HS3ST3A1* et *HS3ST3B1*, codant des enzymes de biosynthèse du sulfate d'héparane. Dans une étude portant sur 270 individus de 44 familles au Burkina Faso, des polymorphismes dans *HS3ST3A1* et *HS3ST3B1* ont été identifiés, avec une analyse de liaison et d'association. Une liaison entre la parasitémie à *P. falciparum* et la région chromosomique contenant ces gènes a été observée grâce à 20 SNPs. Notamment, le polymorphisme rs28470223 dans le promoteur de *HS3ST3A1* était associé à la parasitémie, tandis qu'une analyse d'interaction génétique a révélé des interactions significatives entre *HS3ST3A1* et *HS3ST3B1* (Atkinson *et al.*, 2012).

Le niveau d'infection, mesuré par la parasitémie, est également relié aux formes simples du paludisme, comme mentionné précédemment (cf. II.2.1. Formes Asymptomatique et Simple), notamment lorsque le seuil pyrogène est dépassé (Smith *et al.*, 2002). Ainsi, les analyses de liaison génétique se sont aussi focalisées vers l'étude des formes simples de la maladie.

Jepson et al. ont d'abord montré, par des études de liaison génétique, un lien entre la région 6p21-p23, qui contient les gènes *HLA*, et le paludisme simple (Jepson *et al.*, 1997), ceci ayant été déjà suggéré par des études cas-témoins. Le lien entre la susceptibilité au paludisme simple et la région 6p21-p23 a été confirmé à plusieurs reprises d'abord dans une étude portant sur 34 familles vivant en zone urbaine au Burkina Faso (Flori *et al.*, 2003), avec un pic de liaison identifié à proximité des gènes *TNF* et *NCR3* ensuite, dans une étude de liaison génétique sur tout le génome réalisée sur 63 familles au Burkina Faso (Brisebarre *et al.*, 2014). Bien que le rôle du TNF dans le risque de paludisme grave soit déjà bien établi comme nous avons pu le voir dans la partie précédente (cf. III3.1 Facteur Immunitaire de l'Hôtes) (Knight *et al.*, 1999; McGuire *et al.*, 1999), des recherches supplémentaires ont révélé l'existence de polymorphismes codants et non codants associés aux formes simples de la maladie (Flori *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2017). À l'inverse, *NCR3* n'avait jamais été mis en lumière avant les études de liaison génétique, bien qu'il code pour le récepteur NKp30, crucial pour l'immunité, notamment en facilitant l'élimination des cellules infectées. Il a été démontré qu'une forte expression basale de NKp30 est associée à une activation accrue des cellules NK à des densités parasitaires plus faibles (Walk and Sauerwein, 2019). Des études ont identifié des variants de *NCR3* associés au paludisme simple (Delahaye *et al.*, 2007; Baaklini *et al.*, 2017; Thiam *et al.*, 2018), et plus récemment à l'anémie sévère (Onyango *et al.*, 2023).

Enfin, une analyse génomique sur 68 familles au Ghana a révélé un lien avec la susceptibilité au paludisme simple sur le chromosome 10p15, incluant des gènes comme *PFKP*, *IL15RA*, *IL2RA*, et *GATA3* (Timmann *et al.*, 2007). D'autres études au Sénégal ont également montré des associations avec les régions 6p25.1 et 12q22, contenant des gènes liés à la réponse immunitaire comme *PLXNC1*, *UBE2N*, *SOCS2* et *LYRM4* (Milet *et al.*, 2019). Des recherches complémentaires devraient être réalisées afin de déterminer les variants potentiels pouvant jouer un rôle sur le niveau d'infection, sachant que certains gènes ont déjà été mis en évidence pour d'autres formes cliniques (*IL2RA* (Cabantous *et al.*, 2020), *GATA3* (Oakley *et al.*, 2013), *SOCS2* (Brant *et al.*, 2016)).

Cependant, l'approche de liaison génétique, bien qu'efficace pour identifier des régions du génome associées à des phénotypes spécifiques, présente plusieurs limites. Tout d'abord, comme décrit plutôt, elle manque de résolution, car les régions identifiées sont souvent larges, rendant difficile l'identification précise des gènes ou des variants causaux. Ensuite, les études de liaison génétique n'ont à ce jour jamais été utilisées pour le paludisme sévère principalement parce qu'elles nécessitent des paires de frères et sœurs affectés, ce qui est difficile à obtenir. Dans le cas du paludisme sévère, le recrutement de telles familles est difficile

dans les régions endémiques, où les registres familiaux sont souvent incomplets et où la mortalité infantile due au paludisme peut empêcher la collecte d'échantillons appropriés. En conséquence, ces contraintes rendent les études de liaison peu adaptées voire impossibles pour le paludisme sévère, poussant les chercheurs à privilégier d'autres approches, comme les associations pangénomiques, qui ne nécessitent pas de relations familiales spécifiques.

Association Pangénomique

Depuis peu, et pour contourner les limites des approches de liaison génétique, des études GWAS ont été réalisées afin d'identifier de nouvelles variations pouvant être impliquées dans le développement principalement des formes graves de paludisme. Une étude GWAS est une approche utilisée pour identifier des variations génétiques dans le génome humain qui sont associées à un trait ou à une maladie spécifique. Elle repose sur la comparaison des génomes d'un grand nombre d'individus, en analysant des millions de marqueurs génétiques (comme les SNPs) répartis sur tout le génome. Cette méthode ne fait aucune hypothèse préalable sur les gènes impliqués et explore l'ensemble du génome pour détecter des associations significatives (cf. encadré 3).

Encadré 3 : Analyse d'Association Pangénomique

Les études GWAS ont été réalisées afin de chercher sur l'ensemble du génome humain, sans a priori, de nouvelles variations pouvant être impliquées dans une maladie. Cette technique repose sur l'étude de variations génétiques bialléliques, les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), dans différents groupes d'individus présentant ou non la pathologie. Ainsi, les allèles d'un grand nombre de SNPs (tagSNPs), généralement plus de 500 000 tagSNPs, sont génotypés pour chaque individu de différents groupes, par exemple un groupe témoin (personnes non-infectées ou non atteintes) et un groupe d'individus atteints (personnes présentant une forme clinique) (Fig. 27).

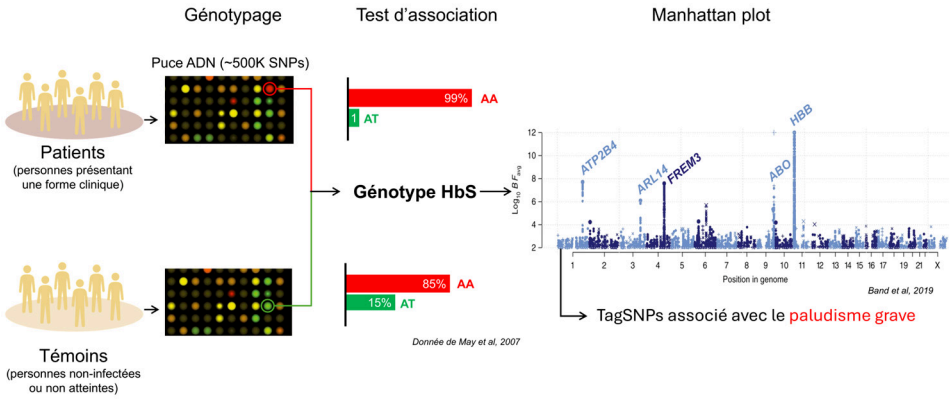


Figure 27 : Étape d'analyse d'association pangénomique

Cette figure illustre les étapes principales d'une étude d'association pangénomique (GWAS) visant à identifier les loci génétiques associés au paludisme grave. Les échantillons génétiques de patients et de contrôles sont analysés à l'aide de puces ADN contenant environ 500 000 SNPs. Un test d'association compare la fréquence des génotypes entre les deux groupes, par exemple, le génotype HbAS (AT) est présent à 15 % chez les contrôles contre une fréquence plus faible chez les personnes atteintes de paludisme grave. Le Manhattan plot visualise les loci génétiques associés, chaque point représentant un SNP avec sa valeur d'association. Par exemple, les loci *HBB*, *ATP2B4*, *ARL14*, *FREM3* et ABO *montrent* une forte association avec le paludisme grave.

Tout comme pour les tests d'association cas-témoins, le groupe témoin doit respecter l'équilibre de Hardy-Weinberg, et les deux groupes doivent être sélectionnés en évitant les facteurs confondant (l'âge, le sexe ou l'origine ethnique). Ces tagSNPs, sont répartis sur l'ensemble du génome humain et sont représentatifs d'un groupe de SNPs en déséquilibre de liaison localisé dans une même région génomique. Deux SNPs sont en déséquilibre de liaison lorsque les SNPs sont proches physiquement l'un de l'autre et sont co-transmis chez les individus. Le déséquilibre de liaison se calcule par la probabilité que 2 variants soient indépendant :

Soit 2 variants génétiques sur le même chromosome

- Variant 1 : Allèles « A » et « a », fréquences = p(A), p(a)
- Variant 2 : Allèles « B » et « b », fréquences = p(B), p(b)

On a 4 combinaisons (ou haplotypes possible) : AB, Ab, aB, ab

Si les 2 variants sont indépendants, ils sont dits en équilibre de liaison :

$$P(AB) = p(A) \times p(B)$$

Si les 2 variants ne sont pas indépendants, ils sont dits en déséquilibre de liaison :

$$P(AB) \neq p(A) \times p(B)$$

Le déséquilibre de liaison (LD) est quantifié par le D' et le r^2, qui offrent des perspectives complémentaires. Le D' mesure la force de l'association entre deux loci, variant de 0 (indépendance) à 1 (association parfaite), et reste sensible même avec des allèles rares. Le coefficient r^2 évalue la dépendance statistique entre les loci, avec des valeurs allant de 0 (absence de corrélation) à 1 (corrélation parfaite). Un r^2 élevé indique que l'allèle à un locus permet de prédire celui à l'autre. Tandis que le D' détecte la liaison, le r^2 est particulièrement utile pour les analyses prédictives.

Enfin une étape clé qui a permis améliore la puissance des analyses d'association en couvrant une plus grande partie du génome est l'imputation. L'imputation génétique est une méthode utilisée pour prédire les génotypes manquants dans un jeu de données, en s'appuyant sur des informations connues provenant d'un panel de référence. Elle exploite le déséquilibre de liaison pour inférer les variants non typés à partir des variants observés.

Pour finir, chaque tagSNP génotypé, les tests d'association sont réalisés (khi2, test exact de Fisher, régression logistique, régression linéaire) afin de déterminer si une différence de fréquence allélique ou de génotype est observée entre les deux groupes d'individus. Si une différence est observée de manière significative, alors cela signifie que le tagSNP est associé à la forme clinique étudiée. Cependant, si un tagSNP est associé avec la pathologie, il n'a pas nécessairement une implication biologique directe (association indirecte). En effet, il est possible, et c'est le cas la plupart du temps, que le tagSNP soit en déséquilibre de liaison avec le SNP fonctionnel causal (Figure 28).

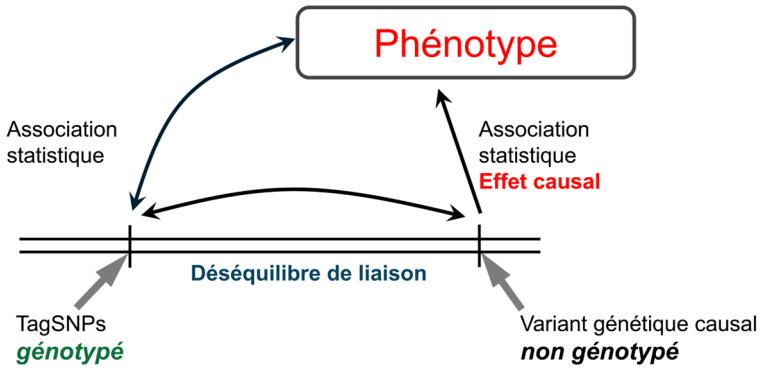


Figure 28 : Représentation du déséquilibre de liaison entre le tagSNP et le variant génétique causal

Le tagSNP génotypé dans les études GWAS est associé avec un trait mais il n'est pas la cause de la maladie (association indirecte). En revanche, il est en déséquilibre de liaison avec le variant génétique causal, c'est-à-dire qu'il y a une co-transmission des allèles de ces deux SNPs dans les populations. Ainsi c'est le variant génétique causal (fonctionnel) qui est directement impliqué dans le processus biologique et non le tagSNP.

La première étude d'association pangénomique (GWAS) sur le paludisme sévère a produit des résultats limités, n'identifiant qu'un nombre restreint de loci associés, notamment le locus HBB, montrant la robustesse de cette mutation a travers les années et les techniques utilisées (Jallow *et al.*, 2009). Ce résultat modeste peut être attribué à plusieurs facteurs. D'une part, le déséquilibre de liaison (LD), sur lequel reposent les GWAS, diffère significativement entre les populations (International HapMap Consortium *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2017). Les populations africaines, en particulier, présentent des blocs de déséquilibre de liaison très différents en raison de leur grande diversité génétique et de leur histoire évolutive. Cependant, les puces utilisées dans cette étude étaient principalement conçues pour des populations d'origine européenne, avec des SNPs sélectionnés pour refléter les blocs de LD typiques des populations occidentales. Ces puces sont moins performantes pour capturer les variations génétiques spécifiques aux populations africaines, réduisant ainsi la sensibilité des analyses. Ces limites méthodologiques ont souligné la nécessité d'adapter les outils génétiques et les panels de référence aux spécificités des populations étudiées pour améliorer la puissance des GWAS dans des contextes comme le paludisme. D'autre part, le phénotype du paludisme sévère est très diversifié, comme nous avons pu le voir (cf. II.2 Formes Cliniques Associées au Paludisme). Cette hétérogénéité phénotypique complique l'identification de loci génétiques associés, car les différents sous-types cliniques peuvent être influencés par des variants distincts. Si ces sous-types ne sont pas correctement stratifiés dans les analyses, il a été démontré que cela peut diluer les signaux génétiques et réduire la puissance statistique des GWAS (van der Sluis *et al.*, 2010).

Avec l'avancée des données disponibles sur les populations africaines et l'évolution des techniques qui ont amélioré les analyses et les résultats, sept autres études GWAS (Timmann *et al.*, 2012; Band *et al.*, 2013; Malaria Genomic Epidemiology Network and Malaria Genomic Epidemiology Network, 2014; Malaria Genomic Epidemiology Network *et al.*, 2015; Ravenhall *et al.*, 2018; Malaria Genomic Epidemiology Network, 2019; Esoh *et al.*, 2023) ont été menées pour identifier des variants génétiques associés au paludisme grave. Ces études ont permis de mettre en évidence plusieurs loci associés, qui ont depuis été pour certains répliqués dans des populations indépendantes, tels que *HBB*, *ABO*, *GYPA/B/E*, et *ATP2B4* (Tab. 7).

Localisation	Méthodes (SNP génotypé)	Taille de la cohorte	(Réplication)	Locus associé	Référence
Gambie	GWAS (500 K)	958 PS 1 382 Ctrl	(1 087) (2 376)	*MAST2, ASB17, SPATA3, C3orf39, CCKAR, SCYE1, ZNF131, DDC, PLXNA4, DLC1, PIP4K2A, CNNM1, FAM53B, HBB, GPC6, RPL10, CIAPIN1, EMR1*	(Jallow *et al.*, 2009)
Ghana	GWAS (946 K)	1 325 PS 826 Ctrl	(1 320) (2 222)	*HBB, ABO, ATPB2B4, MARVELD3*	(Timmann *et al.*, 2012)
Gambie, Kenya, Malawi	Méta-Analyse (1,3 M)	5 425 PS 6 891 Ctrl	*NA*	*HBB, ABO, ATPB2B4, BET1L, C10orf57, MYOT, SMARCA5*	(Band *et al.*, 2013)
Gambie, Mali, Burkina Faso, Ghana, Nigeria, Cameroun, Kenya, Tanzanie, Malawi, Papouasie-Nouvelle-Guinée, Vietnam	GWAS	11 890 PS 17 441 Ctrl	*NA*	*HBB, ABO, ATP2B4, G6PD, CD40L*	(Malaria Genomic Epidemiology Network and Malaria Genomic Epidemiology Network, 2014)
Gambie, Kenya, Malawi, Mali, Ghana, Cameroun, Tanzanie, Burkina Faso	GWAS (2,5 M)	5 633 PS 5 919 Ctrl	(~11 000) (~3 000)	*HBB, ABO, ATPB2B4, FREM3*	(Malaria Genomic Epidemiology Network *et al.*, 2015)
Tanzanie	GWAS (2,5 M)	449 PS 465 Ctrl	*NA*	*HBB, IL23R, IL12RB2, KLHL3, MYOT, CSMD1 LINC00944, FAM155A, LINC00670, NNT*	(Ravenhall *et al.*, 2018)
Gambie, Malawi, Kenya, Tanzanie, Mali, Burkina Faso, Ghana, Nigeria, Cameroun, Vietnam, Papouasie-Nouvelle-Guinée	GWAS & Meta-Analyse (1,5 M)	9 008 PS 8 666 Ctrl	(5 587) (9 959)	*HBB, ABO, ATPB2B4, FREM3, ARL14, EPHA7, MVB12B, TENM4, HCG26, SOX11, DIP2C, SOX5,*	(Malaria Genomic Epidemiology Network, 2019)
Cameroun	GWAS (2,3 M)	693 PS 778 Ctrl	*NA*	*CHST15*	(Esoh *et al.*, 2023)

Tableau 7 : Liste des études GWAS sur le paludisme sévère

Résumé des études GWAS et des méta-analyses portant sur le paludisme sévère (PS) et les témoins (Ctrl) dans différentes régions géographiques, indiquant le nombre de SNPs génotypés (K: mille, M: million), la taille des cohortes de découvert et de réplication, et les loci significatifs associés au paludisme.

À ce jour, la quasi-totalité des études GWAS sur le paludisme sévère ont confirmé l'association avec l'allèle HbS, près de 70 ans après sa découverte par Allison et al. (Allison, 1954) Ce qui est particulièrement remarquable est la différence d'association entre les tagSNPs et le variant causal rs334. Prenons comme exemple la première étude GWAS : le tagSNP associé avec le signal le plus fort était le rs11036238, avec une P-value de $3,7 \times 10^{-11}$ (OR = 0,63 ; IC = 0,55-0,72). En revanche, le SNP causal rs334, génotypé directement, montrait une association bien plus significative, avec une P-value de $1,3 \times 10^{-28}$. Fait encore plus intéressant, le déséquilibre de liaison entre ces deux SNPs était modéré, avec un r^2 de 0,36 en Gambie, indiquant que l'effet de rs334 est si puissant qu'il reste détectable malgré une corrélation génétique relativement faible. Des résultats similaires ont été observés dans d'autres études GWAS. Deux points méritent d'être soulignés : premièrement, bien que le r^2 soit de 0,36 en Gambie, il est bien plus faible (r^2 = 0,0089) dans d'autres populations africaines, corroborant l'hypothèse selon laquelle l'allèle HbS est apparu indépendamment dans différentes populations africaines (Pagnier *et al.*, 1984; Chebloune *et al.*, 1988). Deuxièmement, le signal exceptionnellement fort de rs334 a conduit toutes les études à attribuer les associations observées dans cette région à ce variant unique. Cependant, ce signal pourrait masquer l'existence d'autres SNPs causaux dans la même région, suggérant que l'effet observé pourrait ne pas être exclusivement dû à rs334 mais aussi à des variants qui pourraient aussi réguler l'expression de *HBB*. Au-delà de cette association emblématique avec rs334 (Glu6Val) responsable de l'hémoglobine S (HbS), et le variant rs8176719, qui détermine le groupe sanguin O via une délétion dans l'exon 6 du gène *ABO*, les GWAS ont également permis d'identifier de nouvelles régions génomiques associées à la susceptibilité au paludisme sévère. De manière frappante, ces régions pointent vers des gènes liés aux globules rouges, renforçant l'idée que cette cellule joue un rôle central dans la physiopathologie de l'infection par *Plasmodium falciparum*.

L'une de ces régions identifiée comme associée (Malaria Genomic Epidemiology Network *et al.*, 2015), est le locus situé entre le gène *FREM3* et le groupe de trois gènes de glycophorine (*GYPA*, *GYPB*, *GYPE*) sur le chromosome 4. Une étude ultérieure, s'appuyant sur l'analyse de 765 génomes séquencés issus de dix groupes ethniques africains et sur les données du projet 1000 Genomes, a permis d'identifier un variant complexe du nombre de copies (CNV), nommé DUP4. Ce variant est associé à une résistance au paludisme sévère et explique le signal d'association détecté dans des études précédentes (Leffler *et al.*, 2017). L'haplotype DUP4, aussi appelé Dantu, est uniquement présent en Afrique de l'Est, ce qui, selon les chercheurs, pourrait indiquer une augmentation récente de sa fréquence en raison de la sélection naturelle exercée par le paludisme. Cet haplotype contient cinq gènes de glycophorine, dont deux gènes hybrides combinant des domaines de *GYPB* et *GYPA* (haplotype Dantu/DUP4) (Fig. 29).

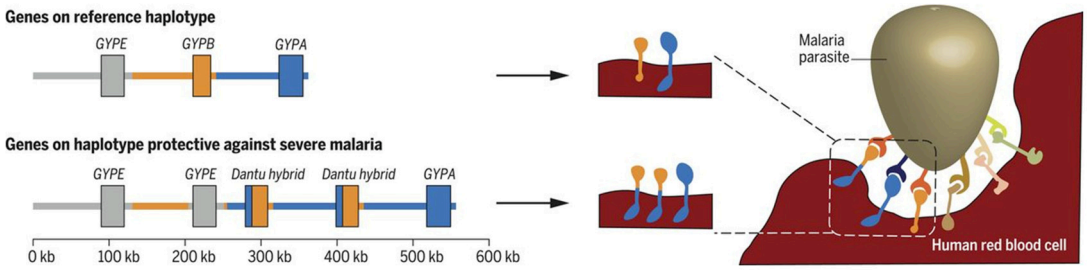


Figure 29 : Variation structurale créant des gènes hybrides de glycophorines est associée à une protection contre le paludisme grave.

L'haplotype de référence contient trois gènes de glycophorines, dont deux (*GYPA* et *GYPB*) codent pour des protéines exprimées à la surface des globules rouges. L'haplotype protecteur contre le paludisme en contient cinq, incluant deux gènes hybrides qui codent pour l'antigène du groupe sanguin Dantu. Ces gènes hybrides combinent le domaine extracellulaire de *GYPB* et le domaine intracellulaire de *GYPA*. Les glycophorines jouent un rôle crucial en tant que récepteurs pour les ligands du parasite du paludisme lors de l'invasion des globules rouges (Leffler *et al.*, 2017).

Le cluster de gènes de glycophorine, *GYPA* et *GYPB*, encode le système de groupe sanguin MNS et sert de récepteur pour *P. falciparum* lors de l'invasion des globules rouges. Plus précisément, *GYPA* et *GYPB* agissent comme récepteurs membranaires pour les protéines EBA-175 et EBL-1 du parasite, respectivement (Mayer *et al.*, 2009). Cette association avec le paludisme grave a été confirmée par d'autres études cas-témoins dans des populations tanzaniennes et kényanes (Manjurano *et al.*, 2015; Ndila *et al.*, 2018). Récemment, il a été démontré que l'haplotype DUP4 joue un rôle dans le contrôle de la parasitémie *in vivo* (Kariuki *et al.*, 2023), ainsi que dans la formation de larges rosettes chez les personnes porteuses de l'haplotype DUP4 (Carlier *et al.*, 2024). Toutefois, des analyses fonctionnelles supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre comment ces variants influencent l'invasion et/ou le développement des parasites dans les érythrocytes et confèrent une protection contre le paludisme grave.

Une autre région nouvellement identifiée est le locus situé sur le chromosome 1, au niveau du gène *ATP2B4*. Ce locus a été initialement mis en évidence par Timmann et al. (Timmann *et al.*, 2012), puis confirmé par plusieurs études ultérieures (Band *et al.*, 2013; Malaria Genomic Epidemiology Network and Malaria Genomic Epidemiology Network, 2014; Malaria Genomic Epidemiology Network *et al.*, 2015; Ndila *et al.*, 2018; Malaria Genomic Epidemiology Network, 2019). *ATP2B4* code pour PMCA4, une pompe transmembranaire exprimée dans les érythrocytes, qui joue un rôle clé dans la sortie du calcium (Ca^{2+}) hors de la cellule. Cette découverte souligne l'importance des mécanismes de régulation ionique dans la réponse des globules rouges à l'infection par *Plasmodium falciparum*. Un haplotype de cinq SNPs (rs1541252, rs1541253, rs377342347, rs1419114, rs2228445) a été identifié, montrant une influence sur l'expression de PMCA4b, la forme mineure de cet haplotype étant associée à une réduction de l'expression de la protéine à la surface des érythrocytes (Zámbó *et al.*, 2017). Ensuite, Lessard et al. (Lessard *et al.*, 2017) ont démontré par analyse in silico eQTL que trois autres SNPs (rs10751450, rs10751451, rs10751452), en déséquilibre de liaison avec les tagSNPs des GWAS, réduisent également l'expression d'*ATP2B4*. Leur étude a révélé que la délétion de cette région augmente le calcium intracellulaire dans les érythrocytes. Au sein du laboratoire, une étude a recherché des SNPs régulateurs en déséquilibre de liaison ($r^2 > 0,6$) avec des tagSNPs associés au paludisme sévère et répliqués dans différentes populations

(Nisar *et al.*, 2022). Les SNPs ont été annotés, priorisés, et les candidats les plus prometteurs ont été localisés dans un promoteur régulant l'expression d'*ATP2B4*. Il est intéressant de noter que parmi les 25 premiers SNPs sur les 126 identifiés, 7 des 8 SNPs précédemment identifiés (rs10751450, rs10751451, rs10751452, rs1541252, rs1541253, rs1419114, rs2228445) figuraient également dans cette liste (Lessard *et al.*, 2017; Zámbó *et al.*, 2017). Cinq SNPs (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, rs1541255) ont été spécifiquement identifiés comme étant les variants les plus prometteurs par leur localisation dans une région avec des marques d'histones activatrices et des pics d'ouverture de la chromatine (cf. IV.1 Régulation de l'Expression des Gènes). Cette activité a été confirmée expérimentalement, et ces SNPs, ainsi que rs10751450, rs10751451 et rs10751452, ont été associés au paludisme sévère dans une population sénégalaise. Les variations mineures identifiées réduisent l'activité du promoteur alternatif, ce qui pourrait entraîner une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Cela suggère un mécanisme par lequel ces variations affectent la susceptibilité au paludisme sévère en modulant les fonctions des érythrocytes. Ces résultats sont particulièrement intéressants car ils mettent en évidence *ATP2B4*, la deuxième protéine impliquée dans la régulation du calcium intracellulaire, après *PIEZO1* (Fig. 30). Cela souligne le rôle crucial du calcium dans la multiplication du parasite *Plasmodium falciparum*. Cette hypothèse est renforcée par une étude montrant que la multiplication des parasites est limitée en présence de l'antagoniste aurintricarboxylic acid (ATA), un inhibiteur de PMCA4, ce qui mime une réduction d'expression par les variants mineurs (Joof *et al.*, 2023).

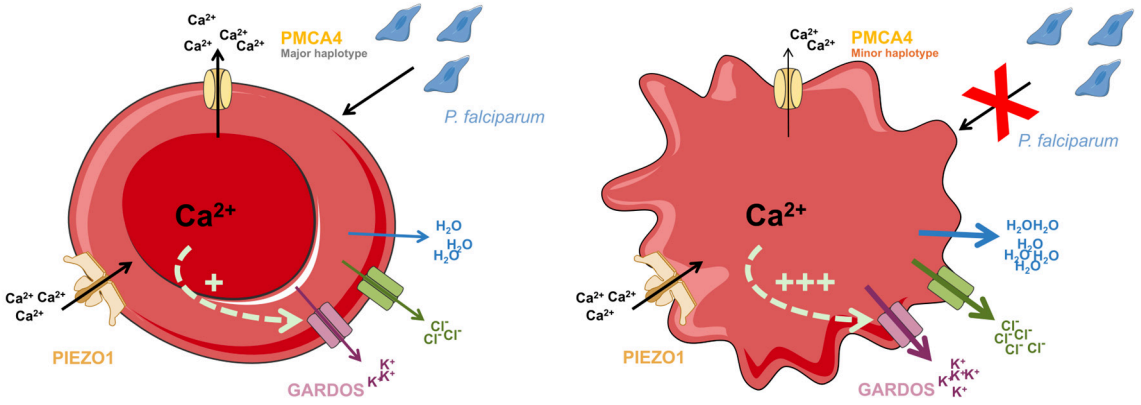


Figure 30 : Effet des haplotypes de PMCA4 sur la concentration intracellulaire en calcium et l'infection par Plasmodium falciparum

À gauche : Dans le cas de l'haplotype majeur de *ATP2B4*, la pompe à calcium (PMCA4) fonctionne normalement, permettant une régulation efficace de la concentration intracellulaire en calcium (Ca^{2+}).
À droite : Dans le cas de l'haplotype mineur de *ATP2B4*, l'expression de la pompe est réduite, entraînant une accumulation de calcium intracellulaire. Cette augmentation perturbe la fonction cellulaire, inhibe la capacité d'invasion du parasite, et protège ainsi contre le paludisme sévère. Les canaux PIEZO1 et GARDOS, ainsi que les flux ioniques (K^+, Cl^-, H_2O), sont également représentés pour illustrer leur rôle dans les échanges membranaires.

Malgré la confirmation de certains loci, tels que *GYPA/B/E* et *ATP2B4*, de nombreuses régions génétiques associées au paludisme demeurent mal comprises, notamment *KLHL3*, identifié dans deux GWAS (Band *et al.*, 2013; Ravenhall *et al.*, 2018), et MARVELD3 (Timmann *et al.*, 2012),ou bien *ARL14* (Ndila *et al.*, 2018; Malaria Genomic Epidemiology Network, 2019), malgré leur potentiel fonctionnel.

KLHL3, précédemment associé à l'hypertension et à l'acidose métabolique (Boyden *et al.*, 2012; Louis-Dit-Picard *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2019), pourrait en effet augmenter le risque d'acidose sévère dans le paludisme. Ce gène se situe dans la région 5q31, souvent évoquée pour son rôle dans la susceptibilité au paludisme comme décrit plus tôt (cf. III3.2.2. Approche Génome Entier). *MARVELD3*, pour sa part, est un composant essentiel des jonctions serrées des cellules épithéliales et endothéliales vasculaires. Son implication dans l'endothélium est particulièrement notable, car l'adhérence des érythrocytes infectés à cette couche cellulaire est un facteur clé dans la physiopathologie du neuropaludisme. Des études ont montré que la réduction de l'expression de certaines protéines de jonction serrée, dont *MARVELD3*, pourrait affecter l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, augmentant ainsi sa perméabilité et entraînant des complications dans des contextes pathologiques, comme les AVC (Tornabene *et al.*, 2019). Des recherches supplémentaires sont essentielles pour élucider ces associations génétiques et leur rôle potentiel dans le paludisme sévère.

Concernant le locus *ARL14*, son implication reste incertaine. Bien que *ARL14* code pour une GTPase impliquée dans le transport de l'antigène du CMH-II dans les cellules dendritiques, des cellules myéloïdes professionnelles présentatrices d'antigènes (Paul *et al.*, 2011), les données disponibles sont contradictoires. Une étude GWAS a révélé une association claire, mais celle-ci n'a pas été répliquée (Malaria Genomic Epidemiology Network *et al.*, 2015). De plus, une étude plus récente n'a pas observé d'association entre le SNP rs75731597 (*ARL14*) et la densité périphérique des parasites, la concentration plasmatique de PfHRP2 (ng/mL), un indicateur de la biomasse totale des parasites, ni le ratio de la concentration plasmatique de PfHRP2 à la densité des parasites circulants (Uyoga *et al.*, 2022). Ces résultats suggèrent que le rôle de *ARL14* dans le paludisme sévère nécessite encore d'être clarifié.

Cela représente l'une des principales limites des GWAS. Premièrement, les résultats des GWAS ne sont pas toujours répliqués ou cohérents entre les études. Comme mentionné précédemment, la population africaine présente une grande diversité génétique, avec des blocs de déséquilibre de liaison spécifiques à chaque population, ce qui entraîne des effets de variants différents d'une population africaine à une autre (Tai, Dhaliwal and Balasubramaniam, 2022). Deuxièmement, bien que les GWAS permettent d'identifier des associations, elles ne permettent pas toujours de comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents. En effet, les variants identifiés sont rarement les variants causaux, ce qui complique considérablement l'interprétation des résultats (cf. encadré 3).

Une piste prometteuse à explorer est celle des variants régulateurs. En effet, plus de 90 % des variants identifiés par les études d'association pangénomique sont situés dans des régions non codantes du génome (Buniello *et al.*, 2019). Ces régions contiennent souvent des éléments régulateurs tels que des enhancers ou des promoteurs qui jouent un rôle clé dans l'expression génique (cf. IV.1 Régulation de l'Expression des Gènes). Les variants causaux dans ces zones peuvent affecter l'expression des gènes voisins, comme cela a été observé pour *ATP2B4*. Cette hypothèse de travail est renforcée par la démonstration de différences d'expression de nombreux gènes entre les sujets présentant des niveaux d'infection différents ou entre des sujets avec des formes cliniques différentes (Lee *et al.*, 2018).

Études Transcriptomiques

Pour explorer la variation d'expression génique à une échelle plus large, des techniques comme le micro-array puis avec les progrès des technologies omics le RNA-seq (séquençage de l'ARN) ont permis de mesurer l'abondance des transcrits dans différentes conditions ou tissus. Cette approche fournit un aperçu global de l'expression génique, en révélant les différences dans l'expression des gènes associés à des variants spécifiques. Beaucoup de

phénotypes ont été étudiés que cela soit *in vivo* ou *in vitro*. En effet, les études humaines, pour des raisons éthiques, se restreignent principalement à l'analyse du sang total (Jamrozik *et al.*, 2015), tandis que les modèles murins ont permis d'obtenir des informations complémentaires, notamment grâce à des études ciblées sur le foie, la rate ou le cerveau (Fig. 31). Toutefois, avant de détailler les résultats, il est important de noter que, bien que le RNA-seq soit extrêmement puissant pour explorer les profils transcriptionnels à l'échelle globale, il présente certaines limites majeures qui peuvent expliquer la divergence des résultats d'une étude à l'autre. Tout d'abord, il repose sur l'analyse de l'ARN total extrait d'un mélange hétérogène de cellules, ce qui masque les différences d'expression génique entre types cellulaires distincts. Cette approche génère une "moyenne globale" qui ne permet pas d'identifier les variations transcriptionnelles spécifiques à chaque sous-population cellulaire, particulièrement importantes dans des contextes biologiques complexes comme l'inflammation ou l'infection ce que représente le paludisme. Ces limitations rendent l'interprétation des données particulièrement difficile dans des tissus hétérogènes tels que la rate, le cerveau ou le sang, où des populations cellulaires spécifiques peuvent jouer des rôles distincts dans le devenir de l'infection.

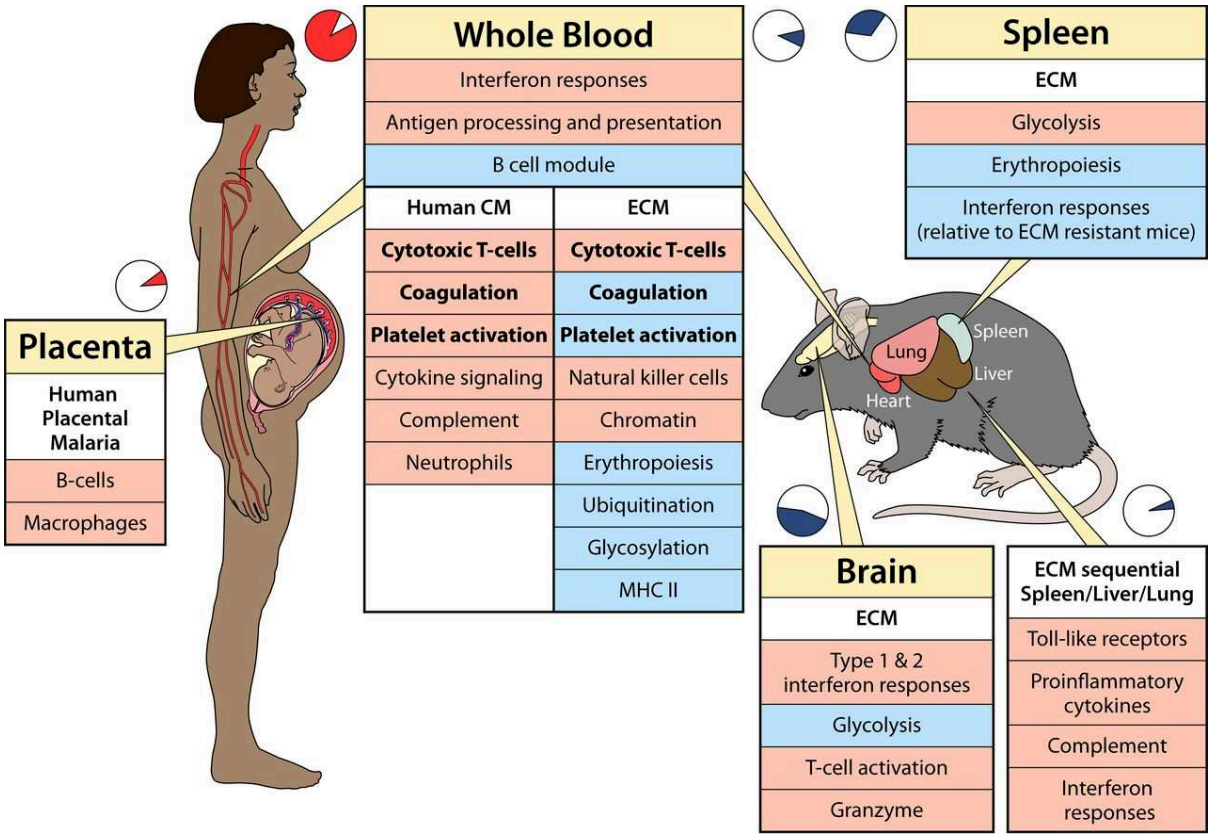


Figure 31 : Réponse transcriptomique de l'hôte au paludisme chez l'humain et la souris. Comparaison des principales caractéristiques de la réponse transcriptionnelle de l'hôte au paludisme chez l'humain (gauche) et la souris (droite). Les diagrammes circulaires montrent la fréquence relative d'étude de chaque tissu pour chaque espèce. Les groupes fonctionnels de gènes sont indiqués comme surexprimés (rouge clair) ou sous-exprimés (bleu clair) pour les formes non compliquées, le neuropaludisme (CM) et le neuropaludisme expérimental (ECM). Les groupes fonctionnels communs aux deux espèces sont signalés en gras (Lee *et al.*, 2018).

Malgré les limites inhérentes à l'approche RNA-seq à l'échelle globale, ces 15 dernières années ont néanmoins permis de réaliser des avancées significatives grâce aux études de transcriptomique en approche "bulk". Les études sur des individus naïfs exposés à des infections contrôlées montrent une activation précoce de nombreux gènes liés à l'immunité innée dès la détection des parasites dans le sang, avant même l'apparition des symptômes (Ockenhouse *et al.*, 2006; Duncan and Draper, 2012; Spring, Polhemus and Ockenhouse, 2014). Ces gènes incluent des cytokines pro-inflammatoires (comme IFN-γ et IL-1β), des récepteurs phagocytaires, la voie de glycolyse et les gènes liés à la présentation antigénique via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I et CMH II). De plus, les études comparant des épisodes de paludisme sévère et non compliqué suggèrent que les épisodes non compliqués présentent une expression plus élevée des gènes des voies IFN et des réponses lymphocytaires T (Krupka *et al.*, 2012). Les études sur le modèle de neuropaludisme murin révèlent chez des souris infectées par *Plasmodium berghei ANKA* traitées par IFN-α (800 000 U), une amélioration de la survie de 60 % (Morrell *et al.*, 2011). Ce traitement a diminué les transcrits de *CXCL9* et *ICAM-1* dans le cerveau, réduit l'expression de *CXCR3* sur les lymphocytes T, ainsi que les niveaux de TNF-α, suggérant un effet anti-inflammatoire. Les études sur les transcriptomes dans le neuropaludisme sont rares (Krupka *et al.*, 2012; Sobota *et al.*, 2016; Cabantous *et al.*, 2017). Tout de même, chez des enfants malawites atteints de neuropaludisme, l'expression des gènes associés aux interférons de type I était significativement diminuée comparé à un épisode de paludisme non compliqué (Krupka *et al.*, 2012). Une étude élargie a montré que les enfants atteints de neuropaludisme présentaient une augmentation des voies liées à l'adhésion cellulaire, à la matrice extracellulaire, et aux neutrophiles, ainsi que des marqueurs de coagulation et d'inflammation (Feintuch *et al.*, 2016). Les analyses plasmatiques ont révélé des concentrations élevées de protéines des granules neutrophiles (élastase, myéloperoxydase), de TNF, d'IL-10 et de MCP-1 chez ces patients (Feintuch *et al.*, 2016). Chez les enfants maliens, une surexpression des gènes liés au complément, aux récepteurs Toll-like, et aux cellules T cytotoxiques a également été observée dans les formes sévères de paludisme (Sobota *et al.*, 2016). Pris ensemble, ces résultats sont particulièrement intéressants, car ils font écho à des études précédentes ayant identifié des variants génétiques associés à ces mêmes gènes dans le cadre du paludisme, grâce à des approches gène candidat comme nous avons déjà pu le voir particulièrement pour le TNF, IL10 et les gènes liés à la voie de l'adhésion cellulaire dont fait partie *ICAM-1*. Pour le cas de l'IFN-α, nous pouvons rajouter que deux SNPs dans les promoteurs des gènes *IFNA2* (-173T) et *IFNA8* (-884A) ont été associés à une diminution de la production d'IFN-α, une susceptibilité accrue à l'anémie sévère palustre, et une mortalité plus élevée chez les enfants, avec des impacts fonctionnels sur l'expression génique et la modulation des médiateurs inflammatoires (Kempaiah *et al.*, 2012).

Ces observations soutiennent fortement notre hypothèse selon laquelle les signaux d'association identifiés pourraient résulter de l'impact des variants sur l'expression génique et que des variants régulateurs pourraient jouer un rôle clé dans la modulation de l'expression de gènes critiques. En effet, la séquence d'ADN joue un rôle essentiel dans la régulation des gènes. Les régions non codantes, autrefois considérées comme de l'ADN "inutile" (junk DNA) (Ohno, 1972), se sont révélées en réalité bien plus riches et complexes que prévu, constituées d'éléments régulateurs cruciaux. Ces éléments, comprenant notamment des régions d'interaction avec des protéines se liant à l'ADN, participent activement à la régulation de l'expression génique. Tous ces aspects seront détaillés dans la section suivante.

IV. Impact des SNPs sur la Régulation de l'Expression Génétique

Les analyses post-GWAS constituent une étape cruciale pour comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents aux associations génétiques identifiées. Ces analyses vont au-delà de la simple association de tagSNPs avec des phénotypes et incluent des approches pour déterminer comment ces variants influencent la fonction des gènes ou les voies biologiques. En effet, bien que certaines régions, telles que celles impliquant *ATP2B4*, aient fourni des premiers l'élément de réponse, de nombreux loci associés restent encore à explorer. Une grande partie des variants associés aux traits se trouvent dans des régions non codantes, souvent dans des régions régulatrices. Pour approfondir ces découvertes, il est essentiel de s'intéresser aux mécanismes moléculaires par lesquels ces variants peuvent influencer la régulation de la transcription. Ainsi, la section suivante abordera les différents mécanismes de régulation de l'expression génique et le rôle des éléments régulateurs dans l'interaction avec les variants génétiques.

IV.1. Régulation de l'Expression des Gènes

IV.1.1. Mécanisme d'Ouverture de la Chromatine

Le premier niveau de régulation de l'expression des gènes est la compaction de l'ADN au sein de la chromatine. L'ADN, une molécule de plus de 3,2 milliards de paires de bases pour le génome humain, doit être condensé pour maintenir une taille compatible avec le noyau cellulaire. Les histones jouent un rôle central dans l'organisation de cet empaquetage de l'ADN. La chromatine est structurée en unités de base appelées nucléosomes, composées d'environ 147 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones, comprenant deux copies de chaque protéine histone : H2A, H2B, H3 et H4 (Luger *et al.*, 1997). Les techniques les plus couramment utilisées pour évaluer l'accessibilité de la chromatine sont l'ATAC-Seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) et le DNase-Seq (Fig. 32).

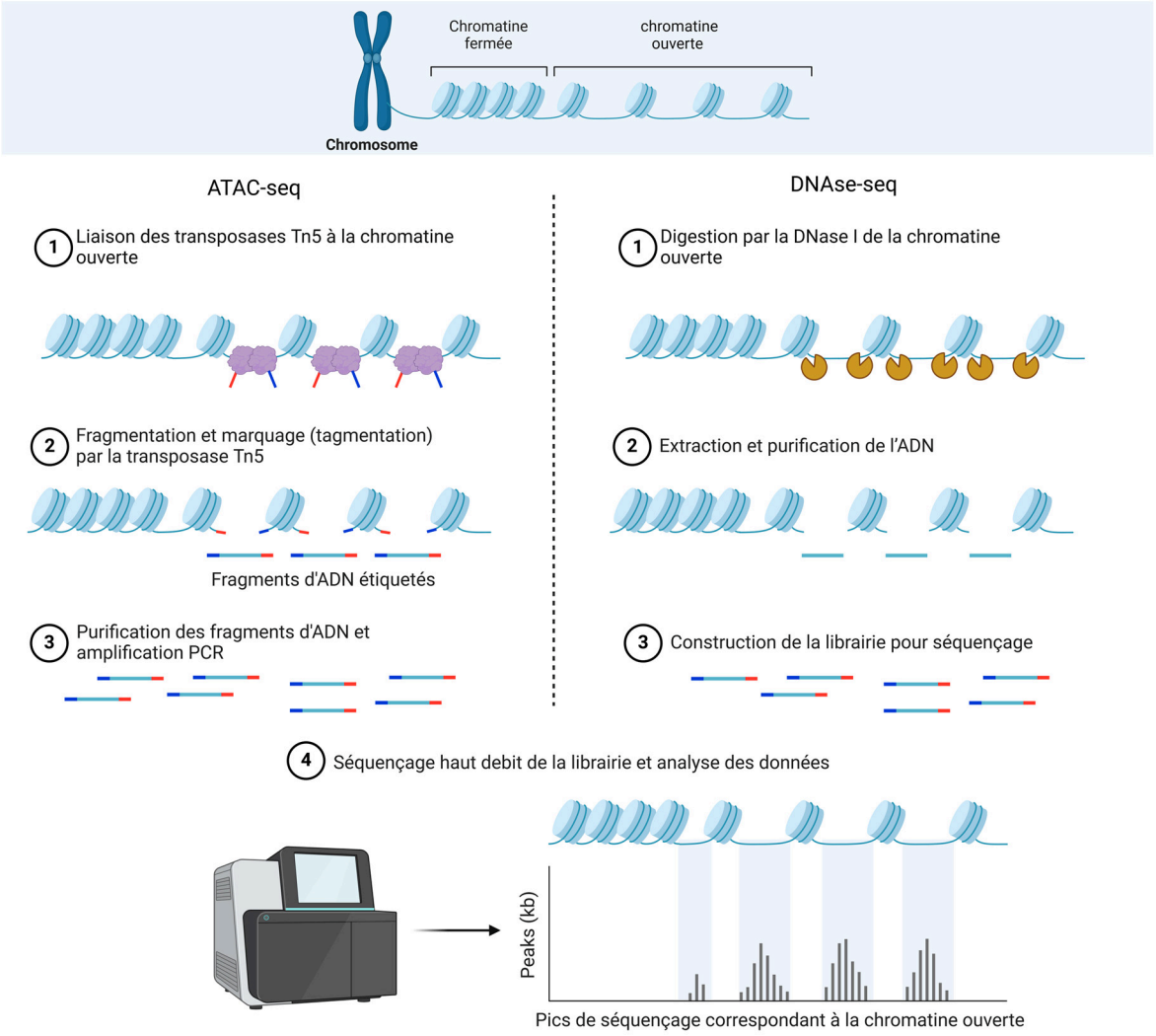


Figure 32 : Technique pour évaluer l'accessibilité de la chromatine par ATAC-seq et DNase-seq

ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing)
L'ATAC-seq est une technique utilisée pour identifier les régions accessibles de la chromatine dans le génome. Elle repose sur l'utilisation d'une transposase qui insère des adaptateurs de séquençage dans les régions de chromatine ouvertes, souvent associées à l'activité transcriptionnelle. Cette méthode permet une résolution fine pour détecter les promoteurs, les enhancers et d'autres éléments régulateurs actifs. L'ATAC-seq nécessite peu de cellules et fournit des données riches sur l'accessibilité globale de la chromatine, les régions hypersensibles à la DNase et la structure de la chromatine.
DNase-seq
La DNase-seq est une méthode moins récente mais puissante qui détecte les régions hypersensibles à la DNase I dans la chromatine. Ces régions sont généralement associées à une chromatine accessible, révélant des sites régulateurs clés tels que les promoteurs, les enhancers et les sites de fixation des facteurs de transcription. L'ADN exposé est digéré par la DNase I, puis les fragments résultants sont séquencés pour cartographier précisément les sites hypersensibles. Bien que cette méthode nécessite un plus grand nombre de cellules que l'ATAC-seq, elle reste une référence pour l'étude de l'accessibilité de la chromatine. Adapté de biorender.

Diverses modifications des histones influencent l'accessibilité de l'ADN et donc la régulation transcriptionnelle. Ces modifications se produisent sur les résidus de lysine et d'arginine. L'acétylation des histones, telle que l'acétylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27ac), est généralement associée à l'activation transcriptionnelle, tandis que la méthylation des histones peut soit activer (H3K4Me3, H3K4Me1) soit réprimer (H3K27Me3 ou H3K9Me3) la transcription (Liang *et al.*, 2004; Black, Van Rechem and Whetstine, 2012)(Fig 33).

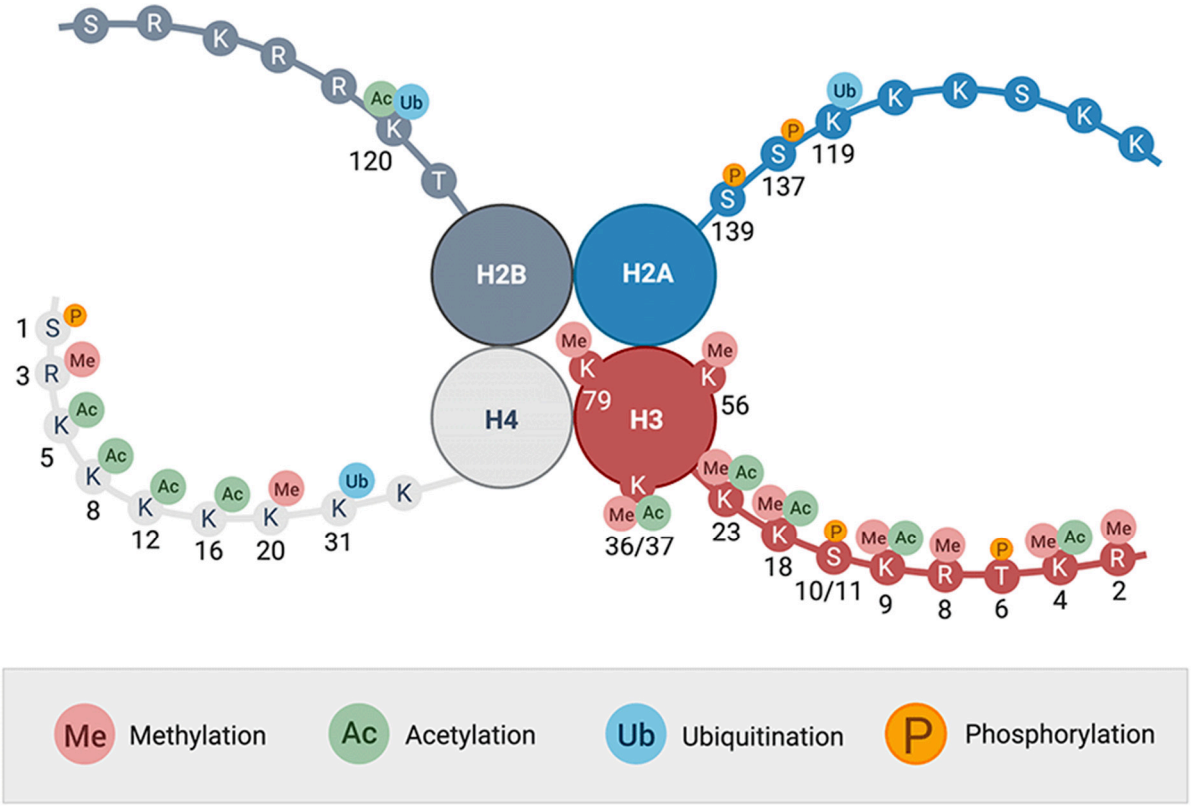


Figure 33 : Modifications post-traductionnelles des histones H2A, H2B, H3 et H4

Les quatre principales modifications post-traductionnelles des histones (méthylation, acétylation, ubiquitination et phosphorylation) se produisent sur les extrémités N- et C-terminales des histones, ainsi que dans la région globulaire du cœur du nucléosome (*Website*, no date).

Pour détecter les modifications des histones, la méthode la plus utilisée est l'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage de l'ADN (ChIP-Seq) (Fig. 34). Cette technique permet d'identifier les régions de l'ADN où les marques histones spécifiques sont présentes. Les zones de chromatine moins compactées sont plus accessibles, favorisant l'interaction avec les éléments régulateurs et le recrutement des facteurs de transcription. Ces interactions peuvent également être détectées par ChIP-Seq. Actuellement, une grande quantité de données issues d'expériences de ChIP-Seq est disponible, et des bases de données spécialisées, comme CistromeDB (pour les marques histone) et ReMap (pour les facteurs de transcription), offrent un accès à ces ensembles de données (Hammal *et al.*, 2022; Taing *et al.*, 2024).

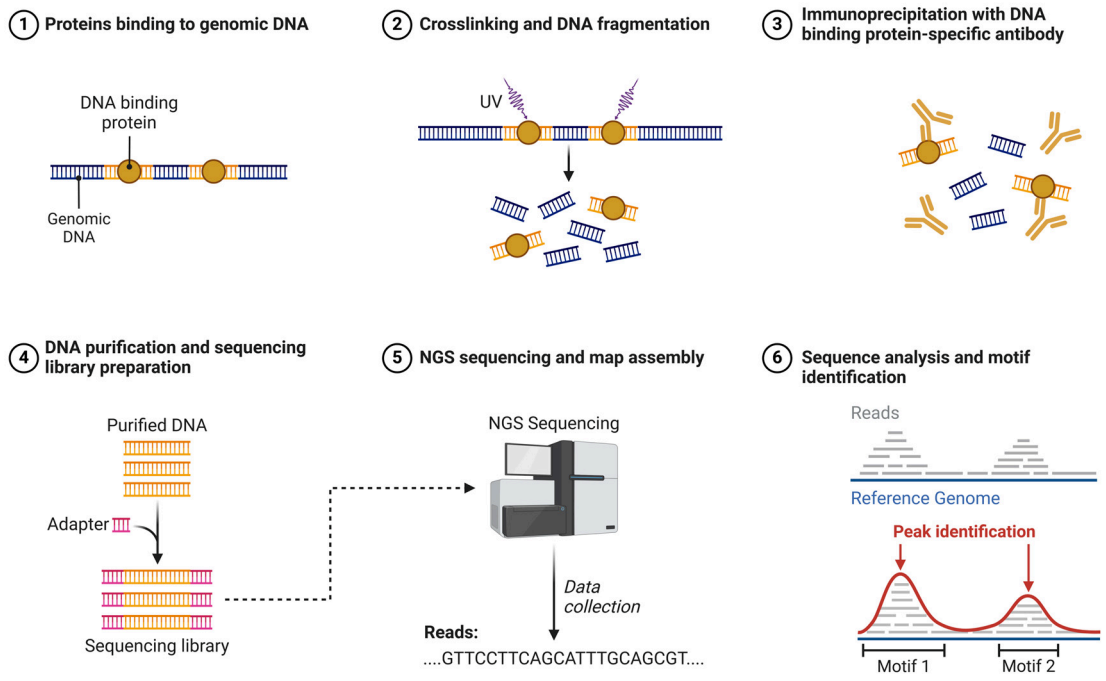


Figure 34 : Description de la technique de ChIP-seq

Le ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation followed by sequencing) est une méthode utilisée pour analyser les interactions entre les protéines et l'ADN (1). Elle implique la fixation des protéines au matériel génétique puis d'une fragmentation (2), suivie de l'immunoprécipitation des complexes protéines-ADN à l'aide d'anticorps spécifiques (3). Après la purification de l'ADN lié à la protéine d'intérêt et l'ajout de barcode (4), l'ADN est séquencé (5) pour identifier les régions génomiques associées à la protéine ciblée, permettant ainsi de cartographier les sites de liaison des facteurs de transcription (6). Adapté de biorender.

L'ensemble de ces mécanismes de régulation épigénétique contrôle précisément l'accès aux différents éléments régulateurs du génome, tels que les promoteurs, les enhancers et les silencers. Cette régulation fine permet une expression génique adaptée et spécifique aux besoins cellulaires.

IV.1.2. Éléments Régulateurs

IV.1.2.1. Promoteur

Un promoteur est une région de l'ADN située en amont du site de démarrage de la transcription d'un gène (TSS), dans la région 5' de celui-ci, et joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression génique. Les promoteurs actifs dans une cellule sont enrichis en marque histone spécifique H3K4Me3 (Black, Van Rechem and Whetstine, 2012). Le promoteur contient des sites de liaison pour l'ARN polymérase, recrutée dans une région d'environ 100 pb autour du TSS (core promoter), facilitée par divers facteurs de transcription, des protéines capables de se lier à l'ADN pour augmenter l'activité de transcription (Kadonaga, 2012; Andersson *et al.*,

2015). Les promoteurs varient en séquence et en structure, incluant souvent des éléments régulateurs spécifiques comme la boîte TATA, qui favorise la reconnaissance et l'attachement de l'ARN polymérase. Ils sont souvent enrichis en sites de fixation pour des facteurs de transcription (Carninci *et al.*, 2006), des séquences spécifiques reconnues par ces facteurs et décrites par des matrices de poids de position (PWM). Une PWM représente chaque position du motif en indiquant la probabilité d'occurrence de chaque nucléotide, facilitant l'identification des sites de liaison. Les promoteurs peuvent également être régulés par des éléments distaux, comme les enhancers et silencers.

IV.1.2.2. Enhancer

Un enhancer est un type d'élément régulateur distal qui augmente l'expression d'un gène cible. Ils peuvent se situer à proximité du promoteur ou jusqu'à 1 Mb de celui-ci, en amont ou en aval, et se trouvent également dans les régions introniques des gènes (Gillies *et al.*, 1983). Contrairement aux promoteurs, leur activité est indépendante de l'orientation (Banerji, Olson and Schaffner, 1983; Neuberger, 1983) et leur région est enrichie en marque histone H3K4Me1 (Black, Van Rechem and Whetstine, 2012). L'abondance des enhancers permet à plusieurs d'entre eux de réguler un même promoteur, ou qu'un enhancer en contrôle plusieurs (Mifsud *et al.*, 2015; Fukaya, Lim and Levine, 2016; Javierre *et al.*, 2016). Les enhancers contiennent de nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription qui favorisent la transcription en facilitant l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription sur le promoteur. Les enhancers jouent un rôle crucial dans la régulation des gènes en activant l'expression génique de manière spécifique aux tissus en opposition aux silencers qui sont connus pour réprimer l'activité du promoteur (Heintzman and Ren, 2009).

IV.1.2.3. Silencer

Un silencer est un élément régulateur distal, tout comme l'enhancer, mais qui diminue ou réprime l'expression d'un gène cible (Brand *et al.*, 1985). Ils contiennent des sites de liaison pour des facteurs de transcription répressifs qui inhibent l'initiation de la transcription. Ces facteurs peuvent se lier à des protéines qui bloquent l'accès à l'ADN ou empêchent l'assemblage du complexe transcriptionnel. Des études récentes ont rapporté l'enrichissement des motifs de liaison d'EZH2 et de REST dans les silencers identifiés (Huang *et al.*, 2019; Doni Jayavelu *et al.*, 2020). Comme mentionné précédemment, les silencers tendent également à co-localiser avec des modifications des histones répressives, telles que H3K27me3 et H3K9me3 (Cai *et al.*, 2021). Cependant, les silencers sont largement moins étudiés aujourd'hui et manquent encore de nombreuses données importantes pour leur caractérisation et leur détection, même si une étude récente a développé une stratégie pour identifier des silencers à l'échelle du génome (Hussain *et al.*, 2023). Les silencers et enhancers demeurent des éléments clés dans la régulation de la transcription, grâce à une interaction physique possible via des boucles formées par la chromatine et l'architecture tridimensionnelle du génome (Fig 35).

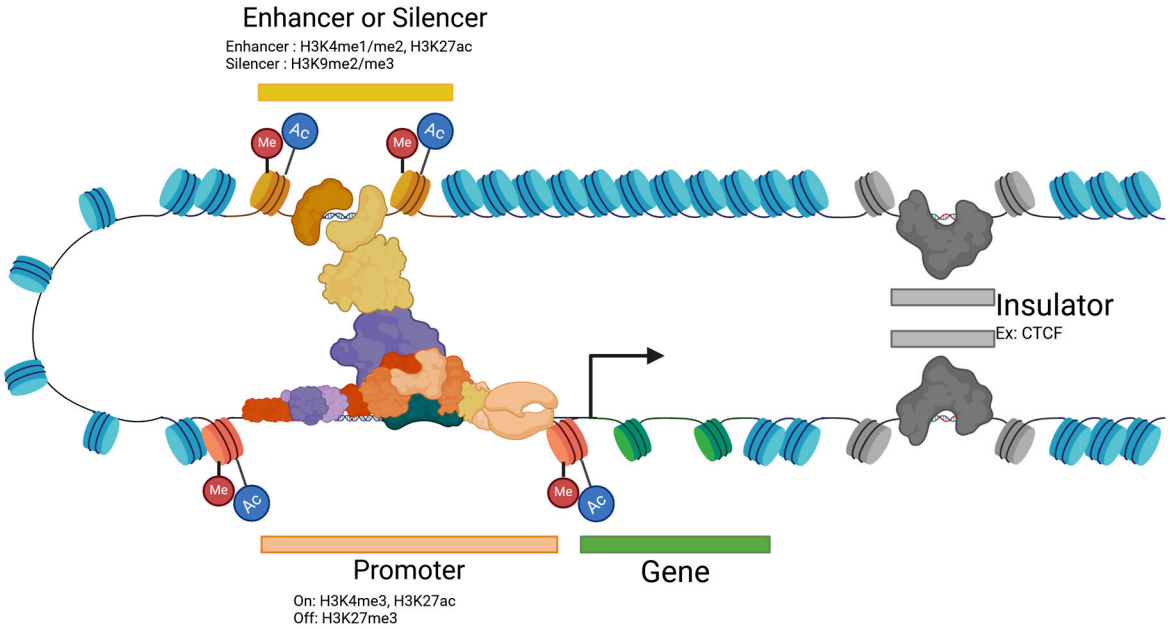


Figure 35 : Organisation spatiale des interactions entre promoteurs, enhancers et silencers régulée par les insulateurs

Schéma illustrant les interactions fonctionnelles entre promoteurs et enhancers ou silencers. Ces interactions sont médiées par des facteurs de transcription et des cofacteurs, qui se lient à des séquences régulatrices spécifiques et favorisent le rapprochement physique des régions d'ADN. Les enhancers stimulent l'expression génique, tandis que les silencers en inhibent l'activité. Ces interactions tridimensionnelles de la chromatine sont finement régulées par des insulateurs, qui agissent comme des barrières pour créer et organiser les contacts entre les éléments régulateurs et les promoteurs, assurant une régulation génique précise. Adapté de biorender.

IV.1.3. Interaction Promoteur-Enhancer-Silencer

Les promoteurs communiquent avec les éléments régulateurs distaux grâce à la formation de boucles de chromatine, où des protéines régulatrices comme CTCF et divers facteurs de transcription facilitent leur rapprochement (Rao *et al.*, 2014; Merkenschlager and Nora, 2016). Les éléments de type insulateur qui peuvent recruter les facteurs CTCF participent à la structure 3D de la chromatine, jouant ainsi un rôle essentiel dans la formation de boucles de chromatine et de domaines de topologie associés (TADs)(Dixon *et al.*, 2012; Nora *et al.*, 2012). Les TADs sont des régions du génome où les séquences d'ADN interagissent plus fréquemment entre elles qu'avec les régions adjacentes, permettant notamment l'interaction entre promoteurs et enhancers. Les TADs structurent la chromatine en domaines distincts d'interaction qui permettent de regrouper des éléments régulateurs (comme les enhancers et les promoteurs) et leurs gènes cibles, favorisant ainsi une régulation efficace de l'expression génétique. Les frontières des TADs sont souvent définies par des protéines comme le CTCF et la cohésine, qui aident à stabiliser les boucles de chromatine et empêchent les interactions non souhaitées avec d'autres TADs voisins (Rao *et al.*, 2014; Sanborn *et al.*, 2015). De nombreuses techniques ont émergé afin de détecter ces interactions de la chromatine, notamment entre promoteurs et éléments régulateurs distaux (Fig. 36).

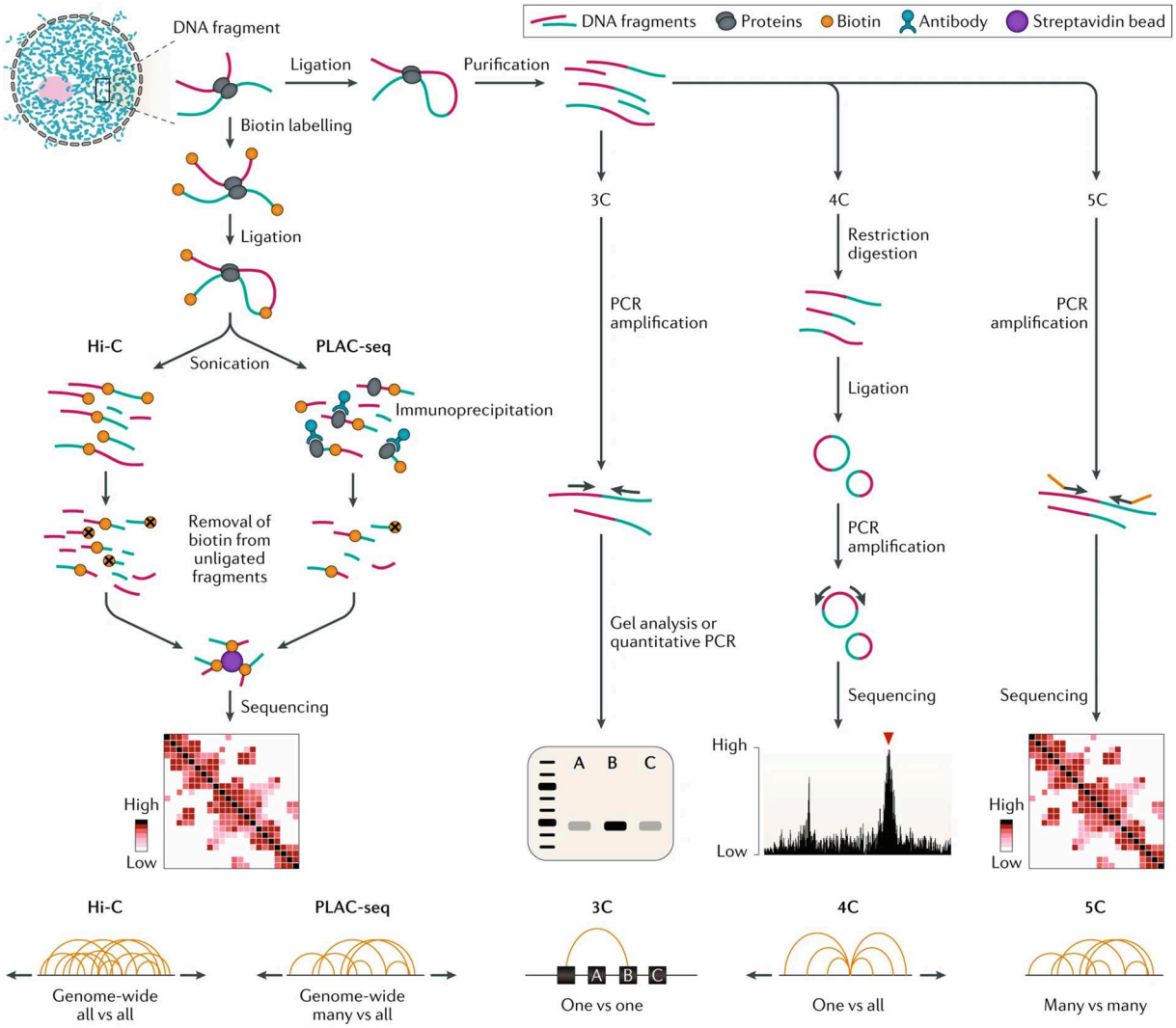


Figure 36 : *Exploration des interactions tridimensionnelles de la chromatine par les méthodes de 3C et ces dérivés* (Sanborn *et al.*, 2015)***.***

Les principales étapes des approches basées sur la capture de la conformation des chromosomes sont similaires, mais chaque méthode se distingue par son objectif et sa résolution. Dans la 3C (one vs one), la chromatine est fixée pour stabiliser les interactions, digérée avec une enzyme de restriction, puis les fragments proches sont ligaturés. Les interactions entre deux régions spécifiques sont quantifiées par PCR avec des amorces ciblant ces loci. La 4C (one vs all) utilise un point de vue unique pour identifier toutes les interactions génomiques associées. Après une seconde digestion enzymatique et une circularisation des fragments, les interactions sont amplifiées et séquencées. La 5C (many vs many) amplifie les fragments dans une région génomique continue, permettant d'analyser toutes les interactions entre fragments dans cette zone. Le Hi-C (all vs all) cartographie les interactions à l'échelle du génome entier. Les fragments d'ADN sont marqués à la biotine avant la ligation, puis séquencés après capture par des billes de streptavidine. Enfin, le PLAC-seq (many vs all) est une variante ciblée où les interactions médiées par une protéine d'intérêt sont isolées par immunoprécipitation avant séquençage. Les approches one vs one, one vs all, many vs many, et all vs all reflètent le type et l'échelle des interactions étudiées : de l'analyse ciblée entre deux loci à l'exploration globale des contacts chromosomiques dans le génome entier.

La méthode 3C (Chromosome Conformation Capture), introduite en 2002, repose sur la fixation de la chromatine, sa digestion enzymatique, et la ligature des fragments adjacents pour détecter les interactions entre deux sites spécifiques du génome (Dekker *et al.*, 2002). Elle a évolué en approches haut débit comme 4C (Circular Chromosome Conformation Capture), qui permet d'identifier tous les contacts d'un locus donné Marieke Simonis, et al. (2006) (Simonis *et al.*, 2006), et 5C (Carbon Copy Chromosome Conformation Capture), qui permet d'examiner des interactions multiples dans une région ciblée (Dostie *et al.*, 2006). Le Hi-C, qui associe 3C et séquençage à haut débit, a révolutionné le domaine en capturant de manière globale les interactions dans le génome entier, révélant des compartiments et domaines spécifiques tels que les TADs (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009). Le Hi-C a ensuite été dérivé en capture Hi-C qui permet de capturer et de cartographier les interactions à l'échelle du génome avec une précision accrue en ciblant des régions d'intérêt (Mifsud *et al.*, 2015), puis Promoter Capture Hi-C (PCHi-C) qui cible spécifiquement les régions promotrices de gènes (Schoenfelder *et al.*, 2015). D'autres techniques, comme ChIA-PET, combinent capture de conformation et immunoprécipitation pour des études focalisées sur des protéines d'intérêt, comme le facteur CTCF (Fullwood *et al.*, 2009; Handoko *et al.*, 2011). le ChIA-PET utilise la sonication des noyaux pour précipiter efficacement la chromatine, mais son impact sur la ligation de proximité reste incertain. En réponse aux limitations de cette méthode, Hi-ChIP et PLAC-seq ont été développés (Fang *et al.*, 2016; Mumbach *et al.*, 2016). Ces approches réalisent un Hi-C in situ et une ligation de proximité dans des noyaux intacts avant la sonication et l'immunoprécipitation, permettant d'enrichir les contacts chromatiniennes spécifiques à une protéine d'intérêt dans des conditions optimales.

La régulation de l'expression génique repose sur des interactions entre promoteurs et éléments régulateurs distaux (enhancers et silencers) via des boucles de chromatine organisées en domaines topologiques (TADs). Des protéines comme CTCF et la cohésine jouent un rôle clé dans la formation de ces boucles et la stabilisation des frontières des TADs, assurant ainsi une régulation précise et souvent spécifique aux tissus. Cependant, toute cette régulation peut être perturbée par la présence de SNPs, qui peuvent altérer les marques d'histones, la fixation des facteurs de transcription ou même modifier les interactions chromatine.

IV.2. Rôles des SNPs Dans La Régulation De L'Expression

Les SNPs sont des variations génétiques courantes dans le génome humain et d'autres espèces. Bien qu'ils aient été initialement considérés comme des mutations neutres, il est désormais bien établi que de nombreux SNPs jouent un rôle central dans la régulation de l'expression génique. Ces variations, souvent situées dans des régions non codantes du génome, peuvent influencer la manière dont les gènes sont activés ou réprimés, affectant ainsi des processus biologiques essentiels. Les SNPs peuvent moduler la liaison des facteurs de transcription, perturber l'épissage des ARN, modifier les marques épigénétiques ou encore altérer l'organisation 3D de la chromatine et cela de manière spécifique (Fig. 37). Dans cette section, nous explorerons en détail comment les SNPs régulent l'expression des gènes et leur impact potentiel sur la physiologie cellulaire et les maladies.

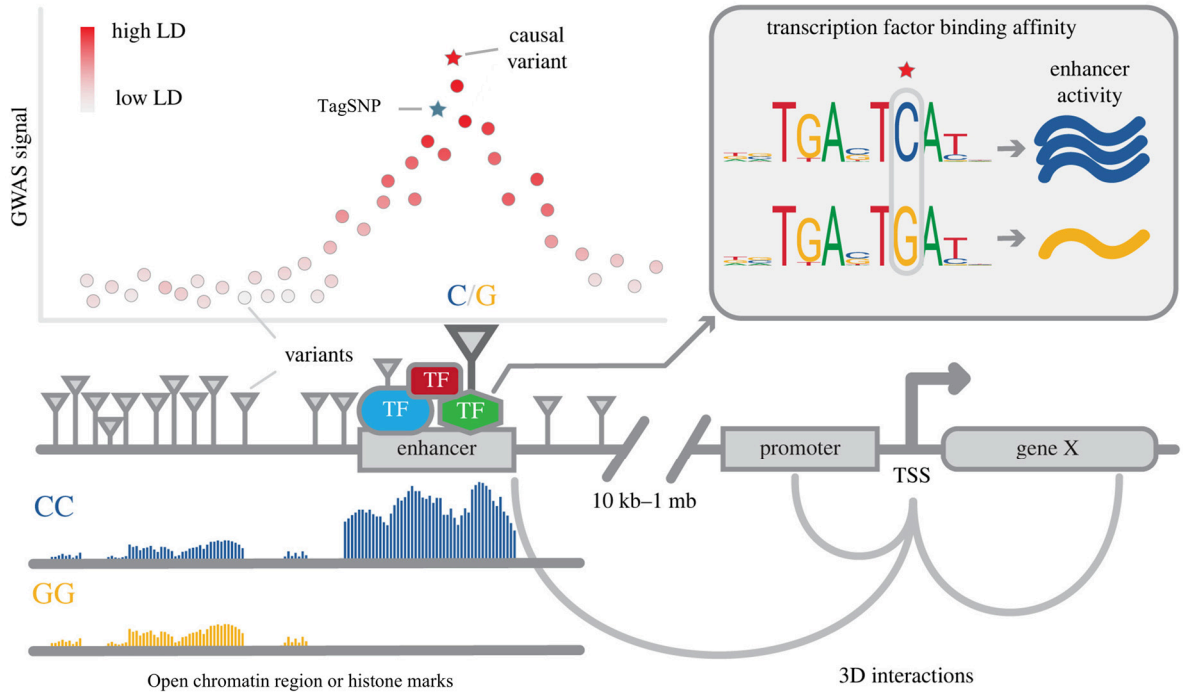


Figure 37 : Impact des SNPs sur la régulation de l'expression génique

Cette Illustration montre les mécanismes par lesquels un variant causal identifié par analyse post-GWAS peut influencer l'activité des enhancers (ou promoteur) et l'expression génique. La partie gauche montre les variants associés au trait, avec un déséquilibre de liaison représenté par un gradient de couleur (rouge : fort LD, blanc : faible LD) par rapport au variant causal marqué par une étoile rouge. Ce variant affecte un enhancer actif dépendant de l'allèle (C/G), situé dans une région de chromatine ouverte ou portant des marques d'histones. La partie centrale montre l'interaction entre des facteurs de transcription (TF) et l'enhancer, où le variant influence l'affinité de liaison du facteur de transcription et, par conséquent, l'activité de l'enhancer. On peut constater que le variant affecte le motif d'un facteur de transcription avec une préférence de liaison pour l'allèle C, entraînant une activité transcriptionnelle accrue. Les interactions 3D de la chromatine (arches grises) connectent l'enhancer au promoteur et au site de transcription (TSS) du gène X, modulant son expression en fonction du génotype (CC ou GG). adapter de (Broekema, Bakker and Jonkers, 2020).

Les SNPs situés dans les régions promotrices peuvent altérer la fixation des facteurs de transcription essentiels à l'initiation de la transcription. Par exemple, une mutation au niveau d'un site de liaison pour un facteur de transcription peut augmenter ou diminuer l'expression d'un gène cible comme nous avons pu le voir dans le cas des SNPs impliqué dans le paludisme grave modifiant la régulation d'ATP2B4 (Nisar *et al.*, 2022). Ces mécanismes influencent directement le niveau de transcription des gènes, avec des conséquences importantes pour la régulation cellulaire.

Les SNPs peuvent agir de la même manière dans les enhancers ou silencers, qui sont des éléments régulateurs distaux, peuvent modifier la capacité de ces régions à réguler leurs gènes cibles (Kilpinen *et al.*, 2013). Certains SNPs impactent les marques d'histones (comme H3K27ac ou H3K4me3) (Kilpinen *et al.*, 2013; McVicker *et al.*, 2013). Ces modifications épigénétiques influencent l'accessibilité et l'activité de la chromatine et, par conséquent, la régulation de l'expression des gènes.

L’une des manières de détecter ces SNPs régulateurs sont les analyses eQTLs. Certains SNPs peuvent être associés à une expression différentielle d'un gène ; on les appelle des loci de traits quantitatifs d'expression (eQTLs) (Consoli *et al.*, 2002). L'analyse standard des eQTL implique un test d'association direct entre les marqueurs de variation génétique et les niveaux d'expression des gènes, généralement mesurés chez des dizaines ou des centaines d'individus (Fig. 38).

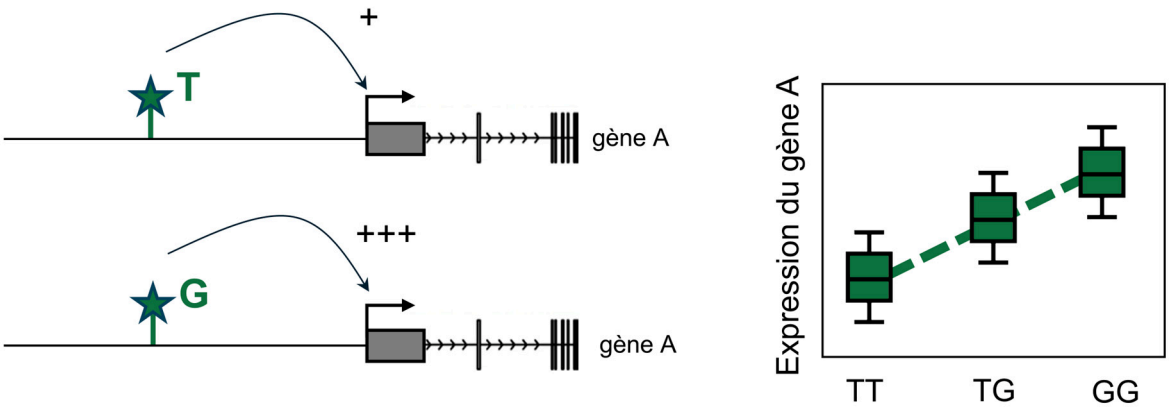


Figure 38 : Effet d'un variant associé à l'expression génique (eQTL)

Un eQTL (expression Quantitative Trait Locus) est une variante génétique influençant l'expression d'un gène spécifique. Dans cet exemple, le génotype GG est associé à une augmentation significative de l'expression génique par rapport aux génotypes TT et TG. Le génotype hétérozygote TG présente un niveau d'expression intermédiaire, reflétant un effet allélique partiel.

Des projets d'envergure ont vu le jour pour identifier les eQTL à travers différents tissus. Le projet GTEx vise à établir une base de données et une banque de tissus associée pour étudier la relation entre la variation génétique et l'expression génique (GTEx Consortium, 2013). Bien que les eQTL aient fourni des informations essentielles sur la régulation génétique, elles comportent plusieurs limitations. En premier lieu, la diversité des populations étudiées constitue une contrainte majeure, comme les analyses GWAS, les résultats d’eQTL peuvent varier de manière significative entre populations, ce qui impose la prudence lorsqu’on souhaite transposer les résultats d’une population à une autre. De plus, bien que les eQTL permettent de corréler un variant génétique avec l'expression d'un gène, elles ne permettent pas d’établir de lien causal direct entre ce variant et l’apparition d’un phénotype, ce qui nécessite des validations supplémentaires dans des modèles expérimentaux fonctionnels pour confirmer ces associations et en élucider les mécanismes sous-jacents.

Les SNPs jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes, en modulant divers mécanismes transcriptionnels et épigénétiques. Lorsqu’ils agissent en tant que variants régulateurs, ces SNPs peuvent influencer directement les processus cellulaires en perturbant l'expression de gènes impliqués dans des fonctions critiques.

Dans le contexte du paludisme, les SNPs régulateurs représentent une piste majeure pour décrypter les signaux d’association révélés par les études GWAS. En modulant l'activation ou la répression de gènes essentiels, ces variants jouent un rôle déterminant dans la réponse immunitaire et les interactions complexes entre l'hôte et le parasite.

Cependant, il est de plus en plus évident que les effets de ces SNPs régulateurs peuvent être restreints à des types cellulaires spécifiques. Par exemple, un SNP peut altérer l’expression

d’un gène dans les lymphocytes T sans impacter les macrophages ou d’autres cellules immunitaires, créant des réponses biologiques différenciées selon le contexte cellulaire. Ce phénomène souligne l'importance de prendre en compte la spécificité cellulaire dans l'étude des mécanismes régulateurs associés au paludisme (Fig. 39).

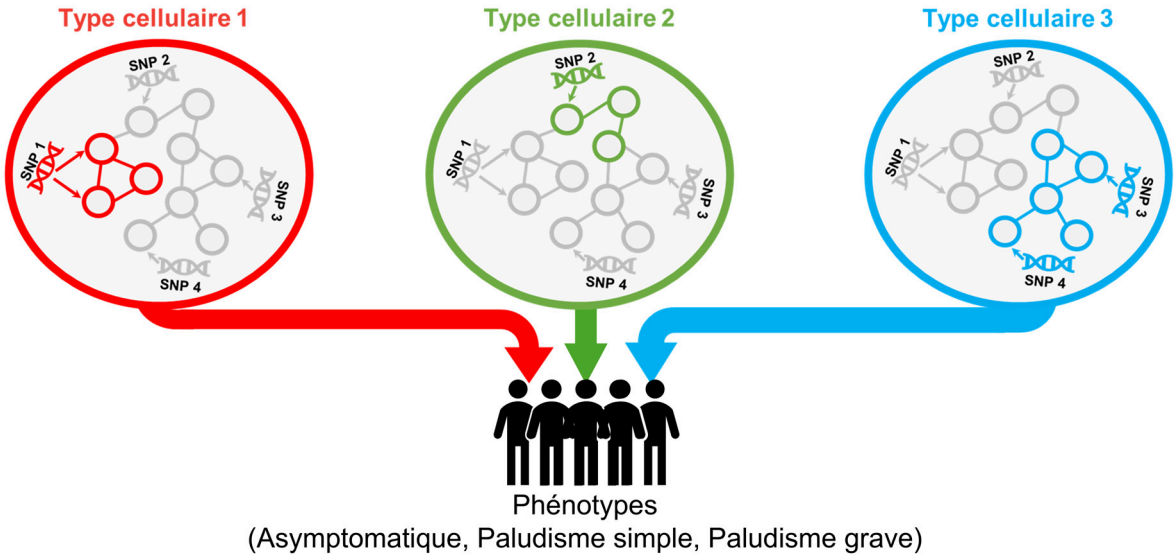


Figure 39 : Impact des variants non codants spécifiques aux types cellulaires sur l'expression génique et la susceptibilité au paludisme

Bien que les SNPs soient présents de manière identique dans toutes les cellules d’un même individu, leur influence sur les réseaux de régulation transcriptionnelle varie selon le type cellulaire. Cette spécificité peut résulter de différences dans l'accessibilité de la chromatine, la disponibilité des facteurs de transcription ou d'autres mécanismes épigénétiques propres à chaque type cellulaire. Ces variants peuvent ainsi jouer un rôle régulateur uniquement dans certains contextes cellulaires, contribuant à des phénotypes cliniques variés, tels que l’état asymptomatique, le paludisme simple ou le paludisme grave, en fonction de leur impact sur les mécanismes de régulation génique et l’environnement cellulaire. Adapté de (Broekema, Bakker and Jonkers, 2020)

Ainsi, les SNPs ne sont pas uniquement des marqueurs génétiques d’association, mais également des régulateurs moléculaires essentiels modulant l’expression génique. Leur impact, pouvant être spécifique à un type cellulaire, pourrait expliquer la diversité des manifestations cliniques du paludisme et les différences de prédisposition génétique à la maladie. Cette hypothèse souligne l’importance d’intégrer des analyses combinant profils génomiques et transcriptionnels afin d’identifier des variants régulateurs spécifiques de types cellulaires. Une telle approche pourrait permettre de décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents, offrant des perspectives innovantes pour comprendre la susceptibilité au paludisme et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées.

V. Hypothèse Et Objectifs Du Projet De Thèse

L'identification de variants régulateurs impliqués dans le paludisme devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de résistance et de susceptibilité. L'approche par gène candidat, exploitée dans un premier temps, a permis d'identifier des résultats robustes sur certains gènes et variants. Toutefois, nous restons convaincus que d'autres polymorphismes, encore inconnus, se situent non seulement à proximité des régions déjà associées au paludisme, mais aussi dans des régions encore inexplorées.

Des techniques ont ensuite émergé pour essayer d'identifier, à l'échelle du génome, des variants associés au paludisme, sans hypothèse a priori. Les études de liaison génétique pangénomique ont ainsi identifié des régions du génome liées génétiquement au paludisme, puis les associations pangénomiques GWAS ont permis de découvrir des loci supplémentaires. Les études GWAS présentent néanmoins des limites majeures dans l'identification des mécanismes sous-jacents aux traits complexes du paludisme. Bien qu'elles aient permis de localiser de nombreux loci associés au paludisme grave, les variants causaux précis, les gènes ciblés et les mécanismes d'action restent largement inconnus. Plus de 90 % des variants en déséquilibre de liaison avec les tagSNPs identifiés se trouvent dans des régions non codantes, souvent mal caractérisées, ce qui complique leur interprétation fonctionnelle. Ces défis soulignent l'incapacité des GWAS à expliquer pleinement les signaux d'associations et les mécanismes moléculaires responsables des différentes manifestations cliniques.

Pour relever ce défi, il est essentiel de comprendre comment les variants génétiques influencent les mécanismes moléculaires du paludisme. Ce projet ambitieux repose sur l'hypothèse que les variants régulateurs, modifiant l'expression des gènes, jouent un rôle déterminant dans la physiopathologie du paludisme. En combinant des approches bioinformatiques de pointe intégrant plusieurs données omics, avec des validations expérimentales précises, mon objectif était d'identifier, de manière inédite, des variants clés impliqués dans le paludisme afin de contribuer au décryptage des bases moléculaires de la prédisposition génétique aux diverses formes cliniques du paludisme. Les objectifs spécifiques étaient :

1. Identifier tous les SNPs candidats, comprenant les TagSNPs des GWAS, leurs SNPs en LD, ainsi que ceux des régions régulatrices influençant l'expression de gènes candidats.

2. d'évaluer, à l'aide de plusieurs approches bioinformatiques, le potentiel régulateur de ces SNPs ainsi que les gènes cibles associés aux régions régulatrices où ces SNPs sont localisés.

3. de valider leur effet sur l'expression des gènes et sur un phénotype à l'échelle cellulaire dans un modèle in vitro pertinent

4. d'évaluer l'association de ces SNPs fonctionnels avec le paludisme et rechercher des interactions épistatiques avec d'autres SNPs

Cependant, notre approche bioinformatique présente des limites, car elle ne prend généralement pas en compte le contexte cellulaire ni l'hétérogénéité des populations cellulaires. Les tissus étant constitués de divers types cellulaires avec des profils d'expression génique distincts, les effets spécifiques des variants peuvent être masqués dans les analyses globales. Nos résultats ont en effet montré que ces variants exercent très souvent un effet spécifique à certains types cellulaires, rendant leur détection difficile avec les approches bioinformatiques classiques.

Pour dépasser cette limite, nous avons commencé une approche innovante en exploitant le séquençage de l'ARN à l'échelle des cellules uniques (scRNA-seq), une technologie de pointe encore inexplorée dans ce contexte. Contrairement aux méthodes traditionnelles, le scRNA-seq permet de révéler l'expression génique à une résolution cellulaire, en prenant en compte l'hétérogénéité des populations cellulaires. Cette stratégie ouvre une nouvelle voie pour déchiffrer les mécanismes moléculaires spécifiques à certains types cellulaires avec pour objectif spécifique dans le cadre de ma thèse :

5. de mettre en place les méthodes visant à identifier, pour la première fois, les gènes différentiellement exprimés au sein de types cellulaires particuliers, en lien avec les formes cliniques au cours du temps

Résultats

I. Identification Et Analyse Fonctionnelle Des SNPs Associes Au Paludisme Grave A Partir Des Données De GWAS

Article 1: From Genome-wide Association Studies to Functional Variants: ARL14 Cis-regulatory Variants Are Associated With Severe Malaria

Mathieu Adjemout, Frederic Gallardo, Magali Torres, Alassane Thiam,Babacar Mbengue, Alioune Dieye, Sandrine Marquet*, Pascal Rihet*

*S. M. et P. R. ont contribué à parts égales à ce travail

The Journal of Infectious Diseases, Volume 230, Issue 3, 15 Septembre 2024, Pages e743–e752, https://doi.org/10.1093/infdis/jiae159

Publié le : 26 mars 2024

De nombreuses études GWAS ont permis d'identifier des loci spécifiques associés au paludisme grave répartis sur différents chromosomes. Aujourd'hui, le défi majeur consiste à identifier les variants causaux expliquant l'association des tagSNP associée au paludisme. Un très petit nombre de variants fonctionnels potentiellement causaux ont été identifiés comme nous avons pu voir durant l'introduction. La majorité des tagSNP associés au paludisme et en déséquilibre de liaison se trouvent dans des régions non codantes. Nous avons émis l'hypothèse que les variants causaux pourraient être des variants régulateurs.

Ce travail vise à découvrir de nouveaux variants régulateurs impliqués dans les signaux d'association génétique identifiés par les GWAS du paludisme grave. En combinant des approches bioinformatiques avancées et des validations expérimentales, j'ai adopté une méthodologie intégrée pour révéler les mécanismes sous-jacents. Tout d'abord, j'ai identifié les SNPs en déséquilibre de liaison avec les tagSNP associés, avant de prioriser ces variants *in silico* en exploitant du multiple donnée omics afin de cibler les candidats les plus prometteurs. Ces SNPs ont ensuite été analysés pour évaluer leur potentiel en tant que variants régulateurs, grâce à des tests expérimentaux mesurant leur impact sur l'activité régulatrice et leur spécificité cellulaire via l'interaction avec des facteurs de transcription. Enfin, j'ai validé leur association avec le paludisme grave dans une population sénégalaise permettant pour la première fois d'identifier des SNPs causaux pouvant expliquer le signal de l'association dans la région d'*ARL14.*

Contribution : Dans cet article, ma contribution a été de réaliser les analyses bioinformatiques et le génotypage des deux SNPs (rs116525449 et rs79644959). J'ai également réalisé les expériences de gènes rapporteurs et de quantification des facteurs de transcription par qPCR. Enfin, j'ai produit les figures et participé à la rédaction et aux révisions de l'article.

The Journal of Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE

From Genome-wide Association Studies to Functional Variants: *ARL14* Cis-regulatory Variants Are Associated With Severe Malaria

Mathieu Adjemout,[1] Frederic Gallardo,[1] Magali Torres,[1] Alassane Thiam,[2] Babacar Mbengue,[3] Alioune Dieye,[3] Sandrine Marquet,[1,a] and Pascal Rihet[1,a]

[1]Aix-Marseille Univ, Inserm, TAGC Theories and Approaches of Genomic Complexity, MarMaRa Institute, Marseille, France; [2]Pole d'Immunophysiopathologie & Maladies Infectieuses, Institut Pasteur de Dakar; and [3]Service d'Immunologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Senegal

Background. Genome-wide association studies have identified several nonfunctional tag single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with severe malaria. We hypothesized that causal SNPs could play a significant role in severe malaria by altering promoter or enhancer activity. Here, we sought to identify such regulatory SNPs.

Methods. SNPs in linkage disequilibrium with tagSNPs associated with severe malaria were identified and were further annotated using FUMA. Then, SNPs were prioritized using the integrative weighted scoring method to identify regulatory ones. Gene reporter assays were performed to assess the regulatory effect of a region containing candidates. The association between SNPs and severe malaria was assessed using logistic regression models in a Senegalese cohort.

Results. Among 418 SNPs, the best candidates were rs116525449 and rs79644959, which were in full disequilibrium between them, and located within the *ARL14* promoter. Our gene reporter assay results revealed that the region containing the SNPs exhibited cell-specific promoter or enhancer activity, while the SNPs influenced promoter activity. We detected an association between severe malaria and those 2 SNPs using the overdominance model and we replicated the association of severe malaria with the tagSNP rs116423146.

Conclusions. We suggest that these SNPs regulate *ARL14* expression in immune cells and the presentation of antigens to T lymphocytes, thus influencing severe malaria development.

Keywords. severe malaria; GWAS; *ARL14*; enhancer; promoter.

Plasmodium falciparum malaria remains a major health problem in tropical and subtropical countries, causing 619 000 deaths in 2021, mostly in Africa [1]. Subjects infected by *P falciparum* can develop asymptomatic infections, mild malaria, and severe forms of the disease, such as cerebral malaria (CM) or severe anemia. Evidence for host genetic factors controlling the different malaria phenotypes has been reported [2–4]. Furthermore, genome scans have mapped several genes in the control of blood infection levels [5, 6], mild malaria [5, 7], and severe malaria (SM) [8–13]. In particular, the genome-wide association study (GWAS) based on the largest dataset identified different SM loci on chromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 11, and 12 [13]. Nowadays, the challenge is to identify the causal variants that explain the association of the tag single-nucleotide polymorphisms (SNPs) with SM. A very small number of potentially causal functional variants have been identified. Hemoglobin S in *HBB* (HbS) is the best-known causal variant. This missense mutation located within chromosome 11 has been shown to be associated with protection against SM [8, 14], to influence parasite growth in vitro in hypoxic conditions [15], and to be associated with low parasitemia in vivo [16]. Besides, the structural variant *DUP4*, which is in linkage disequilibrium (LD) with a tagSNP located within chromosome 4 and associated with SM, was shown to prevent parasite growth in vivo [17]. In addition to these variants affecting the protein sequence, it is thought that regulatory variants explain associations with SM detected by GWAS. More generally, since most of the SNPs associated with a disease are within noncoding regions, it has been proposed that the causal SNPs are mostly SNPs regulating gene expression [18, 19]. In this way, several regulatory variants in LD with the tagSNP located within *ATP2B4* have been proposed as causative variants [20, 21]. Furthermore, several authors have provided evidence of their effect on both the intracellular calcium concentration [20, 21] and the in vitro growth of the parasite [22, 23].

The purpose of this work was to identify new regulatory variants underlying genetic association signals detected by GWAS

Received 28 December 2023; editorial decision 24 March 2024; accepted 25 March 2024; published online 26 March 2024

Presented in part: European Molecular Biology Organization workshop, Marseille, October 2023.

[a]S. M. and P. R. contributed equally to this work.

Correspondence: Pascal Rihet, PhD, TAGC U1090, 163 avenue de luminy, Marseille cedex 09 13288, France (pascal.rihet@univ-amu.fr); Sandrine Marquet, PhD, TAGC U1090, 163 avenue de luminy, Marseille cedex 09 13288, France (sandrine.marquet@univ-amu.fr).

The Journal of Infectious Diseases® 2024;230:e743–52

© The Author(s) 2024. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

https://doi.org/10.1093/infdis/jiae159

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/230/3/e743/7635474 by inserm 540 user on 23 January 2025

of SM. To this aim, we first searched for the SNPs in LD with the tagSNPs and prioritized them. Second, we investigated whether the best candidates are regulatory variants. Third, we assessed their association with SM in a Senegalese population.

MATERIALS AND METHODS

Bioinformatic Prioritization and Functional Annotation of Genetic Variants

Supplementary Table 1 shows the SNPs whose association with SM has been detected by GWAS [8–13]. Among these, rs334 or HbS that is a causative variant located on chromosome 1 was excluded. SNPs in LD with the 36 associated tagSNPs (Supplementary Table 1) were searched using the FUMA SNP2GENE tool [24]. This tool provided a list of 418 SNPs along with their expression quantitative trait loci (eQTL) annotation and CADD (combined annotation dependent depletion) score, which aims to predict the pathogenicity of genetic variants. SNPs in LD with these tagSNPs, in the African population, were selected with a threshold of r^2 >0.6. They were further prioritized using the integrative weighted (IW) scoring annotation tool [25] and annotated using both ChIP-seq ReMap catalogue and ENCODE database [26, 27]. This helped us identify SNPs located within sequence-binding transcription factors (TFs) or within potential regulatory elements. For the 2 selected SNPs, the impact of the SNPs on TF binding sites (TFBSs) was evaluated with RSAT tool [28], using multiple databases of TFBS (Jaspar, Hocomoco, ENCODE, Homer). To identify the TFs potentially involved in the enhancer activity of *ARL14* promoter, motifs predicted by JASPAR2022 [29] were retrieved using the University of California, Santa Cruz (UCSC) genome browser [30]. Only predicted TFBSs with a score >400 were selected.

Study Subjects, Blood Samples, and Phenotypes

The study population has been previously described [21, 31]. In brief, it comprised 117 patients with SM and 79 control individuals. Ninety patients with CM and 27 with severe noncerebral malaria (NCM) were enrolled from the principal hospital of Dakar and the regional hospital of Tambacounda. The control samples were taken from healthy individuals living in Dakar. They did not have any malaria infection (as determined by microscopy) or any other febrile illness, selected at the same period of enrollment. The allele and genotype frequencies within the control population reflected those within the general population. Informed consent was obtained from each participant and/or their relatives prior to inclusion, after giving them written or verbal information in their native language. The study received approval from the institutional research ethics committee of Université Cheikh Anta Diop.

SM cases were defined according to the World Health Organization criteria [32]. CM cases were defined based on a deep coma (Glasgow coma score <9), and NCM cases had severe anemia, hypoglycemia, respiratory distress, or hypoxia.

DNA Extraction, DNA Amplification, and Genotyping

Genomic DNA was extracted and further amplified as described previously [31]. The tagSNP rs116423146 and 2 additional SNPs, namely rs116525449 and rs79644959, were genotyped using the TaqMan allelic discrimination technique (C_150809577_10, C__27835914_10, C__27837814_10; Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts). In all, 192 of the 196 individuals were successfully genotyped for the 3 SNPs. The reaction mixture consisted of 1 µL of genomic DNA at 12.5 ng/µL, 2.1 µL of 2× master mix (TaqMan Genotyping Master Mix, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts), and 0.06 µL for the TaqMan 40× assays in a final volume of 5 µL.

Luciferase Gene Reporter Assay

Promoter Activity

The 460 bp promoter region located upstream of the *ARL14* gene (GRCh38, chr3: 160676881-160677341 containing the SNPs rs79644959, rs116525449) was cloned into the pLG.4.12-basic plasmid (catalog # E6671, Promega, Madison, Wisconsin) at the HindIII and BglII restriction sites (GeneCust, Boynes, France). We obtained 2 different pGL4.12 constructs containing the minor or major alleles of both SNPs. The reporter gene experiment was performed in K562 (CCL-243, ATCC) and GM12878 (Coriell Institute) cell lines. K562 cells were grown in RPMI 1640 (Thermo Fisher) with glutaMax (61870-044, Gibco) and 10% decomplemented fetal bovine serum (FBS). The GM12878 cells were cultured in RPMI 1640 with glutaMax (61870-044, Gibco) and 15% nondecomplemented FBS. Transfection of cells was performed using the Neon transfection system (Invitrogen, Thermo Fisher) according to the manufacturer's instructions. For each assay, 10^6 cells were co-transfected with 200 ng of control vector pRL-SV40 (catalog # E2231, Promega) and 1 µg of vector tested. Empty pGL4.12-basic vector was used as a control. After transfection, cells were maintained at 37°C in 5% carbon dioxide for 24 hours. Luc2CP and Renilla luciferase values were obtained by analyzing 20 µL of cell lysate.

Enhancer Activity

The 460 bp *ARL14* promoter region used previously was cloned into pGL3-SV40 vector (catalog # E1761, Promega) between BamH1 sites. pGL3-SV40 vector was used as a control. Luciferase assays were performed in K562 and GM12878 cells as described above.

Reverse-Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction

The RNA extraction from both K562 cells and GM12878 cells was conducted using the RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Following this, 1 µg of RNA per sample was converted into cDNA using the Superscript VILO Master Mix (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was carried out using the SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Primers were designed

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/230/3/e743/7635474 by inserm 540 user on 23 January 2025

employing the Primer 3 software. Subsequently, gene expression was normalized against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, and the relative expression was computed using the ΔCt method. The data provided is an average from triplicates across 3 independent experiments per sample and is expressed as fold change relative to K562 cells.

Statistical Analysis

The Haploview tool [33] was used to determine the deviation in genotype frequency from Hardy-Weinberg equilibrium for the control group. Genetic association analyses were performed using IBM SPSS Statistics 27 (IBM, Armonk, New York). We performed logistic regression analyses that allowed us to include age, sex, and HbS in the model. For luciferase reporter assay and RT-qPCR results, statistical analyses were performed using the Wilcoxon test. All the tests used were 2-sided. P values <.05 were considered statistically significant. Plot generation was performed using ggplot2.

RESULTS

Prioritization of Candidate SNPs Identified 2 SNPs Close to *ARL14*

We sought to identify functional regulatory SNPs underlying the genetic association signals detected by GWAS. Among the various GWAS, a total of 36 tagSNPs associated with SM were found to be distributed across 29 loci (Supplementary Table 1). Then, we identified the SNPs in LD with the malaria-associated tagSNPs in African population, using an r^2 threshold of 0.6. Finally, we prioritized 418 SNPs using the IW scoring method. Findings are summed up in Figure 1, and the ranking of all SNPs is shown in Supplementary Table 2. Table 1 presents the SNPs with the 10 highest IW scores. They were clustered into 3 loci: *ARL14*, *ATP2B4*, and *KLHL3*. The SNP having the best score is located on chromosome 3 near *ARL14* (Figure 1). Interestingly, rs116525449 is located at 31 bp of rs79644959, which was ranked 6th based on IW score. Furthermore, these 2 SNPs are in full LD in African populations based on 1000 genome data. Both SNPs are located within promoter activity region based on an ENCODE annotation (EH38E2253584). The other SNPs were also within regulatory regions, as shown in Table 1. Eight of the top 10 SNPs were eQTLs for *ATP2B4*, *LAX1*, or *KLHL3*, while rs116525449 and rs79644959 were not annotated as eQTLs. Furthermore, we investigated the ability of the sequences containing the SNPs to bind TFs using the ReMap tool, which is a ChIP-seq peak catalogue. The best SNPs shown in Table 1 were all located in peaks of ChIP-seq. These include rs116525449 and rs79644959, for which 86 and 103 peaks of ChIP-seq were registered in the ReMap catalogue, respectively. Interestingly, the SNP with the highest IW score is close to *ARL14*, which has been poorly studied in malaria. Also, we further focused on rs116525449 and rs79644959 located close to *ARL14*. We hypothesized that they regulate *ARL14* expression, leading to malaria resistance or susceptibility.

The Sequence Containing rs116525449 and rs79644959 Has a Regulatory Activity in GM12878 and K562 Cell Lines

We investigated the potential regulatory effect of rs116525449 and rs79644959 using luciferase reporter assays in GM12878 and K562 cell lines, which are lymphoblastoid and erythromyeloid cells, respectively. Since those SNPs are in complete LD, we studied the effect of sequences containing rs79644959-G and rs116525449-C on the one hand and rs79644959-A and rs116525449-G on the other hand, which are the major and minor haplotypes, respectively. First, we cloned the sequences upstream of the luciferase reporter gene to evaluate their promoter activity (Figure 2*A*). Both sequences showed higher luciferase activity than the negative control in GM12878 and K562 cells ($P < .0001$). A 5-fold increase of luciferase activity was observed for both major and minor haplotypes in GM12878 cells and for the major haplotype in K562 cells compared to the activity of the basic vector. Moreover, in K562 cells, the promoter activity was nearly 3-fold higher with the sequence containing the minor haplotype compared with the major haplotype. These results indicate an allele-independent promoter activity in GM12878 cells, while the promoter activity depends on SNP alleles in K562 cells.

We hypothesized that our sequences act as enhancers on distal genes. The results of FUMA showed evidence of interaction between the region containing SNPs and *NMD3* and *PP1ML* promoters in GM12878. Hence, we cloned our sequences downstream of the luciferase reporter gene. Strikingly, our sequences showed an enhancer activity in GM12878 cells ($P < .0001$), but not in K562 cells (Figure 2*B*). The luciferase activity was 3-fold higher in the presence of our sequences in GM12878 cells. However, the enhancer activities of the 2 sequences corresponding to the 2 haplotypes did not differ.

To decipher the molecular mechanisms underlying cell and allele-specific promoter activity, we then investigated whether the 2 SNPs could disrupt TFBS binding to DNA. First, we identified the TFs, for which there is experimental evidence of their binding to the region containing the SNPs based on the ReMap catalogue (Supplementary Table 3). Second, we used RSAT tools to identify TFs, the binding sites of which may be altered by the 2 SNPs (Supplementary Table 4). As shown in Figure 3, the results indicate that rs79644959 influences the binding of GABPA, ERG, and E2F1, while rs116525449 may alter the binding of PRDM1. Besides, based on data of RNA-seq ENCODE cell lines [34], *GABPA*, *E2F1*, and *PRDM1* were shown to be expressed in both K562 and GM12878, while *ERG* was undetected in both cell lines. We further measured *ERG*, *GABPA*, *E2F1*, and *PRDM1* expression levels in GM12878 and in K562 cells using the RT-qPCR method. There was no ERG expression in GM12878 or K562. In addition, we found that *E2F1* and *GABPA* levels were 2-fold and 1.3-fold higher in K562 cells than in GM12878, respectively,

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/230/3/e743/7635474 by inserm 540 user on 23 January 2025

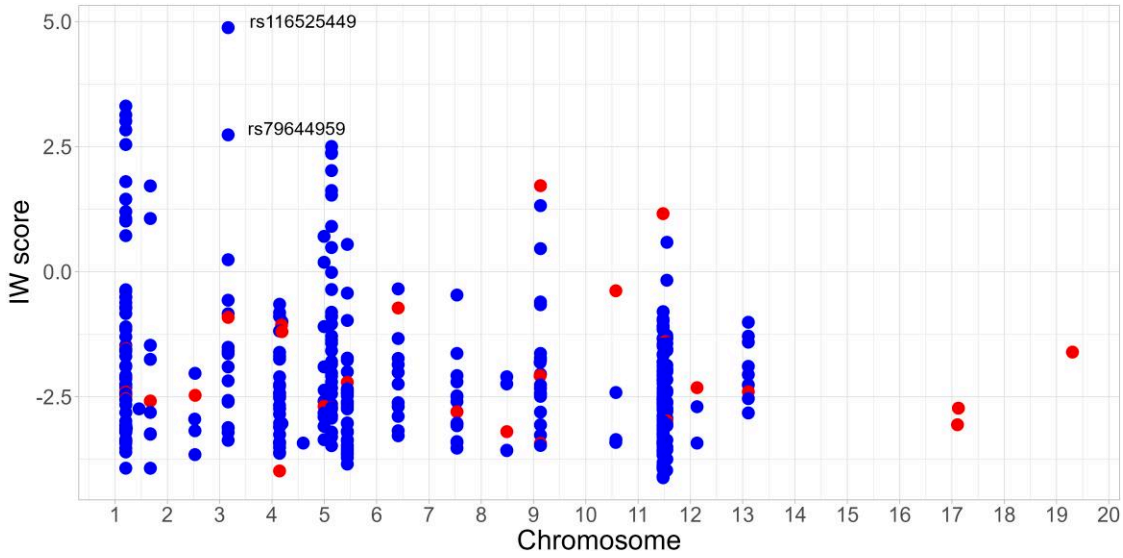


Figure 1. Manhattan plot showing candidate single-nucleotide polymorphism (SNP) integrative weighted (IW) scores. The IW scoring method was used to prioritize functionally relevant noncoding variants. The graph displays the IW scores of 418 candidate SNPs depending on their position. The 36 tagSNPs, mostly low-ranked, are shown in red dot. The SNPs in linkage disequilibrium with the tagSNPs are shown in blue dot. The best candidate was rs116525449.

while we found no difference between *PDRM1* expression level in K562 and GM12878 cells (Figure 4*A*). We propose that the combination of high of *E2F1* and *GABPA* expression levels, along with their preferential binding to the minor allele of rs116525449, results in a higher promoter activity of the minor allele sequence compared to the major allele sequence in K562 (Figure 4*C*). Furthermore, the PRDM1 binding to the rs116525449 major allele may compensate for the low *E2F1* and *GABPA* expression in GM12878, possibly explaining the lack of SNPs impact on promoter activity in GM12878.

We then investigated whether the binding of certain TFs to our sequences could explain the allele-independent but cell-specific enhancer activity. Sequence analysis using JASPAR allowed us to predict TFBS (Supplementary Table 5), including *STAT1*, *STAT2*, and *NR3C1* binding sites. Interestingly, their expression levels were found to be the highest in GM12878 cells of all predicted TFs based on data of RNA-seq ENCODE cell lines [34]. Using RT-qPCR, we found that *NR3C1* and *STAT2* levels were 6.1-fold and 3.6-fold higher in GM12878 than in K562, respectively (Figure 4*B*). *STAT1* levels were, nevertheless, 1.5-fold lower in GM12878 than in K562. Interestingly, TFBS do not align to the SNPs, indicating that *STAT1*, *STAT2*, and *NR3C1* bind to sequences near the SNPs (Figure 4*D*). These results indicate an allele-independent enhancer activity and an increased enhancer activity in GM12878 compared to K562.

rs116525449 and rs79644959 Variants and Their GWAS tagSNP Are Associated With SM in Senegal

We further investigated the association of *ARL14* SNPs with SM. To this aim, we selected rs116423146, which was previously identified by a GWAS [13], and rs116525449 and rs79644959 for genotyping in a Senegalese population. There was no deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 1$), and there was no difference between the frequency of genotypes in the control group and that of the general population living in The Gambia, based on the Gambian Genome Variation Project ($P > .39$). Furthermore, we evidenced full LD between rs116525449 and rs79644959 as predicted by the 1000 Genome data. However, the LD coefficient between rs11623146 and the 2 SNPs was lower in our Senegalese cohort ($r^2 = 0.47$) than that in the whole 1000 Genome African population ($r^2 = 0.65$) and that in the Niger population ($r^2 = 0.83$). It was, however, higher than that of the Gambian population ($r^2 = 0.33$). Nonetheless, we replicated the association of the tagSNP rs11623146 with SM.

The *P* value was significant ($P = .030$) using the overdominance model (Table 2), which is the most appropriate inheritance model, as stated in the previous study [13]. Despite the low LD between the tagSNP rs11623146 and regulatory SNPs rs116525449 and rs79644959, we also found a significant association ($P = .017$). All *P* values remained significant ($P < .05$) when including age, which was the only covariate with a significant effect (Table 2). It is interesting to note that the *P* value was improved for both rs116525449 and rs79644959 compared to the tagSNP. We further included age, the tagSNP, and either rs116525449 or rs79644959 in the regression logistic model to determine whether the association of the tagSNP rs116423146 could be explained by the effect of the other SNPs. After adding either rs116525449 or rs79644959 to the statistical model, the association of rs11623146 with SM was no longer significant. Conversely, both rs116525449 and rs79644959 remained

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/230/3/e743/7635474 by inserm 540 user on 23 January 2025

Table 1. Numbers of Transcription Factor ChIP-seq Peaks, Expression Quantitative Trait Loci Hit, and ENCODE Candidate Cis-regulatory Elements for the Best Single-Nucleotide Polymorphism Prioritized by Integrative Weighted Scoring Method

Chr	SNP rsID	Rank IW Scoring	Binding Transcription Factor	eQTL Hits	Regulatory Element
3	rs116525449	1	86	…	Promoter-like (ARL14)
1	rs11240734	2	76	ATP2B4 (+1)	Promoter-like (ATP2B4)
1	rs1541252	3	168	ATP2B4 (+1)	Promoter-like (ATP2B4)
1	rs10751450	4	79	ATP2B4 (+1)	Proximal enhancer-like
1	rs2228445	5	23	ATP2B4 (+1)	Distal enhancer-like
3	rs79644959	6	103	…	Promoter-like (ARL14)
1	rs1541254	7	214	LAX1	Promoter-like (ATP2B4)
5	rs73298155	8	277	KLHL3 (+7)	Proximal enhancer-like
5	rs11386045	9	4	KLHL3 (+7)	Distal enhancer-like
5	rs2905584	10	20	KLHL3 (+8)	…

Abbreviations: Chr, chromosome; eQTL, expression quantitative trait loci; IW, integrative weighted; SNP, single-nucleotide polymorphism.

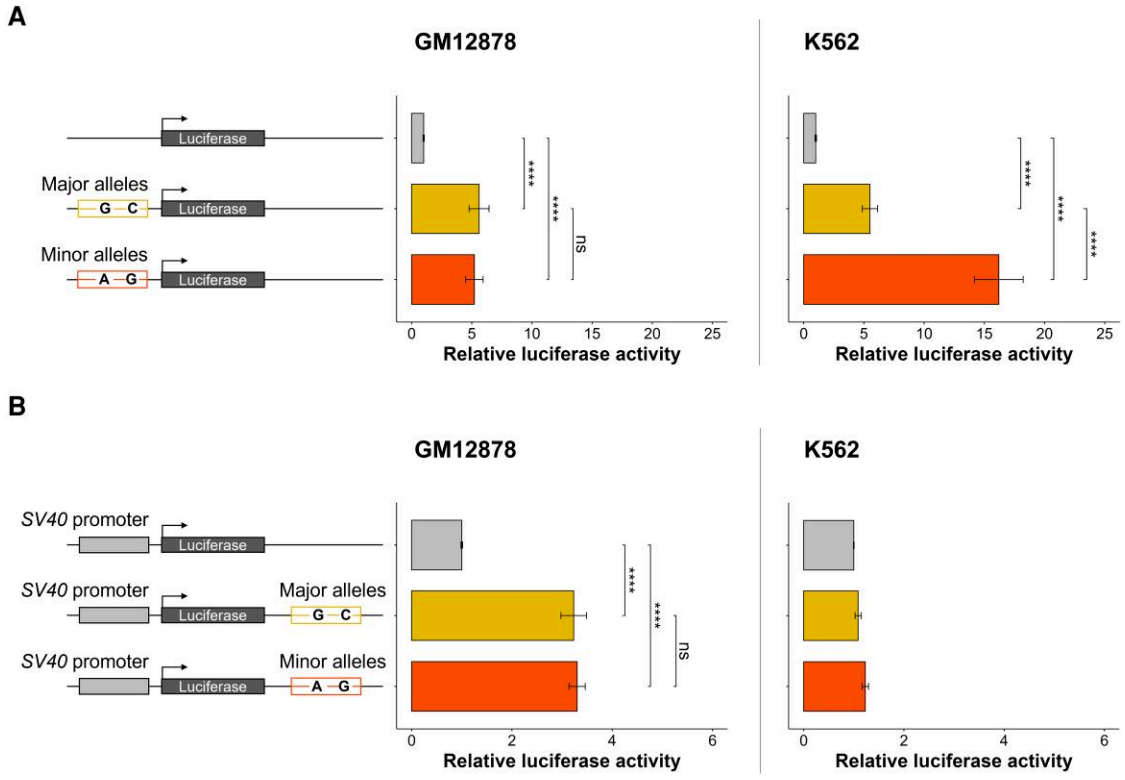


Figure 2. Luciferase gene reporter assays assessing the regulatory activity of *ARL14* variants in GM12878 cells and K562 cells. *A*, Promoter activity of the *ARL14* region containing major or minor alleles of the rs79644959 and rs116525449. Basic vector was used as reference. *B*, Enhancer activity of the *ARL14* region containing major or minor alleles of rs79644959 and rs116525449. SV40 promoter was used as reference. Data presented as the mean ± standard error of the mean of 9 replicates. ****$P < .0001$; ns, nonsignificant.

associated with SM. Our results suggest that SNPs rs116525449 and rs79644959 could be the causal SNPs.

DISCUSSION

In this study, we prioritized 418 candidate SNPs, the top 10 of which were in or near *ARL14*, *ATP2B4*, or *KLHL3*. The best new promising candidate, namely rs116525449, is close to *ARL14* and is in full LD with rs79644959, which was ranked sixth based on the IW score. We further obtained evidence of the functional effect of *ARL14* SNPs and their association with SM.

Our results concerning *ATP2B4* SNPs are reminiscent of those we recently published. We prioritized the SNPs in LD with tagSNPs, whose association had been replicated for SM

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/230/3/e743/7635474 by inserm 540 user on 23 January 2025

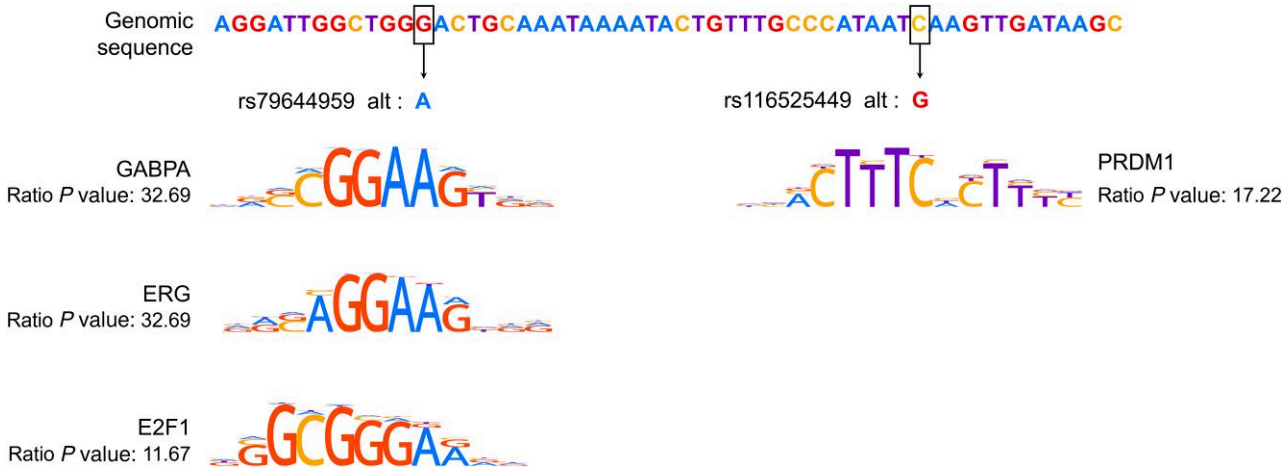


Figure 3. Predicted disrupted transcription factor binding sites by *ARL14* variants using RSAT. Genomic region containing rs79644959 and rs116525449 (hg38-chr3:160677111-160677166) is shown. *P* value ratio was calculated by dividing the best probability of transcription factor binding by the worst probability. GABPA, ERG, and E2F1 had a higher binding probability on rs79644959 minor allele compared to the major allele. PRDM1 had a higher binding probability on rs116525449 major allele compared to minor allele.

[21]. The best candidate SNPs were located within *ATP2B4* that encodes for PMCA4, the main calcium pump in red blood cells. Among these SNPs, we reported rs11240734, rs1541252, rs107511450, and 1541254, which were ranked in the top 10 SNPs in the present study. Our prioritization analysis also revealed SNPs located near or in *KLHL3* or *ARL14*, which have been reported to be associated with SM, and the association of which has not been replicated to our knowledge [12, 13].

Here we confirmed for the first time the association between SM and rs116423146, which is close to *ARL14*, using the overdominance model. This result is consistent with the association of SM with rs75731597, which is in LD with rs116423146 [35]. Interestingly, the overdominance model has appeared to be the best genetic model for detecting the association of SM with rs116423146 and rs75731597 [13, 35]. More generally, it has been recently proposed that heterozygote advantage may be detected for other loci, and that overdominance should be considered in GWAS [36]. Since rs116423146 is unlikely functional based on our prioritization and annotation studies, we further investigated the role of the best candidates close to *ARL14*. Here we provide evidence of an association of SM with rs116525449 and rs79644959, which were in LD with rs116423146 in our study population. Interestingly, the LD coefficient varies greatly between African populations, and the LD coefficient in our study population appeared to be intermediate compared with other African populations—it ranges from 0.33 in The Gambia to 0.83 in Nigeria. Strikingly, rs116525449 and rs79644959 seemed to be better associated with SM compared to rs116423146. In the same way, the results based on a conditional logistic regression approach showed that the association between SM and the tagSNP rs116423146 was explained by rs116525449 or rs79644959, suggesting their causal roles.

Furthermore, we provide experimental evidence that rs116525449 and rs79644959 are regulatory SNPs. These variants modify *ARL14* promoter activity in K562 cells, an erythromyeloid cell line, although those SNPs are not annotated as eQTLs current databases. This is probably due to the absence of rs116525449 and rs79644959 in European populations, which have been in the majority in eQTL studies.

However, we did not detect any effect of the 2 SNPs on gene expression in GM12878 cells, which are immortalized B cells. This suggests a cell-specific regulatory role of rs116525449 and rs79644959. Analyzing TFBS and assessing predicted TF expression levels allowed us to propose a biological model at the molecular level (Figures 4*C* and 4*D*). E2F1 and GABPA may bind to the minor allele of rs79644959 with a higher affinity compared to that of the major allele both in GM12878 and K562 cells. However, the transcription factor PRDM1 that is expressed in GM12878 cells may bind to the major allele of rs116525449, thus compensating for the absence of E2F1 and GABPA binding on the major allele and balancing the expression of *ARL14*.

Moreover, luciferase reporter assay results showed that the sequence containing rs116525449 and rs79644959 has an enhancer activity, which was much higher in GM12878 than that in K562, irrespective of allele. This suggests an allele-independent cell-specific effect. This may be due to differences in TF expression level between GM12878 and K562. In particular, STAT2 and NR3C1 that bind to sequences close to rs116525449 and rs79644959 show higher expression levels in GM12878 cells than those in K562 cells. Furthermore, these TFs are known to be recruited to enhancer regions [37, 38], which would likely activate enhancer activity in GM12878 cells to a greater extent than of K562 cells. *ARL14* genetic variation

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/230/3/e743/7635474 by inserm 540 user on 23 January 2025

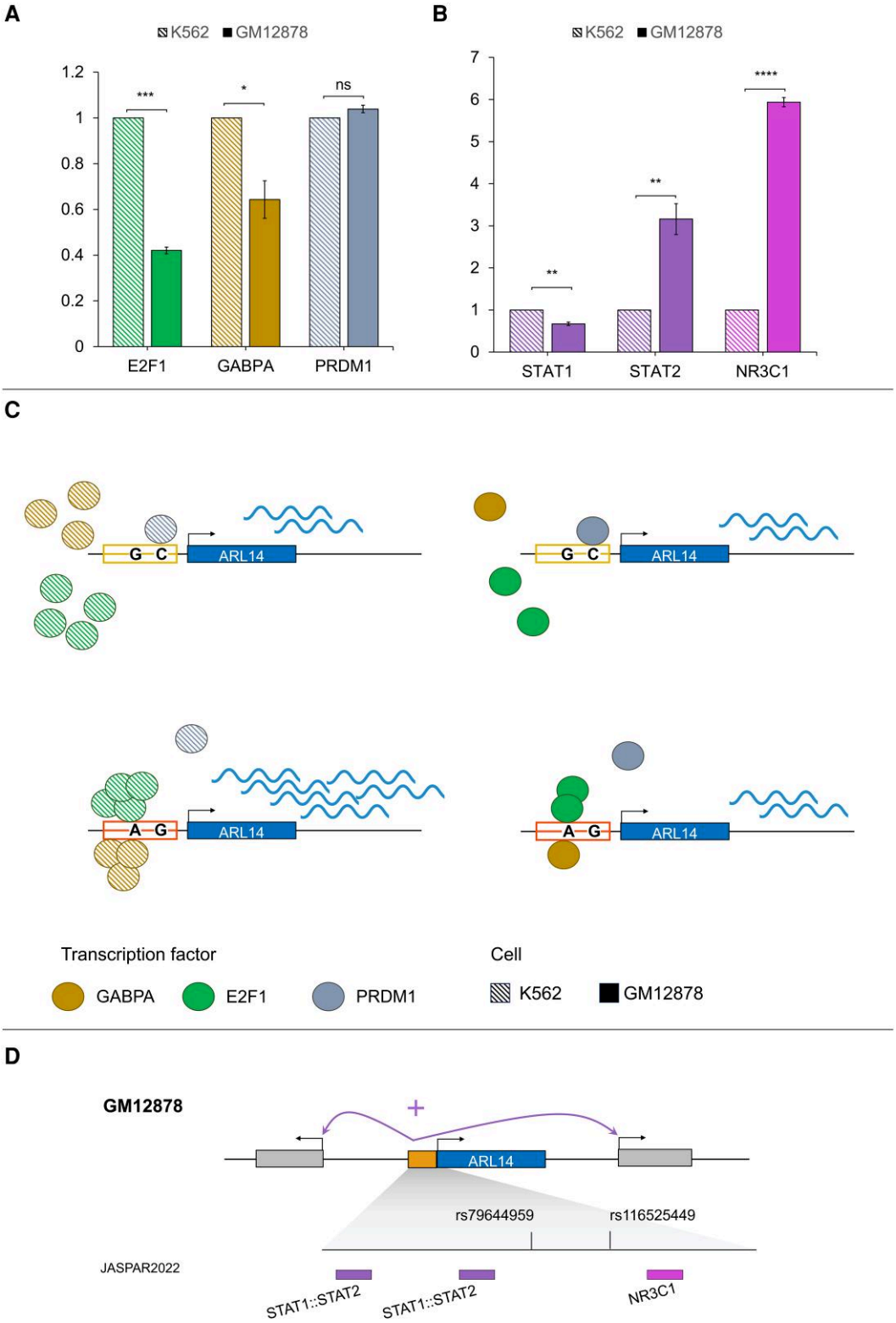


Figure 4. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) results and models for transcriptional regulation of *ARL14* gene in GM12878 and K562 cells. *A* and *B*, RT-qPCR results for selected transcription factor expression levels in GM12878 and K562 cells, respectively. *C*, Model for a promoter activity of the sequence containing rs79644959 and rs116525449. E2F1 and GABPA are expressed in GM12878 and K562 and were predicted to bind to rs79644959 minor allele. PRDM1, which is expressed in GM12878, was predicted to bind to the rs116525449 major allele. As a result, the level of *ARL14* expression in K562 is similar to that in GM12878. *D*, Model for an enhancer activity of the sequence containing rs79644959 and rs116525449. STAT1:STAT2 and NR3C1 that bind to sequences close to the single-nucleotide polymorphisms are affected by neither rs79644959 nor rs116525449. A higher expression of *STAT2* and *NR3C1* in GM12878 causes an increased enhancer activity compared to K562. $^{*}P < .05$, $^{**}P < .01$, $^{***}P < .001$, $^{****}P < .0001$; ns, nonsignificant.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/230/3/e743/7635474 by inserm 540 user on 23 January 2025

Table 2. Association of *ARL14* Single-Nucleotide Polymorphisms With Severe Malaria in a Senegalese Population

SNP rsID	Position[a]	Minor Allele	Risk Genotype	Odds Ratio	95% Confidence Interval	*P* Value
rs116423146 (C > T)	160 679 075	T	CC-TT	2.62[b] (2.70)[c] (1.90)[d]	1.07–6.41[b] (1.04–6.99)[c] (.63–5.68)[d]	.030[b] (.041)[c] (.250)[d]
rs79644959 (G > A)	160 677 123	A	GG-AA	2.29[b] (2.20)[c,d]	1.15–4.57[b] (1.07–4.52)[c,d]	.017[b] (.032)[c] (.031)[d]
rs116525449 (C > G)	160 677 154	G	CC-GG	2.29[b] (2.20)[c,d]	1.15–4.57[b] (1.07–4.52)[c,d]	.017[b] (.032)[c] (.031)[d]

[a]Data represent the position on chromosome 3 according to human hg38 coordinates.

[b]Results of the logistic regression analysis for each single-nucleotide polymorphism (SNP) without any covariate.

[c]Results of the logistic regression analysis for each SNP when considering age as a covariate.

[d]Results of the logistic regression model including either rs79644959 or rs116525449, and rs116423146 and age.

was previously found to be associated with immune disorders such as systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and idiopathic inflammatory myopathies [39]. Indeed, the small GTPase encoded by *ARL14* plays a key role in the transport of major histocompatibility complex (MHC) class II antigen in dendritic cells, which are professional myeloid antigen-presenting cells [40]. We therefore propose that the regulatory variants rs116525449 and rs79644959 of *ARL14* may influence immune-mediated resistance to SM by influencing the distribution of MHC class II antigens on the surface of antigen-presenting cells and hence activation of T lymphocytes. Increased antigen presentation by such cells could thus enable parasite elimination; however, hyperactivation of CD8 T lymphocytes could be deleterious [41].

In conclusion, our study confirms the association between SM and the tagSNP rs116423146 previously detected by GWAS. Furthermore, we showed that 2 SNPs in LD with rs116423146 are regulatory variants and are associated with SM, suggesting that they are causal variants. Additional genetic association studies in independent African populations would be useful, while further studies are required to investigate their functional effect at the cellular level.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (http://jid.oxfordjournals.org/). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. We thank all the patients who participated in the study.

Financial support. This work was supported by the African Higher Education Centers of Excellence project (CEA-SAMEF) at Université Cheikh Anta Diop de Dakar (to A. D.); the Pasteur Institutes in Dakar and in Paris (to A. T.); Inserm (to P. R.); and Aix-Marseille University (to P. R.). M. A. was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of Research. This project was carried out in the framework of the Inserm GOLD Cross-Cutting program (to P. R.).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

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

References

1. World Health Organization. World malaria report 2022. Available at: https://www.who.int/teams/global-malaria-programme.
2. Damena D, Chimusa ER. Genome-wide heritability analysis of severe malaria resistance reveals evidence of polygenic inheritance. Hum Mol Genet **2020**; 29:168–76.
3. Mackinnon MJ, Mwangi TW, Snow RW, Marsh K, Williams TN. Heritability of malaria in Africa. PLoS Med **2005**; 2:e340.
4. Rihet P, Abel L, Traoré Y, Traoré-Leroux T, Aucan C, Fumoux F. Human malaria: segregation analysis of blood infection levels in a suburban area and a rural area in Burkina Faso. Genet Epidemiol **1998**; 15:435–50.
5. Brisebarre A, Kumulungui B, Sawadogo S, et al. A genome scan for *Plasmodium falciparum* malaria identifies quantitative trait loci on chromosomes 5q31, 6p21.3, 17p12, and 19p13. Malar J **2014**; 13:198.
6. Sakuntabhai A, Ndiaye R, Casadémont I, et al. Genetic determination and linkage mapping of *Plasmodium falciparum* malaria related traits in Senegal. PLoS One **2008**; 3:e2000.
7. Milet J, Boland A, Luisi P, et al. First genome-wide association study of non-severe malaria in two birth cohorts in Benin. Hum Genet **2019**; 138:1341–57.
8. Jallow M, Teo YY, Small KS, et al. Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. Nat Genet **2009**; 41:657–65.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/230/3/e743/7635474 by inserm 540 user on 23 January 2025

9. Timmann C, Thye T, Vens M, et al. Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. Nature **2012**; 489:443–6.
10. Band G, Le QS, Jostins L, et al. Imputation-based meta-analysis of severe malaria in three African populations. PLoS Genet **2013**; 9:e1003509.
11. Malaria Genomic Epidemiology Network; Band G, Rockett KA, Spencer CCA, Kwiatkowski DP. A novel locus of resistance to severe malaria in a region of ancient balancing selection. Nature **2015**; 526:253–7.
12. Ravenhall M, Campino S, Sepúlveda N, et al. Novel genetic polymorphisms associated with severe malaria and under selective pressure in north-eastern Tanzania. PLoS Genet **2018**; 14:e1007172.
13. Band G, Le QS, Clarke GM, et al. Insights into malaria susceptibility using genome-wide data on 17,000 individuals from Africa, Asia and Oceania. Nat Commun **2019**; 10:5732.
14. Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, et al. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. Lancet **2002**; 359:1311–2.
15. Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ. Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. Nature **1978**; 274:701–3.
16. Uyoga S, Watson JA, Wanjiku P, et al. The impact of malaria-protective red blood cell polymorphisms on parasite biomass in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. Nat Commun **2022**; 13:3307.
17. Kariuki SN, Macharia AW, Makale J, et al. The Dantu blood group prevents parasite growth in vivo: evidence from a controlled human malaria infection study. Elife **2023**; 12:e83874.
18. Maurano MT, Humbert R, Rynes E, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. Science **2012**; 337:1190–5.
19. Damena D, Agamah FE, Kimathi PO, et al. Insilico functional analysis of genome-wide dataset from 17,000 individuals identifies candidate malaria resistance genes enriched in malaria pathogenic pathways. Front Genet **2021**; 12:676960.
20. Lessard S, Gatof ES, Beaudoin M, et al. An erythroid-specific ATP2B4 enhancer mediates red blood cell hydration and malaria susceptibility. J Clin Invest **2017**; 127: 3065–74.
21. Nisar S, Torres M, Thiam A, et al. Identification of ATP2B4 regulatory element containing functional genetic variants associated with severe malaria. Int J Mol Sci **2022**; 23:4849.
22. Joof F, Hartmann E, Jarvis A, et al. Genetic variations in human ATP2B4 gene alter *Plasmodium falciparum* in vitro growth in RBCs from Gambian adults. Malar J **2023**; 22:5.
23. Adjemout M, Pouvelle B, Thiam F, et al. Concurrent PIEZO1 activation and ATP2B4 blockade effectively reduce the risk of cerebral malaria and inhibit in vitro *Plasmodium falciparum* multiplication in red blood cells. Genes Dis **2023**; 10:2210–14.
24. Watanabe K, Taskesen E, van Bochoven A, Posthuma D. Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. Nat Commun **2017**; 8:1826.
25. Wang J, Dayem Ullah AZ, Chelala C. IW-scoring: an integrative weighted scoring framework for annotating and prioritizing genetic variations in the noncoding genome. Nucleic Acids Res **2018**; 46:e47.
26. Chèneby J, Ménétrier Z, Mestdagh M, et al. Remap 2020: a database of regulatory regions from an integrative analysis of human and *Arabidopsis* DNA-binding sequencing experiments. Nucleic Acids Res **2019**; 48:D180–8.
27. ENCODE Project Consortium; Moore JE, Purcaro MJ, Pratt HE, et al. Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. Nature **2020**; 583:699–710.
28. Nguyen NTT, Contreras-Moreira B, Castro-Mondragon JA, et al. RSAT 2018: regulatory sequence analysis tools 20th anniversary. Nucleic Acids Res **2018**; 46:W209–14.
29. Castro-Mondragon JA, Riudavets-Puig R, Rauluseviciute I, et al. JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles. Nucleic Acids Res **2022**; 50:D165–73.
30. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The human genome browser at UCSC. Genome Res **2002**; 12:996–1006.
31. Thiam A, Baaklini S, Mbengue B, et al. NCR3 polymorphism, haematological parameters, and severe malaria in Senegalese patients. PeerJ **2018**; 6:e6048.
32. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg **2000**; 94:S1–90.
33. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics **2005**; 21:263–5.
34. Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells. Nature **2012**; 489:101–8.
35. Ndila CM, Uyoga S, Macharia AW, et al. Human candidate gene polymorphisms and risk of severe malaria in children in Kilifi, Kenya: a case-control association study. Lancet Haematol **2018**; 5:e333–45.
36. Akoth M, Odhiambo J, Omolo B. Genome-wide association testing in malaria studies in the presence of overdominance. Malar J **2023**; 22:119.
37. Santiago-Algarra D, Souaid C, Singh H, et al. Epromoters function as a hub to recruit key transcription factors required for the inflammatory response. Nat Commun **2021**; 12:6660.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/230/3/e743/7635474 by inserm 540 user on 23 January 2025

38. McDowell IC, Barrera A, D'Ippolito AM, et al. Glucocorticoid receptor recruits to enhancers and drives activation by motif-directed binding. Genome Res **2018**; 28:1272–84.
39. Acosta-Herrera M, Kerick M, González-Serna D, et al. Genome-wide meta-analysis reveals shared new loci in systemic seropositive rheumatic diseases. Ann Rheum Dis **2019**; 78:311–9.
40. Paul P, van den Hoorn T, Jongsma MLM, et al. A genome-wide multidimensional RNAi screen reveals pathways controlling MHC class II antigen presentation. Cell **2011**; 145: 268–83.
41. Albrecht-Schgoer K, Lackner P, Schmutzhard E, Baier G. Cerebral malaria: current clinical and immunological aspects. Front Immunol **2022**; 13:863568.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/article/230/3/e743/7635474 by inserm 540 user on 23 January 2025

Résultat Complémentaire Article 1 : Absence D'association Détectée Entre Les Variants De La Région De *KLHL3* Et Le Paludisme Grave

Mes résultats de priorisation ont permis de mettre en évidence plusieurs SNPs localisés dans la région du gène *KLHL3*, qui se sont avérés être très bien classés dans les analyses. Il se trouve que la région de *KLHL3* a été identifiée à la fois dans les résultats des analyses GWAS avec le paludisme grave et dans un pic de liaison génétique avec le niveau d'infection. Par conséquent, j'ai décidé d'évaluer l'association de trois de ces SNPs dans la région de *KLHL3* avec le paludisme grave et le paludisme simple au sein d'une population sénégalaise et une population du Burkina Faso. La cohorte sénégalaise, recrutée entre 2012 et 2015, comprenait 117 patients atteints de paludisme grave (90 cas de neuropaludisme et 27 cas de paludisme sévère non cérébral), 75 patients atteints de paludisme simple, ainsi que 79 témoins sains vivant à Dakar. Les témoins sélectionnés avec une absence d'infection palustre et de maladie fébrile. En ce qui concerne la cohorte du Burkina Faso, l'étude a été menée à Logoforousso, et a impliqué 234 participants répartis en 50 familles nucléaires. Pendant 18 mois, chaque famille a été visitée 28 fois, soit une fois toutes les trois semaines, pendant les saisons sèches et pluvieuses. Des échantillons de sang ont été prélevés pour mesurer la parasitémie asymptomatique à *Plasmodium falciparum*.

Les SNPs rs73298155, rs2905584, rs11953707 (région de *KLHL3*) ont été génotypés par la technique de discrimination allélique en Taqman (Thermofisher) en utilisant respectivement les essais C_99507425, C_15852160, C_2548899. Le mélange réactionnel est constitué de 1 ml d'ADN génomique à 12,5 ng/ml, 2,1 μl de master mix 2x (TaqMan Genotyping Master Mix, Applied Biosystems) et 0,06 μl pour les essais Taqman 40x (C_99507425, C_15852160, C_2548899) dans un volume final de 5 μl. Le programme utilisé est constitué d'une étape initiale de 10 min à 95 °C suivie de 40 cycles de 15 s à 95 °C, et une 1 min à 60 °C.

Pour chaque SNPs, l'équilibre Hardy-Weinberg a été vérifié grâce à l'outil Haploview dans la population contrôle dans la cohorte du Sénégal. Cependant, les 3 SNPs génotypés dans la région de *KLHL3* n'ont montré aucune association avec les formes graves ou simples de paludisme, même après une régression logistique prenant en compte l'âge comme facteur confondant. De même, les analyses familiales et les tests TDT n'ont révélé aucune association entre la parasitémie et les SNPs de *KLHL3*. Ainsi, je n'ai pas pu répliquer l'association des SNPs de *KLHL3* avec le paludisme ou la parasitémie.

Une explication possible réside dans la taille limitée des cohortes utilisées, qui pourrait réduire la capacité à détecter l'association en raison d'un manque de puissance statistique. Par exemple, avec une taille d'effet modérée de 1,2, il serait nécessaire d'inclure environ 9 172 individus par groupe pour obtenir une puissance de 80 %. Cela met en évidence le besoin de cohortes plus importantes pour valider ces résultats.

Une autre hypothèse pertinente serait que les divergences observées entre les études soient dues à des différences géographiques, telles que le degré d'exposition au paludisme, ou à des variations génétiques spécifiques aux groupes ethniques. Dans ce contexte, il est possible que le variant causal ne soit pas systématiquement en déséquilibre de liaison avec les TagSNPs analysés.

Pour surmonter cette limitation, une stratégie potentielle consisterait à réaliser une analyse spécifique de la région étudiée en abaissant le seuil de corrélation (par exemple, r^2 à 0,4) afin d'inclure un plus grand nombre de SNPs dans l'analyse, augmentant ainsi les chances d'identifier le variant causal. Alternativement, utiliser une population de référence plus appropriée pour calculer le déséquilibre de liaison pourrait améliorer la précision des résultats. En effet, dans notre approche, le déséquilibre de liaison a été calculé en regroupant toutes les populations africaines. Il serait pertinent de refaire cette analyse en se concentrant sur une population géographiquement et génétiquement plus proche de la Tanzanie, comme celle du Kenya présent dans les données 1000 Genomes. Cela permettrait de mieux refléter les caractéristiques génétiques des individus inclus dans l'étude GWAS ayant identifié l'association avec le locus KLHL3.

II. Impact De Variants Modifiant L'homéostasie Du Calcium Dans Les Globules Rouges Sur La Susceptibilité Au Paludisme

Article 2: ATP2B4 Regulatory Genetic Variants Are Associated With Mild Malaria

Alassane Thiam, Samia Nisar, **Mathieu Adjemout,** Frederic Gallardo, Oumar Ka, Babacar Mbengue, Gora Diop, Alioune Dieye, Sandrine Marquet, Pascal Rihet

Malaria Journal volume 22, Article number: 68 (2023), https://doi.org/10.1186/s12936-023-04503-8

Publié le : 27 Février 2023

Les résultats de mon précédent article ont montré que, en plus des variants associés à *ARL14*, des variants régulateurs se trouvent également dans le locus *ATP2B4*, répliquant ainsi les résultats précédents du laboratoire.

Au sein du laboratoire, une étude précédente a identifié des SNPs régulateurs en déséquilibre de liaison avec des TagSNPs associés au paludisme sévère, en sélectionnant les TagSNPs robuste associées au moins dans 2 études distinctes (Nisar *et al.*, 2022). Cette étude a permis d'identifier cinq SNPs régulateurs situés dans le promoteur alternatif du gène *ATP2B4*. Ces cinq SNPs sont en déséquilibre de liaison et constituent un haplotype. Il a été démontré que l'haplotype mineur est associé à une protection contre le paludisme sévère dans une population sénégalaise. Les analyses expérimentales ont permis d'identifier la région contenant ces variants comme un "Epromoter", un élément régulateur ayant à la fois une activité promotrice et enhancer. Cette régulation complexe varie en fonction de la présence de l'haplotype, l'haplotype mineur étant associé à une diminution de l'activité enhancer sur le promoteur principal d'*ATP2B4* pouvant conduire à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et affecter l'invasion des érythrocytes par le *Plasmodium*.

En complément de ces résultats, une étude a examiné l'impact des polymorphismes d'*ATP2B4* sur la croissance *in vitro* des parasites (Joof *et al.*, 2023). Elle a révélé une réduction de cette croissance dans les globules rouges des homozygotes porteurs de l'allèle mineur du rs1541252, l'un des cinq SNPs de l'haplotype analysé précédemment dans notre laboratoire. Ces résultats sont en parfait accord avec les analyses génétiques montrant que l'haplotype mineur pourrait conférer une protection contre les formes graves de paludisme en modulant la parasitémie. Cette hypothèse est corroborée par une autre étude démontrant que l'inhibition de l'expression de PMCA4 affectait légèrement la croissance des parasites dans des cellules érythroïdes dérivées de cellules souches humaines, établissant un lien entre le développement parasitaire et l'homéostasie du calcium dans les globules rouges (Pance *et al.*, 2023).

Nous nous sommes alors demandé si cet haplotype pouvait influencer le paludisme simple, notamment par leur capacité potentielle à réduire la charge parasitaire via l'élévation du

calcium intracellulaire. J'ai pu démontrer, pour la première fois, une association entre l'haplotype d'*ATP2B4* et le paludisme simple.

Contribution : Dans cet article, ma contribution a été réalisée les tests d'association et à la révision de l'article.

Malaria Journal

RESEARCH

Open Access

ATP2B4 regulatory genetic variants are associated with mild malaria

Alassane Thiam[1], Samia Nisar[2,3], Mathieu Adjemout[2], Frederic Gallardo[2], Oumar Ka[4], Babacar Mbengue[4], Gora Diop[1], Alioune Dieye[4], Sandrine Marquet[2*] and Pascal Rihet[2*]

Abstract

Background Genome-wide association studies have identified *ATP2B4* as a severe malaria resistance gene. Recently, 8 potential causal regulatory variants have been shown to be associated with severe malaria.

Methods Genotyping of rs10900585, rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, rs1541255, rs10751450, rs10751451 and rs10751452 was performed in 154 unrelated individuals (79 controls and 75 mild malaria patients). rs10751450, rs10751451 and rs10751452 were genotyped by Taqman assays, whereas the fragment of the *ATP2B4* gene containing the remaining SNPs was sequenced. Logistic regression analysis was used to assess the association between the SNPs and mild malaria.

Results The results showed that mild malaria was associated with rs10900585, rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, rs1541255, rs10751450, rs10751451 and rs10751452. The homozygous genotypes for the major alleles were associated with an increased risk of mild malaria. Furthermore, the haplotype containing the major alleles and that containing the minor alleles were the most frequent haplotypes. Individuals with the major haplotypes had a significantly higher risk of mild malaria compared to the carriers of the minor allele haplotype.

Conclusions *ATP2B4* polymorphisms that have been associated with severe malaria are also associated with mild malaria.

Keywords Mild malaria, *Plasmodium falciparum*, *ATP2B4*, Regulatory variants

Background

Malaria remains one of the most common infectious diseases. According to the World Health Organization (WHO), the estimated number of cases and deaths in 2020 were 241 million and 627,000, respectively [1]. In 2020, 95% and 96% of the cases and deaths occurred in Africa. The most severe forms of the disease are mainly caused by *Plasmodium falciparum*. Host genetic factors have been shown to explain between 20 and 25% of the variations in *P. falciparum* malaria phenotypes [2–4]. *Plasmodium falciparum* can cause asymptomatic infections, mild malaria, or severe malaria, including severe anaemia and cerebral malaria. Genome-wide genetic linkage analyses and genome-wide association studies have been carried out to map genes involved in the control of blood infection levels, mild malaria or severe malaria [5–14].

A large genome-wide association study (GWAS) conducted by Timmann et al. [14] in Ghana identified a new severe malaria locus on chromosome 1q32 within the *ATP2B4* gene. Other GWAS and candidate gene studies

*Correspondence:
Sandrine Marquet
sandrine.marquet@univ-amu.fr
Pascal Rihet
pascal.rihet@univ-amu.fr
[1] Unité d'Immunogénétique, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal
[2] Aix Marseille Univ, INSERM, TAGC, MarMaRa Institute, Marseille, France
[3] Sardar Bahadur Khan Women's University, Quetta 1800, Balochistan, Pakistan
[4] Service d'Immunologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, Senegal

© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

conducted in Burkina Faso, Cameroon, Gambia, Kenya, Mali, Malawi, or Tanzania confirmed the association of the *ATP2B4* gene with severe malaria [11, 15, 16]. *ATP2B4* gene encodes for PMCA4, which is the main calcium pump in erythrocytes. Also, it has been hypothesized that genetic variation within *ATP2B4* disrupts the homeostasis of intraerythrocytic calcium concentration and thus, affects the development and structure of intraerythrocytic stages of the parasite [17]. Thus, it is expected that *ATP2B4* genetic variation is associated with parasitaemia and mild malaria attack, which is caused by parasitaemia above a clinical threshold [18]. There was, nevertheless, no report of association analysis of *ATP2B4* single nucleotide polymorphisms (SNP) with parasitaemia or mild malaria.

Most of the genetic association studies reported an association of severe malaria with the tag SNPs rs10900585 or rs4951377, which are in strong linkage disequilibrium with each other. The SNPs rs10751450, rs10751451, and rs10751452 that are in linkage disequilibrium with these tag SNPs were found to influence the expression of *ATP2B4* [17], suggesting that they may be the causal SNPs. More recently, rs10900585, rs10751450, rs10751451, and rs10751452 were reported to be associated with severe malaria in a Senegalese population [19]. Furthermore, 5 new regulatory SNPs (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255) that disrupt the activity of a new regulatory element were also associated with severe malaria in the Senegalese population [19].

The study aim was to assess the association of the tag SNP rs10900585 and the recently identified regulatory SNPs with mild malaria (MM) in a Senegalese population. Here evidence of an association with mild malaria both at the SNP and haplotype levels is reported.

Methods

Study subjects and phenotypes

Mild malaria patient samples (n = 75) were taken at the Principal Hospital of Dakar and the regional hospital of Tambacounda in Senegal on the day of hospital admission [20], whereas control samples (n = 79) were taken from healthy individuals living in Dakar [19]. Additional file 1: Table S1 shows the characteristics of malaria patients and control individuals.

The control individuals were blood donors who did not have any malaria infection (as determined by microscopy) or any other febrile illness, selected at the same period of enrolment. Selected healthy individuals were medically followed by the National Transfusion Center or Hospital Principal more than two years with biological analyses every three months. Only samples from aparasitaemic donors were included in this control group. It should be stressed that the control individuals cannot be considered resistant individuals, since they may be unexposed and uninfected at the time of sampling. The allele and genotype frequencies within the control population rather reflected those within the general population.

All the clinical cases were defined according to WHO criteria [21]. For the patients, the presence of *P. falciparum* infection was determined by an immunoassay enabling the detection of pfHRP2 (Standard diagnostics-Abbott Inc, Chicago, Illinois, USA). According to WHO recommendations, for all subjects, *P. falciparum* parasitaemia was measured by examination of Giemsa-stained blood smears using a magnification × 1000 and by establishing the parasite count per 1000 leukocytes. To obtain reliable results, each slide was examined by two biologists and the mean of the two results was calculated when the difference between them was low. If there was a big difference between the two counts, a third reading was done to reduce the possibility of discordance, and the mean was calculated. The detailed procedure has been described previously [20]. MM patients had fever with *P. falciparum* parasitaemia; the median of parasitaemia was 6516 parasitized red blood cells/µl (25th and 75th percentile 640–37,238 pRBC/µl). MM patients did not show any evidence of impaired consciousness or seizures before and at the time of enrolment. They were surveyed for the two weeks following their enrolment, and there was no case of impaired consciousness or seizures. Blood samples were obtained on the day of hospital admission. The institutional research ethics committee of the University Cheikh Anta Diop approved the study.

DNA extraction, DNA amplification, and genotyping

Genomic DNA was extracted and further amplified as described [20]. rs10900585, rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254 and rs1541255 were genotyped using Sanger sequencing. The fragment of the *ATP2B4* gene containing the polymorphisms was amplified by PCR with 5 µL of whole genomic DNA, 25 µL of Master Mix GoTaq G2 Hot Start (Promega Corporation, Madison, WI USA) according to the manufacturer's instructions and 3 µL of a mixture of primers sense F: 5′TCAGGCCTAGCTATCAGTTCAG 3′ and antisense R: 5′ CGAGTAGCCGTCCGAAGTC 3′ of 10 µM each. The amplification was carried out in Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) following 35 cycles with a Tm of 60 °C. After amplification, the PCR product was checked on 1.5% agarose gel. The amplicon was then further purified with QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Sequencing was performed by GATC (Constance, Germany) from 5 µL of PCR product (20–80 ng / µL) and 5µL of F primer at

5 µM. The chromatograms were read with Chromas 2.6.5 software (South Brisbane, Australia).

rs10751450, rs10751451 and rs10751452 were genotyped by Taqman assays (C_31796478_10, C_31796479_10 and C_31796480_10) respectively. Each reaction well was added with 1.84 µl of H2O, 2.1 µl of 2X Taqman master mix, 0.06 µl of Taqman probes and 1 µl of DNA (10–15 ng/µl). Amplification was performed with polymerase activation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation (95 °C, 15 s) and annealing/extension (60 °C, 1 min). After amplification, allelic identification was performed by the integrated software of the Quantstudio 6 Flex System (Real-time PCR Software v1.3).

Statistical analysis

SPSS (statistical software version 20) was used to perform data analyses. All the tests were two-tailed. Chi-squared test was used to compare control and patient groups for gender and ethnic groups. Mann–Whitney test was used to compare the age of the controls with that of patients. Logistic regression method that allowed us to take into account potential confounding factors was used to perform genetic association analyses. The Nominal P values, the Odds ratios (OR) and their 95% confidence interval (CI) were calculated. Moreover, the FDR method was used to correct for multiple tests [22]. Genetic association results were considered significant if the FDR was lower than 0.05. Haploview software package was used to test Hardy–Weinberg equilibrium, to construct haplotypes and to calculate their frequency [23].

Results

Association between the SNPs and mild malaria

For all the SNPs including the tag SNP (rs10900585) and 8 potential candidate variants (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, rs1541255, rs10751450, rs10751451 and rs10751452), the observed genotype frequencies in the control group conformed to the Hardy–Weinberg equilibrium ($P > 0.5$ for all SNPs). Additional file 1: Table S2 shows the minor allele frequency in the studied population and in 1000 genome populations. Additional file 1: Figure S1 shows the linkage disequilibrium r-square coefficients between all the pairs of SNPs. Table 1 shows structural and functional annotations of the SNPs on the basis of public databases [24–27]. Interestingly, there was no functional annotation for rs10900585, whereas the sequences containing the other SNPs bind transcription factors and were annotated as regulatory elements. Table 2 shows relevant Encode and GeneHancer regulatory elements [25, 26], including those containing the studied SNPs. It should be stressed that these potential regulatory elements have been recently experimentally validated [17, 19]. In particular, they were shown to have an enhancer activity, which increases the activity of the main *ATP2B4* promoter [19].

The association of the variants with MM was assessed using a logistic regression model. The subjects carrying the homozygous genotype for major alleles were compared with those carrying either the heterozygous genotype or the homozygous genotype for minor alleles, as shown in Table 3. In other words, the association study was performed under a dominant genetic model, which has been proposed in severe malaria studies [11, 14, 15, 19]. A significant association with MM was detected for all the SNPs ($P < 0.001$) without the effect

Table 1 *ATP2B4* SNP annotation

SNP	Position[a]	%genotyped	Structural annotation[b]	Functional annotation[b]		
				Encode	GeneHancer	ReMap[c]
rs10751450 (C > T)	203681817	99.4	Intron	Enhancer	Enhancer	46
rs10751451 (C > T)	203681850	99.4	Intron	Enhancer	Enhancer	49
rs10751452 (T > C)	203681902	99.4	Intron	Enhancer	Enhancer	50
rs11240734 (T > C)	203682696	100	Intron	Enhancer	Enhancer	54
rs1541252 (C > T)	203682799	100	5′ UTR	a. promoter[d]	enhancer	90
rs1541253 (C > T)	203682912	100	5′ UTR	a. promoter	enhancer	149
rs1541254 (G > C)	203683012	100	5′ UTR	a. promoter	enhancer	104
rs1541255 (A > G)	203683013	100	5′ UTR	a. promoter	enhancer	103
rs10900585 (T > G)	203684896	100	Intron	None	None	0

[a] Data represent the position on chromosome 1 according to human hg38 coordinates

[b] SNPs have been annotated using g: Profiler, Encode, GeneHancer and the catalog of ChIP-seq peak ReMap

[c] Number of ChIP-seq peaks using the ReMap catalog. It indicates the ability of the sequence containing the SNP to bind transcription factors

[d] a. promoter means alternative promoter

Table 2 Relevant ENCODE and GeneHancer regulatory elements within *ATP2B4* gene

Type	Identifier	Coordinate[a]	Studied SNPs within the regulatory elements
Main promoter	EH38E1413765[b]	203626509–203626856	None
Proximal enhancer	EH38E1413842[b]	203681720–203682066	rs10751450, rs10751451, rs10751452
Alternative promoter	EH38E1413843[b]	203682665–203683013	rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, rs1541255
Enhancer	GH01J203680[c]	203680647–203684029	rs10751450, rs10751451, rs10751452, rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, rs1541255

[a] Data represent the position on chromosome 1 according to human hg38 coordinates

[b] Encode identifier

[c] GeneHancer identifier

Table 3 Association of *ATP2B4* SNPs with mild malaria in Senegalese population

	Position[a]	Minor allele	Risk genotype	Odd ratio	95% CI	P value
rs10751450 (C>T)	203681817	T	CC	3.55[b] (3.52)[c]	1.83–6.91[b] (1.78–6.95)[c]	0.0002[b] (0.0003)[c]
rs10751451 (C>T)	203681850	T	CC	3.35 (3.32)	1.72–6.51 (1.69–6.53)	0.0003 (0.0005)
rs10751452 (T>C)	203681902	C	TT	3.17 (3.13)	1.64–6.14 (1.60–6.15)	0.0006 (0.0009)
rs11240734 (T>C)	203682696	C	TT	3.42 (3.39)	1.76–6.64 (1.72–6.66)	0.0003 (0.0004)
rs1541252 (C>T)	203682799	T	CC	3.42 (3.39)	1.76–6.64 (1.72–6.66)	0.0003 (0.0004)
rs1541253 (C>T)	203682912	T	CC	3.42 (3.39)	1.76–6.64 (1.72–6.66)	0.0003 (0.0004)
rs1541254 (G>C)	203683012	C	GG	3.62 (3.60)	1.86–7.05 (1.83–7.10)	0.0001 (0.0002)
rs1541255 (A>G)	203683013	G	AA	3.62 (3. 60)	1.86–7.05 (1.83–7.10)	0.0001 (0.0002)
rs10900585(T>G)	203684896	G	TT	3.42[b] (3.39)[c]	1.76–6.6[b] (1.72–6.66)[c]	0.0003[b] (0.0004)[c]

[a] Data represent the position on chromosome 1 according to human hg38 coordinates

[b] Results of the logistic regression analysis without any covariate

[c] Results of the logistic regression analysis when taking into account age as a covariate

of any covariate. An association of the SNPs with MM was further detected when considering age as a covariate ($P<0.001$); it should be stressed, nevertheless, that controls and mild malaria patients did not differ in age ($P=0.22$). Furthermore, the proportion of the Fulani ethnic group was calculated in the control group and in the patient group because membership in the Fulani group reduces the risk of clinical malaria [28]. There was no imbalance between the control group and the patient group with respect to ethnic group membership ($P=0.25$). Nevertheless, the ethnic group was included as a covariate in a larger statistical model. The association of the SNPs with mild malaria was confirmed when including age, gender and ethnic groups in the logistic regression model ($P<0.001$). Additional file 1: Table S3 shows the detailed results. The homozygous genotypes for the major alleles were found to be associated with an increased risk of developing MM (Table 3). The homozygotes for the major allele had a risk of developing an attack of uncomplicated malaria between 3.17 and 3.62 times higher than carriers of the minor allele. Very similar results were obtained when taking into account age as a covariate (Table 3). Besides, an association study was performed under an additive genetic model. As expected, a significant association of the SNPs with mild malaria was detected (Additional file 1: Table S4). All the association results remained significant after applying an FDR of 5%.

Association between haplotypes and mild malaria

This analysis focused on the potential functional variants. First, a haplotype analysis was conducted under the dominant model, which combined rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254 and rs1541255. In all, 3 haplotypes were observed with various frequencies ranging from 0.025 to 0.570 in the control group (Table 4). The 2 most frequent haplotypes were that containing the major alleles (TCCGA) and that containing the minor alleles (CTTCG) in both control and mild malaria groups. The frequency of the former haplotype was 0.570 and 0.784 in the control group and the mild malaria group, respectively. In contrast, the frequency of the later haplotype was 0.405 and 0.209, respectively. The frequency of the third haplotype was lower than 0.025 in both groups. Also, the two most frequent haplotypes were further studied. The homozygotes for the haplotype containing the major alleles (TCCGA) were compared with the carriers of the haplotype containing the minor alleles

(CTTCG). The analysis showed that individuals with the major allele haplotype had a 3.4 higher risk of mild malaria compared to the carrier of the minor allele haplotype (Table 5). Very similar results were obtained after including age or age, gender and ethnic groups as covariates in the logistic regression model (Additional file 1: Tables S3 and S4).

The haplotype analysis was further carried out under the dominant model by including rs10751450, rs10751451, rs10751452, rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254 and rs1541255. Seven haplotypes were observed (Table 4). Again, the most frequent haplotypes were that containing the major alleles (CCTTCCGA) and that containing the minor alleles (TTCCTTCG). The frequency of the major allele haplotype was 0.544 and 0.784 in the control group and the mild malaria group, whereas that of the minor allele haplotype was 0.392 and 0.203 in the control group and the mild malaria group, respectively. The frequency of the other haplotypes was lower than 0.025 in both groups. Also, these haplotypes were not considered in further analysis. Homozygotes for the major haplotypes were found 3.5 times more likely to have mild malaria than carriers of the minor allele haplotype when including covariates in the statistical model or not (Additional file 1: Table S3). Noticeably, a significant association was also found between haplotypes and mild malaria using an additive genetic model (Additional file 1: Table S4). All the association results remained significant after applying an FDR of 5%.

Discussion

GWAS have identified *ATP2B4* as a severe malaria locus [11, 14]. In particular, rs10900585 has been associated with severe malaria in several independent populations, and a meta-analysis further confirmed this association [19]. Eight regulatory SNPs in linkage disequilibrium with rs10900585 were further identified, and evidence of the association between these regulatory SNPs and severe malaria in Senegal was reported [19]. Here the aim of the study was to assess the association of these SNPs with mild malaria in Senegal.

The results showed the association of mild malaria with rs10751450, rs10751451, rs10751452, rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254 and rs1541255. Homozygotes for the major alleles had almost a threefold increased risk of mild malaria, compared to carriers of the minor alleles. Similarly, individuals with the major allele haplotype had an increased risk of mild malaria. Interestingly, the major alleles of those SNPs have been associated with severe malaria [19], whereas carriers of the minor alleles were associated with protection against severe malaria. Besides, individuals with the minor allele haplotype were shown to have a reduced expression of PMCA4b [19, 29].

Table 4 Haplotype frequency in the Senegalese population

Study subjects	5 SNP haplotype[a]	Frequency	8 SNP haplotype[b]	Frequency
Control	TCCGA	0.570	CCTTCCGA	0.544
	CTTCG	0.405	TTCCTTCG	0.392
	TCCCA	0.025	CCTTCCCA	0.025
			TCTTCCGA	0.019
			CCTCTTCG	0.013
			CTTTCCGA	0.006
Mild malaria	TCCGA	0.784	CCTTCCGA	0.784
	CTTCG	0.209	TTCCTTCG	0.203
	TCCCA	0.007	TTCCTTGA	0.007
			CCTCTTCG	0.007

[a] rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254 and rs1541255 were included in the haplotype analysis

[b] rs10751450, rs10751451 rs10751452, rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254 and rs1541255 were included in the haplotype analysis

Table 5 Haplotype association analysis in the Senegalese population

Major allele haplotype	Minor allele haplotype	Risk genotype	OR	95% CI	P value
TCCGA	CTTCG	TCCGA/TCCGA[a]	3.40[c] (3.45)[d]	1.73–6.69[c] (1.73–6.86)[d]	0.0003[c] (0.0004)[d]
CCTTCCGA	TTCCTTCG	CCTTCCGA/CCTTCCGA[b]	3.53 (3.51)	1.78–7.02 (1.74–7.08)	0.0003 (0.0004)

[a] rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254 and rs1541255 were included in the analysis

[b] rs10751450, rs10751451 rs10751452, rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254 and rs15412552 were included in the analysis. OR, odds ratio; CI, confidence interval

[c] Results of the logistic regression analysis without any covariate

[d] Results of the logistic regression analysis when taking into account age as a covariate

It has been proposed that the reduction of the expression of *ATP2B4* that encodes for PMCA4 causes an increased intracellular calcium concentration, increased MCHC, erythrocyte dehydration and finally a reduced parasite level [17, 19]. Very recently, Joof et al. [29] investigated the effect of *ATP2B4* polymorphisms on the in vitro growth of parasites. They found a reduced parasite growth in red blood cells taken from homozygotes carriers of the minor haplotype, whereas they did not find any effect of those polymorphisms on neither invasion nor adhesion. In addition, Pance et al. [30] showed that the inhibition of the expression of PMCA4 had a slight effect on the in vitro growth of parasites in human stem cell-derived erythroid cells. In contrast, *ATP2B4* gene targeting in mice infected by *Plasmodium berghei* strain ANKA did not alter parasitaemia, although it protected against cerebral malaria [31]. The authors found an increased expression of PMCA1 in *ATP2B4*−/− mice and, therefore, suggested that PMCA1 and other calcium channels may compensate for a low expression of *ATP2B4* and a low level of PMCA4 at the cell surface. These results indicate the need to assess the effect of *ATP2B4* variants on parasitaemia measured in vivo in subjects living in malaria-endemic areas.

Conclusions

ATP2B4 minor allele haplotype that protects against severe malaria also protects against mild malaria in a Senegalese population. This is consistent with the biological model based on an impaired expression of PMCA4 at the cell surface leading to an accumulation of intracellular calcium that activates the GARDOS channel causing erythrocyte dehydration and a reduction of the parasite growth. However, further studies are needed to evaluate the association between *ATP2B4* polymorphisms and parasitaemia.

Abbreviations

GWAS	Genome-wide association study
MM	Mild malaria
OR	Odd ratio
SNP	Single nucleotide polymorphism

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12936-023-04503-8.

Additional file 1: Figure S1. Linkage disequilibrium (LD) (r-squared) map for the *ATP2B4* variants in the studied population. r-squared values ranged from 0.83 to 1. r-squared values were equal to 1 for the haplotype block containing rs11240734, rs1541252, rs1541253. **Table S1**. Characteristics of study subjects. **Table S2.** SNP minor allele frequency in the study population and in other African populations. The position is the position on chromosome 1 according to human hg38 coordinates. **Table S3.** Genetic association results under the genetic dominant model. Haplotype contains the studied SNPs but rs10900585, which is not functional. **Table S4.** Genetic association results under the genetic additive model. Haplotype contains the studied SNPs but rs10900585.

Acknowledgements

We thank all the individuals who participated in the study.

Author contributions

SM and PR designed and supervised the project. AT extracted the DNA samples and performed whole genome amplification. OK, AT, GD and BM were involved in the recruitment, the follow-up of Senegalese individuals, and the collection and interpretation of biological data including parasite density, haematology, and other characteristics from different areas (Dakar and Tambacounda), under the supervision of AD. SN genotyped most of the genetic variants, whereas AT and FG participated in genotyping. MA performed haplotype and statistical analyses under the supervision of PR and SM. SM and PR wrote the paper. All authors have received the manuscript and approved the final version before submitting the article. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the African Higher Education Centers of Excellence project (CEA-SAMEF) at UCAD, the Pasteur Institute in Dakar, the Pasteur Institute in Paris, the French embassy in Senegal, INSERM, and Aix-Marseille University. MA and SN were supported by a PhD fellowship from the French ministry of research and the Higher Education Commission (HEC) from Pakistan, respectively.

Availability of data and materials

The full data used may be released upon reasonable request to the corresponding authors.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Comité d'Ethique de la Recherche de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar on January 2015. Written informed consent was obtained for each patient or their accompanying family members.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. Therefore, the authors declare that they have no competing interests.

Received: 21 June 2022 Accepted: 18 February 2023
Published online: 27 February 2023

References

1. WHO. World malaria report. Geneva: World Health Organization. 2021.
2. Damena D, Chimusa ER. Genome-wide heritability analysis of severe malaria resistance reveals evidence of polygenic inheritance. Hum Mol Genet. 2020;29:168–76.
3. Mackinnon MJ, Mwangi TW, Snow RW, Marsh K, Williams TN. Heritability of malaria in Africa. PLoS Med. 2005;2: e340.
4. Rihet P, Abel L, Traore Y, Traore-Leroux T, Aucan C, Fumoux F. Human malaria: segregation analysis of blood infection levels in a suburban area and a rural area in Burkina Faso. Genet Epidemiol. 1998;15:435–50.
5. Band G, Le QS, Jostins L, Pirinen M, Kivinen K, Jallow M, et al. Imputation-based meta-analysis of severe malaria in three African populations. PLoS Genet. 2013;9: e1003509.
6. Brisebarre A, Kumulungui B, Sawadogo S, Atkinson A, Garnier S, Fumoux F, et al. A genome scan for *Plasmodium falciparum* malaria identifies quantitative trait loci on chromosomes 5q31, 6p21.3, 17p12, and 19p13. Malar J. 2014;13:198.
7. Jallow M, Teo YY, Small KS, Rockett KA, Deloukas P, Clark TG, et al. Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. Nat Genet. 2009;41:657–65.

8. Milet J, Boland A, Luisi P, Sabbagh A, Sadissou I, Sonon P, et al. First genome-wide association study of non-severe malaria in two birth cohorts in Benin. Hum Genet. 2019;138:1341–57.
9. Milet J, Nuel G, Watier L, Courtin D, Slaoui Y, Senghor P, et al. Genome wide linkage study, using a 250K SNP map, of *Plasmodium falciparum* infection and mild malaria attack in a Senegalese population. PLoS ONE. 2010;5: e11616.
10. Network MGE. A novel locus of resistance to severe malaria in a region of ancient balancing selection. Nature. 2015;526:253–7.
11. Network MGE. Insights into malaria susceptibility using genome-wide data on 17,000 individuals from Africa, Asia and Oceania. Nat Commun. 2019;10:5732.
12. Ravenhall M, Campino S, Sepúlveda N, Manjurano A, Nadjm B, Mtove G, et al. Novel genetic polymorphisms associated with severe malaria and under selective pressure in North-eastern Tanzania. PLoS Genet. 2018;14: e1007172.
13. Sakuntabhai A, Ndiaye R, Casadémont I, Peerapittayamonkol C, Rogier C, Tortevoye P, et al. Genetic determination and linkage mapping of *Plasmodium falciparum* malaria related traits in Senegal. PLoS ONE. 2008;3: e2000.
14. Timmann C, Thye T, Vens M, Evans J, May J, Ehmen C, et al. Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. Nature. 2012;489:443–6.
15. Ndila CM, Uyoga S, Macharia AW, Nyutu G, Peshu N, Ojal J, et al. Human candidate gene polymorphisms and risk of severe malaria in children in Kilifi, Kenya: a case-control association study. Lancet Haematol. 2018;5:e333–45.
16. Rockett KA, Clarke GM, Fitzpatrick K, Hubbart C, Jeffreys AE, Rowlands K, et al. Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study. Nat Genet. 2014;46:1197–204.
17. Lessard S, Gatof ES, Beaudoin M, Schupp PG, Sher F, Ali A, et al. An erythroid-specific *ATP2B4* enhancer mediates red blood cell hydration and malaria susceptibility. J Clin Invest. 2017;127:3065–74.
18. Rogier C, Commenges D, Trape JF. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. Am J Trop Med Hyg. 1996;54:613–9.
19. Nisar S, Torres M, Thiam A, Pouvelle B, Rosier F, Gallardo F, et al. Identification of *ATP2B4* regulatory element containing functional genetic variants associated with severe malaria. Int J Mol Sci. 2022;23:4849.
20. Thiam A, Baaklini S, Mbengue B, Nisar S, Diarra M, Marquet S, et al. NCR3 polymorphism, haematological parameters, and severe malaria in Senegalese patients. PeerJ. 2018;6: e6048.
21. World Health Organization. Severe falciparum malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94(Suppl 1):S1-90.
22. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc Ser B. 1995;57:289–300.
23. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics. 2005;21:263–5.
24. Chèneby J, Gheorghe M, Artufel M, Mathelier A, Ballester B. ReMap 2018: an updated atlas of regulatory regions from an integrative analysis of DNA-binding ChIP-seq experiments. Nucleic Acids Res. 2018;46(D1):D267–75.
25. ENCODE Project Consortium, Moore JE, Purcaro MJ, Pratt HE, Epstein CB, Shoresh N, et al. Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. Nature. 2020;583:699–710.
26. Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, Hadar R, Plaschkes I, Iny Stein T, et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. Database (Oxford). 2017;2017:bax028.
27. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). Nucleic Acids Res. 2019;47(W1):W191–8.
28. Troye-Blomberg M, Arama C, Quin J, Bujila I, Ostlund Farrants AK. What will studies of Fulani individuals naturally exposed to malaria teach us about protective immunity to malaria? Scand J Immunol. 2020;92: e12932.
29. Joof F, Hartmann E, Jarvis A, Colley A, Cross J, Avril M, et al. Cellular mechanism by which genetic variations in human ATP2B4 gene protect against severe malaria. Malar J. 2023;22:5.
30. Pance A, Ling B, Mwikali K, Koutsourakis M, Agu C, Rouhani F, et al. Stem cell technology provides novel tools to understand human variation in *Plasmodium falciparum* malaria. bioRxiv. 2021;12:120.
31. Villegas-Mendez A, Stafford N, Haley MJ, Pravitasari NE, Baudoin F, Ali A, et al. The plasma membrane calcium ATPase 4 does not influence parasite levels but partially promotes experimental cerebral malaria during murine blood stage malaria. Malar J. 2021;20:297.

Publisher's Note

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

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

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

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

BMC

Article 3: Concurrent PIEZO1 Activation And ATP2B4 Blockade Effectively Reduce The Risk Of Cerebral Malaria And Inhibit *In Vitro Plasmodium Falciparum* Multiplication In Red Blood Cells

Mathieu Adjemout, Bruno Pouvelle, Fatou Thiam, Alassane Thiam, Magali Torres, Samia Nisar, Babacar Mbengue, Alioune Dieye, Pascal Rihet*, Sandrine Marquet*

*S. M. et P. R. ont contribué à parts égales à ce travail

Genes & Diseases, Volume 10, Issue 6, Novembre 2023, Pages 2210-2214, https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.02.029

Publié le : 27 mars 2023

La régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire semble jouer un rôle clé dans le développement des formes cliniques du paludisme, en influençant la croissance parasitaire via l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire. Cette hypothèse est formulée sur la base de nos résultats obtenus pour *ATP2B4*, et est renforcée par la découverte d'une mutation de gain de fonction (E756del) dans le canal calcique PIEZO1 sous sélection positive en Afrique. La forte prévalence de la mutation E756del de *PIEZO1,* présente chez un tiers de la population africaine mais absente des autres populations, a été favorisée par une pression de sélection exercée par le paludisme tout comme HbS.

Dans un premier temps, j'ai confirmé l'association de la mutation spécifique E756del de *PIEZO1* avec le neuroplaudisme. Ensuite, mes observations suggèrent que cette augmentation du calcium intracellulaire pourrait jouer un rôle déterminant dans la prévention des formes sévères de la maladie en réduisant la parasitémie dans une culture de globule rouge infecté.

Étant donné l'expression conjointe de *PIEZO1* et d'*ATP2B4* dans les globules rouges, j'ai exploré leur interaction statistique afin d'identifier un potentiel effet synergique. Pour approfondir cette analyse, j'ai étudié l'impact direct de la modulation du calcium intracellulaire en bloquant PMCA4 et en activant PIEZO1. Ces expériences, réalisées à l'aide de cultures cellulaires et de cytométrie, ont permis d'évaluer précisément les effets de ces régulateurs de l'homéostasie calcique sur la parasitémie.

Contribution : Dans cet article, ma contribution a été de réaliser le génotypage du variant E756Del. J'ai également participé aux analyses statistiques et bioinformatique et à l'interprétation des résultats. J'ai aussi participé à la rédaction de l'article et la réalisation des figures.

Genes & Diseases (2023) 10, 2210–2214

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.keaipublishing.com/en/journals/genes-diseases



RAPID COMMUNICATION

Concurrent PIEZO1 activation and ATP2B4 blockade effectively reduce the risk of cerebral malaria and inhibit *in vitro* *Plasmodium falciparum* multiplication in red blood cells

Malaria caused by the *Plasmodium falciparum* parasite is responsible for more than 240 million cases per year and killed 627,000 people in 2020, mostly African children. The malaria parasite is transmitted by mosquitos belonging to the genus *Anopheles*. After an asymptomatic liver stage, the parasite is released into the bloodstream to invade red blood cells (RBCs) and replicate asexually. This erythrocytic phase is associated with a variety of clinical manifestations, including mild and severe malaria. Cerebral malaria (CM) is one of the most severe forms, characterized by the sequestration of parasitized RBCs in the small capillaries of the brain and the local development of cytokine-mediated inflammation. Genetic variants in genes encoding proteins involved in red blood cell physiology are protective factors against severe malaria, as clearly demonstrated for the sickle cell variant of hemoglobin (HbS). Rare gain-of-function mutations in Piezo1, a mechanosensitive calcium channel, are involved in hereditary xerocytosis, a disease characterized by red cell dehydration and mild hemolysis. Interestingly, RBC dehydration is associated with reduced *Plasmodium* infection *in vitro*[1] suggesting that *PIEZO1* polymorphisms may protect against malaria. Recently, a gain-of-function *PIEZO1* E756del variant (rs59446030) under positive selection in Africa, was associated with protection against severe malaria in children in Gabon.[2] However, a large case–control study in Ghana failed to replicate this association.[3] In this study, we sought to further characterize the role of this *PIEZO1* polymorphism in malaria by confirming its association in a Senegalese population and identifying the genetic interaction with polymorphisms in the *ATP2B4* gene that encodes PMCA4, the major RBC calcium pump. We prove that activation of Piezo1 modulates intracellular calcium concentration and inhibits *Plasmodium falciparum* multiplication in RBCs. Furthermore, we demonstrated the additive effect of Piezo1 activation and PMCA4 blockade on the inhibition of parasite multiplication in erythrocytes.

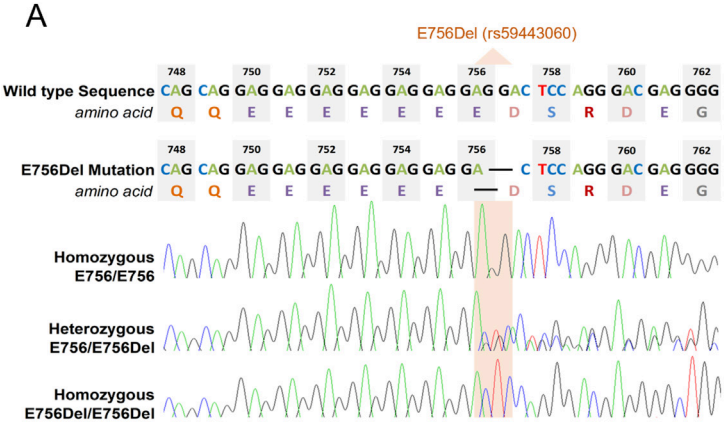
The E756del variant of *PIEZO1*, a 3-nucleotide deletion (GGA) in the coding region of the gene, results in the deletion of glutamic acid (Fig. 1A). Genotyping of this mutation was performed in a Senegalese population composed of 82 individuals with CM, 27 with severe malaria, 74 with mild malaria, and 77 healthy controls living in Dakar (Table S1). Genotype frequencies were consistent with Hardy–Weinberg Equilibrium. We found that the E756del variant was strongly associated with protection against CM ($P = 0.007$, odds ratio = 0.36 [0.17–0.76]) in our Senegalese population using a Fisher's exact test and logistic regression analysis (Fig. 1B). This association remained significant even when age was included as a covariate in the statistical model ($P = 0.009$, odds ratio = 0.35 [0.16–0.77]). Our results are consistent with a previous study showing that Piezo1 gain-of-function mice are protected against experimental CM.[1] In addition, we evaluated the effect of this *PIEZO1* variant in combination with the *ATP2B4* haplotype of 5 regulatory SNPs (rs11210734-rs1541252-rs1541253-rs1541254-rs1541255) (Table S1) that we previously showed to be associated with severe malaria.[4] In this study, we showed that individuals having at least one *ATP2B4* minor allele haplotype are protected against CM ($P = 0.04$, estimated odds ratio = 0.5 [0.26–0.93]) (Fig. 1C). Second, we demonstrated a combined effect between the protective

Peer review under responsibility of Chongqing Medical University.

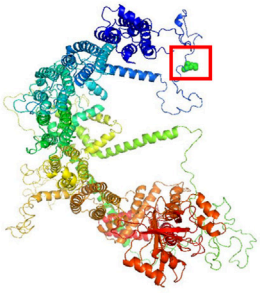
https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.02.029

2352-3042/© 2023 The Authors. Publishing services by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co., Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

A



H



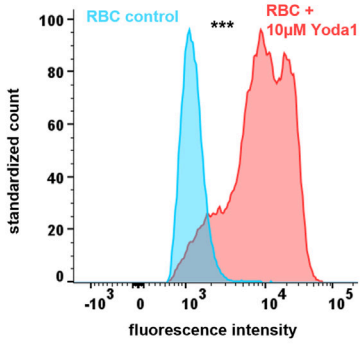
B

Variant	Minor allele	Protective genotype	Ctrl (n=77)	MM (n=74)	SM (n=27)	CM (n=82)	Odd ratio (95% CI) Ctrl vs MM	Odd ratio (95% CI) Ctrl vs SM	Odd ratio (95% CI) Ctrl vs CM
rs59446030 (GGA> -)	E756Del	E756/E756Del	28 (36%)	18 (24%)	9 (33%)	14 (17%)	0.56 (0.28 - 1.14)	0.88 (0.35 - 2.21)	**0.36** (0.17 - 0.76)**

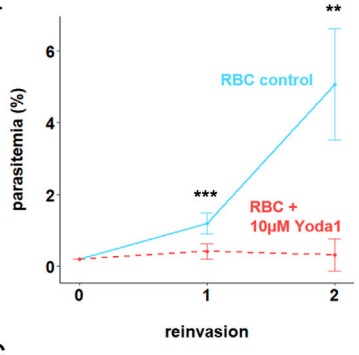
C

Variant present	Ctrl	CM	Odd ratio (95% CI)	P-value (two-tailed)
PIEZO1				
Risk genotypes (DEL/DEL + WT/WT)	49	68	1	-
Protective genotype (WT/DEL)	28	14	0.36 (0.17-0.76)	0.007
ATP2B4				
Risk haplotype (Major/Major)	26	45	1	-
Protective haplotypes (Major/Minor + Minor/Minor)	49	42	0.50 (0.26-0.93)	0.04
Combination				
Risk genotypes PIEZO1/haplotype ATP2B4	17	33	1	-
Protective genotypes PIEZO1/haplotype ATP2B4	17	5	0.15 (0.05-0.48)	0.0009
Interaction PIEZO1 × ATP2B4			0.28 (0.13-0.61)	0.001

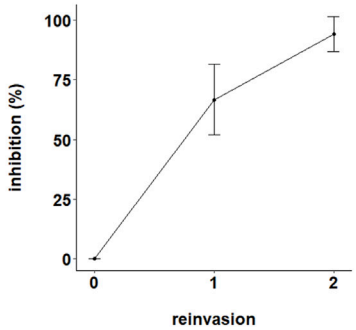
D



E



F



G

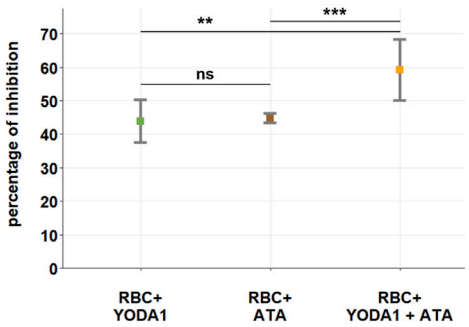


Figure 1 The combination of genetic variants in the *ATP2B4* and *PIEZO1* genes protects against cerebral malaria by altering calcium homeostasis that inhibits *P. falciparum* reinvasion. **(A)** Description of the E756Del mutation of *PIEZO1*. The E756Del mutation (rs59446030) is a 3-base pair DNA deletion in a GGA repeat and results in a deletion of a glutamate (E) amino acid. The ancestral genotype consists of 8 repeats of the GGA motif, compared to 7 repeats in E756Del mutation. Genotyping was performed

genotype of *PIEZO1* and the protective haplotype of *ATP2B4* ($P = 9.10-4$, odds ratio = 0.15 [0.05—0.48]) (Fig. 1C). We also identified a significant genetic interaction between *ATP2B4* and *PIEZO1* variants using logistic regression analysis ($P = 1.10-3$ (odds ratio = 0.28 [0.13—0.61]) (Fig. 1C). For individuals heterozygous and homozygous for the haplotype with minor *ATP2B4* alleles, the odds ratio was 0.5. In contrast, for individuals with both the protective heterozygous genotype for *PIEZO1* and the protective *ATP2B4* haplotype, the odds ratio was 0.15, indicating stronger protection against CM. *ATP2B4* encodes PMCA4, a calcium pump, and E756Del is a gain-of-function mutation that increases the activity of the mechanosensitive cationic channel Piezo1, both of which are expressed on the surface of RBCs. To assess *in vitro* the effect of Piezo1 activation on intracellular calcium, we incubated human RBCs from a healthy blood group O donor provided by the local blood bank (Etablissement Français du Sang) with Yoda 1, a specific activator of Piezo1. As shown in Figure 1D, in each of the two experiments performed, cells treated with Yoda1 had a 10-fold increased calcium concentration ($P < 0.0001$) compared with cells without Yoda1. Similarly, a meta-analysis considering MFI, SD, and sample size showed increased calcium concentration in Yoda1-treated cells ($P < 0.001$). Yoda1 (in the micromolar range) causes increased opening of Piezo1 in response to mechanical stimulation, thus allowing massive calcium entry. In the RBC, increased intracellular calcium activates the GARDOS channel, resulting in potassium efflux, water loss, and cellular dehydration.[5] Piezo1 is an important channel for maintaining calcium homeostasis and RBC volume. Then, using synchronized mature stages parasites (*Plasmodium falciparum* 3D7 strain) incubated in the presence of 10 μM of Yoda1 for three days, we showed that after two invasions, parasitemia increased from 0.2% to 5% in the control culture without Yoda1 while it dropped to 0.32% in the culture with Yoda1 ($P = 0.002$) (Fig. 1E). As shown in Figure 1F, the percentage of inhibition reached 94% after two invasions on day 3, confirming that the increase in intracellular calcium in erythrocytes prevents parasite multiplication. We thus demonstrated *in vitro* that parasite multiplication is significantly inhibited by the chemical activation of Piezo1 in agreement with a previous study. We have previously shown that the *ATP2B4* minor allele haplotype is associated with a decrease in enhancer activity and, consequently a decrease in the long PMCA4a and PMCA4b transcripts, the two isoforms expressed mainly in the brain and red blood cells respectively.[4] This decrease in *ATP2B4* expression leads to increased intracellular calcium[4] probably due to a functional impairment of active calcium extrusion. To evaluate the effect of PMCA4 inhibition on parasite growth, experiments were performed in the presence of ATA (aurintricarboxylic), a specific inhibitor of PMCA4. At 100 μM of ATA, we observed approximately 44%

by PCR amplification using the forward primer 5′-CAGGCAGGATGCAGTGAGTG-3′ and the reverse primer 5′-GGACATGGCACAGCAGACTG-3′, followed by Sanger sequencing. The chromatogram shows the result of three observed genotypes, homozygous E756, heterozygous E756/E756Del, and homozygous E756Del. **(B)** Association of the *PIEZO1* mutation with cerebral malaria in the Senegalese population-based study. A total of 260 individuals were genotyped, including 77 healthy individuals (Control, Ctrl), 74 subjects with mild malaria (MM) characterized by symptoms such as headache, fever, nausea, 27 cases of severe malaria (SM) without neurological symptoms, and 82 cases of cerebral malaria (CM) characterized by deep coma (GCS <9). We performed the statistical analysis with IBM SPSS Statistics. Fisher's exact test was used to calculate *P*-values without any covariate ($P = 0.006$). **(C)** Association of *PIEZO1* mutation and *ATP2B4* regulatory variants with cerebral malaria. *P*-values and odds ratios were calculated using logistic regression to assess the association of *PIEZO1* and *ATP2B4* genetic variants separately or in combination. Considering the combination of the protective genotype of *PIEZO1* with the protective haplotypes of *ATP2B4*, the association was highly significant by both Fisher's exact test and logistic regression. **(D)** Visualization of calcium concentration in red blood cells without (blue) and with (pink) Yoda 1 treatment. Culture of red blood cells from healthy donor blood was performed for 24 h in the presence of the agonist Yoda1 at a final concentration of 10 μM. Intracellular calcium was measured by flow cytometry with Fluo-4. Fluorescence intensity was estimated on 20,000 labeled red blood cells. Analyzing each of the two experiments performed with Yoda1-treated cells showed a significant increase in calcium concentration compared with cells without Yoda1 ($P < 0.0001$). **(E)** Estimation of *in vitro* parasitemia without (blue) and with (pink) Yoda1. *P. falciparum* (3D7 strain) culture was synchronized by sorbitol treatment. 24 h later, the percentage of parasitemia was brought to 0.2% and the parasites were cultured in the presence of 10 μM of Yoda1 for 2 reinvasions. Parasitemia was determined by flow cytometry, using SYBR Green to label the parasites, after 24 h and 72 h of culture in the presence of Yoda1. A paired sample *t*-test was performed to assess the impact of Yoda1 on the parasite. During the first and second reinvasion, the percentage of parasitemia was lower in the presence of Yoda1 ($P = 0.0007$ and $P = 0.002$, respectively). **(F)** Inhibition of parasite invasion. Percentage inhibition of parasite invasion was estimated on days 1 and 3 of infected red blood cells culture in the presence of 10 μM Yoda1. **(G)** *In vitro* inhibition of parasite invasion using ATA (aurintricarboxylic acid), a specific inhibitor of PMCA4 (the plasma membrane calcium ATPase 4) encoded by *ATP2B4* and/or Yoda1 an activator of PIEZO1. A culture of *P. falciparum* (3D7 strain) was synchronized by sorbitol treatment and incubated 24 h later in the presence of either Yoda1 at 1.8 μM (green), ATA at 100 μM (brown), or both ATA at 100 μM and Yoda1 at 1.8 μM (orange). After 24 h of treatment, the parasitemia of each culture was determined by flow cytometry, using SYBR Green to label the parasites. Student's *t*-test was used to calculate *P*-values. Stronger inhibition was observed by combining Yoda1 and ATA ($P = 0.001$ and $P < 0.001$ compared to Yoda1 and ATA, respectively). No statistical difference was observed between Yoda1 and ATA (*P*-value = 0.254). **(H)** Conformation of the human PIEZO1 protein. Representation of the monomer of human PIEZO1 constructed by sequence homology with mice (Uniprot KB - E2JF22) using the SWISS-MODEL. The result was visualized on PyMOL. Position E756 is shown in the red frame. The region containing this mutation in humans is not conserved in mice, which does not allow us to establish a 3D structure of this region by sequence homology. Data are represented ± standard deviation. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. ns, not significant.

parasite inhibition, and similarly, we observed 45% inhibition in the presence of Yoda1 at 1.8 μM (Fig. 1G). Interestingly, when ATA and Yoda1 were added simultaneously, we achieved significantly stronger inhibition of 59% (Fig. 1G) compared with Yoda1 ($P = 0.001$) or ATA ($P < 0.001$), supporting the additive effect of PIEZO1 and ATP2B4 variants. To date, no human structure of Piezo1 has been established, and the region containing the E756Del mutation is not conserved in the mouse model, making it impossible to establish the impact of this mutation on the 3D conformation of the protein (Fig. 1H). However, we can assume that the E756Del mutation alters the secondary structure of Piezo1, resulting in a gain of function. Furthermore, the *PIEZO1* mutation and *ATP2B4* regulatory variants may play a key role in the protection against CM through the biological function of these genes in other cell types such as T cells, B cells, and astrocytes. Indeed, the increase of intracellular calcium is one of the activation signals of the T cells promoting the elimination of the parasite. In addition, the increase in intracellular calcium in astrocytes leads to a reduction in the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines such as IL-1β, TNFα, and CXCL1 and thus may protect against CM. Moreover, PIEZO1 appears to play an important role in B cell responses to membrane-associated antigens.

In conclusion, we confirmed that the Piezo1 gain-of-function mutation is associated with protection against CM in a Senegalese population. Our results also indicate that the combination of the *PIEZO1* mutation and the *ATP2B4* SNPs further protects individuals against CM probably because they disrupt cell calcium homeostasis. Indeed, the activation of Piezo1 and the alteration of PMCA4 simultaneously affect parasite multiplication *in vitro* because of increased intracellular calcium.

Ethics declaration

The Comité d'Ethique de la Recherche de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar has approved the protocols. Each participant, their parents, or legal guardians for any minors before inclusion has received written or verbal information in their native language and given written consent.

Author contributions

SM and PR designed and supervised the project. MA genotyped the E756Del variant, and SN and MT participated in *ATP2B4* genotyping. AT extracted the DNA samples and performed whole genome amplification. AT, FT, and BM were involved in the recruitment, the follow-up of Senegalese individuals, and the collection and interpretation of biological data, under AD supervision. BP performed cytometry experiments for intracellular calcium levels and parasite growth rate estimation. MA, PR, and SM performed statistical analyses and interpreted the results. MA and SM wrote the paper. SM and PR supervised the whole research and provided guidance. All authors read the manuscript and approved the final version before submitting the article.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Funding

This work was supported by the African Higher Education Centers of Excellence Project (CEA-SAMEF) at UCAD, the Pasteur Institute in Dakar, the Pasteur Institute in Paris, the French Embassy in Senegal, INSERM, and Aix-Marseille University. MA and SN were supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Research and the Higher Education Commission (HEC) in Pakistan, respectively. This work received support from the French Government under the France 2030 Investment Plan, as part of the Initiative d'Excellence d'Aix-Marseille Université - A*MIDEX - Institute MarMaRa (No. AMX-19-IET-007).

Acknowledgements

We thank all the individuals who participated in the study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.02.029.

References

1. Ma S, Cahalan S, LaMonte G, et al. Common *PIEZO1* allele in African populations causes RBC dehydration and attenuates *Plasmodium* infection. *Cell*. 2018;173(2):443—455.
2. Nguetse CN, Purington N, Ebel ER, et al. A common polymorphism in the mechanosensitive ion channel *PIEZO1* is associated with protection from severe malaria in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(16):9074—9081.
3. Thye T, Evans JA, Ruge G, et al. Human genetic variant E756del in the ion channel PIEZO1 not associated with protection from severe malaria in a large Ghanaian study. *J Hum Genet*. 2022; 67(1):65—67.
4. Nisar S, Torres M, Thiam A, et al. Identification of *ATP2B4* regulatory element containing functional genetic variants associated with severe malaria. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9):4849.

5. Maher AD, Kuchel PW. The Gárdos channel: a review of the Ca^{2+}-activated K^{+} channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(8):1182—1197.

Mathieu Adjemout [a], Bruno Pouvelle [a], Fatou Thiam [b], Alassane Thiam [c], Magali Torres [a], Samia Nisar [a], Babacar Mbengue [d], Alioune Dieye [d], Pascal Rihet [a,1,*], Sandrine Marquet [a,e,1,*]

[a] *Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche (UMR) U1090, Aix Marseille Université, TAGC Theories and Approaches of Genomic Complexity, Institut MarMaRa, Marseille, France*
[b] *Groupe de Recherche Biotechnologie Appliquée et Bioprocédés Environnementaux (GRBA-BE), Ecole Supérieure Polytechnique, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar BP5005, Senegal*
[c] *Pole D'Immunophysiopathologie & Maladies Infectieuses (IMI), Institut Pasteur de Dakar, Dakar BP 220, Senegal*
[d] *Service D'Immunologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar BP5005, Senegal*
[e] *Aix Marseille University, CNRS, Marseille 13009, France*

*Corresponding author. Aix Marseille University, INSERM, TAGC, Marseille, 13288, France.
E-mail addresses: pascal.rihet@univ-amu.fr (P. Rihet), sandrine.marquet@univ-amu.fr (S. Marquet)

1 October 2022
Available online 27 March 2023

[1] These authors contributed equally to this work.

III. Déchiffrage D'un Elément Cis-Régulateur Dual Présent Dans Un Locus Associé Au Paludisme Grave

Article 4: Unraveling an enhancer-silencer regulatory element showing epistatic interaction with a variant that escaped genome-wide association studies

Mathieu Adjemout*, Samia Nisar*, Amélie Escandell, Hong Thu Nguyen Huu, Magali Torres, Alassane Thiam, Iris Manosalva, Babacar Mbengue, Alioune Dieye, Salvatore Spicuglia, Pascal Rihet,Sandrine Marquet

*M. A. et S. N. ont contribué à parts égales à ce travail

bioRxiv preprint, https://doi.org/10.1101/2024.03.18.585566

Publié le : 19 mars 2023

Article en cours de révision dans *Cell Genomics*

Comme mentionné précédemment, au sein du laboratoire, il a été identifié cinq SNPs régulateurs localisé dans un promoteur alternatif d'*ATP2B4.* Ce promoteur présente la particularité d'exercer à la fois une fonction promotrice sur les transcrits courts d'*ATP2B4* et une activité enhancer sur les transcrits longs. Cet élément est couramment désigné sous le nom d'Epromoteur (pour Enhancer-promoteur). Ainsi, l'haplotype mineur détecté dans l'Epromoteur est responsable d'une réduction de l'activité enhancer et d'une augmentation de l'activité promotrice (Nisar *et al.*, 2022). Puisque les enhancers sont capables de réguler plusieurs gènes à distance, nous avons émis l'hypothèse, à laquelle j'ai tenté de répondre, que cet élément Epromoteur est capable de réguler d'autres gènes de la région.

Pour répondre à ce défi, nous avons réalisé une nouvelle approche intégrant les données génétiques et épigénétiques, en combinant des analyses bioinformatiques et expérimentales. Grâce aux données issues de capture-Hi-C, j'ai pu identifier que l'Epromoteur interagit avec le promoteur du gène *LAX1*, un gène impliqué dans la régulation négative de l'activation des cellules T. Cette étude a permis de faire une découverte étonnante, le premier élément cis-régulateur dual, présentant à la fois une activité enhanceur (E) sur le gène *ATP2B4* et une activité silenceur (S) sur le gène *LAX1*, au sein du même type cellulaire humain. Nous avons nommé cet élément "ESpromoteur". Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives fascinantes dans la compréhension des mécanismes régulateurs complexes impliqués dans la susceptibilité au paludisme.

Nous avons ensuite démontré que la fonction silenceur de ce ESpromoteur sur le gène cible *LAX1* est modulée par un variant fonctionnel, le rs11240391, situé dans la région promotrice

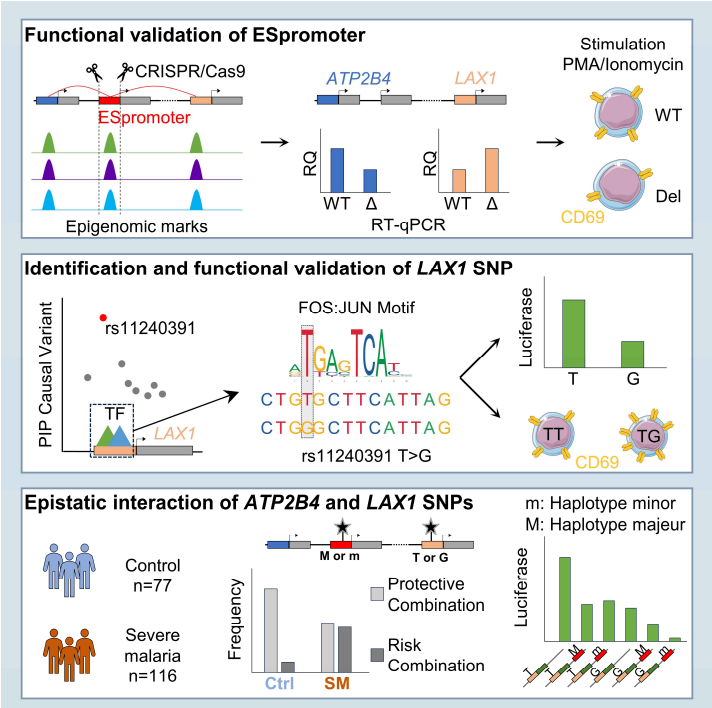
de *LAX1*. Ce variant causal réduit l'expression de *LAX1* en perturbant le recrutement du facteur de transcription AP-1. Fait remarquable, il n’est en déséquilibre de liaison avec aucun autre polymorphisme, ce qui le rend indétectable par les approches GWAS traditionnelles en raison de son absence parmi les SNPs génotypés. Enfin, grâce à des analyses cellulaires approfondies, j’ai mis en évidence que ce variant altère directement l’activation/inhibition des cellules T, révélant un mécanisme inédit de susceptibilité au paludisme. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de régulation et soulignent l'importance de développer des approches multi-omiques (intégration de différents types de données génétiques, génomique et épigénétique) pour identifier des variants régulateurs non détectables par des techniques conventionnelles.

Contribution : Dans cet article, ma contribution a été la réalisation des analyses bioinformatiques, des tests statistiques et des expériences de cytométrie en flux. J'ai également réalisé les figures et participé à la rédaction et à la révision de l'article.

Unraveling an enhancer-silencer regulatory element showing epistatic interaction with a variant that escaped genome-wide association studies

Mathieu Adjemout,[1,#] Samia Nisar,[1,#] Amélie Escandell,[1] Romain Torres,[2] Magali Torres,[1] Hong Thu Nguyen Huu,[1] Alassane Thiam,[3] Iris Manosalva,[1] Babacar Mbengue,[4] Alioune Dieye,[4] Véronique Adoue,[2] Salvatore Spicuglia,[1] Pascal Rihet,[1] Sandrine Marquet,[1,5,6,*]

[1]Aix-Marseille Univ, INSERM, TAGC, MarMaRa Institute, Marseille, France
[2]Infinity, Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases, University of Toulouse, Inserm U1291, CNRS U5051, Toulouse, France
[3]IMI, Institut Pasteur de Dakar, Dakar BP 220, Sénégal
[4]Service D'Immunologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar BP5005, Sénégal
[5]Aix-Marseille Univ, CNRS, Marseille, France
[6]Lead Contact
*Correspondance: sandrine.marquet@univ-amu.fr (S.M.)
[#]equal contribution



In brief:

Adjemout and Nisar et al. identify a dual enhancer-silencer regulatory element, the 'ESpromoter'. They discovered an epistatic interaction between the ESpromoter haplotype and an *LAX1* promoter variant, which escaped GWAS detection and is responsible for severe malaria susceptibility through T-cell activation. They demonstrate the power of multi-omics approaches to decipher regulatory mechanisms.

KEYWORDS

• Cis-regulatory elements • Enhancer-Silencer • Dual function • Epistatic interaction • Functional variants • Severe malaria • T-cells activation • Transcriptional regulation

HIGHLIGHTS

- Dual enhancer-silencer element (ESpromoter) in a single human cell type
- Functional SNP for severe malaria risk that escaped genome-wide association studies
- Genome editing at the SNP impacts *LAX1* expression and T-cell activation
- Epistatic interaction between SNPs increases the risk of severe malaria

SUMMARY
Regulation of gene expression has recently been complicated by identifying Epromoters, a subset of promoters with enhancer function. Here, we uncovered a dual cis-regulatory element, "ESpromoter," exhibiting both enhancer and silencer function as a regulator of the nearby genes *ATP2B4* and *LAX1* in single human T cells. Through an integrative approach, we pinpointed functional rs11240391, a severe malaria risk variant that escapes detection in genome-wide association studies, challenging conventional strategies for identifying causal variants. CRISPR-modified cells demonstrated the regulatory effect of ESpromoter and rs11240391 on *LAX1* expression and T-cell activation. Furthermore, our findings revealed an epistatic interaction between ESpromoter SNPs and rs11240391, impacting severe malaria susceptibility by further reducing *LAX1* expression. This groundbreaking discovery challenges the conventional enhancer-silencer dichotomy. It highlights the sophistication of transcriptional regulation and argues for an integrated approach combining genetics, epigenetics, and genomics to identify new therapeutic targets for complex diseases.

INTRODUCTION
Gene expression is tightly regulated in time and space to ensure that genes are switched on or off at the right times and in the right amounts. Disruption of this regulation can result in a wide range of diseases and syndromes, including cancers[1,2], neurological[3,4], developmental disorders, autoimmune, cardiovascular, and infectious diseases[5]. Gene expression profiling has therefore emerged as a powerful approach for gaining deeper insights into the pathological mechanisms of complex diseases by identifying specific transcriptomic signatures linked to these pathologies[6–13].
In humans, the regulation of gene expression occurs through the intricate interplay between proximal promoters located near the 5' end of genes, responsible for initiating their expression, and distal cis-regulatory elements (CREs), known as enhancers[14]. These enhancers can activate gene transcription over large distances and independently of orientation. Recent studies have unveiled that a subset of promoters can also serve as enhancers, termed "Epromoters"[15–18]. By assessing all human core promoters of coding genes, it was shown that around 3% of promoters exhibited enhancer activity in each cell line[15]. These Epromoters often regulate several distal genes, suggesting that they may function as regulatory hubs for the coordinated regulation of gene clusters[16,18]. Moreover, Epromoters appear to be associated with a higher density of Transcription factors (TFs) binding and a higher quality of binding sites[15,16]. This is consistent with Epromoters being preferentially associated with housekeeping[19] and stress response genes[20], including interferon-response genes. Investigating these promoters, enhancers, or Epromoters is essential for understanding complex gene regulation, as they wield the power to directly influence physiological traits or diseases by simultaneously regulating the expression of numerous proximal and distal genes. Furthermore, the presence of sequence variations within these regulatory elements adds another layer of molecular complexity. These variations have the potential to directly impact disease development by altering the binding sites for transcription factors, leading to the deregulation of target gene expression. The cis effects of non-coding variants on gene expression could be the main risk factor for complex phenotypic traits and disease susceptibility, as supported by genome-wide association studies (GWAS). Over 90% of the variants uncovered through GWAS are located in non-coding genome regions, frequently lacking comprehensive functional annotations[21,22]. Consequently, the study of the functional significance of specific risk variants is becoming essential to elucidate the underlying

pathogenesis in the fields of biology and health. Despite the identification of numerous genomic loci associated with severe malaria, the precise causal genetic variants, the genes responsible, and the mechanisms by which they operate remain largely unknown. Identifying these regulatory variants and elucidating their functional implications is a major challenge requiring new approaches.

To address this challenge, we have devised an innovative strategy to identify causal variants associated with severe malaria within regulatory elements by dissecting their impact on gene expression. Given the persistent threat to public health posed by malaria, this study is of paramount importance in improving our understanding of the regulatory mechanisms governing malaria susceptibility genes. This knowledge is essential for developing innovative, effective, and sustainable therapeutic interventions. In this context, we have established a comprehensive pipeline that integrates genetic and epigenomic data using a combination of bioinformatics and experimental approaches. Our previous research resulted in the identification of an Epromoter within the *ATP2B4* gene locus[17], demonstrating the efficacy of our strategy. This Epromoter comprises five regulatory variants -namely rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255- all of which have been associated with severe malaria[17,23] and are in strong linkage disequilibrium (LD) with the non-functional lead SNP (rs10900585) previously identified by genome-wide association studies (GWAS)[24–28]. The current challenge is to establish the link between this disease-associated region and the genes affected while identifying the specific cell types involved. This is essential for unraveling the mechanisms and biological pathways underlying the genetic susceptibility of individuals to malaria.

Here, our aim was, therefore, to assess the ability of this *ATP2B4* Epromoter to regulate the expression of other genes within this same genomic region, potentially involved in malaria susceptibility. Thanks to this study, we have discovered a dual cis-regulatory element exhibiting both an enhancer (E) activity on the *ATP2B4* gene and a silencer (S) activity on the *LAX1* gene in the same human cell type, which we called “ESpromoter”.

Subsequently, we have demonstrated that the silencing function of this ESpromoter on the *LAX1* target gene is influenced by the presence of a functional variant (rs11240391) located in its promoter region, revealing an epistatic interaction between them. This causal variant, which is not in LD with any other polymorphism in African populations, cannot be detected through Genome-Wide Association Studies (GWAS) due to its absence among genotyped Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Furthermore, our research also highlights the limitations inherent in the exclusive use of GWAS strategies to identify causal variants. We illustrate that our more comprehensive approach, integrating multi-omics data, proves more effective in identifying regulatory elements and variants.

RESULTS

LAX1 is a target of *ATP2B4* Epromoter

Characterized as Epromoter, the *ATP2B4* internal promoter can potentially interact with other genes, even those hundreds of kilobases away. Prediction of the interaction between Genehancer regulatory elements and neighboring genes suggested that the *ATP2B4* Epromoter may have four target promoters, including *ATP2B4*, *LAX1*, *ZC3H11A,* and *OPTC* (Figure 1A). Promoter capture Hi-C data from CD4+ T cells[29], revealed a significant T-cell specific interaction between *ATP2B4* Epromoter and both *LAX1* and *ATP2B4* promoters (Figure 1B, Figure S1). However, no significant interaction was detected between the *ATP2B4* Epromoter and the *ZC3H11A* and *OPTC* genes in CD4+ T cells[29].

To further investigate these interactions, we analyzed HiChiP data based on histone 3 lysine 27 (H3K27ac) from various cell types, including T cells[30]. We observed that the *ATP2B4* Epromoter interacts with the *ATP2B4* promoter across all tested cell types, indicating that this specific interaction is not restricted to T cells (Figure 1C). Additionally, the interaction between the *ATP2B4* Epromoter and the *LAX1* promoter, initially identified in primary CD4+ T cells using PCHiC data [29], was also confirmed in three CD4+ T cell lines (Treg, Th17, and Naive T primary cells) using HiChiP data (Figure 1C). These data indicate that the Epromoter interacts simultaneously with the *ATP2B4* and *LAX1* promoters only in T cells.

***ATP2B4* Epromoter and the *LAX1* promoter are active chromatin regions in CD4+ T cells.**
To further characterize the epigenetic context of *ATP2B4* in immune cells, we looked at chromatin features that may be useful for identifying potential regulatory regions and their cell-specific function. More specifically, the study of chromatin accessibility using ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing) profiles in various human immune cells[31] confirmed the existence of cell-specific open chromatin in the *ATP2B4* locus (Figure 1D). Particularly high accessibility was observed in CD4+ T cells for the cis-regulatory region containing malaria-associated variants and for the *LAX1* promoter. These two regions also showed chromatin accessibility in CD8+ T cells and Natural Killer (NK) cells (Figure 1D). These open regions could serve as binding sites for transcription factors, facilitating cell-specific regulation. We have also studied other epigenetic features, such as histone marks, in CD4+ T cells, where an interaction between these two regions was established. The analysis of acetylation profiles of H3K27Ac profiles from Roadmap data[32], accessible via the WashU genome browser, revealed active gene regulatory elements corresponding to the *ATP2B4* Epromoter and the *LAX1* promoter in CD4+ T cells (Figure 1E). Notably, malaria-associated SNPs were found to align with an H3K27Ac peak in CD4+ T cells. In addition, the *ATP2B4* Epromoter showed an H3K4me1 mark stronger than the H3K4me3 mark, whereas the *LAX1* promoter exhibited a more pronounced H3K4me3 mark. These observations are consistent with their respective roles as enhancers or promoters in this specific cell type. These characterizations confirm that the *ATP2B4* Epromoter and the *LAX1* promoter are active chromatin regions (ACRs) in CD4+ T cells. Overall, the data indicates a strong correlation between DNA accessibility and histone marks, supporting T cells as a pertinent model for investigating the underlying regulatory mechanisms. Interestingly, similar profiles were observed for Jurkat cells, a human T cell line (Figure S2), which prompted us to use them for further experiments aimed at elucidating the regulatory mechanisms governing these regions.

The *ATP2B4* cis-regulatory element has a dual enhancer-silencer function in a single-cell type
We performed genome editing experiments in the Jurkat cell line to determine the regulatory function of the *ATP2B4* CRE on the target genes (*ATP2B4* and *LAX1*). We deleted a 506 bp region encompassing the rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255 SNPs using CRISPR-Cas9 with two flanking guide RNAs (gRNAs) (Figure 2A). Three clones with a 506 bp biallelic deletion (Δ1, Δ2, and Δ3) were generated from a total of 457 screened clones. An unedited wild-type clone, also exposed to the CRISPR-Cas9 complex, was selected. Expression of these genes was assessed without and with stimulation, since *LAX1*, which is involved in TCR signaling, requires PMA/ionomycin stimulation to be induced. In the wild-type, a slight decrease in the expression of long *ATP2B4* transcripts was observed under PMA/ionomycin stimulation (Figure 2B) as previously observed[33]. Deletion of the 506 bp region

in the Jurkat cells resulted in decreased expression of the *ATP2B4* long transcripts, with or without PMA/ionomycin stimulation (Figure 2B), with a 1.8-, 1.2- and 2.9-fold decrease for Δ1, Δ2, and Δ3 respectively in stimulated condition ($p < 0.01$).

As shown in Figure 2C, the *LAX1* gene has a PMA/ionomycin-inducible promoter whose expression increased 3-fold in wild-type Jurkat cells after stimulation. However, *LAX1* gene expression increased significantly in all three clones with the 506 bp deletion in the presence or absence of stimulation. Thus, the *LAX1* gene is highly expressed in Δ1, Δ2 and Δ3 clones, even in the absence of stimulation (Figure 2C).

These data demonstrate that deletion of the *ATP2B4* cis-regulatory element simultaneously results in decreased *ATP2B4* expression and increased *LAX1* expression in the Jurkat cell line. These results suggest that the cis-regulatory region acts as an enhancer for *ATP2B4* and as a silencer for *LAX1*. We have therefore identified a type of regulatory element that we named "ESpromoter", which has the dual function of both enhancer and silencer in the same cell type (Figure S1).

The dual enhancer-silencer function is independent of the variants within the ESpromoter

To confirm the dual function of the cis-regulatory element of *ATP2B4* (ESpromoter) and assess the impact of SNPs on gene regulation, we performed luciferase gene reporter assays in the Jurkat cell line. First, we transfected the cells with a construct containing the ESpromoter region downstream of the luciferase reporter gene and the 780-bp *ATP2B4* long transcript promoter upstream of luciferase (Figure 2D). We initially validated the promoter activity of this 780-bp region compared to the basic vector ($p < 0.0001$, with a 40-fold increase). We also confirmed the enhancer activity of the 601-bp ESpromoter containing the five SNPs on the *ATP2B4* promoter without stimulation ($p < 0.01$, with a 1.3-fold increase) and with PMA/ionomycin stimulation for 24 hours. However, no significant difference was observed between the constructs with minor or major alleles for the 5 SNPs located in the ESpromoter (Figure 2D). We then transfected Jurkat cells with constructs in which the *ATP2B4* promoter was replaced by the 810-bp *LAX1* promoter region. We showed the activity of the *LAX1* promoter after 6 h or 24 h of PMA/ionomycin stimulation compared to the basic vector ($p < 0.0001$, fold increase of 20 for 6 hours and 39 for 24 hours) (Figure 2E) as well as the silencing effect of the ESpromoter region on *LAX1* promoter ($p < 0.0001$, fold decrease of 2.24 for 6 hours and 2.45 for 24 hours). The decrease in expression was the same for both major and minor haplotypes. These data confirm that this regulatory region exhibits enhancer and silencer activity independent of *ATP2B4* SNP alleles in the Jurkat cell line. Therefore, we have confirmed the existence of a regulatory element, "ESpromoter", with a dual enhancer-silencer function.

Increased expression of *LAX1* in clones lacking the ESpromoter region delayed T-cell activation

Since the adaptor protein LAX functions as a negative regulator of lymphocyte signaling[34], an increase in *LAX1* expression is expected to prevent T lymphocyte activation. To evaluate the activation of Jurkat wild-type cells and Jurkat clones lacking the ESpromoter region after PMA/ionomycin stimulation, we followed the surface expression of CD69, a T cell surface activation marker rapidly induced after stimulation through the T cell antigen receptor (TCR) as a measure of T cell activation. Jurkat unmodified cells and deleted clones were stimulated for 4 hours with PMA/ionomycin, and CD69 cell surface expression was measured before

stimulation, at 15-minute intervals between 1 and 2 hours, and at the end of the 4-hour period after stimulation (Figure 2F, 2G, 2H). We showed that the number of CD69-positive cells was similar for wild-type Jurkat cells and the unedited wild-type clone exposed to CRISPR-Cas9 (WTc) at all stimulation times (Figure 2F and 2G). The number of CD69-positive cells increased with stimulation time for the WT, WTc, and Δ3. However, at each time point, the number of CD69-positive cells was higher for unmodified cells (WT and WTc) compared to clone Δ3, with around 90% and 70%, respectively, after 4 h of stimulation. This difference was statistically significant using a paired t-test ($p = 0.001$) (Figure 2F and 2H).

ESpromoter sequence is essential for normal human primary T cell activation

To investigate the functional role of ESpromoter in human primary T cells, we performed CRISPR-Cas9 mediated deletion of its sequence in purified naive CD4+T cells (Figure S3A), followed by 24 hours of TCR activation using CD3/CD28/CD2 soluble antibody complexes. To assess cytokine production, a 4-hour restimulation step with PMA/ionomycin/BFA was included. The genomic deletion was validated using PCR primers, flanking the three guide RNAs (Figure S3B). Loss of ESpromoter resulted in a 24.3% increase in *LAX1* expression and a 23.5% decrease in *ATP2B4* expression compared to the control, consistent with the dual enhancer-silencer function of the ESpromoter (see Methods and Figure 3A). At the phenotypic level, ESpromoter deletion led to a significant reduction in T cell activation markers, characterized by a marked decrease in the CD69+CD25+ double-positive population (mean of 24.7% in control vs 5.7% after deletion) (Figure 3B and 3C) and impaired IL-2 secretion (mean of 62% in controls vs 47.8% after deletion) (Figure 3C). These findings suggest that the dual enhancer-silencer function of ESpromoter is also relevant in primary T cells, playing a critical role in regulating activation.

Discovery of the functional variant rs11240391 in the *LAX1* promoter

Non-coding variants can affect gene expression by modifying enhancer function, thereby regulating cell-specific gene expression. However, we found no evidence of allele-specific regulation of LAX1 by the five ATP2B4 SNPs in the ESpromoter. We therefore investigated whether SNPs within the *LAX1* promoter, identified as the target region of the ESpromoter through Hi-C experiments (Figure 1B), could indeed functionally regulate its expression. To identify such regulatory SNPs, we used various databases and tools to prioritize the most promising candidates. Hence, we first searched for expression Quantitative Trait Loci (eQTLs) using the Elixir eQTL catalogue[35], revealing several SNPs with a PIP (Posterior Inclusion Probability) score > 0.2 (Figure 4A), indicating the probability of the variant being functional. Among them, rs11240391, located in the *LAX1* promoter, exhibited a high PIP score of 0.76 ($p = 1.09 \times 10^{-10}$) in whole blood tissue (Figure 4A). This SNP is also described as an eQTL for *LAX1* in CD4+ T cells, with a PIP of 0.92, in FIVEx database[36]. Furthermore, the ENCODE data confirm that the *LAX1* promoter region corresponds to a cis-regulatory element (Figure 4A), where numerous Chip-seq peaks for transcription factors were identified using ReMap2022[37] (Figure 4A). We, therefore, focused on further experiments to elucidate the cis-regulation role of rs11240391 in Jurkat cells. To study its impact on *LAX1* expression, we cloned the *LAX1* promoter with each allele into a luciferase reporter construct, and we measured relative expression in the presence or absence of PMA/ionomycin stimulation. Upon stimulation, luciferase expression increased for both the T and G alleles (Figure 4B). However, the minor “G” allele at rs11240391 showed reduced expression compared to the major “T”

allele under both conditions ($p < 0.001$) (Figure 4B), confirming the functional role of this SNP (Figure S1).

The regulatory function of the rs11240391 SNP was mediated by the FOS and JUN transcription factors

Transcription factors are known to be key players in gene regulation, and their binding to target regulatory regions can be altered by genetic variants. To uncover the regulatory mechanism and determine whether TF binding may be different between rs11240391 alleles, we used the RSAT tool. Hence, we identified *in silico* several factors whose binding appeared to be affected by this SNP (Figure 4C), suggesting preferential binding of these factors on the "T" allele. The best p-value ratio was obtained for FOS::JUN ($p = 20.83$). The use of ChIP-seq data from ReMap 2022[37] showed the binding of the TFs JUN, JUNB, JUND, FOS, and MAF to the *LAX1* promoter (Figure 4D). These data suggest a potential role for FOS and JUN in the regulation of the *LAX1* gene. Therefore, we next focused on these two TFs and assessed whether the rs11240391 variant of the *LAX1* promoter could be a potential target of FOS and JUN. Biological relevance was investigated by luciferase assays in Jurkat cells. As shown in Figure 4E, in the presence of plasmids expressing the FOS and JUN proteins, relative luciferase activity was significantly increased ($p < 0.0001$, 1.69-fold increase) only in the presence of the T allele of the rs11240391 variant. This result suggests that the FOS and JUN transcription factors can bind to the *LAX1* promoter, specifically on the T allele, as predicted by RSAT (Figure 4C). Thus, a clear potentialization of the activation effects can be observed in the presence of FOS and JUN, allowing the formation of the AP1 dimer. To confirm allele-specific protein binding, we performed an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using 30-bp biotinylated DNA fragments centered upon each allele of rs11240391, together with nuclear extracts from the Jurkat cell line stimulated for 2 h with PMA/Ionomycin. The SNP rs11240391 showed unbalanced binding between alleles, revealing three complexes, one showing higher intensity and two showing lower intensity for the major T allele compared with the G allele (Figure 4F). The complex corresponding to the upper band disappeared when we used an excess of unlabeled oligonucleotides containing the AP-1 sequence[38] (Figure 4F), supporting that the differences in retardation reflect differences in protein binding to the AP-1 site. Therefore, this specific AP-1 shift confirms the preferential binding of AP-1 to the T allele of rs11240391, as expected based on bioinformatics predictions and luciferase assays (Figure 4F).

Genetic editing of rs11240391 allele confirms its regulatory impact on *LAX1* expression

To confirm whether the effect on *LAX1* gene expression is allele-specific at rs11240391, we performed homologous recombination (HR) with CRISPR-Cas9 genome editing to replace the T alleles of wild-type Jurkat cells with the G allele (Figure 5A). After screening more than 700 clones, only two heterozygous (T/G) clones were successfully recovered through HR without any additional insertions, deletions, or base modifications (Figure 5A). The limited efficiency of HR with CRISPR-Cas9 is likely attributed to the difficulty of deactivating the guide RNA (gRNA) once HR has been accomplished. Notably, the Cas9 enzyme can cleave the integrated DNA fragment again, as the protospacer adjacent motif (PAM) remains unchanged. This precaution is taken to avoid introducing a new mutation by altering the PAM sequence on the DNA donor carrying the minor allele T. *LAX1* quantification was performed by RT-qPCR, showing a significant decrease of the *LAX1* transcript in both heterozygous clones compared with the wild-type cells unmodified after CRISPR-Cas9 (WT_{HR}) ($p < 0.001$, 2.12-fold decrease) (Figure 5B).

We then assessed the effect of the addition of FOS and JUN proteins in cultured wild-type cells or heterozygous clones. As expected, a significant increase in *LAX1* expression was observed in WT_{HR} (T/T) cells ($p < 0.0001$, 1.65-fold increase) when the 2 TFs were added together (Figure 5C). Only a slight increase in *LAX1* was observed in the presence of FOS and JUN in the T/G clones compared to the WT_{HR} (T/T) clone. This result is consistent with a lower binding of FOS and JUN to the 'G' allele of rs11240391, as predicted by the RSAT tool.

Heterozygous rs11240391 clones display hyperactivation of TCR signaling

Based on the biological function of the *LAX1* gene, we hypothesized that a decrease in *LAX1* expression, as demonstrated in rs11240391 heterozygous clones, may increase the activation of TCR signaling. To confirm this hypothesis, we quantified the CD69 marker on the cell surface by flow cytometry before (0 hours) and at several points after PMA/ionomycin stimulation (at 1 hour, then every 15 minutes between 1 and 2 hours, and finally after 4 hours of stimulation) for WT_{HR} cells and the two T/G clones (Figure 5D and 5E). We observed that the number of CD69-positive cells was higher in the two heterozygous clones even before the stimulation (Figure 5D and 5E), which is consistent with the reduced *LAX1* expression of these clones. The number of CD69-positive cells was 8.3% for wild-type T/T cells (WT_{HR}) compared with 28.9% and 17.1 % for the two heterozygous cells, suggesting basal hyperactivation of the cell. The number of CD69-positive cells increased with the duration of stimulation for all three clones, with higher numbers in the T/G clones than in the T/T clone ($p = 0.0003$ and $p = 0.0008$ when WT_{HR} was compared to T/C_1 and T/C_2, respectively), with almost 100% of positive cells at 4 hours of stimulation for the heterozygous clones. These data demonstrate that rs11240391, a regulatory variant of *LAX1*, affects T-cell activation (Figure S1).

Association of severe malaria with rs11240391 that was not detected in GWAS

Since T-cell immunity plays a central role in protection against pathogens[39–41], genetic variants that deregulate it could be associated with susceptibility to infectious diseases. Furthermore, as the *ATP2B4* internal promoter (ESpromoter) harbors genetic variants associated with severe malaria[23,41] and regulates *LAX1* expression, we hypothesize that the rs11240391 variant in the *LAX1* promoter might also be associated with severe malaria. We conducted a case-control association study in a Senegalese population (Figure 6A, Table S1), with observed genotype frequencies consistent with Hardy–Weinberg equilibrium. We found that the GG genotype leads to an increased risk of severe malaria (OR = 2.6, $p = 0.005$) (Figure 6B, Figure S1), with 39% and 19% in cases and controls, respectively. This result suggests that a diminished *LAX1* expression, leading to T-cell hyperactivation, may predispose individuals to disease. To assess whether *LAX1* expression might be involved in susceptibility to severe malaria, we re-analyzed previously published expression data by comparing the transcriptome of PBMCs from children with cerebral malaria (one form of severe malaria) and uncomplicated malaria[6,7]. We observed that cerebral malaria was associated with significantly reducing *LAX1* expression ($p = 0.025$, fold change 1.85) (Figure 6C).

It is important to note that the association signal for rs11240391, identified here, was not detected in previous genome-wide association studies, as this SNP is not included among the genotyped variants and is in very low LD with all other SNPs ($r^2 < 0.4$, except for rs6680886 having an r^2 of 0.56) in African populations (Figure S4). The LD between rs11240391 and the TagSNP rs10900585 associated with severe malaria by GWAS was estimated to be $r^2 = 0.0015$ in African populations using the LD pair module in LDlink web-based application[42]. Consistently, figure 6D shows that the SNP rs11240391 is in a region with a high recombination

rate (data from Yoruba in Ibadan, Nigeria), which favors the absence of polymorphisms in LD with it. We then confirmed the absence of LD in our Senegalese population between rs11240391 and the TagSNP rs10900585 genotyped in the GWAS, as well as with the 5 SNPs within the *ATP2B4* ESpromoter (Figure 6E).

Epistatic interaction between rs11240391 and SNPs at ESpromoter

Considering the established involvement of the ESpromoter in *LAX1* gene regulation and the physical interaction between it and the *LAX1* promoter, we decided to explore potential epistatic interactions between rs11240391 and the five SNPs of the ESpromoter previously associated with severe malaria[17]. Individuals carrying both the GG risk genotype at rs11240391 and the *ATP2B4* risk haplotype (Major haplotype) had a higher risk of developing severe malaria with 21% and 8% in severe malaria and controls, respectively (OR = 3.05, $p < 0.0001$) (Figure 6F, Figure S1, Table S2), suggesting an epistatic interaction between them. To further dissect this genetic control, we performed a logistic regression analysis. This analysis highlighted a strong interaction between the *ATP2B4* and *LAX1* variants (p= 0.000118), and the best-fit model reveals three genetic combinations, each associated with different levels of severe malaria risk (Figure 6G). Individuals having at least one minor *ATP2B4* haplotype copy and at least one major T allele copy for *LAX1* were at the lowest risk and were thus the baseline for OR calculation (group I, 25% of SM and 53.4% of Ctrl) (Figure 6G and 6H). Individuals homozygous for both major *ATP2B4* haplotype and major T allele *LAX1*, as well as individuals homozygous either for major *ATP2B4* haplotypes or minor G allele of *LAX1*, were at intermediate risk of developing SM with an OR of 2.99 (p = 0.001; 95% confidence interval (CI) = 1.54-2.78), (group II, 53.6% of SM and 38.4% of Ctrl; note that only 10 individuals were homozygous for the minor *ATP2B4* haplotype and for the minor G allele of *LAX1*) (Figure 6G and 6H). The remaining subjects who are homozygous for both the major *ATP2B4* haplotype and for the minor G allele of *LAX1* were at the highest risk of developing SM with an OR of 5.57 (p = 0.0008; 95% CI=2.01-15,42), (group III, 21.4% of SM and 8.2% of Ctrl) (Figure 6G and 6H). In addition, we carried out a haplotype analysis, combining rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, rs1541255 and rs11240391, revealing four haplotypes showing different frequencies between cases and control individuals: (1) rs11210734T-rs1541252C-rs1541253C-rs1541254G-rs1541255A-rs11240391G (Major *ATP2B4* haplotype with the minor allele for rs11240391 *LAX1* variant; 0.42 for SM versus 0.28 for ctrl), (2) rs11210734T-rs1541252C-rs1541253C-rs1541254G-rs1541255A-rs11240391T (Major *ATP2B4* haplotype with the major allele for rs11240391 *LAX1* variant; 0.31 SM, 0.32 ctrl) (3) rs11210734C-rs1541252T-rs1541253T-rs1541254C-rs1541255G-rs11240391G (Minor *ATP2B4* haplotype with the minor allele for rs11240391 *LAX1* variant; 0.17 SM, 0.20 Ctrl) and (4) rs11210734C-rs1541252T-rs1541253T-rs1541254C-rs1541255G-rs11240391T (Minor *ATP2B4* haplotype with the major allele for rs11240391 *LAX1* variant; 0.10 SM, 0.20 Ctrl). The haplotype (1) was found to be associated with an increased risk of developing SM (p = 0.004), whereas the haplotype (4) was associated with protection (p = 0.003). Together, these genetic results support our hypothesis of an epistatic interaction between the five variants of the *ATP2B4* haplotype and the rs11240391 variant of *LAX1*. We then assessed the functional relevance of this epistatic interaction by luciferase reporter assays. We transfected Jurkat cells with constructs containing the 810-bp promoter region of *LAX1* with the T or G allele for rs11240391 upstream of luciferase, and the ESpromoter with the major or minor haplotype downstream of luciferase. We validated the haplotype-independent silencer impact of the ESpromoter on the *LAX1* promoter in the presence of the major T allele of rs11240391 ($p < 0.001$, with a 2.27-

and 2.13-fold decrease in the presence of the major haplotype or the minor haplotype respectively).
However, in the presence of the minor G allele of rs11240391 at the *LAX1* promoter, the silencer effect of the ESpromoter was haplotype-dependent showing a more pronounced decrease in luciferase expression in the presence of the minor haplotype ($p < 0.01$, 2.19-fold decrease in the presence of the minor G allele with the major haplotype versus 8.18 with the minor haplotype) (Figure 6I).
We have demonstrated epistatic interaction since the regulatory impact of the genetic variants at the ESpromoter depends on the allele of rs11240391 at the *LAX1* promoter. This underlies a functional relationship between them in favor of a synergistic effect.

DISCUSSION

To elucidate the regulatory dynamics of the *ATP2B4* locus and its potential impact on the risk of severe malaria, we used an integrative approach combining genetics, epigenomics, and CRISPR-cas9 genome editing (Figure S1). We aimed to decipher the molecular mechanisms by which regulatory elements and causal variants influence gene function. We discovered a cis-regulatory element, which we called “ESpromoter”, exhibiting dual enhancer and silencer functions, by both activating and repressing gene expression in a single human cell type. Additionally, our strategy identified a functional SNP (rs11240391) associated with severe malaria and revealed its epistatic interaction with SNPs within the ESpromoter. We have, therefore, shown that our integrative approach can effectively uncover regulatory elements and polymorphisms, overcoming the weaknesses of GWAS used alone to identify causal variants in complex human diseases.
Enhancers activate gene expression in a tissue-specific manner, while silencers prevent inappropriate activation by repressing transcription[43]. Notably, some regulatory elements can act either as an enhancer or a silencer, depending on the type of tissue or cellular context, in Drosophila[44–46], in mice[47] and human[48]. Recent studies suggest that promoters may exhibit silencer-like function[49,50] or enhancer-like function[15–18]. Our results, therefore, challenge the current view of enhancers and silencers as two distinct types of regulatory elements. Instead, we suggest that dual-function CREs in the same cell type may be an important phenomenon in transcriptional regulation that has not yet been explored, reflecting the complexity, dynamics, and diversity of regulatory interactions at active elements.
The exact mechanism underlying these dual elements in the same cell type remains unknown. However, there is supporting evidence for a model of enhancer-silencer activity in which the ESpromoter would make direct 3D contact with the promoters of the regulated genes[29], likely facilitated by TFs and cofactors acting as intermediaries. Cis-regulatory elements are DNA fragments that serve as active hubs to recruit TFs through short DNA motifs to regulate transcription (Figure 7). TFs binding impacts gene expression through various mechanisms, ensuring robust and complex spatio-temporal regulation[51]. Proper TFs positioning facilitates protein-protein interactions, cooperative binding and recruitment of cofactors and transcriptional machinery[51]. Here, we demonstrated that *LAX1* expression requires the binding of both FOS and JUN, at the *LAX1* promoter, which is efficient only in the presence of the major allele T at rs11240391. The Activator Protein 1 (AP-1), a FOS and JUN dimer, regulates gene expression in response to stimuli such as cytokines and infection and enables chromatin remodeling. Interestingly, AP-1 also binds to the ESpromoter region (Figure S5) independently of the haplotype, and to the *ATP2B4* promoter in which no common variants were identified. However, its role in the dual enhancer-silencer function of the ESpromoter remains unclear.

Specific TFs can act as activators or repressors for different genes, influencing transcriptional machinery and chromatin remodeling at crucial loci[52–54].

Cis-regulatory elements often contain genetic variants, adding further complexity to their genomic function. With up to 90% of GWAS loci containing non-coding variants, identifying disease-causing regulatory elements remains a major challenge, particularly in prioritizing and validating their functional effects. We identified a regulatory SNP, rs11240391, in the *LAX1* promoter associated with severe malaria. This SNP was undetectable by conventional GWAS methods due to its non-inclusion as a TagSNP and lack of LD with other SNPs in African populations. While GWAS can localize loci associated with complex diseases, they are limited in identifying causal functional SNPs, highlighting the need for alternative strategies such as the one used in this study. Furthermore, common non-coding variants, which often have low individual impact on gene expression, likely affect disease risk through modest phenotypic effects. We, therefore, propose that functional assessment of several variants simultaneously, to assess their epistatic interaction, is crucial for understanding their combined impact on disease[17,23]. We found that the enhancer or silencer function of the ESpromoter is independent of the *ATP2B4* haplotype in the presence of the major T allele at rs11240391 in Jurkat cells. However, the repressive function is stronger with the minor G allele for rs11240391, suggesting an epistatic interaction between these SNPs. This genetic interaction correlates with a significantly increased risk of severe malaria in the Senegalese population. In addition, common variants in dual enhancer-silencer elements can modify the regulation of nearby genes, from the same biological pathway, potentially leading to stronger molecular perturbations and important phenotypic consequences.

Interestingly, our results demonstrated that this ESpromoter increases the *ATP2B4* and decreases *LAX1* expression, two genes playing an essential role in T-cell activation[33,34], suggesting a key role of this cis-regulatory element in the immune response. PMCA (plasma membrane Ca2+ ATPase), encoded by 4 different genes (*ATP2B1-4*), is the main extrusion pump expressed in various cell types regulating intracellular Ca2+ homeostasis. Specifically, PMCA4b, one of the two long transcripts regulated by the ESpromoter, is the major transcript in CD4+ T cells[33] and Jurkat cells[55]. Downregulation of PMCA4b reduced the effector cell fraction and led to the accumulation of naive cells[33], supporting that the dual cis-regulatory element may play a key role in CD4+ T cell activation by subpopulation stoichiometry and, immune response outcome. We propose that PMCA4 expression is biphasic[33], with an initial repressive phase driven by YY1 to adapt to increased intracellular levels of cytosolic Ca2+ during activation, followed by enhanced PMCA4 expression to protect against intracellular Ca2+ overload and support effector cells and memory cells survival. Moreover, CD147 interacts with PMCA4 to bypass TCR signaling and inhibit IL-2 expression[56], while the LAX adaptor protein, a LAT-like molecule identified in T cells[57] negatively regulates the TCR signaling pathway[34]. Deletion of the ESpromoter leads to an increase in *LAX1*, a decrease in *ATP2B4* expression, and reduced CD69-positive cells upon stimulation in both human primary T cells and Jurkat cell lines. Moreover, in Jurkat clones heterozygous for rs11240391, downregulation of *LAX1* results in hyper-responsiveness to TCR-mediated stimulation like LAX-deficient mice[58], which also shows enhanced calcium flux. Overall, our data suggest that PMCA4 and LAX1 play a central role in calcium homeostasis and CD4+ T cell activation, integrating positive and negative mechanisms to balance TCR signalling and the immune response.

Moreover, ESpromoters may impact various physiological and pathological traits, by regulating multiple proximal and distal genes at a given locus[18], even those in different pathways but

shared across different diseases. Consequently, dysfunction of cis-regulatory elements due to genetic, structural or epigenetic alterations may cause a wide range of human diseases[59]. Genetic variations in the ESpromoter (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255) and *LAX1* promoter (rs11240391) likely have pleiotropic effects, as they regulate the function of T cells, key players in adaptive immunity. The minor allelic frequency of rs11240391 is higher in Africa than in other populations, indicating that, while it is a risk factor for malaria, it may offer a protective advantage in the context of other endemic diseases. In other populations, the minor allele frequency exceeds 17%; therefore, we can speculate that this variant may be associated with immune-related diseases worldwide. The pleiotropic role of non-coding variants has recently been pointed up by the identification of a genetic variant associated with five vascular diseases[60]. Finally, we have highlighted another layer of complexity by demonstrating an epistatic interaction between these genetic variants, which increases severe malaria risk, by deregulating *LAX1* and hyper-activating T cells. Surprisingly, individuals with the combination of minor *ATP2B4* haplotype and minor *LAX1* allele associated with the lowest *LAX1* level are not at a higher risk of severe malaria. We have shown that these individuals have an intermediate risk of disease and propose that this is due to the protective effect of minor *ATP2B4* haplotype in other cell types, as previously demonstrated[17]. Understanding epistasis is key to unraveling the complexity inherent in genetic combinations and their effect on complex diseases.

Although 3D interaction between the ESpromoter and target gene promoters in CD8+ T cells remains unproven, open chromatin at *ATP2B4* and *LAX1* promoters as well as for the ESpromoter, suggests a similar regulatory mechanism. Hyper-activation of CD8+ T cells due to *LAX1* deregulation and disrupted Ca2+ signaling, a major determinant of CD8+ T cell reactivity, may contribute to severe malaria, particularly cerebral malaria. Such immune hyper-activation may also play a central role in many autoimmune and allergic diseases. Understanding how genetic alterations affect T cell function could uncover therapeutic targets for malaria and other immune-related diseases, highlighting the potential pleiotropic effects of these variants.

Limitations of the study

Although our study provides valuable insights, some limitations should be considered. One limitation is the lack of direct functional validation for the repressive mechanisms of the ESpromoter. While the repressor effect appears to be independent of the repressor marks (H3K9me3/H3K27me3) in Jurkat cells, these results are consistent with studies showing the existence of silencers independent of these epigenetic modifications. Hence, additional experiments are needed to deeper characterize the key factors involved. Specifically, determining whether specific co-repressors are required for the silencer-mediated activity of the ESpromoter needs to be clarified. We proposed AP-1 as a potential candidate for this role, which could be tested through AP-1 depletion via siRNA. Additionally, despite our efforts to generate GG homozygous clones, we only obtained two heterozygous clones for rs11240391. Future experiments, such as prime editing or base editing, will be necessary to generate GG homozygous clones and further explore the allele-specific effects of rs11240391 on *LAX1* expression. A larger African cohort is required to achieve sufficient statistical power to replicate the epistatic interaction between *ATP2B4* and *LAX1* genetic variants, given the low allele frequencies of the five *ATP2B4* variants in Asian and European populations. Nevertheless, our study has uncovered a dual cis-regulatory element that may be widespread in the genome and implicated in various diseases.

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead contact, Sandrine Marquet (Sandrine.marquet@univ-amu.fr).

Materials availability

The materials that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request. Please contact the lead contact, Sandrine Marquet (sandrine.marquet@univ-amu.fr), for additional information.

Data and code availability

This paper did not generate any unique datasets or code. This paper analyzes existing, publicly available data. These accession numbers for the datasets are listed in the key resources table.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the African Higher Education Centers of Excellence project (CEA-SAMEF) at UCAD (to B.M.); the Pasteur Institutes in Dakar and in Paris (to A.T.); the French Embassy in Dakar; recurrent funding from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Aix-Marseille University. This work was also supported by the French Agency for Research (Agence Nationale de la Recherche, ANR) ANR-22-CE15-0025-01 “MADBIO” (to S.M.) and ANR-23-CE15-0003 “RNAMethylTcell” (To V.A.). M.A. and S.N. were supported by a PhD fellowship from the French Ministry of Research and the Higher Education Commission (HEC) from Pakistan, respectively. This project was carried out in the framework of the INSERM GOLD Cross-Cutting program (P.R., S.M.). We thank the members of TAGC, Lydie Pradel and Nathalie Arquier, for their helpful discussions and Pauline Andrieux for her advice on CRISPR technology. Selected artwork shown in the graphical abstract was used from or adapted from pictures provided by Servier Medical Art (Servier; https://smart.servier.com/), licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 Unported License. We thank all patients who participated in the study, the Dakar main hospital and Tambacounda regional hospital for the recruitment of biological samples. We are grateful to Claire Detraves for technical help and to R. Romieu-Mourez and P-E. Paulet from the human immune monitoring platform of Infinity-INSERM UMR1291 for technical assistance, the supervision of the PBMC biobank from healthy adult subjects, and the Marseille-Luminy cell biology platform for the management of cell culture.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, S.M.; Methodology, M.A., S.N., A.E., R.T., M.T., H.T.N.H., I.M, V.A., and S.M.; Investigation, S.S., P.R., and S.M.; Senegalese cohort, A.T., B.M., A.D., and P.R.; Writing - Original Draft, M.A., and S.M.; Writing - review and Editing, M.A., S.S., P.R., V.A. and S.M., Funding Acquisition, A.T., A.D., P.R., V.A. and S.M.; Supervision, S.M.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

FIGURE TITLES AND LEGENDS

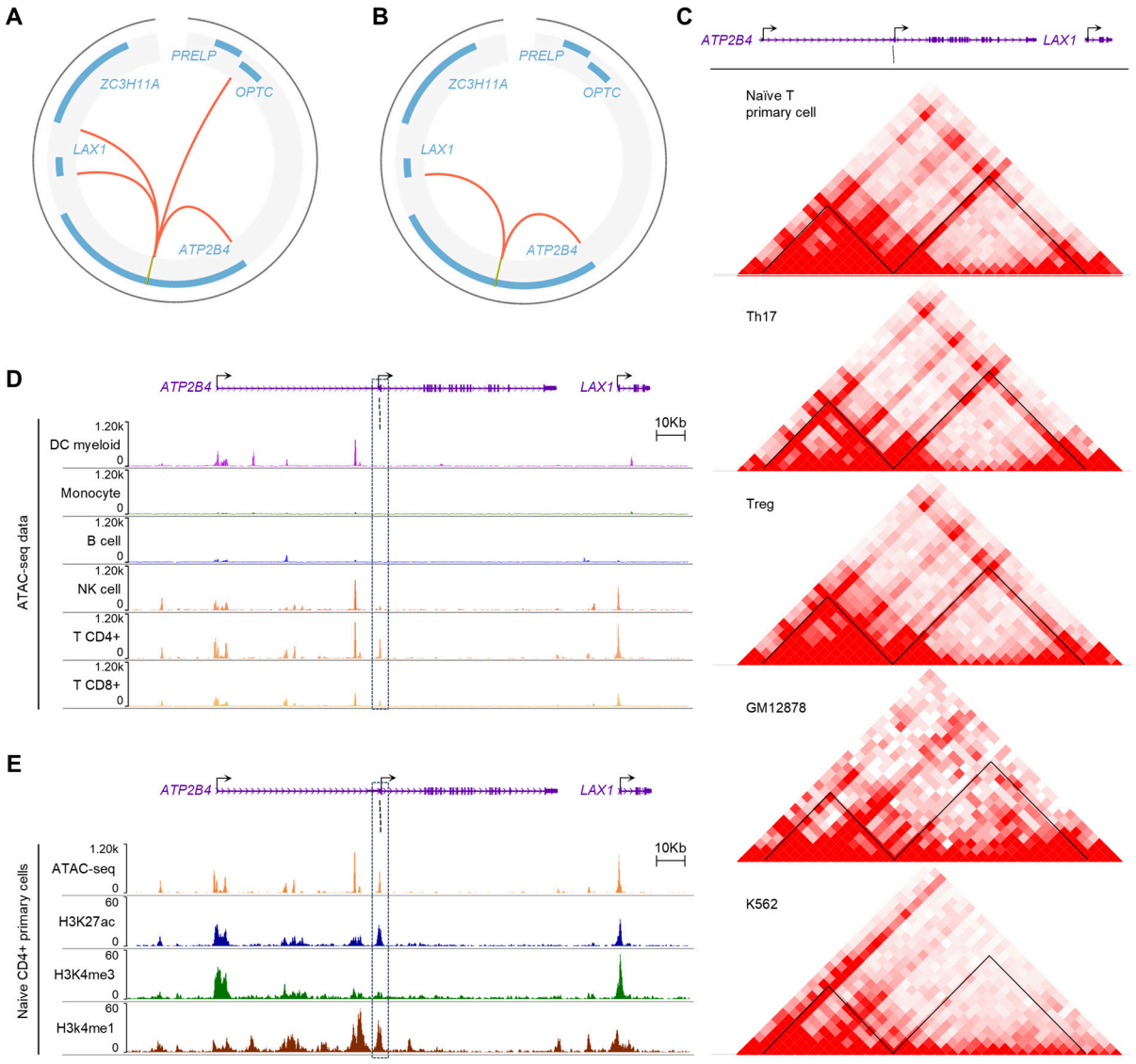


Figure 1. Epromoter in the *ATP2B4* locus, a potential cis-regulatory element of *LAX1*

(A) Circos plots illustrating predictive chromatin interactions of Genehancer regulatory elements with the *ATP2B4* Epromoter (yellow line). Predictions indicate potential interactions with multiple target promoters, including *ATP2B4*, *LAX1*, *ZC3H11A*, *PRELP*, and *OPTC*. These interactions were computationally inferred based on regulatory element annotations.

(B) Circos plots displaying significant chromatin interactions with the *ATP2B4* Epromoter (yellow line) in primary T CD4+ cells as measured by promoter capture Hi-C (PCHiC) data[29]. Experimentally validated interactions confirm strong contacts with *ATP2B4* and *LAX1* promoters, in this specific cell type.

(C) Chromatin interaction maps reveal *ATP2B4* Epromoter interactions across multiple cell types. Hi-C interaction matrices from HiChiP data (Mumbach et al. 2017; PMID: 28945252) are shown for different T cell subtypes (Naive T primary cells, Th17, and Treg) as well as non-T cell lines (GM12878 and K562). Strong interactions, indicated by darker shades of red, highlight the *ATP2B4* Epromoter's contact with the *ATP2B4*

and *LAX1* promoters across all tested CD4+ T cell lines. Black lines correspond to the 5 SNPs previously identified (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255). The interaction between the *ATP2B4* Epromoter and the *LAX1* promoter is consistently observed in all CD4+ T cell lines[30] (Naive T, Th17, and Treg), further confirming its presence in T cells. However, this interaction appears less prominent or absent in non-T cell lines.

(D) WashU epigenome browser view of ATAC-seq for immune cells. The frame corresponds to the Epromoter. Black lines correspond to the 5 SNPs previously identified (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255). The regions corresponding to the Epromoter and the *LAX1* promoter are particularly open in CD4+ T cells.

(E) WashU epigenome browser view of epigenomic data in naive CD4+ primary cells. The frame corresponds to the Epromoter. Black lines correspond to the 5 SNPs previously identified (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255). The presence of prominent peaks for active histone marks suggests a regulatory role for the *ATP2B4* Epromoter and *LAX1* promoter in CD4+ T cells.

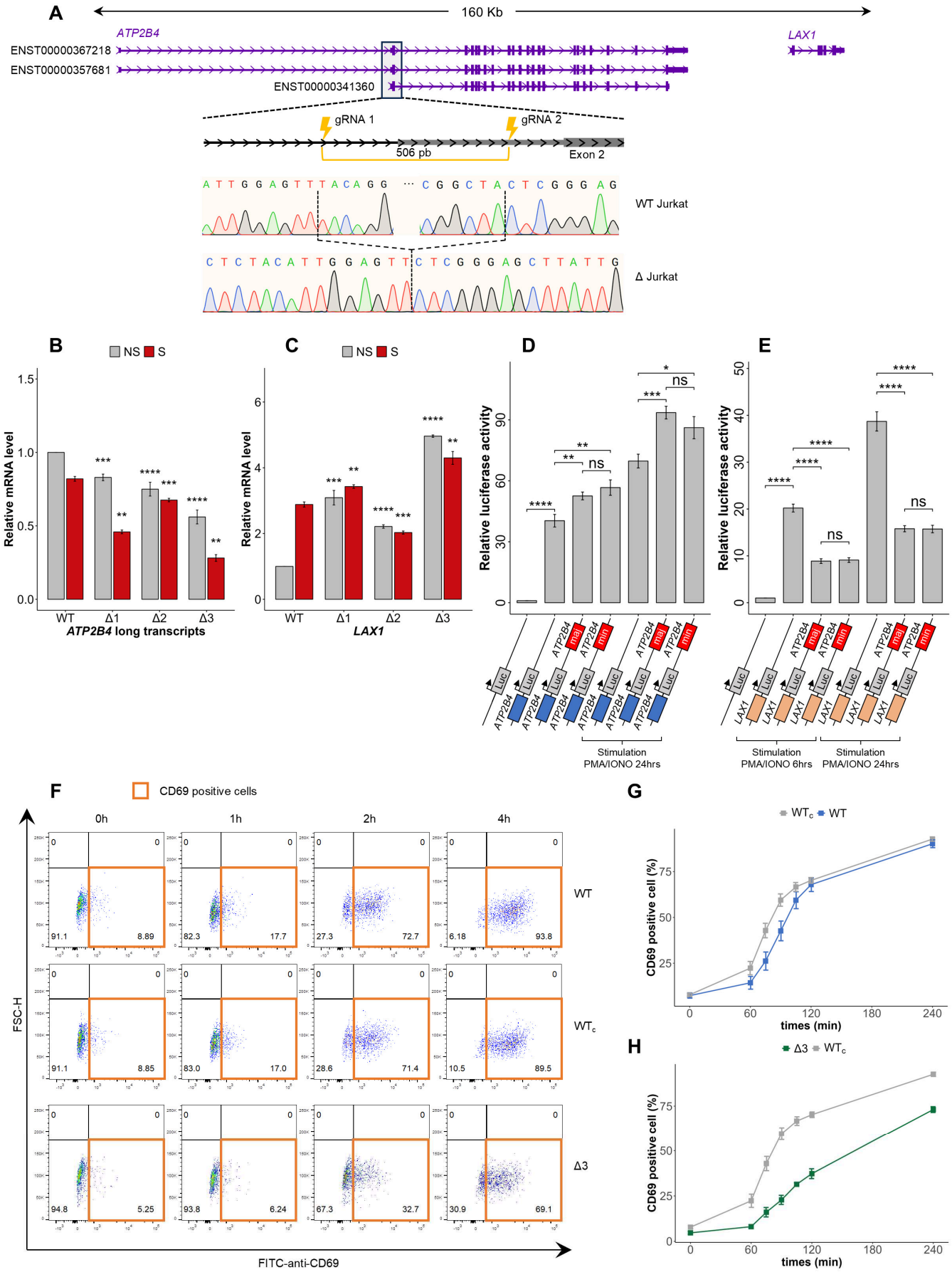

A
160 Kb
ATP2B4
LAX1
ENST00000367218
ENST00000357681
ENST00000341360
gRNA 1
gRNA 2
506 pb
Exon 2
WT Jurkat
Δ Jurkat
B
NS S
Relative mRNA level
WT Δ1 Δ2 Δ3
ATP2B4 long transcripts
C
NS S
Relative mRNA level
WT Δ1 Δ2 Δ3
LAX1
D
Relative luciferase activity
ns
ATP2B4 mal
ATP2B4 min
Luc
ATP2B4
Stimulation PMA/IONO 24hrs
E
Relative luciferase activity
LAX1
Stimulation PMA/IONO 6hrs
Stimulation PMA/IONO 24hrs
F
CD69 positive cells
0h 1h 2h 4h
WT
WTc
Δ3
FSC-H
FITC-anti-CD69
91.1 8.89
82.3 17.7
27.3 72.7
6.18 93.8
91.1 8.85
83.0 17.0
28.6 71.4
10.5 89.5
94.8 5.25
93.8 6.24
67.3 32.7
30.9 69.1
G
WTc WT
CD69 positive cell (%)
times (min)
H
Δ3 WTc
CD69 positive cell (%)
times (min)

Figure 2. Identification of a cis-regulatory element with a dual enhancer-silencer function (ESpromoter) and its role in inhibiting Jurkat T cell activation.

(A) Generation of cell lines with a 506-bp deletion of the ESpromoter using two single guides RNAs (gRNA1 and gRNA2) flanking the regulatory region containing the 5 SNPs, through CRISPR-Cas9 technology. The position of the deletion is indicated relative to the long *ATP2B4* (ENST00000367218, ENST00000367218) and short (ENST00000341360) transcripts of *ATP2B4* and the *LAX1* gene. Sanger sequencing chromatograms show the genomic sequence of the wild-type Jurkat clone (WT Jurkat), and one representative edited clone (Δ Jurkat).

(B) RT-qPCR analysis of *ATP2B4* long transcript expression (ENST00000357681, ENST00000367218) on wild-type Jurkat cells and clones deleted for the ESpromoter (Δ1, Δ2, and Δ3) in culture without stimulation (NS: no stimulation in grey) or with PMA/ionomycin stimulation for 6 hours (S: stimulated in red). Clones with a deletion had a decreased *ATP2B4* expression under both conditions. Values were generated from 3 independent experiments performed in triplicate. Wild-type Jurkat NS and S are used as references. All data represent mean values ± SEM. Two-sided Student's t-tests and stars indicate significance (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

(C) RT-qPCR analysis of *LAX1* expression on wild-type Jurkat cells and on clones deleted for the ESpromoter (Δ1, Δ2, and Δ3) without stimulation (NS: no stimulation in grey) or with PMA/ionomycin stimulation for 6 hours (S: stimulated in red). Clones with a deletion had increased *LAX1* expression under both conditions. Values were generated from 3 independent experiments performed in triplicate. Wild-type Jurkat NS and S are used as references. All data represent mean values ± SEM. Two-sided Student's t-tests and stars indicate significance (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

(D) Graphs showing the relative luciferase activity under the control of *ATP2B4* promoter alone or in combination with the ESpromoter region containing either the major haplotype (maj: TCCGA) or minor haplotype (min: CTTGG) for the 5 SNPs (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255) without and with PMA/ionomycin stimulation. Luciferase assays confirmed the enhancer effect of the ESpromoter on the *ATP2B4* promoter independently of the haplotype. Values were generated from 3 independent experiments performed in triplicate. All data represent normalised mean values ± SEM. Two-sided Student's t-tests and stars indicate significance (ns, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

(E) Graphs showing the relative luciferase activity under the control of *LAX1* promoter alone or in combination with the ESpromoter region containing either the major haplotype (maj) or minor haplotype (min) for the 5 SNPs (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255) under PMA/ionomycin stimulation (6 h and 24 h). Luciferase assays confirmed the silencer effect of the ESpromoter on the *LAX1* promoter independently of the haplotype. Values were generated from 3 independent experiments performed in triplicate. All data represent normalised mean values ± SEM. Two-sided Student's t-tests and stars indicate significance (ns, **** $p < 0.0001$).

(F) T-cell activation was assessed based on CD69 staining and flow cytometric gating strategy. Plots showing the results at different time points after PMA/Ionomycin stimulation of wild-type Jurkat cells (WT), wild-type clone after CRISPR-Cas9 editing (WTc), and deleted clone for the ESpromoter (Δ3). Representative experiments on 2000 cells according to Forward Scatter-Horizontal (FSC-H) and anti-CD69 staining

with Fluorescein Isothiocyanate (FITC). The number represents the percentage of cells. The orange window corresponds to CD69-positive cells. The rate of CD69-positive cells increased with stimulation time.

(G) Monitoring Jurkat cell activation by anti-CD69 staining through flow cytometry after PMA/ionomycin stimulation. Values represent the average ± SEM of two independent experiments performed in duplicate, indicating the percentage of cells positive for anti-CD69 staining (acquisition of 2000 cells per clone) for wild-type Jurkat (WT), and wild-type clone without genomic edition after CRISPR-Cas9 (WTc). A similar percentage of CD69-positive cells was observed between WT and WTc.

(H) Monitoring Jurkat cell activation by anti-CD69 staining through flow cytometry after PMA/ionomycin stimulation. Values represent the average ± SEM of two independent experiments performed in duplicate, indicating the percentage of cells positive for anti-CD69 staining (acquisition of 2000 cells per clone) for wild-type clone without genomic edition after CRISPR-Cas9 (WTc) and deleted clones for the ESpromoter (Δ3). A lower number of CD69-positive cells was observed in the Δ3 clone.

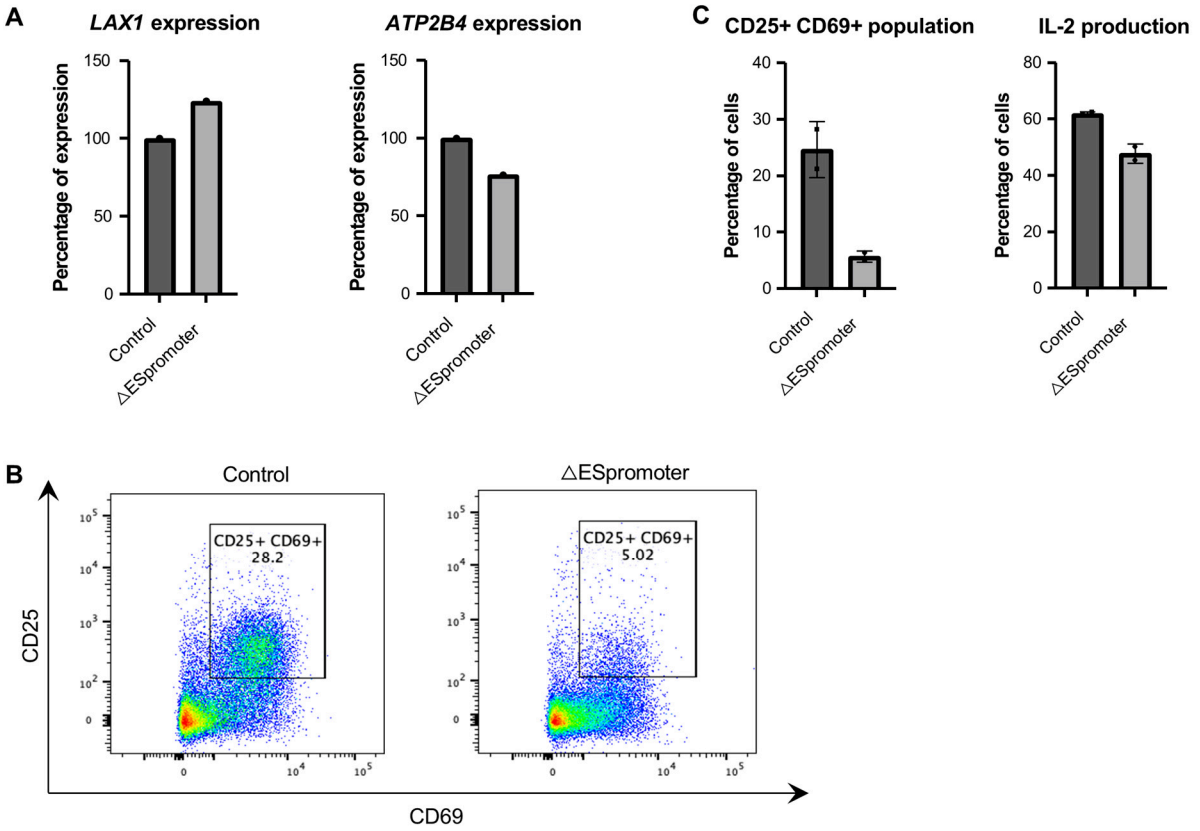


Figure 3. ESpromoter is essential for normal human primary T cell activation.

(A-C) Phenotypic analysis of naive CD4+ T cells, either deleted or not for ESpromoter, following 24 hours activation with CD3/CD28/CD2 complexes, including a 4 hours restimulation step with PMA/ionomycin/BFA, see also Figure S3.

(A) Relative expression of *LAX1* (left) and *ATP2B4* (right) assessed by RT-qPCR in one donor. Deletion of the ESpromoter leads to an increase in *LAX1* expression and a decrease in *ATP2B4* expression.

(B) Surface expression of CD25 and CD69 in primary control T cells and in cells deleted for the ESpromoter. Data are representative of two independent experiments. The number of $CD25^{+}CD69^{+}$ double-positive cells is shown as a percentage.

(C) Quantification of $CD25^{+}CD69^{+}$ double-positive cells (left) and IL-2-producing cells (right). Data is from two independent experiments. A strong decrease in $CD25^{+}$ $CD69^{+}$ cells and a decrease in the percentage of IL-2-producing cells were observed after the deletion of the ESpromoter.

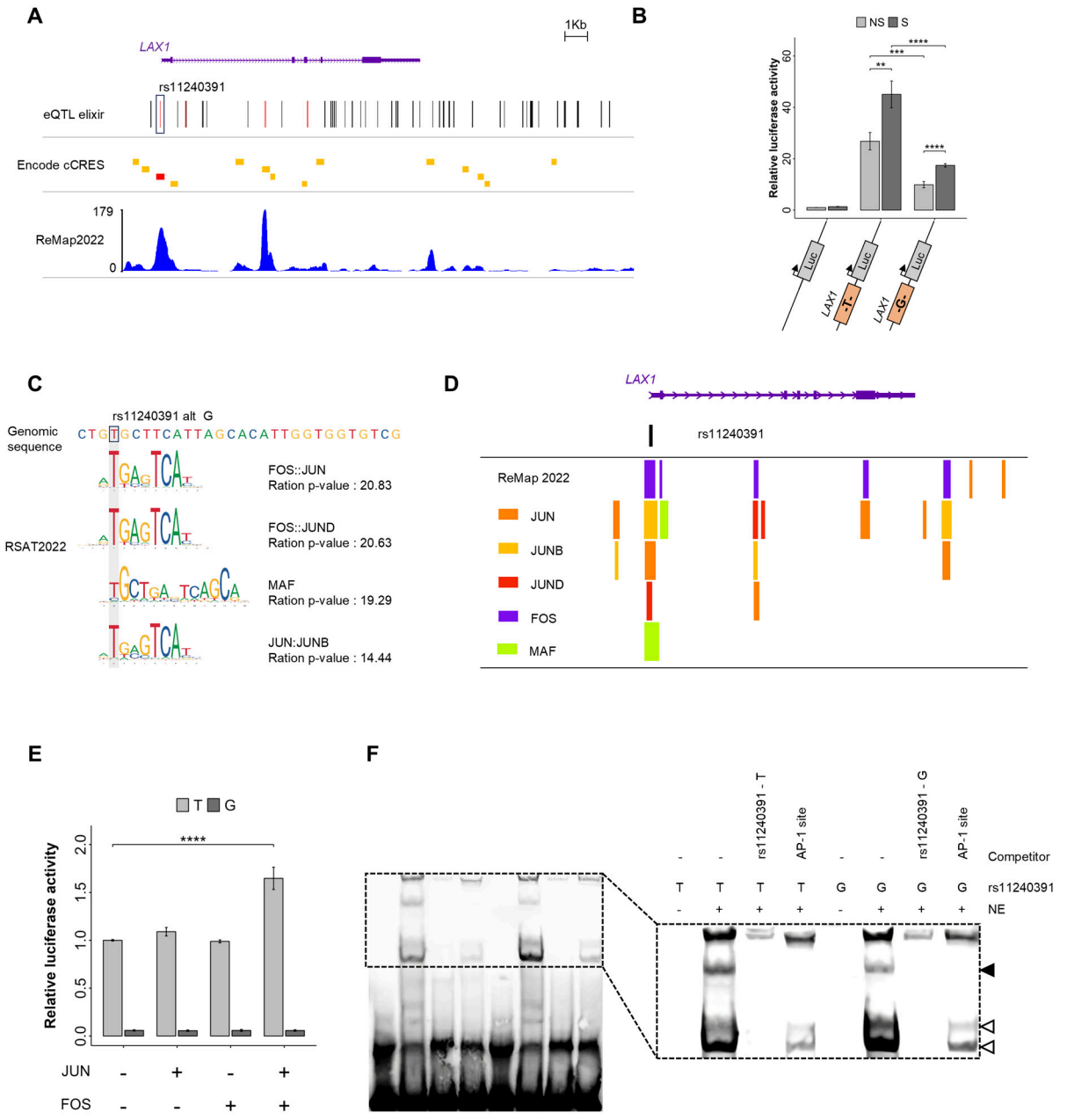


Figure 4. Identification of the functional variant rs11240391 corresponding to the FOS and JUN binding site

(A) WashU epigenome browser view of *LAX1* region with the position of all eQTLs for *LAX1* in the ELIXIR database, those having a PIP score > 0.7 are shown in red. Localization of Encode cCRES was shown with promoter-like elements in red and enhancer-like elements in orange. The density of CHIP-seq peaks available in ReMap2022 is also displayed. These results revealed a potentially functional SNP in the *LAX1* promoter (rs11240391).

(B) Luciferase assays to assess the impact of the rs11240391 variant on *LAX1* promoter activity without stimulation (NS: no stimulation in grey) or with PMA/ionomycin stimulation for 6 hours (S: stimulation in black). Values were generated from 3 independent experiments performed in triplicate. Relative luciferase activity was lower with the “G” allele than with the “T” allele. The graph shows the mean values ± SEM.

p-values were calculated using a two-sided Student's t-test, and stars indicate significance (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

(C) Prediction of transcription factor binding sites disruption at rs11240391 using RSAT. The genomic sequence containing the variant is displayed. The *p*-value ratio was calculated by dividing the best and worst probability of transcription factor binding. All transcription factors exhibit a higher binding affinity to the T allele of SNP rs11240391. The FOS::JUN motif is the most affected by the allele change.

(D) CHIP-seq peaks from ReMap2022 confirmed the binding of transcription factors, identified by RSAT, in the region containing rs11240391.

(E) Luciferase assays to evaluate the impact of rs11240391 on the fixation of transcription factors by adding expression plasmid of JUN or FOS or both. The major allele T was represented in grey, and the minor allele G was represented in black. A higher relative luciferase activity was observed in the presence of the "T" allele, which only increased with the simultaneous addition of JUN and FOS. Values were generated in triplicate from 3 independent experiments. The plot shows the mean values ± SEM. P-values were calculated using a two-sided Student's t-test and stars indicate significance (**** $p < 0.0001$).

(F) EMSA for SNP rs11240391. Nuclear extracts (NE:10 □g) from Jurkat cells stimulated for 2 h with PMA/ionomycin were incubated with biotinylated doubled-stranded oligonucleotides containing either the major T allele (rs11240391 - T) or the alternative G allele (rs11240391 – G). Two different competitions were performed either with excess of non-biotinylated duplex identical to the biotinylated duplex or with excess of non-biotinylated duplex containing specific AP-1 site. Complexes were separated on 6% nondenaturing polyacrylamide gels. Positions of specific (filled arrow) and non-specific (open arrow) AP-1 retardation are indicated. The intensity of the specific AP-1 complex band decreased in the presence of the biotinylated duplex containing the G allele.

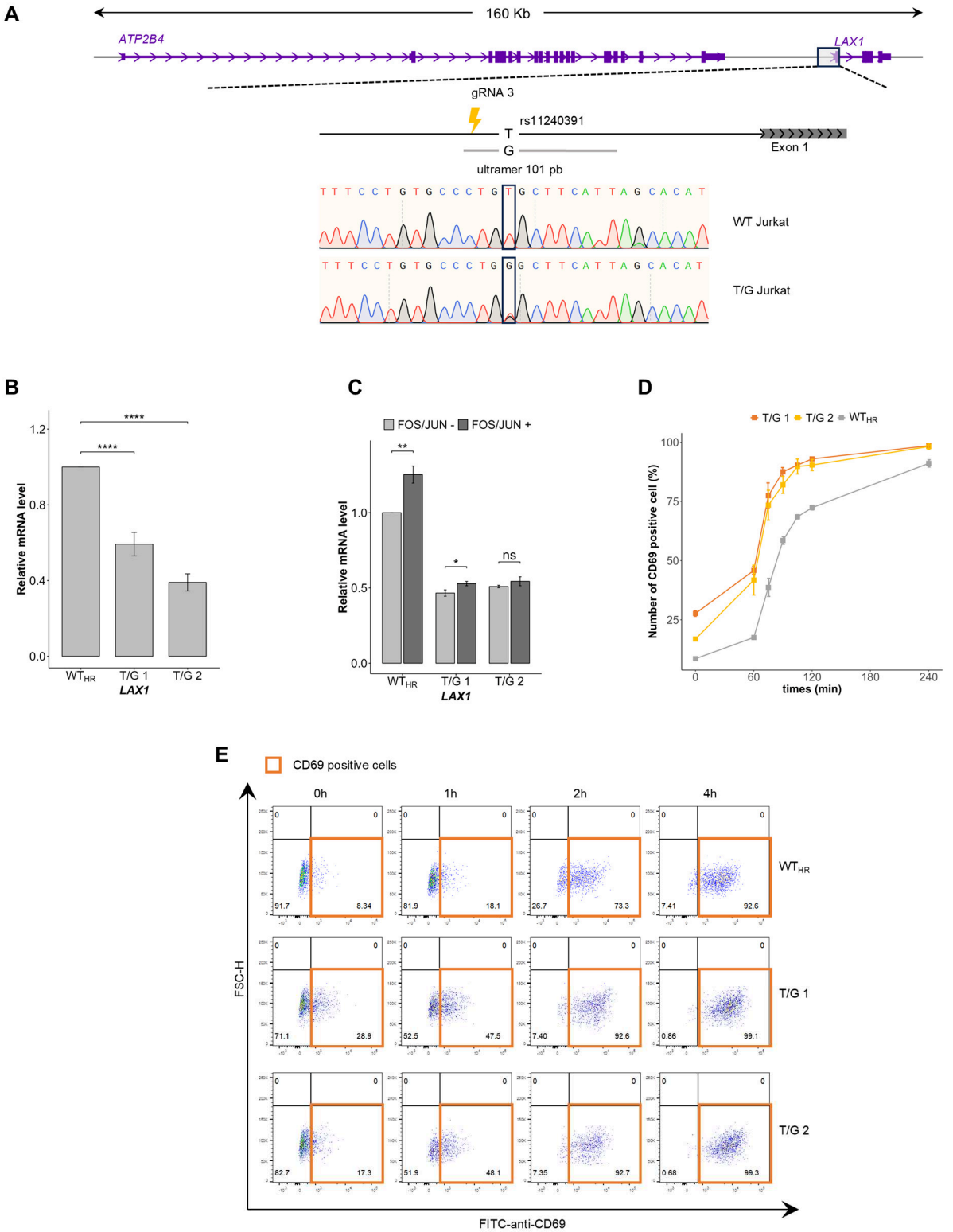


Figure 5. Lower *LAX1* expression in heterozygous T/G Jurkat clones is associated with higher T cell activation.

(A) Generation of cell lines with a modified rs11240391 variant allele by homologous recombination using a 101 pb ultramer, a single guide RNA (gRNA3), and CRISPR-Cas9 technology. Sanger sequencing chromatograms show the genomic sequence of the wild-type Jurkat clone (WT Jurkat) and of the clone in which a “T” allele has been replaced by a “G” allele (T/G Jurkat).

(B) RT-qPCR analysis of *LAX1* gene expression on wild-type clone after homologous recombination experiment (WT_{HR}) and two heterozygous clones (T/G 1 and T/G 2) for the rs11240391 SNP. Values were generated in triplicate from 3 independent experiments. The plot shows the mean values ± SEM. *p*-values were calculated using a two-sided Student's t-test and stars indicate significance (**** $p < 0.0001$).

(C) RT-qPCR analysis of *LAX1* gene expression in wild-type Jurkat cells (WT_{HR}) and T/G clone heterozygotes (T/G 1 and T/G 2) for the SNPs rs11240391, untransfected (grey) or transfected (black) with both expression plasmids for FOS and JUN. Values were generated in triplicate from 3 independent experiments. The plot shows the mean values ± SEM. *p*-values were calculated using a two-sided Student's t-test and stars indicate significance (ns, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

(D) Monitoring of Jurkat cell activation by anti-CD69 staining through flow cytometry after PMA/ionomycin stimulation. The values represent the average ± SEM of two independent experiments performed in duplicate, indicating the percentage of cells positive for anti-CD69 staining (acquisition of 2000 cells per clone). The comparison was carried out between a wild-type clone after a homologous recombination experiment (WT_{HR}) and two heterozygous clones (T/G 1 and T/G 2) for the rs11240391 SNP. The percentage of $CD69^+$ cells was higher in heterozygous clones than in WT_{HR}.

(E) T-cell activation in Jurkat clones was assessed based on CD69 staining and flow cytometric gating strategy. Plots showing the results at different time points after PMA/Ionomycin stimulation of wild-type clone after CRISPR-Cas9 editing (WT_{HR}) and heterozygous clones (T/G 1 and T/G 2) for the rs11240391 SNP. Representative experiments on 2000 cells of each type in function to Forward Scatter-Horizontal (FSC-H) and anti-CD69 staining with Fluorescein Isothiocyanate (FITC). The number represents the percentage of cells. The orange window corresponds to CD69-positive cells. A higher percentage of CD69-positive cells was observed for T/G 1 and T/G 2 clones.

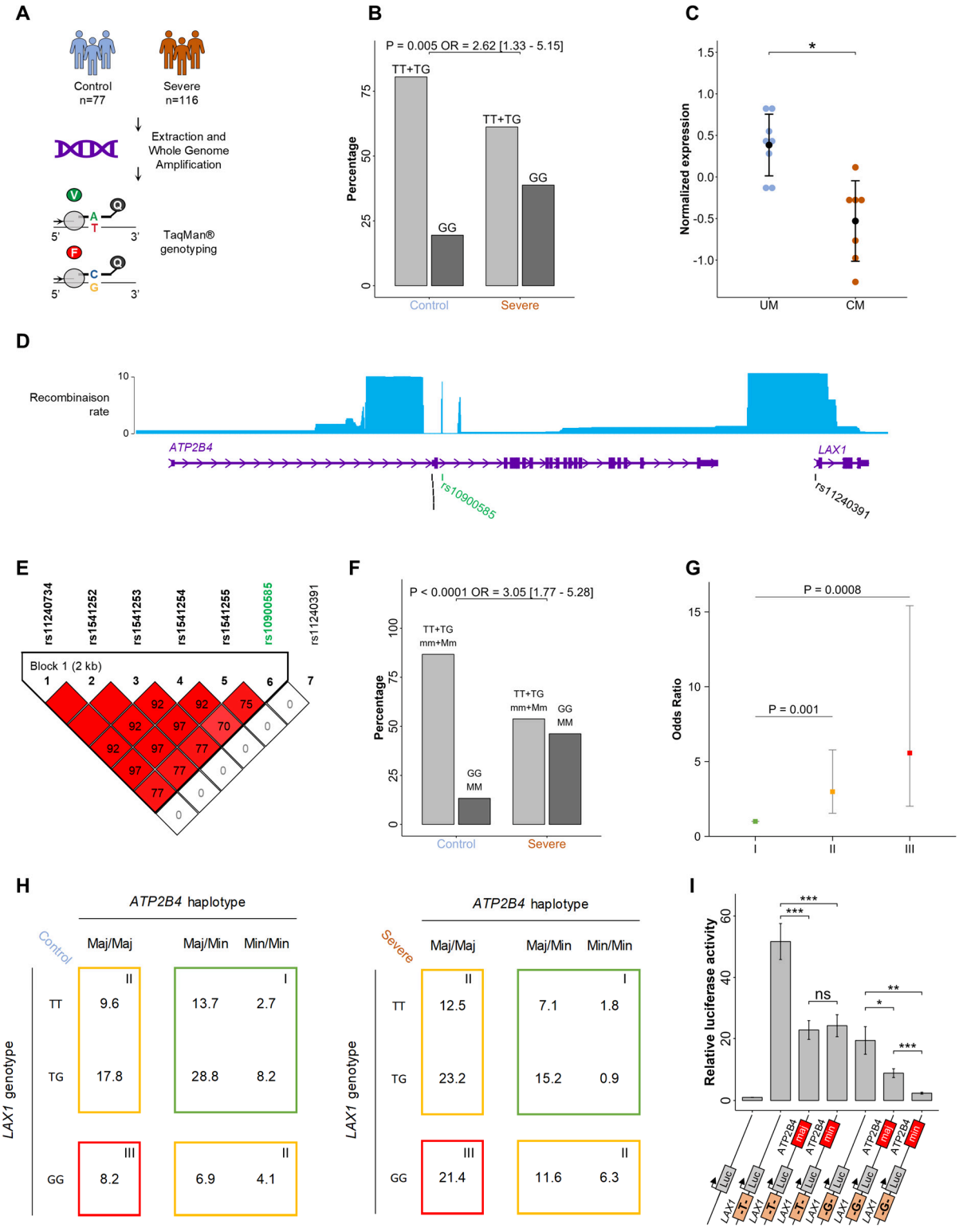


Figure 6. Epistatic interaction between *ATP2B4* and *LAX1* genetic variants associated with differential risk of severe malaria through regulation of *LAX1* expression

(A) Design for recruitment of Senegalese cohort, amplification of DNA, and genotyped of rs11240391 using TaqMan assays, see also Table S1.

(B) Association of rs11240391 with severe malaria. The graph shows the percentage of the GG risk genotype (black) versus heterozygous TG and major homozygous TT (grey) in the control and severe malaria groups. *p*-values were calculated using logistic

regression analyses and the graph displays the Odds Ratio (OR) with its 95% confidence interval. GG individuals have a 2.62 risk of developing severe malaria.

(C) Normalized *LAX1* expression obtained by microarray in children with uncomplicated malaria (UM) and cerebral malaria (CM). Lower expression of *LAX1* is observed in CM.

(D) WashU epigenome browser view of recombination rate of YRI (Yoruba in Ibadan, Nigeria). Black lines correspond to the 5 SNPs previously identified (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255) and the SNP in the *LAX1* promoter (rs11240391). The green line corresponds to the tagSNP (rs10900585) previously associated with severe malaria in GWAS analyses. The *ATP2B4* SNPs and the *LAX1* SNP rs11240391 are in two different recombination blocks.

(E) Linkage disequilibrium (LD) between different SNPs of the *ATP2B4* and *LAX1* genes in our Senegalese cohort. LD is expressed as r^2 multiplied by 100. SNPs with an $r^2 > 0.6$ are considered in linkage disequilibrium and are colored in red. No LD was observed between the *ATP2B4* SNPS and the SNP *LAX1* rs11240391.

(F) Epistatic interaction between the haplotype of 5 SNPs and rs11240391 computed by logistic regression. The plot shows the percentage of individuals carrying either both protective haplotype/genotype (mm+Mm/TT+TG) (m: minor haplotype, M: major haplotype) or both risk haplotype/genotype (MM/GG). Individuals carrying the GG genotype and the MM haplotype are at increased risk of severe malaria. *p*-values were calculated using logistic regression analyses and the graph displays the Odds Ratio (OR) with a 95% confidence interval, see also Table S2.

(G) Severe malaria (SM) risk associated with genotype combination groups. The coloured dots represent OR, and the bars represent 95% confidence intervals. Group I corresponded to the baseline SM risk (OR=1). Group II had a moderate SM risk [OR=2.99, 95% CI (1.54-5.78), $p = 0.001$]; the risk was increased in group III [OR=5.57, 95% CI (2.01-15.42), $p = 0.0008$].

(H) Genotype combinations were identified by conditional logistic regression due to the interaction between *ATP2B4* and *LAX1* variants. Group I included individuals with at least one minor *ATP2B4* haplotype copy and at least one major T allele copy for *LAX1* (25% of SM and 53.4% of Ctrl). Group II included individuals homozygous for both major *ATP2B4* haplotype and major T allele *LAX1* as well as individuals homozygous either for major *ATP2B4* haplotypes or minor G allele of *LAX1* (53.6% of SM and 38.4% of Ctrl). Group III included individuals homozygous for both the major *ATP2B4* haplotype and for the minor G allele of *LAX1 (*21.4% of SM and 8.2% of Ctrl).

(I) Luciferase assays to functionally assess the epistatic effect between the haplotype, including the 5 SNPs in the ESpromoter and the *LAX1* promoter SNP rs11240391. Graphs showing the relative luciferase activity under the control of *LAX1* promoter with "T" or "G" allele at rs11210391 alone or in combination with the ESpromoter containing either the major haplotype (maj: TCCGA) or minor haplotype (min: CTTGG) for the 5 SNPs (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255). Values were generated in triplicate from 3 independent experiments. The plot shows the mean values ± SEM. P-values were calculated using a two-sided Student's t-test, and stars indicate significance (ns, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

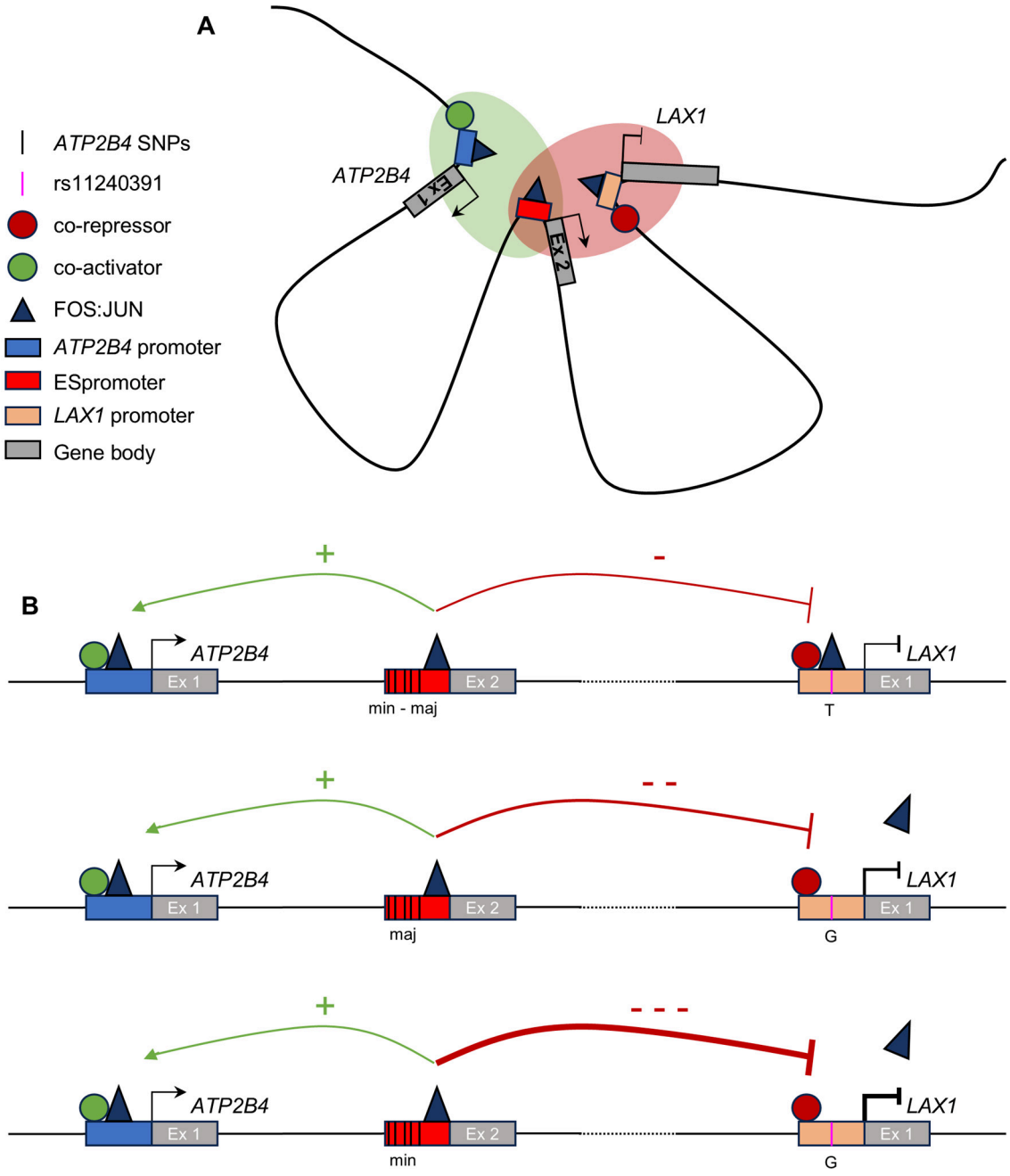


Figure 7. Model of the dual enhancer-silencer function of ESpromoter, epistatic interaction, and gene regulation

(A) Chromatin interactions place promoters in close physical proximity, facilitating the recruitment of transcription factors needed to activate or repress transcription of their associated genes. The presence of an Enhancer-Silencer promoter (ESpromoter) within a regulated gene cluster could facilitate the assembly or maintenance of the transcription factor and co-factors by tightening the promoter-promoter interactions or by providing specific transcriptional regulators required for neighboring gene regulation.

(B) Expression of the long transcripts *ATP2B4* and *LAX1* is regulated by a dual enhancer-silencer regulatory element (ESpromoter) in the same cell line through

genetic variants associated with severe malaria. ESpromoter functions as an enhancer for the long *ATP2B4* transcripts independently of the haplotype of the five SNPs it contains (min: minor haplotype or Maj: major haplotype) while it functions as a silencer for *LAX1* gene with an allele-specific intensity. The five SNPs within the ESpromoter act synergistically with rs11240391 to inhibit *LAX1* gene expression. This epistatic interaction results in a stronger silencing effect in the presence of the G allele of rs11240391, for which no FOS::JUN binding is possible. Unidentified co-activators and co-repressors are also thought to modulate the activating or repressing effect on *ATP2B4* and *LAX1*, respectively.

STAR★METHODS

KEY RESSOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Mouse monoclonal FITC anti-human CD69	BioLegend	Cat#310904; RRID: AB_314839
BD Horizon™ Mouse anti-human CD3-BV510	BD Biosciences	Cat#563247;RRID: AB_2738093
CD4 Monoclonal antibody (RPA-TA) - FITC	eBioscience	Cat#17-0049-41, RRID: AB_1272048
BD Pharmingen Mouse anti human CD45RA – PE-Cy™	BD Biosciences	Cat#561216, RRID:AB_10611721
ImmunoCult™ Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator	STEMCELL	Cat#10990
Brilliant Violet 711™ anti-human CD69 Antibody	BioLegend	Cat#310944, RRID:AB_2566466
PE/Cyanine7 anti-human CD25 Antibody	BioLegend	Cat#302612, RRID:AB_314281
BD Horizon™ BV750 Rat Anti-Human IL-2	BD Biosciences	Cat#554563, RRID: AB_398570
Bacterial and virus strains		
NEB 5-alpha competent E. coli (High efficiency)	New England Biolabs	Cat#C29871
Invitrogen™ E. coli chemically competent One Shot™ TOP10	ThermoFisher	Cat#C404003
Biological samples		
Severe malaria and control samples from Senegal	This paper (Table S1)	N/A
Cerebral malaria and uncomplicated malaria children from Mali	Patients Section (Cabantous et al., 2017)[6]	https://doi.org/10.1093/infdis/jix359.
Blood Sample	EFS (DC-2015-2488)	N/A
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma-Aldrich	Cat#P1585
Ionomycin	Sigma-Aldrich	Cat#13909
Brefeldin A	Sigma-Aldrich	Cat#B7651-5MG
Alt-R™-s.p Hifi Cas9 Nuclease V3	Integrated DNA technologies	Cat#1081060
Alt-R® Cas9 Electroporation Enhancer 2 nM	Integrated DNA technologies	Cat#1075915
Alt-R® Cas9 Electroporation Enhancer 10 nM	Integrated DNA technologies	Cat#1075916
Alt-R™-s.p Cas9 Nuclease V3	Integrated DNA technologies	Cat#1081059
Alt-R® HDR Enhancer V2	Integrated DNA technologies	Cat#10007910
DPBS	ThermoFisher	Cat#14190094
DMSO	Sigma-Aldrich	Cat#D4540
FBS	ThermoFisher	Cat#A5256701
ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium	STEMCELL	Cat#10981
eFluor 506	ThermoFisher	Cat#65-0866-18
Critical commercial assays		
Master Mix PCR Power SYBR™ Green	Applied Biosystems	Cat#4367659
QIAamp DNA mini kit	QIAGEN	Cat#51306
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs	Cat# E0554S
Phire Tissue Direct PCR Master Mix	ThermoFisher	Cat#F170L
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN	Cat#28106

Dual-Luciferase kit	Promega	Cat#E1910
RNeasy Plus mini kit	QIAGEN	Cat#74136
TaqMan™ Genotyping Master Mix	Applied Biosystems	Cat#4371357
Superscript VILO Master Mix	Invitrogen	Cat#11755-050
EasySep™ Human Naive CD4+ T Cell Isolation kit II	STEMCELL	Cat#19555
P2 Primary Cell 4D-Nucleofector X kit S	Lonza Bioscience	Cat#V4XP-2024
DNeasy Blood and Tissue Kits for DNA Isolation	QIAGEN	Cat#ID69504
NucleoSpin® RNA XS kit	MACHEREY-NAGEL	Cat#740990.50
SensiFAST cDNA Synthesis Kit	Ozyme	Cat#BIO-65053
SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix	BioRad	Cat#1725017
Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit	BD Biosciences	Cat#554714
Nuclear extract kit	Active Motif	Cat#40010
Bradford protein assay	Bio-Rad	Cat#5000006
GelshiftTM Chemiluminescent EMSA Kit	Active Motif	Cat#37341
6% polyacrylamide Novex™ DNA Retardation Gels	ThermoFisher	Cat#EC63652BOX
Deposited data		
Physical chromatin interaction prediction	Genehancer (Fishilevich et al., 2017)[62]	https://hgdownload.soe.ucsc.edu/gbdb/hg38/geneHancer/geneHancerRegElementsDoubleElite.hg38.bb
Physical chromatin interaction	Mumbach et al., 2017[30]	GEO: GSE101498
Physical chromatin interaction in CD4+	González-Serna et al., 2023[29]	GEO: GSM6509371
Transposase-accessible chromatin using sequencing	Calderon et al., 2019[31]	GEO : GSE118189
Naïve CD4+ epigenomic markers	Roadmap (Kundaje et al., 2015)[32]	GEO: GSM325895
Database of Human DNA binding sequences experiments	ReMap (Hammal et al., 2022)[37]	https://remap.univ-amu.fr
Predicted regulatory elements	ENCODE project consortium 2020[65]	https://www.encodeproject.org
Fine-scale recombination rate	HapMap (Kong et al., 2010)[66]	/gbdb/hg19/decode/hapMapRelease24YRIRecombMap.bw
eQTL Catalogue 2023	ELIXIR Estonia (Kerimov et al., 2023)[35]	https://elixir.ut.ee/eqtl/
Jaspar TFBS databases	Castro-Mondragon et al., 2022[68]	https://jaspar.elixir.no/
Experimental models: Cell lines		
Human: Jurkat cell line: clone E6-1	ATCC	TIB-152
Oligonucleotides		
Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA for sequences see table S3	This paper	
Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA	Integrated DNA technologies	Cat#1072533
Alt-R® CRISPR-Cas9 Negative Control crRNA	Integrated DNA technologies	Cat#1072544
Alt-R® CRISPR-Cas9 Negative Control crRNA	Integrated DNA technologies	Cat#1072545
Alt-R® CRISPR-Cas9 Negative Control crRNA	Integrated DNA technologies	Cat#1072546
TaqMan assay SNP genotyping C_319219_10	Applied Biosystems	Cat#4351379
See Table S3 for additional oligonucleotides		
Recombinant DNA		

pGL3-Basic vector	Promega	Cat#E1751
pRL-SV40	Promega	Cat#E2231
pGL3- Basic with 780 bp *ATP2B4* promoter	This paper	
pGL3- Basic with 780 bp *ATP2B4* promoter and 610 bp ESpromoter major haplotype	This paper	
pGL3- Basic with 780 bp *ATP2B4* promoter and 610 bp ESpromoter minor haplotype	This paper	
pGL3- Basic with 810 bp *LAX1* promoter rs11240391-T allele T	This paper	
pGL3- Basic with 810 bp *LAX1* promoter rs11240391-G allele	This paper	
pGL3- Basic with 810 bp *LAX1* promoter rs11240391-T allele and 610 bp ESpromoter major haplotype	This paper	
pGL3- Basic with 810 bp *LAX1* promoter rs11240391-T allele and 610 bp ESpromoter minor haplotype	This paper	
pGL3- Basic with 810 bp *LAX1* promoter rs11240391-G allele and 610 bp ESpromoter major haplotype	This paper	
pGL3- Basic with 810 bp *LAX1* promoter rs11240391-G allele and 610 bp ESpromoter minor haplotype	This paper	
pcDNA3.1 Mammalian expression vector	ThermoFisher	Cat#V79020
c Fos (FOS) (NM_005252) Human Tagged ORF Clone	Origene	Cat#RC202597
c-Jun (JUN) (NM_002228) Human Tagged ORF Clone	Origene	Cat#RC209804
Software and algorithms		
ClicO FS	Cheong et al., 2017[63]	http://clicofs.codoncloud.com
WashU Epigenome Browser	Li et al., 2022[64]	http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/
RSAT: regulatory sequence analysis tools	Santana-Garcia et al., 2022[67]	http://rsat.sb-roscoff.fr/
Custom Alt-R™ CRISPR-cas9 guide RNA	Integrated DNA technologies	https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM
Alt-R™ CRISPR HDR design tool	Integrated DNA technologies	https://eu.idtdna.com/pages/tools/alt-r-crispr-hdr-design-tool
NEBaseChanger	New England BioLabs	https://nebasechanger.neb.com/
Primer3web version 4.1.0	Untergasser et al., 2012[71]	https://primer3.ut.ee/
IBM SPSS Statistics	IBM	https://www.ibm.com/support/pages/downloading-ibm-spss-statistics-27ggplot
Haploview	Barrett et al., 2005 [72]	https://www.broadinstitute.org/haploview/downloads
Flowjo	Treestar	https://www.flowjo.com/
R software V4.1.3	the R Core Team and the R Foundation for Statistical Computing	https://www.r-project.org/
R package ggplot2 v3.4.1	Wilkinson et al. 2011[73]	https://ggplot2.tidyverse.org/
R package ggpubr v0.6.0	R package	https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/

Experimental Model and Subject Details

Cell lines

Jurkat cells were cultured according to standard cell culture protocols. RPMI 1640 medium with GlutaMax (61870-044, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, A5256701, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) was used as the culture medium. Cells were maintained in a 37 °C incubator with 95% humidity and an atmosphere containing 5% CO2. Jurkat cells were subcultured to a density of 1 million cells per milliliter. The culture medium was refreshed every three days to ensure a constant supply of nutrients. Combined stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich, P1585) and ionomycin (Iono; Sigma-Aldrich, I3909) was performed to activate Jurkat cells. Cells were harvested during the exponential growth phase, washed, and resuspended in a fresh medium. Subsequently, PMA, a protein kinase C activator, and ionomycin, a calcium ionophore, were added at 20 ng/mL and 2.5 μM final, respectively. The cells were incubated for a specific time in each experiment.

Cohort

Patients diagnosed with malaria were recruited from two Senegalese locations, Dakar Primary Hospital and Tambacounda Regional Hospital, including malaria patients (n = 117), with 90 cases of cerebral malaria and 27 cases of severe non-cerebral malaria, as reported previously[61]. Control samples (n = 79) were recruited from healthy volunteers in Dakar. Information on age and sex are available in Table S1. Age is associated with SM as shown in Table S2. Written informed consent was obtained from each patient and accompanying family members. The research protocol was approved by the institutional research ethics committee of Cheikh Anta Diop University. On the day of admission, venous blood samples were collected alongside biological data to determine parasite density, haematology, and other relevant characteristics. The presence of *Plasmodium falciparum* was checked by examining thin and thick blood smears by at least two biologists trained before initiating antimalarial treatment. A blood smear was considered positive if asexual parasites were identified, and quantification of parasitized erythrocytes was performed by counting the number per microliter (μL) of blood.

PBMC isolation and cryopreservation

PBMCs were isolated from adult volunteers who donated their blood in the Occitania region in France. Donors reported feeling well and were evaluated to be in good general health by a physician at the French transfusion public service (Etablissement Français du Sang, EFS). Only blood donors who were negative for the presence of HBV, HCV, HIV, and syphilis infection were selected for this work. PBMC were isolated from buffy coats obtained 18 to 24 h after the venipuncture and processed immediately

upon receipt. Isolated PBMCs were frozen in heat-inactivated FBS (Gibco FBS, ThermoFisher) containing 10% tissue culture-grade DMSO (Sigma). Cryovials containing $20x10^6$ PBMC were transferred at -80°C at a cooling rate of 0.2–1°C/minute using a cryopreservation module (StrataCooler Cryo Preservation Module, Agilent Technologies) and, after 24 to 96 h, transferred to liquid nitrogen. To ensure that cellular assays could be properly interpreted and to avoid confounding factors such as poor cryopreservation of the PBMC, we quantified cell viability after thawing and a 20 ± 4 h recovery period on an automated Cellometer auto2000 (Nexcelom) cell counter using acridine orange and propidium iodide cell staining. Subject PBMCs that did not meet the viability criteria of ≥ 85% were excluded from analyses. This study on PBMC from healthy adult subjects was approved by the French South-West & Overseas Ethical Committee and was registered at the French Ministry of Higher Education and Research (DC-2015-2488). Experiments were performed in agreement with the guidelines of the Declaration of Helsinki.

Human $CD4^+$ T Cell purification

Purification was performed using the EasySep™ Human Naive CD4+ T Cell Isolation Kit II purchased from STEMCELL technologies using the manufacturer's recommendations. Purity (>97%) was validated using antibodies recognizing CD3 (BD Horizon™ BV510 Mouse Anti-Human CD3), CD4 (CD4 Monoclonal Antibody (RPA-T4), FITC, eBioscience) and CD45RA (BD Pharmingen™ PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD45RA) on the MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer (Miltenyi Biotec) (Figure S3A).

Method Details

Data acquisition

The data of physical chromatin interactions were obtained from Genehancer data prediction[62] and from GEO: GSM6509371[29]. The circos plot was built using ClicO FS[63]. All genomic regions were obtained using WashU Epigenome Browser[64]. ATAC-seq data from a PBMC sub-cell were obtained from Calderon et al.[31]. Naive CD4+ epigenomic markers were obtained from Roadmap Data from GEO available on WashU Epigenome Browser[32]. ReMap data[37] were obtained from the download page (https://remap.univ-amu.fr/download_page) using non-redundant peaks. The predicted regulatory elements come from the ENCODE project[65] available on UCSC tracks. The recombination rate data is also available on the UCSC website and comes from the HapMap project[66]. The eQTL data and pip value were obtained from ELIXIR Estonia eQTL Browser[35].

Motif analysis

The impact of the selected SNP on transcription factor binding sites (TFBS) was assessed with the Rsat tool[67], in its default settings and using the Jaspar TFBS

databases[68] (Jaspar core non-redundant vertebrates 2020 Collection). Then, for the predicted transcription factor binding sites, the presence of transcription factor in the SNP region was confirmed using ReMap data[37].

Genome editing using CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 guide selection, single-stranded oligodeoxynucleotide donor design, and RNP complex preparation

We identified guide RNAs using computational algorithms prioritizing on-target efficacy and reduction of off-target effects using the CRISPR design tool provided by IDT (Integrated DNA Technologies), the custom Alt-R™ CRISPR-Cas9 guide RNA and the Alt-R™ CRISPR HDR design tools. A 101-bp HDR donor oligonucleotide was also designed for CRISPR-mediated Homology Directed Repair (HDR). These chemically synthesized oligoribonucleotides were manufactured by IDT: crRNAs (35 mer with a part specific to the target DNA sequence, Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA, IDT), universal tracrRNAs (67 mer, Alt- R CRISPR-Cas9 tracrRNA, 20 nmol, 1072533, IDT) and the 100-bp single-stranded oligodeoxynucleotide donor template (ssODN). These sequences were resuspended in IDTE buffer (pH 7.5, 11-05-01-15, IDT) to achieve a final concentration of 100 µM each. The active gRNA complex was formed by mixing 5 µL of universal tracrRNA (100 µM) with 5 µL of crRNA (100 µM) and incubated for 5 minutes at 95°C and then returned to room temperature. The Cas9 Ribonucleoprotein (RNP) complex was assembled *in vitro* by incubating 3.4 μL of Cas9 protein (62 μM) (Alt-R™-S.p Hifi Cas9 Nuclease V3, 100 μg, 1081060, IDT) with 4.8 μL active gRNA complex (crRNA-tracrRNA) and 1.8 μL of PBS (1X).

Deletion of ESpromoter region in Jurkat cells

The ESpromoter deletion was performed in Jurkat cells as previously described[17]. To generate the 506 bp genomic deletion comprising the 5 SNPs, 5 x 10^5 Jurkat cells were electroporated by the Neon transfection system (MPK5000, Invitrogen) with 2 μL of gRNA1 RNP complex and 2 μL gRNA2 RNP complex and 2 µL of HDR enhancer. Following the transfection, the pool of transfected cells was clonally plated into 96-well plates at a limiting dilution of less than 0.5 to avoid mixed clones. Following 14 days of cell growth, the individual clone was isolated, genomic DNA was extracted and amplified by PCR and then screened for the desired deletion. DNA amplification was performed directly from the clones, previously treated with 20 μL of dilution buffer and 0.5 μL of DNA Release additive, which improved DNA release from the cells. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using 25 μL of 2X Phire Tissue Direct PCR Master Mix containing Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2 μL of previously prepared DNA and 1 μL of forward and reverse primer (10 μM), annealing at 60 °C. Clones were screened for deletion by PCR using primers F1 and R1, followed by agarose gel electrophoresis of PCR amplicons. A short fragment of 335 bp in the presence of deletion and a long fragment of 841 bp in the absence of deletion were expected. PCR products were purified using

the PCR DNA Purification kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions, and the deletion was confirmed by Sanger sequencing of PCR amplicons. One wild-type clone (WT_c) and three 506-bp biallelic deletion clones (Δ1, Δ2, and Δ3) were selected for further study.

Deletion of ESpromoter region in primary T cells

CRISPR-Cas9 assays were performed as previously described, with minor adaptations[69]. Briefly, crRNA–tracrRNA duplexes were prepared using three different crRNAs per condition targeting the ESpromoter sequence or using negative control crRNAs (IDT, Catalog#1072544,
#1072545 and #1072546). RNP complexes were then prepared by adding 90 pmol of Cas9 nuclease (IDT, Catalog #1081059) to the duplexes for 20-30 min. After adding 4µL of 100 µM
Alt-R Cas9 Electroporation Enhancer (IDT, Catalog #1075916), 1.5 million T cells per condition were transfected using the P2 Primary Cell 4D-Nucleofector X kit S (Lonza) and the EH100 program with a 4D-Nucleofector (Lonza). CD4+ Cells were then cultured in ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium for 24 hours supplemented with ImmunoCult™ Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator (25 µl/1 million cells). To assess cytokine production, a 4-hour restimulation step with PMA/ionomycin/BFA was also included.
The crRNA guides used for the CRISPR-Cas9 deletion were the same as the previous experiment in Jurkat cells, with the addition of a third guide gRNA4 to enhance deletion efficiency. Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kits for DNA Isolation (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. To confirm CRISPR-Cas9-mediated deletion, PCR was performed using classical parameters with primers flanking the deleted region at an annealing temperature of 64°C. Primers (F1 and R1) used are the same as for clone selection in Jurkat cells.

Single nucleotide editing in Jurkat cells

The Jurkat cell line was genotyped for rs11240391 by PCR amplification of a 527 bp fragment using primers F2 and R2, followed by Sanger sequencing. The sequence indicated that the Jurkat cell line is homozygous T/T for rs11240391. To replace, by homologous recombination, the T allele with a G allele at the rs11240391 variant located in the promoter region of the *LAX1* gene, we transfected the cells with 3.6 µL of gRNA3 RNP complex, 0.4 µL HDR enhancer (3mM) and 3.6 µL at 100 µM of ssODN in which a G allele is present in place of the T allele. The active gRNA complex and Cas9 RNP complex were made as described above and transfected by the Neon transfection system into Jurkat cells. After 48 hours, the pool of transfected cells was clonally plated into 96-well plates at a limiting dilution of less than 0.5 to avoid mixed clones. Cell growth, DNA extraction, and PCR amplification using primers F2 and R2 were performed as described above. The sequence of the rs11240391 variant was

determined by Sanger sequencing in different clones. One wild-type clone (WT_{HR}) and two heterozygous clones (T/G_1 and T/G_2) were selected for further study.

Luciferase reporter assay

Promoter Activity

The 780-bp *ATP2B4* promoter fragment (GRCh38, chr1: 203626081-203626860) was inserted into the MluII-XhoI sites of the pGL3-basic vector (Promega, Madison, WI, USA, # E1751), which contained the firefly luciferase coding sequence (GeneCust, Boynes, France). The 810-bp *LAX1* promoter region (GRCh38, chr1: 203764726-203765536) containing rs1124039 was also inserted into the MluII-XhoI sites of the pGL3-basic vector (Promega, Madison, WI, USA, # E1751). These constructs were supplied by Genecust custom services (Luxembourg). Site-directed mutagenesis was then performed to modify the "T" allele to "G" in rs1124039 using the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) and the Forward 5' – CTGTGCCCTGgGCTTCATTAG -3' and Reverse 5' – GAAACTCTGCTCAGCTCTTAATC - 3' mutagenesis primers designed by NEBaseChanger tool.

Jurkat cells were transfected using the Neon™ Transfection system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. One day before transfection, cells were diluted to a concentration of 0.6 million. In each experiment, 1 million cells were co-transfected with 1 μg of vectors: (1) negative control vector (empty pGL3-basic vector (cat# E1751)) or the construct to be tested (pGL3-*ATP2B4* promoter, pGL3-*LAX1* rs11240391-T allele, pGL3-*LAX1* rs11240391-G allele) and (2) 200 ng of pRL-SV40 (plasmid encoding renilla luciferase from Promega (cat# E2231)), as an internal control for transfection efficiency. After transfection, Jurkat cells were rested at 37ºC in 5% CO2 for 24 h. Under stimulation conditions, Jurkat cells were treated with PMA/ionomycin and incubated for 6 or 24 hours. Next, cells were subjected to firefly and renilla luciferase activity on 20 μl of cell lysate with 100µL LARII (1X) followed by 100µL of Stop and go (1X) according to the standard instructions provided in the Dual-Luciferase kit (Promega, Madison, WI, USA) using a TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The firefly luciferase activity of each sample was normalized to renilla luciferase and expressed as fold change relative to the empty vector control. Three experiments were performed in triplicate.

Enhancer-silencer Activity

From the construct containing the 780-bp fragment of *ATP2B4* promoter (GRCh38, chr1: 203626081-203626860) at the MluI-XhoI sites, the 601-bp fragment of *ATP2B4* ESpromoter (GRCh38, chr1: 203682499-203683100) was cloned into the SalI-BamHI sites either with the minor or major alleles of the five SNPs (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255). The 601-bp fragment of *ATP2B4* ESpromoter

containing the respective minor or major allele of the 5 SNPs was cloned into the SalI-BamHI sites in the construct having the 810-bp of *LAX1* promoter region (GRCh38, chr1: 203764726-203765536) at the MluI-XhoI used for the promoter activity. Luciferase assays were performed in Jurkat cells as described above.

Effect of transcription factors

For the luciferase assay, the cells were transfected with a total of 2 μg of plasmid, including (1) 0.5 µg of pRL-SV40 and (2) 0.5 µg of either Firefly luciferase gene pGL3-*LAX1* rs11240391-T allele or pGL3-*LAX1* rs11240391-G allele with or without (3) 0.5 µg of expression plasmids coding for proteins of interest (FOS, RC202597, Origene) and or (JUN, RC209804, Origene) completed with (4) 0 to 1 µg of empty pcDNA3.1 plasmid to equalize DNA quantities as previously described[70] in each condition, as detailed below:

1: 0.5 µg pGL3-Renilla + 0.5 µg pGL3-*LAX1*-T + 1 µg pcDNA3.1
2: 0.5 µg pGL3-Renilla + 0.5 µg pGL3-*LAX1*-G + 1 µg pcDNA3.1
3: 0.5 µg pGL3-Renilla + 0.5 µg pGL3-*LAX1*-T + 0.5 µg plasmide JUN + 0.5 µg pcDNA3.1
4: 0.5 µg pGL3-Renilla + 0.5 µg pGL3-*LAX1*-G + 0.5 µg plasmide JUN + 0.5 µg pcDNA3.1
5: 0.5 µg pGL3-Renilla + 0.5 µg pGL3-*LAX1*-T + 0.5 µg plasmide FOS + 0.5 µg pcDNA3.1
6: 0.5 µg pGL3-Renilla + 0.5 µg pGL3-*LAX1*-G + 0.5 µg plasmide FOS + 0.5 µg pcDNA3.1
7: 0.5 µg pGL3-Renilla + 0.5 µg pGL3-*LAX1*-T + 0.5 µg plasmide JUN + 0.5 µg plasmide FOS
8: 0.5 µg pGL3-Renilla + 0.5 µg pGL3-*LAX1*-G + 0.5 µg plasmide JUN + 0.5 µg plasmide FOS
Luciferase assays were performed in Jurkat cells as described above.

Transfection of WT and T/G edited clones with transcription factors

Jurkat WT clone WT_{HR} (wild-type clone isolated after CRISPR/Cas 9) and heterozygous clones T/G_1 and T/G_2 were counted before being diluted to 0.3 million cells per milliliter in RPMI+glutamax culture medium (10% decomplemented SVF) 24 h before transfections. Cells were washed in 10 mL of 1X DPBS. For each clone, 1 million cells resuspended in 100 μL of T buffer (NEON Invitrogen) were co-transfected with 500 ng of FOS and 500 ng of JUN expression plasmids (RC202597 and RC209804, respectively, Origene). In the condition without plasmids, the clones underwent the electric shock of transfection (1200 volts 40 ms 1 pulse) and will serve as controls. For each sample, each condition was performed in two replicates. Cell pellets were recovered after 48h of cell culture.

RT-qPCR

RNA extractions from Jurkat wild-type cells and edited clones (deletion or allele modification) were conducted using the RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). 1 μg of RNA per sample was transcribed into cDNA using the Superscript VILO Master Mix (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed using the SYBR Select Master Mix (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems Waltham, MA, USA) on the QuantStudio 6 Flex instrument on 10-fold diluted cDNA. Primers F3/R3 for *ATP2B4* and F4/R4 for *LAX1* gene expression quantification were designed using Primer3 software[71]. Gene expression was normalized using the HPRT1 housekeeping gene, and the relative expression was computed using the ΔΔCT method. The data provided is an average of triplicates from three independent experiments per sample.
Approximately 50,000 T cells per condition were used, and total RNA was extracted using the NucleoSpin® RNA XS kit (MACHEREY-NAGEL). Reverse transcription was carried out with the SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Ozyme), and quantitative PCR was performed using the SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix on a LightCycler® 480 instrument (Roche Diagnostics). Primers F5/R5 for *ATP2B4* and F4/R4 for *LAX1* gene expression quantification were used.

Flow cytometry staining and analyses

The day before PMA/Ionomycin stimulation, Jurkat cells and clones were diluted to a concentration of 0.6 million. The cells were then stimulated as described above. After stimulation, samples were collected at 6 time points: 0 hours, every 15 minutes from 1 to 2 hours, and a final point at 4 hours. Samples were stored at 4°C until collection of the last time point at 4 hours. For each time point, samples were divided into two groups: unstained cells (negative) and stained cells (positive) with an anti-CD69 antibody (310904, BioLegend). The cells were then centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes at 4°C. Positive samples were resuspended with 100 μL of anti-CD69/DPBS antibody. After 30 minutes of incubation in the dark at 4°C, samples were washed with 3ml DPBS and centrifuged at 1500 rpm. Cells were then resuspended in 250 μL of DPBS. Negative samples were resuspended in 250 μL of DPBS. Samples were acquired on the LSRFortessa-X20 cytometer (BD Bio-sciences), and data were analysed using FlowJo software (version 10, LLC).

After 24h of cell culture, primary T cells were stimulated using 10 ng/mL Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, Sigma) and 1 µg/mL Ionomycin (Sigma) for 4 hours in the presence of 10 µg/mL Brefeldin A (Sigma). Cells were then labeled with the fixable viability dye eFluor 506 and stained with fluorophore-conjugated antibodies specific for CD69-BV711 (310944, BioLegend), CD25-PeCy7 (302612, BioLegend) and IL-2-BV750 (MQ1-17H12 (RUO), BD Biosciences) by using the Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Data acquisition was performed on FACSymphony™ Cell Analyzer (BD Biosciences). Analyses were carried out using FlowJo and Prism software.

TaqMan genotyping

Genomic DNA from the Senegalese population was extracted and amplified as described previously[61]. The rs11240391 single nucleotide polymorphism (SNP) was genotyped using the TaqMan allelic discrimination technique (4351379, C_319219_10, Thermofisher, Waltham, MA, USA) on the QuantStudio 6 Flex instrument. A total of 117 severe malaria cases and 79 controls were genotyped. The master mix consisted of 1 μl of genomic DNA at a concentration of 12.5 ng/μl, 2.1 μl of 2x master mix (TaqMan Genotyping Master Mix, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), and 0.06 μl for the Taqman 40x assays in a final volume of 5 μl. The thermal cycling program included an initial step of 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles.

Nuclear extracts preparation and electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear proteins were extracted from the Jurkat cell line using the Nuclear extract kit (Active Motif, cat# 40010) according to the manufacturer's instructions. For the preparation of nuclear extracts, 9.10^6 fresh wild-type cells were used. Protein concentrations were determined by a Bradford protein assay (Bio-Rad). EMSA was performed using the Gelshift™ Chemiluminescent EMSA Kit (Active Motif, cat#37341) according to manufacturer's instructions. For the oligo probe, a 30 bp fragment with the SNP rs11240391 centered in the middle was made by annealing two biotinylated oligonucleotides (OligoB Ref F and OligoB Ref R for the major T allele; OligoB Alt F and OligoB Alt R for the minor G allele). For the competition, the same 30 bp non-biotinylated oligos were used (Oligo Ref F and Oligo Ref R for the major T allele; Oligo Alt F and Oligo Alt R for the minor G allele). The second competition was performed by using AP-1 competitor corresponding to 27 bp non-biotinylated oligos containing bases -65 to -39 of human *MMP13* promoter sequence[38] (OligoAP-1 F and OligoAP-1 R). For each reaction, we have used 10 □g of nuclear extract, 2 □l of 0.2 □M of biotinylated oligo duplexes, and 2 □l of 40 □M of non-biotinylated competitor oligo duplexes. Complexes were separated on 6% polyacrylamide Novex™ DNA Retardation Gels prepared with 0.5X TBE gel buffer.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses

The Haploview tool[72] was used to assess the deviation of genotype frequency from Hardy Weinberg equilibrium in the control group. Genetic association analyses were conducted using IBM SPSS Statistics 27 (IBM, NY, USA). Logistic regression analyses were performed to adjust for the influence of age and to determine genetic interactions between *ATP2B4* and *LAX1* gene variants. Haplotype frequency estimation and haplotype association tests were performed with Haploview[72] using the "do association test" option and the "Case-control data" parameter. Statistical analyses of luciferase reporter assays and RT-qPCR results were performed by Student's t-tests (ns, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). All tests were two-sided. Graphs were

generated using ggplot2[73] and ggpubr. Paired t-test was used to compare the percentage of CD69-positive cells of wild-type cells with that of cells mutated with the Crispr-Cas9 method, after assessing the normality of the data using the Shapiro-Wilk method. These tests were one-sided, with an alternative hypothesis based on known *LAX1* expression in the cells and the known effect of *LAX1* on CD69 expression.

Supplemental Information PDF file

Figure S1-S5

Table S1. Excel file containing additional data too large to fit in a PDF, related to Figure 6

Table S2: Results of epistatic interaction between the 5 SNPs at ESpromoter and rs11240391, related to Figure 6

Table S3: Details of oligonucleotides used (name, source, identifier, and sequence) related to the Key resources table

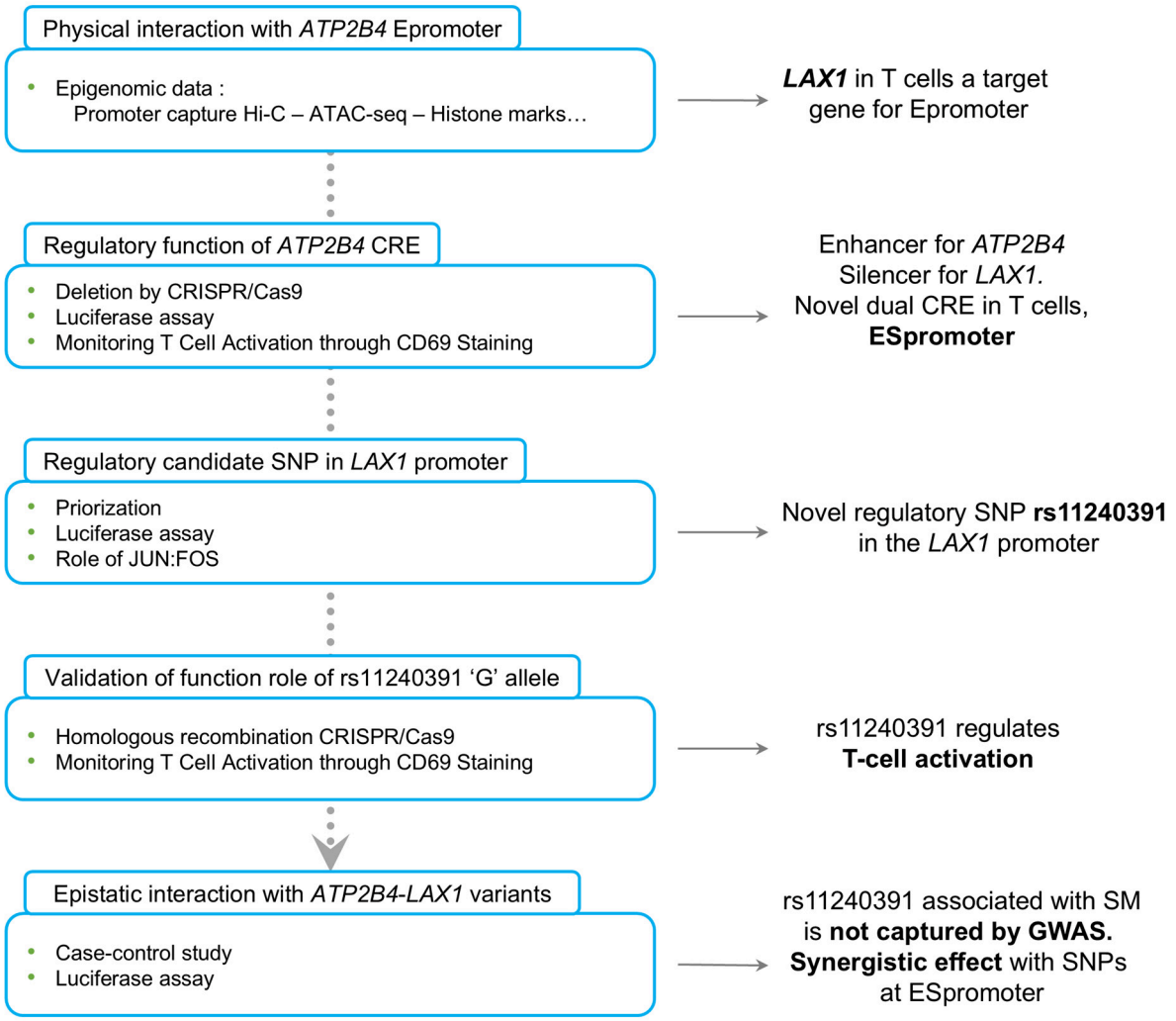


Figure S1: Workflow of bioinformatics and experimental analysis with the key findings, related to Figure 1-6

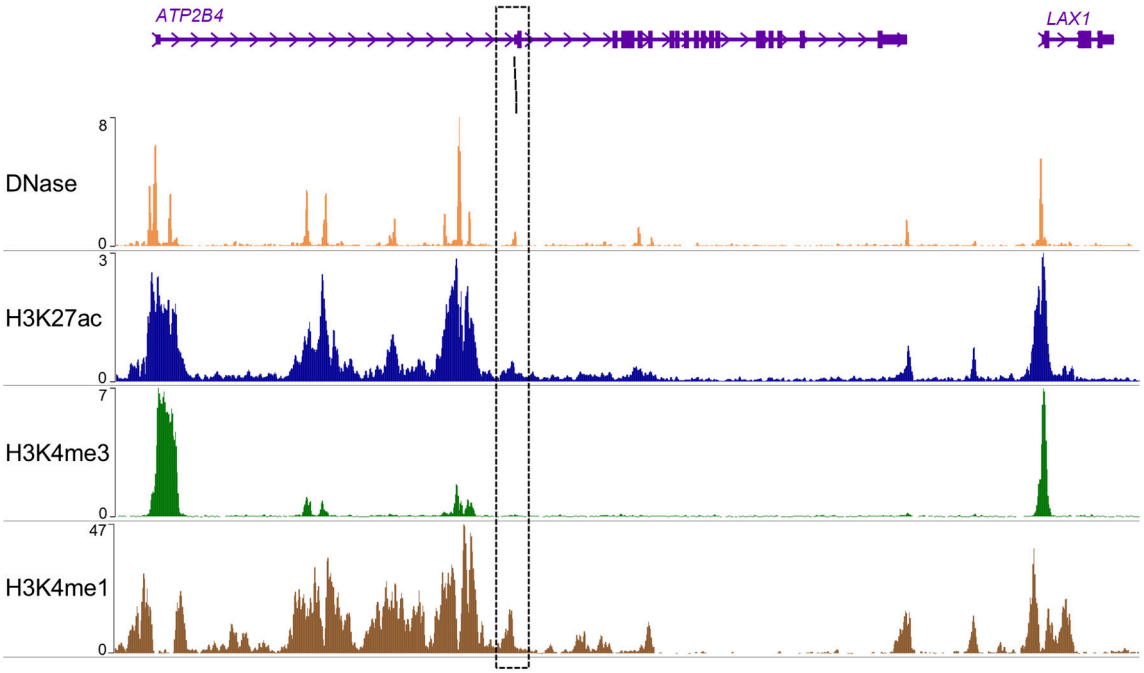


Figure S2: Epigenomic marks of Jurkat cell, related to Figure 1

WashU epigenome browser view of epigenomic data in Jurkat cells. The frame corresponds to the Epromoter. Black lines correspond to the 5 SNPs previously identified (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, and rs1541255).

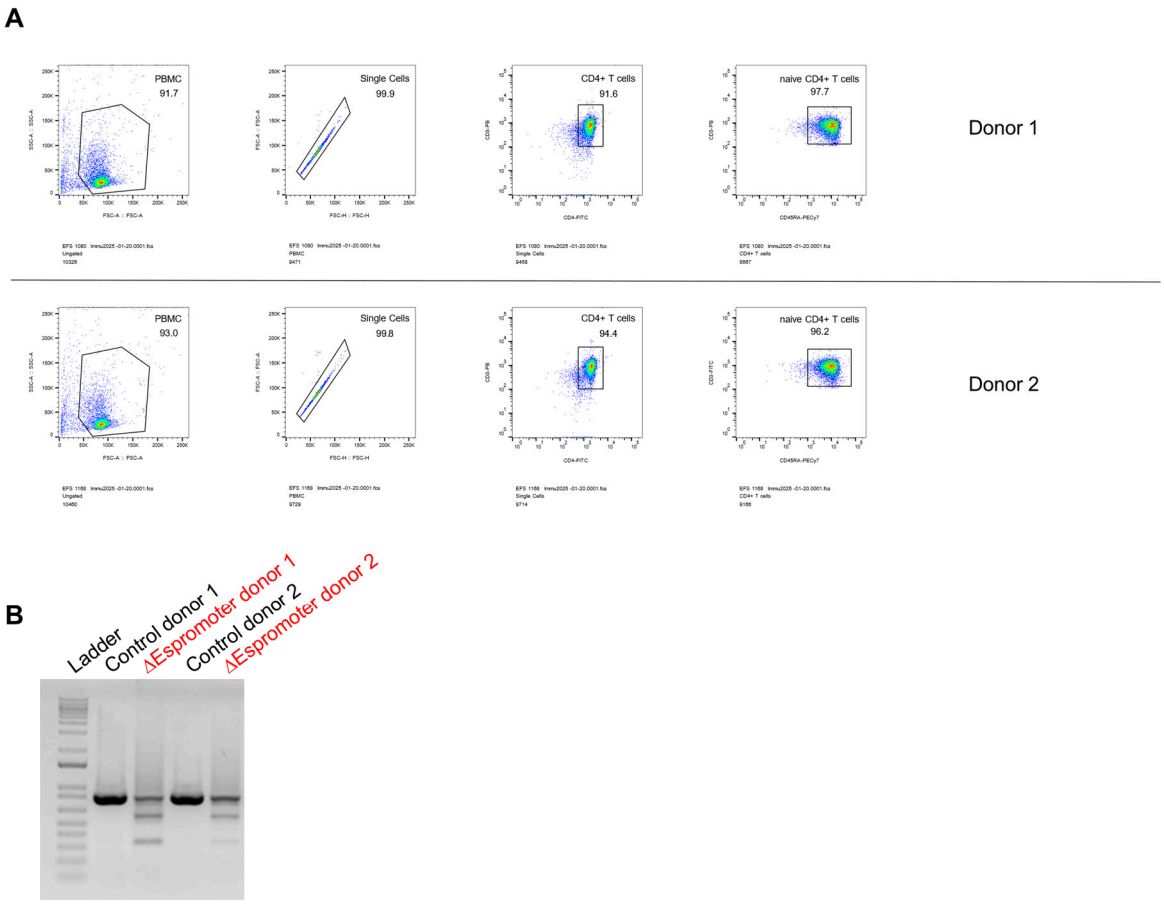


Figure S3: ESpromoter is essential for normal human primary T cell activation, related to Figure 3.

(A) Flow cytometry gating strategy used to validate the purity of naive CD4+ T cells from each blood donor.
(B) Agarose gel electrophoresis of PCR amplification from genomic DNA extracted from cells subjected to CRISPR-Cas9-mediated ESpromoter deletion or control conditions. A smear indicates successful deletion, reflecting micro-insertions and deletions (indels) generated between the three crRNA guide sites.

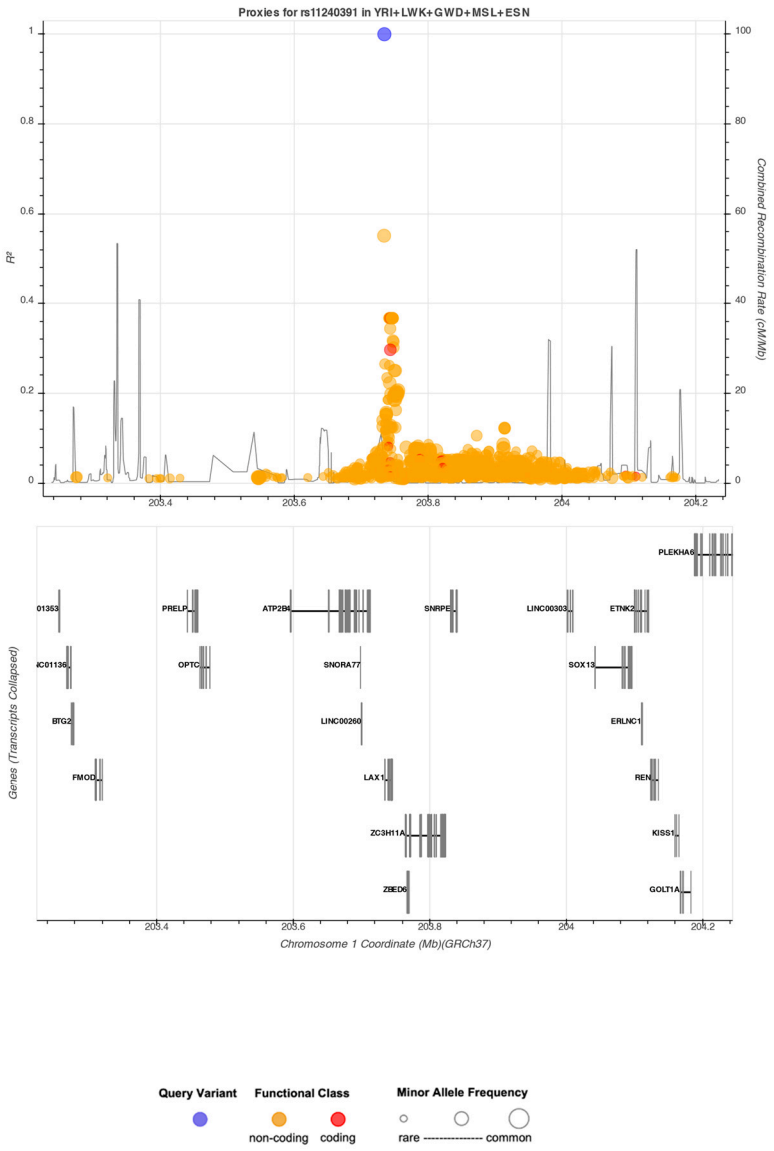


Figure S4: rs11240391 shows no significant linkage disequilibrium with nearby variants, related to Figure 6.

The top panel is a LocusZoom plot illustrating the linkage disequilibrium (LD) along chromosome 1 (chr1:203234231-204234231-GRCh37) in African populations (YRI, LWK, GWD, MSL, ESN). The X-axis represents genomic coordinates, while the left Y-axis shows the LD (r^2) between rs11240391 and surrounding variants. The right Y-axis represents combined recombination rates estimated from HapMap data. Each point represents a genetic variant, with blue indicating the rs11240391 query variant, orange for non-coding variants, and red for coding variants. The size of each circle corresponds to the minor allele frequency (MAF), with larger circles representing more common variants. The bottom panel displays the annotated genes in the region.

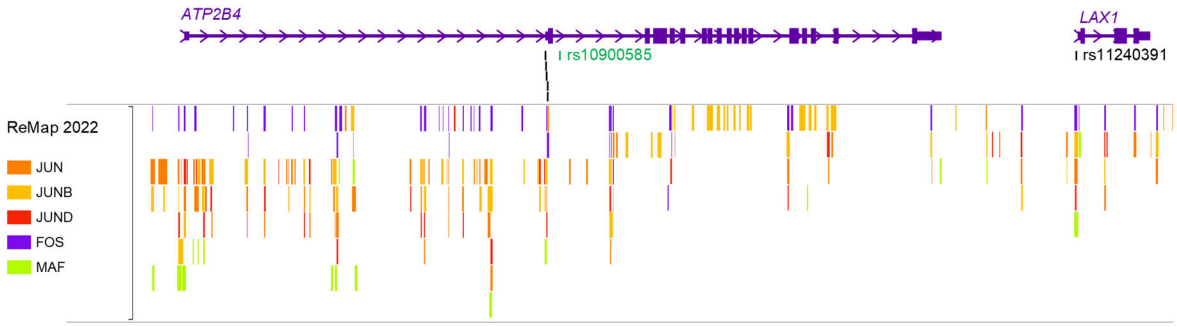


Figure S5: Identification of the FOS and JUN binding site on ESpromoter region, *ATP2B4* and *LAX1* promoters, related to Figure 4

CHIP-seq peaks from ReMap2022 confirmed the binding of transcription factors, identified by RSAT, within the ESpromoter and *ATP2B4* and *LAX1* promoters, particularly the FOS::JUN dimer corresponding to AP-1.

Excel File: Table_S1

Table S1: Description of the case-control cohort recruited in Senegal, related to Figure 6

For each individual, the details indicated are identification number, phenotype (control: Ctrl; Severe malaria: SM), age in years, sex (Female: F; Male: M), and the genotype for rs11240391.

	Ctrl	SM	Odd ratio (95% CI)	P-value (two-sided)
Age	NA	NA	0.98 (0.97-0.99)	0.002
Sex				
Male	40	72	1	-
Female	38	38	0.57 (0.31-1.01)	0.07
LAX1				
Risk genotypes (GG)			1	-
Protective genotype (TT+ TG)	62	71	0.38 (0.19-0.75)	0.005
ATP2B4				
Risk haplotype (Major/Major)	26	64	1	-
Protective haplotypes (Major/Minor + Minor/Minor)	49	49	0.40 (0.22-0.74)	0.004
Combination				
Risk genotypes *LAX1*/haplotype *ATP2B4*	6	24	1	-
Protective genotypes *LAX1*/haplotype *ATP2B4*	39	28	0.18 (0.07-0.50)	0.0008
Interaction *LAX1* × *ATP2B4*			0.33 (0.19-0.57)	0.00006

Table S2: Results of epistatic interaction between the 5 SNPs at ESpromoter and rs11240391, related to Figure 6

Oligonucleotides		
sgRNA	SEQUENCE	PAM
gRNA1	TCCTCTACATTGGAGTTTAC	AGG
gRNA2	TAGACTTCGGACGGCTACTC	GGG
gRNA3	CCAATGTGCTAATGAAGCAC	AGG
gRNA4	CAACTGTAGTAGTAGACGTC	AGG
ssODN sequence	SEQUENCE	
ssODN – G at rs11240391	TATGTTTTCTTCTAGCAGATTAAGAGCTGAGCAGAGTTTCCTG TGCCCTGGGCTTCATTAGCACATTGGTGGTGTCGTTTCCGGT GACTGACTCTCTGTTT	
Primers for EMSA	SEQUENCE	
OligoB Ref F	5'[BIO]CCTGTGCCCTGTGCTTCATTAGCACATTGG 3'	
OligoB Ref R	5'[BIO]CCAATGTGCTAATGAAGCACAGGGCACAGG 3'	
OligoB Alt F	5'[BIO]CCTGTGCCCTGGGCTTCATTAGCACATTGG 3'	
OligoB Alt R	5'[BIO]CCAATGTGCTAATGAAGCCCAGGGCACAGG 3'	
Oligo Ref F	5'CCTGTGCCCTGTGCTTCATTAGCACATTGG 3'	
Oligo Ref R	5'CCAATGTGCTAATGAAGCACAGGGCACAGG 3'	
Oligo Alt F	5'CCTGTGCCCTGGGCTTCATTAGCACATTGG 3'	
Oligo Alt R	5'CCAATGTGCTAATGAAGCCCAGGGCACAGG 3'	
OligoAP-1 F	5′ CCTATCCATAAGTGATGACTCACCATT 3′	
OligoAP-1 R	5'AATGGTGAGTCATCACTTATGGATAGG 3'	
PCR primers	SEQUENCE	
F1	GGCCACCCTTCAGATCACTT	
R1	GCCTCCCTGTCTCAACTTCT	
F2	TGAATCAGAAGAGGGTCCCG	
R2	CGATCTCACCGGACATGGT	
F3	CAAGAGTCTGGCCCGAGTTA	
R3	TGGACGATCTCAACAGCAGA	
F4	AGAAATTCTGAGAGCCCGGAG	
R4	GATACCCACCGCGTACTCTG	
F5	TTGGAGAACTTCTGTGGGGC	
R5	GGCATCCTTGGTGATCTCCT	
HPRT1 forward	GGGTGTTTATTCCTCATGGAC	
HPRT1 reverse	CTCCCATCTCCTTCATCACA	
Primers for mutagenesis	SEQUENCE	
Forward at rs11240391	CTGTGCCCTGgGCTTCATTAG	
Reverse at rs11240391	GAAACTCTGCTCAGCTCTTAATC	

Table S3: Details of oligonucleotides used (name, source, identifier, and sequence), related to the Key resources table

REFERENCES

1. Demircioğlu, D., Cukuroglu, E., Kindermans, M., Nandi, T., Calabrese, C., Fonseca, N.A., Kahles, A., Lehmann, K.-V., Stegle, O., Brazma, A., et al. (2019). A Pan-cancer Transcriptome Analysis Reveals Pervasive Regulation through Alternative Promoters. Cell *178*, 1465-1477.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.018.
2. Zhuang, H.-H., Qu, Q., Teng, X.-Q., Dai, Y.-H., and Qu, J. (2023). Superenhancers as master gene regulators and novel therapeutic targets in brain tumors. Exp Mol Med *55*, 290–303. https://doi.org/10.1038/s12276-023-00934-0.
3. Sun, N., Akay, L.A., Murdock, M.H., Park, Y., Galiana-Melendez, F., Bubnys, A., Galani, K., Mathys, H., Jiang, X., Ng, A.P., et al. (2023). Single-nucleus multiregion transcriptomic analysis of brain vasculature in Alzheimer's disease. Nat Neurosci *26*, 970–982. https://doi.org/10.1038/s41593-023-01334-3.
4. Riboldi, G.M., Vialle, R.A., Navarro, E., Udine, E., de Paiva Lopes, K., Humphrey, J., Allan, A., Parks, M., Henderson, B., Astudillo, K., et al. (2022). Transcriptome deregulation of peripheral monocytes and whole blood in GBA-related Parkinson's disease. Mol Neurodegener *17*, 52. https://doi.org/10.1186/s13024-022-00554-8.
5. Wilk, A.J., Lee, M.J., Wei, B., Parks, B., Pi, R., Martínez-Colón, G.J., Ranganath, T., Zhao, N.Q., Taylor, S., Becker, W., et al. (2021). Multi-omic profiling reveals widespread dysregulation of innate immunity and hematopoiesis in COVID-19. J Exp Med *218*. https://doi.org/10.1084/jem.20210582.
6. Cabantous, S., Doumbo, O., Poudiougou, B., Louis, L., Barry, A., Oumar, A.A., Traore, A., Marquet, S., and Dessein, A. (2017). Gene Expression Analysis Reveals Genes Common to Cerebral Malaria and Neurodegenerative Disorders. J Infect Dis *216*, 771–775. https://doi.org/10.1093/infdis/jix359.
7. Cabantous, S., Poudiougou, B., Bergon, A., Barry, A., Oumar, A.A., Traore, A.M., Chevillard, C., Doumbo, O., Dessein, A., and Marquet, S. (2020). Understanding Human Cerebral Malaria through a Blood Transcriptomic Signature: Evidences for Erythrocyte Alteration, Immune/Inflammatory Dysregulation, and Brain Dysfunction. Mediators Inflamm *2020*, 3280689. https://doi.org/10.1155/2020/3280689.
8. Nakano, M., Ota, M., Takeshima, Y., Iwasaki, Y., Hatano, H., Nagafuchi, Y., Itamiya, T., Maeda, J., Yoshida, R., Yamada, S., et al. (2022). Distinct transcriptome architectures underlying lupus establishment and exacerbation. Cell *185*, 3375-3389.e21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.07.021.
9. Reyes, M., Filbin, M.R., Bhattacharyya, R.P., Billman, K., Eisenhaure, T., Hung, D.T., Levy, B.D., Baron, R.M., Blainey, P.C., Goldberg, M.B., et al. (2020). An immune-cell signature of bacterial sepsis. Nat Med *26*, 333–340. https://doi.org/10.1038/s41591-020-0752-4.
10. Zubovic, L., Piazza, S., Tebaldi, T., Cozzuto, L., Palazzo, G., Sidarovich, V., De Sanctis, V., Bertorelli, R., Lammens, T., Hofmans, M., et al. (2020). The altered transcriptome of pediatric myelodysplastic syndrome revealed by RNA sequencing. J Hematol Oncol *13*, 135. https://doi.org/10.1186/s13045-020-00974-3.
11. Gentles, A.J., Newman, A.M., Liu, C.L., Bratman, S. V, Feng, W., Kim, D., Nair, V.S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C.D., et al. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. Nat Med *21*, 938–945. https://doi.org/10.1038/nm.3909.
12. Wang, Q., Zhang, Y., Wang, M., Song, W.-M., Shen, Q., McKenzie, A., Choi, I., Zhou, X., Pan, P.-Y., Yue, Z., et al. (2019). The landscape of multiscale transcriptomic networks and key regulators in Parkinson's disease. Nat Commun *10*, 5234. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13144-y.
13. Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W.M., Zheng, S., Butler, A., Lee, M.J., Wilk, A.J., Darby, C., Zager, M., et al. (2021). Integrated analysis of multimodal single-cell data. Cell *184*, 3573-3587.e29. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.048.
14. Pennacchio, L.A., Bickmore, W., Dean, A., Nobrega, M.A., and Bejerano, G. (2013). Enhancers: five essential questions. Nat Rev Genet *14*, 288–295. https://doi.org/10.1038/nrg3458.
15. Dao, L.T.M., and Spicuglia, S. (2018). Transcriptional regulation by promoters with enhancer function. Transcription *9*, 307–314. https://doi.org/10.1080/21541264.2018.1486150.
16. Santiago-Algarra, D., Souaid, C., Singh, H., Dao, L.T.M., Hussain, S., Medina-Rivera, A., Ramirez-Navarro, L., Castro-Mondragon, J.A., Sadouni, N., Charbonnier, G., et al. (2021). Epromoters function as a hub to recruit key transcription factors required for the inflammatory response. Nat Commun *12*, 6660. https://doi.org/10.1038/s41467-021-26861-0.
17. Nisar, S., Torres, M., Thiam, A., Pouvelle, B., Rosier, F., Gallardo, F., Ka, O., Mbengue, B., Diallo, R.N., Brosseau, L., et al. (2022). Identification of ATP2B4 Regulatory Element Containing Functional Genetic Variants Associated with Severe Malaria. Int J Mol Sci *23*. https://doi.org/10.3390/ijms23094849.
18. Malfait, J., Wan, J., and Spicuglia, S. (2023). Epromoters are new players in the regulatory landscape with potential pleiotropic roles. Bioessays *45*, e2300012. https://doi.org/10.1002/bies.202300012.
19. Zabidi, M.A., Arnold, C.D., Schernhuber, K., Pagani, M., Rath, M., Frank, O., and Stark, A. (2015). Enhancer-core-promoter specificity separates developmental and housekeeping gene regulation. Nature *518*, 556–559. https://doi.org/10.1038/nature13994.
20. Malfait, J., Wan, J., Singh, H., Souaid, C., Farah, G., Esnault, C., Sarrazin, S., Sieweke, M., and Spicuglia, S. (2024). Epromoters bind key stress-related transcription factors to regulate clusters of stress response genes. Preprint, https://doi.org/10.1101/2024.11.26.625372 https://doi.org/10.1101/2024.11.26.625372.
21. Buniello, A., MacArthur, J.A.L., Cerezo, M., Harris, L.W., Hayhurst, J., Malangone, C., McMahon, A., Morales, J., Mountjoy, E., Sollis, E., et al. (2019). The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. Nucleic Acids Res *47*, D1005–D1012. https://doi.org/10.1093/nar/gky1120.

22. Boix, C.A., James, B.T., Park, Y.P., Meuleman, W., and Kellis, M. (2021). Regulatory genomic circuitry of human disease loci by integrative epigenomics. Nature *590*, 300–307. https://doi.org/10.1038/s41586-020-03145-z.
23. Adjemout, M., Pouvelle, B., Thiam, F., Thiam, A., Torres, M., Nisar, S., Mbengue, B., Dieye, A., Rihet, P., and Marquet, S. (2023). Concurrent PIEZO1 activation and ATP2B4 blockade effectively reduce the risk of cerebral malaria and inhibit in vitro Plasmodium falciparum multiplication in red blood cells. Genes Dis *10*, 2210–2214. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.02.029.
24. Timmann, C., Thye, T., Vens, M., Evans, J., May, J., Ehmen, C., Sievertsen, J., Muntau, B., Ruge, G., Loag, W., et al. (2012). Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. Nature *489*, 443–446. https://doi.org/10.1038/nature11334.
25. Band, G., Le, Q.S., Jostins, L., Pirinen, M., Kivinen, K., Jallow, M., Sisay-Joof, F., Bojang, K., Pinder, M., Sirugo, G., et al. (2013). Imputation-based meta-analysis of severe malaria in three African populations. PLoS Genet *9*, e1003509. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003509.
26. Malaria Genomic Epidemiology Network, Band, G., Rockett, K.A., Spencer, C.C.A., and Kwiatkowski, D.P. (2015). A novel locus of resistance to severe malaria in a region of ancient balancing selection. Nature *526*, 253–257. https://doi.org/10.1038/nature15390.
27. Ravenhall, M., Campino, S., Sepúlveda, N., Manjurano, A., Nadjm, B., Mtove, G., Wangai, H., Maxwell, C., Olomi, R., Reyburn, H., et al. (2018). Novel genetic polymorphisms associated with severe malaria and under selective pressure in North-eastern Tanzania. PLoS Genet *14*, e1007172. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007172.
28. Malaria Genomic Epidemiology Network (2019). Insights into malaria susceptibility using genome-wide data on 17,000 individuals from Africa, Asia and Oceania. Nat Commun *10*, 5732. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13480-z.
29. González-Serna, D., Shi, C., Kerick, M., Hankinson, J., Ding, J., McGovern, A., Tutino, M., Villanueva-Martin, G., Ortego-Centeno, N., Callejas, J.L., et al. (2023). Identification of Mechanisms by Which Genetic Susceptibility Loci Influence Systemic Sclerosis Risk Using Functional Genomics in Primary T Cells and Monocytes. Arthritis Rheumatol *75*, 1007–1020. https://doi.org/10.1002/art.42396.
30. Mumbach, M.R., Satpathy, A.T., Boyle, E.A., Dai, C., Gowen, B.G., Cho, S.W., Nguyen, M.L., Rubin, A.J., Granja, J.M., Kazane, K.R., et al. (2017). Enhancer connectome in primary human cells identifies target genes of disease-associated DNA elements. Nat Genet *49*, 1602–1612. https://doi.org/10.1038/ng.3963.
31. Calderon, D., Nguyen, M.L.T., Mezger, A., Kathiria, A., Müller, F., Nguyen, V., Lescano, N., Wu, B., Trombetta, J., Ribado, J. V, et al. (2019). Landscape of stimulation-responsive chromatin across diverse human immune cells. Nat Genet *51*, 1494–1505. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0505-9.
32. Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., et al. (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. Nature *518*, 317–330. https://doi.org/10.1038/nature14248.
33. Merino-Wong, M., Niemeyer, B.A., and Alansary, D. (2021). Plasma Membrane Calcium ATPase Regulates Stoichiometry of CD4+ T-Cell Compartments. Front Immunol *12*, 687242. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.687242.
34. Zhu, M., Granillo, O., Wen, R., Yang, K., Dai, X., Wang, D., and Zhang, W. (2005). Negative regulation of lymphocyte activation by the adaptor protein LAX. J Immunol *174*, 5612–5619. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5612.
35. Kerimov, N., Tambets, R., Hayhurst, J.D., Rahu, I., Kolberg, P., Raudvere, U., Kuzmin, I., Chowdhary, A., Vija, A., Teras, H.J., et al. (2023). eQTL Catalogue 2023: New datasets, X chromosome QTLs, and improved detection and visualisation of transcript-level QTLs. PLoS Genet *19*, e1010932. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010932.
36. Kwong, A., Boughton, A.P., Wang, M., VandeHaar, P., Boehnke, M., Abecasis, G., and Kang, H.M. (2022). FIVEx: an interactive eQTL browser across public datasets. Bioinformatics *38*, 559–561. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab614.
37. Hammal, F., de Langen, P., Bergon, A., Lopez, F., and Ballester, B. (2022). ReMap 2022: a database of Human, Mouse, Drosophila and Arabidopsis regulatory regions from an integrative analysis of DNA-binding sequencing experiments. Nucleic Acids Res *50*, D316–D325. https://doi.org/10.1093/nar/gkab996.
38. Samuel, S., Beifuss, K.K., and Bernstein, L.R. (2007). YB-1 binds to the MMP-13 promoter sequence and represses MMP-13 transactivation via the AP-1 site. Biochim Biophys Acta *1769*, 525–531. https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.07.003.
39. Moss, P. (2022). The T cell immune response against SARS-CoV-2. Nat Immunol *23*, 186–193. https://doi.org/10.1038/s41590-021-01122-w.
40. Nlinwe, O.N., Kusi, K.A., Adu, B., and Sedegah, M. (2018). T-cell responses against Malaria: Effect of parasite antigen diversity and relevance for vaccine development. Vaccine *36*, 2237–2242. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.023.
41. Kurup, S.P., Butler, N.S., and Harty, J.T. (2019). T cell-mediated immunity to malaria. Nat Rev Immunol *19*, 457–471. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0158-z.
42. Machiela, M.J., and Chanock, S.J. (2015). LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. Bioinformatics *31*, 3555–3557. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv402.
43. Ogbourne, S., and Antalis, T.M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. Biochem J *331 (Pt 1)*, 1–14. https://doi.org/10.1042/bj3310001.

44. Jiang, J., Cai, H., Zhou, Q., and Levine, M. (1993). Conversion of a dorsal-dependent silencer into an enhancer: evidence for dorsal corepressors. EMBO J *12*, 3201–3209. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05989.x.
45. Gisselbrecht, S.S., Palagi, A., Kurland, J. V, Rogers, J.M., Ozadam, H., Zhan, Y., Dekker, J., and Bulyk, M.L. (2020). Transcriptional Silencers in Drosophila Serve a Dual Role as Transcriptional Enhancers in Alternate Cellular Contexts. Mol Cell *77*, 324-337.e8. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.004.
46. Halfon, M.S. (2020). Silencers, Enhancers, and the Multifunctional Regulatory Genome. Trends Genet *36*, 149–151. https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.12.005.
47. Kehayova, P., Monahan, K., Chen, W., and Maniatis, T. (2011). Regulatory elements required for the activation and repression of the protocadherin-alpha gene cluster. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 17195–17200. https://doi.org/10.1073/pnas.1114357108.
48. Huang, D., and Ovcharenko, I. (2022). Enhancer-silencer transitions in the human genome. Genome Res *32*, 437–448. https://doi.org/10.1101/gr.275992.121.
49. Wei, X., Xiang, Y., Peters, D.T., Marius, C., Sun, T., Shan, R., Ou, J., Lin, X., Yue, F., Li, W., et al. (2022). HiCAR is a robust and sensitive method to analyze open-chromatin-associated genome organization. Mol Cell *82*, 1225-1238.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.01.023.
50. Hussain, S., Sadouni, N., van Essen, D., Dao, L.T.M., Ferré, Q., Charbonnier, G., Torres, M., Gallardo, F., Lecellier, C.-H., Sexton, T., et al. (2023). Short tandem repeats are important contributors to silencer elements in T cells. Nucleic Acids Res *51*, 4845–4866. https://doi.org/10.1093/nar/gkad187.
51. Spitz, F., and Furlong, E.E.M. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. Nat Rev Genet *13*, 613–626. https://doi.org/10.1038/nrg3207.
52. Yagi, R., Zhu, J., and Paul, W.E. (2011). An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. Int Immunol *23*, 415–420. https://doi.org/10.1093/intimm/dxr029.
53. Doni Jayavelu, N., Jajodia, A., Mishra, A., and Hawkins, R.D. (2020). Candidate silencer elements for the human and mouse genomes. Nat Commun *11*, 1061. https://doi.org/10.1038/s41467-020-14853-5.
54. Shi, Y., Seto, E., Chang, L.S., and Shenk, T. (1991). Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. Cell *67*, 377–388. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90189-6.
55. Caride, A.J., Filoteo, A.G., Penheiter, A.R., Pászty, K., Enyedi, A., and Penniston, J.T. (2001). Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca2+: fast pumps reside in fast cells. Cell Calcium *30*, 49–57. https://doi.org/10.1054/ceca.2001.0212.
56. Supper, V., Schiller, H.B., Paster, W., Forster, F., Boulègue, C., Mitulovic, G., Leksa, V., Ohradanova-Repic, A., Machacek, C., Schatzlmaier, P., et al. (2016). Association of CD147 and Calcium Exporter PMCA4 Uncouples IL-2 Expression from Early TCR Signaling. J Immunol *196*, 1387–1399. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501889.
57. Zhu, M., Janssen, E., Leung, K., and Zhang, W. (2002). Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling. J Biol Chem *277*, 46151–46158. https://doi.org/10.1074/jbc.M208946200.
58. Zhu, M., Granillo, O., Wen, R., Yang, K., Dai, X., Wang, D., and Zhang, W. (2005). Negative regulation of lymphocyte activation by the adaptor protein LAX. J Immunol *174*, 5612–5619. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5612.
59. Zaugg, J.B., Sahlén, P., Andersson, R., Alberich-Jorda, M., de Laat, W., Deplancke, B., Ferrer, J., Mandrup, S., Natoli, G., Plewczynski, D., et al. (2022). Current challenges in understanding the role of enhancers in disease. Nat Struct Mol Biol *29*, 1148–1158. https://doi.org/10.1038/s41594-022-00896-3.
60. Gupta, R.M., Hadaya, J., Trehan, A., Zekavat, S.M., Roselli, C., Klarin, D., Emdin, C.A., Hilvering, C.R.E., Bianchi, V., Mueller, C., et al. (2017). A Genetic Variant Associated with Five Vascular Diseases Is a Distal Regulator of Endothelin-1 Gene Expression. Cell *170*, 522-533.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.049.
61. Thiam, A., Baaklini, S., Mbengue, B., Nisar, S., Diarra, M., Marquet, S., Fall, M.M., Sanka, M., Thiam, F., Diallo, R.N., et al. (2018). NCR3 polymorphism, haematological parameters, and severe malaria in Senegalese patients. PeerJ *6*, e6048. https://doi.org/10.7717/peerj.6048.
62. Fishilevich, S., Nudel, R., Rappaport, N., Hadar, R., Plaschkes, I., Iny Stein, T., Rosen, N., Kohn, A., Twik, M., Safran, M., et al. (2017). GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. Database (Oxford) *2017*. https://doi.org/10.1093/database/bax028.
63. Cheong, W.-H., Tan, Y.-C., Yap, S.-J., and Ng, K.-P. (2015). ClicO FS: an interactive web-based service of Circos. Bioinformatics *31*, 3685–3687. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv433.
64. Li, D., Purushotham, D., Harrison, J.K., Hsu, S., Zhuo, X., Fan, C., Liu, S., Xu, V., Chen, S., Xu, J., et al. (2022). WashU Epigenome Browser update 2022. Nucleic Acids Res *50*, W774–W781. https://doi.org/10.1093/nar/gkac238.
65. ENCODE Project Consortium, Moore, J.E., Purcaro, M.J., Pratt, H.E., Epstein, C.B., Shoresh, N., Adrian, J., Kawli, T., Davis, C.A., Dobin, A., et al. (2020). Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. Nature *583*, 699–710. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2493-4.
66. Kong, A., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D.F., Masson, G., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Walters, G.B., Jonasdottir, A., Gylfason, A., Kristinsson, K.T., et al. (2010). Fine-scale recombination rate differences between sexes, populations and individuals. Nature *467*, 1099–1103. https://doi.org/10.1038/nature09525.
67. Santana-Garcia, W., Castro-Mondragon, J.A., Padilla-Gálvez, M., Nguyen, N.T.T., Elizondo-Salas, A., Ksouri, N., Gerbes, F., Thieffry, D., Vincens, P., Contreras-Moreira, B., et al. (2022). RSAT 2022: regulatory sequence analysis tools. Nucleic Acids Res *50*, W670–W676. https://doi.org/10.1093/nar/gkac312.

68. Castro-Mondragon, J.A., Riudavets-Puig, R., Rauluseviciute, I., Lemma, R.B., Turchi, L., Blanc-Mathieu, R., Lucas, J., Boddie, P., Khan, A., Manosalva Pérez, N., et al. (2022). JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles. Nucleic Acids Res *50*, D165–D173. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1113.
69. Seki, A., and Rutz, S. (2018). Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells. Journal of Experimental Medicine *215*, 985–997. https://doi.org/10.1084/jem.20171626.
70. Canac, R., Cimarosti, B., Girardeau, A., Forest, V., Olchesqui, P., Poschmann, J., Redon, R., Lemarchand, P., Gaborit, N., and Lamirault, G. (2022). Deciphering Transcriptional Networks during Human Cardiac Development. Cells *11*. https://doi.org/10.3390/cells11233915.
71. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res *40*, e115. https://doi.org/10.1093/nar/gks596.
72. Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., and Daly, M.J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics *21*, 263–265. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457.
73. Wilkinson, L. (2011). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis by WICKHAM, H. Biometrics *67*, 678–679. https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2011.01616.x.

IV. Identification De Variants Régulateurs Des Récepteurs Fc Gamma Par Une Approche Gène Candidat

Article 5: A Non-Coding Fc Gamma Receptor Cis-Regulatory Variant Within The 1q23 Gene Cluster Is Associated With Plasmodium Falciparum Infection In Children Residing In Burkina Faso

Jules Cretin*, **Mathieu Adjemout***, Christelle Dieppois, Frederic Gallardo, Magali Torres, Zachary Merard, Serge Aimé Sawadogo, Christophe Picard, Pascal Rihet, Pascale Paul

*M. A. et J. C. ont contribué à parts égales à ce travail

International Journal of Molecular Science, 2023, https://doi.org/10.3390/ijms242115711

Publié le : 28 octobre 2023

Les récepteurs Fc-gamma jouent un rôle central dans la réponse immunitaire, en particulier dans les interactions avec les anticorps IgG pour orchestrer la phagocytose, l'activation cellulaire et la clairance des pathogènes. Leur importance est particulièrement marquée dans des maladies comme le paludisme, où une réponse immunitaire efficace peut faire la différence entre une infection asymptomatique et une maladie sévère. Le locus *FCGR*, composé des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A* et *FCGR3B*, est bien connu pour son polymorphisme complexe, qui influence à la fois la fonction des récepteurs et leur régulation transcriptionnelle. Cependant, la majorité des études se sont concentrées sur les variants codants, laissant en grande partie inexplorée l'influence des variants non codants sur la régulation de ces gènes. Nous avons entrepris d'explorer, par une approche combinant bioinformatique et expérimentations, le rôle de variants non codants dans la régulation des récepteurs FCGR, connus pour leur implication dans la réponse immunitaire contre le paludisme et leurs interactions avec les anticorps IgG.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné des eQTL pour les gènes *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A*, et *FCGR3B* dans le sang total. Deux variants régulateurs, rs2099684 et rs1771575, situés dans des marques epigénomiques activatrices, ont été priorisés grâce à diverses analyses bioinformatique, et à des annotations des facteurs de transcription spécifiques aux cellules immunitaires. Nous avons génotypé les variants non-codants rs2099684 et rs1771575 chez 234 individus issus d'une région endémique du paludisme au Burkina Faso afin de tester leur association avec la parasitémie *in vivo*.

En parallèle, nous avons génotypé deux SNPs codants, rs1801274 et rs1050501, déjà connus pour leur impact fonctionnel sur la structure et l'activité des récepteurs FcγRs. Bien que notre objectif principal soit d'identifier des variants régulateurs, l'inclusion de ces SNPs codants

permet une meilleure compréhension globale du locus FCGR en intégrant à la fois des mécanismes transcriptionnels et des altérations structurales directement liées à la réponse immunitaire.

Nos analyses prenant en compte l'âge et les liens familiaux ont révélé une découverte marquante : le rs1771575 est associé à une prévalence accrue de l'infection palustre chez les enfants et module l'expression des gènes *FCGR2B*, et *FCGR3A* dans les cellules immunitaires. Cette étude dévoile un variant cis-régulateur clé, rs1771575, qui influence l'activité des récepteurs FcγRs dans les cellules neutrophiles, soulignant son rôle crucial dans la capacité des enfants du Burkina Faso à contrôler l'infection palustre.

Contribution : Dans cet article, ma contribution a été réalisée les analyses d'association familiale et à la révision de l'article.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

A Non-Coding Fc Gamma Receptor Cis-Regulatory Variant within the 1q23 Gene Cluster Is Associated with *Plasmodium falciparum* Infection in Children Residing in Burkina Faso

Jules Cretin [1,2,†], Mathieu Adjemout [1,2,†], Christelle Dieppois [1], Frederic Gallardo [1], Magali Torres [1], Zachary Merard [3], Serge Aimé Sawadogo [4,5], Christophe Picard [3,6], Pascal Rihet [1,*] and Pascale Paul [1,*]

1 INSERM 1090, TAGC Theories and Approaches of Genomic Complexity, Campus de Luminy, Aix Marseille University, 13288 Marseille, France; mathieu.adjemout@univ-amu.fr (M.A.); christelle.dieppois@outlook.fr (C.D.); frederic.gallardo@inserm.fr (F.G.); magali.torres@univ-amu.fr (M.T.)
2 Institut MarMaRa, 13288 Marseille, France
3 ADES UMR, Aix Marseille University, 13288 Marseille, France; christophe.picard@efs.sante.fr (C.P.)
4 Unité de Formation en Sciences de la Santé (UFR/SDS), Université Joseph KI-ZERBO, Ouagadougou 03 BP 7021, Burkina Faso; serge.sawadogo@ujkz.bf
5 Centre PrïmO-Nelson Mandela, 84 rue Sao Tomé et Principe, Ouagadougou 09 BP 706, Burkina Faso
6 Immunogenetics Laboratory, Etablissement Français du Sang PACA-Corse, 13001 Marseille, France
* Correspondence: pascal.rihet@univ-amu.fr (P.R.); pascale.paul@inserm.fr (P.P.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Antibodies play a crucial role in activating protective immunity against malaria by interacting with Fc-gamma receptors (FcγRs). Genetic variations in genes encoding FcγRs can affect immune cell responses to the parasite. In this study, our aim was to investigate whether non-coding variants that regulate FcγR expression could influence the prevalence of *Plasmodium falciparum* infection. Through bioinformatics approaches, we selected expression quantitative trait loci (eQTL) for *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A*, and *FCGR3B* genes encoding FcγRs (*FCGR*), in whole blood. We prioritized two regulatory variants, rs2099684 and rs1771575, located in open genomic regions. These variants were identified using RegVar, ImmuNexUT, and transcription factor annotations specific to immune cells. In addition to these, we genotyped the coding variants *FCGR2A*/rs1801274 and *FCGR2B*/rs1050501 in 234 individuals from a malaria-endemic area in Burkina Faso. We conducted age and family-based analyses to evaluate associations with the prevalence of malarial infection in both children and adults. The analysis revealed that the regulatory rs1771575-CC genotype was predicted to influence *FCGR2B/FCGR2C/FCGR3A* transcripts in immune cells and was the sole variant associated with a higher prevalence of malarial infection in children. In conclusion, this study identifies the rs1771575 cis-regulatory variant affecting several FcγRs in myeloid and neutrophil cells and associates it with the inter-individual capacity of children living in Burkina Faso to control malarial infection.

Keywords: Fc-gamma receptors/FcγRs; regulatory variants; malaria; *Plasmodium falciparum* parasitemia; Fc-gamma receptor (FCGR) gene polymorphism; FCGR2A gene polymorphism; FCGR2B gene polymorphism; Burkina Faso; FCGR ex-pression quantitative trait loci (eQTL)

check for updates

Citation: Cretin, J.; Adjemout, M.; Dieppois, C.; Gallardo, F.; Torres, M.; Merard, Z.; Sawadogo, S.A.; Picard, C.; Rihet, P.; Paul, P. A Non-Coding Fc Gamma Receptor Cis-Regulatory Variant within the 1q23 Gene Cluster Is Associated with *Plasmodium falciparum* Infection in Children Residing in Burkina Faso. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 15711. https://doi.org/10.3390/ijms242115711

Academic Editor: Natalie Nieuwenhuizen

Received: 7 August 2023
Revised: 27 August 2023
Accepted: 31 August 2023
Published: 28 October 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Malaria caused by *Plasmodium falciparum* (*Pf*) remains a significant global health burden, particularly for children living in endemic regions [1]. The disease's severity and outcomes are influenced by a complex interplay of environmental and genetic factors. Repeated exposures of children to *Pf* and other pathogens allow individuals in endemic African regions to gradually develop immunity against clinical malaria. The high mortality rate associated with malarial infection has exerted strong selective pressure, shaping the human genome in endemic regions throughout recent history [2]. Several studies have

documented the prevalence of *Pf* infection in children from diverse geographical regions. These investigations have highlighted the disproportionate burden faced by children living in sub-Saharan Africa and Southeast Asia. While genome-wide association [3,4] and prospective transcriptomics studies [5,6] have explored host genetic susceptibility to control parasitemia and fever following *Pf* infection, research on the functional association is still needed. Monocytes and neutrophils play a crucial role in controlling parasite burden and protecting the host from malaria [7–14], and a low monocyte to neutrophil ratio has been associated with an increased risk of developing complicated malaria [15]. As demonstrated via passive transfer experiments with immunoglobulin G (IgG) in humans, antibodies drive immune responses that enable the control of the parasite via direct agglutination of the parasite or interaction with a wide variety of Fc-gamma receptors (FcγRs) expressed on immune cells [16]. FcγR recognition of the Fc-domains of antibodies bound to pathogenic antigens leads to immune activation of neutrophils, monocytes, and natural killer (NK) cells, which participate in the elimination of the malaria parasite via antibody-dependent cell phagocytosis (ADCP) and cytotoxicity (ADCC), antibody-dependent cellular inhibition (ADCI), or respiratory burst [10,17–20]. The *FCGR* genes are clustered on chromosome 1q23 and encode FcγR-activating receptors (FcγRI/CD64, FcγRIIA/CD2a, FcγRIIC/CD32c, FcγRIIIA/CD16a, and FcγRIIIB/CD16b) that bear an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) [21]. Activating FcγRIIA/CD32a and FcγRIIIB/CD16b can facilitate early activation of neutrophil-mediated opsonic phagocytosis of sporozoites or FcγRIIA/CD32a monocyte-driven *P. falciparum* elimination of infected erythrocytes [22]. The *FCGR2B* gene is highly homologous to the *FCGR2A/FCGR2C* genes but encodes a FcγRIIB (CD32b) inhibitory isoform with an intracellular immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM), expressed at high levels on B cells and basophils and at low levels on a fraction of circulating monocytes and neutrophils [23]. Several polymorphisms have been detected in the genes encoding these activating receptors and are further associated with host susceptibility or resistance to malaria in different populations endemic for malaria. The rs1801274 coding mutation in the *FCGR2A* gene, which encodes the FcγRIIA/CD32a for the Fc fragment of IgG, has been implicated in various diseases, including malaria [22,24–27]. The C allelic variant of rs1801274 encodes the arginine allele(R), while the T allele encodes the variant histidine (H) with higher binding affinity for IgG2 and IgG3 than the (R) isoform of the FcγRIIA/CD32a activating isoform. A study involving over 1800 individuals in India found that rs1801274-TT homozygotes were significantly associated with protection from disease manifestation, with a stronger association observed in the malaria non-endemic region [28]. However, conflicting results have been reported regarding the impact of this polymorphism on malaria susceptibility [22,24–26,29–34].

The complexity of interindividual variation in FcγR-mediated phagocytic activity is enhanced by the co-expression of the activating receptor alongside the inhibitory receptor FcγRIIB/CD32b in monocytes. This interplay functions as a unique counterpoint to activating *FCGR*; FcγRIIB signaling differs from that of activating FcγR due to the presence of an intracellular immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM). Upon phosphorylation, this motif acts as a checkpoint inhibitory pathway, reversing immune activation initiated by ITAM-bearing Fc receptors. Additionally, FcγRIIB has been shown to participate in antibody-mediated target cell depletion through ITIM-independent mechanisms [35,36]. FcγRIIB/CD32b expression on B lymphocytes is also involved in the BCR-dependent differentiation of B lymphocytes into antibody-producing cells, thus potentially impacting IgG production. The rs1050501 mutation refers to a single nucleotide change located in exon 5 of the *FCGR2B* gene, resulting in an amino acid substitution from isoleucine (I) to threonine (T) at position 232 (I232T) in the transmembrane domain of the protein. This mutation has been associated with various infectious or autoimmune disease traits [31,37,38]. The frequency of the homozygous FcγRIIBT232 variant varies considerably among different ethnic populations, being higher in Africans (8–11%) or Southeast Asians (5–7%) than in Caucasians (1%) [39]. These differences in allelic frequencies suggest recent positive selection of this protective mutation in endemic areas, potentially accounting

for varying susceptibility to infectious or autoimmune diseases in different geographic regions [31,40]. The FcγRIIB-232TT genotype has notably been associated with an increased risk of vertical acquisition of HIV-1 [41], but it has also shown a strong protective effect against severe malaria in Kenya. However, the underlying mechanisms involving *FCGR2A* and *FCGRB* coding mutations remain complex and require further investigation. The I232T substitution reduces the in situ two-dimensional binding affinities and association rates of FcγRIIB with its ligands, IgG1, IgG2, and IgG3, by three to four folds [42]. This protective effect of the rs1050501 T allelic variant against malaria infection has been associated with a lower capacity to impair FcγRIIA-mediated antibody response, which affects individuals' ability to eliminate parasites through monocyte-driven FcγRIIA phagocytosis of *P. falciparum*-infected human erythrocytes [31]. However, other studies have shown no association between this polymorphism and malaria susceptibility.

The relationship between functional *FCGR* variants and malaria immunization and severity has been extensively explored [29]. However, their correlation with parasitemia has received less attention. Additionally, while certain coding FcγR variants have been associated with malaria susceptibility, there is a lack of research focused on investigating the impact of FcγR regulatory variants on immune activation potential. Causality in associations with complex malaria phenotypes poses challenges, particularly due to the fact that approximately 90% of GWAS variants that regulate cell-specific gene expression are located in non-coding regions, which have been insufficiently studied. Various studies have suggested that non-coding trait-associated variants are enriched for expression quantitative trait loci (eQTLs), which can influence target gene expression. Consequently, these eQTLs may impact the FcγR-dependent innate cell immune activation threshold, affecting the host's ability to eliminate parasites via the antibody-dependent activation of innate immune cells.

Given the limited understanding of how regulatory genetic variants influence immune-related traits and their association with the progressive acquisition of protection, our study aims to investigate whether *FCGR* eQTLs identified within the *FCGR* gene cluster can be linked to the individual ability of children to control *P. falciparum* infection.

2. Results

2.1. Prioritization and Annotation of Putative Regulatory SNPs in the Non-Coding FCGR Gene Cluster

The SNP selection procedure, summarized in Figure 1, involved several steps. Initially, we identified 773 SNPs with eQTL annotations for *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A*, and *FCGR3B* genes in the GTEX version 8 database [43]. Subsequently, we prioritized 636 SNPs using the RegVar tool [44], which is based on the GTEX version 7 database (Supplemental Table S1). Among these, we further annotated the 20 SNPs with the best RegVar scores, which were higher than the 0.8 threshold (Supplemental Table S2). Out of the selected SNPs, 13 were found to be eQTLs in immune cells, as indicated by both the ImmuNexUT database [45] and the ebi eQTL catalog [46]. Among these, only 2 intergenic eQTLs (rs1771575 and rs2099684) were located in open genomic regions binding transcription factors in immune cells, as shown by the ATAC-seq Database [47] and the ReMap ChIP-seq catalog [48]. These immune cells include neutrophils, monocytes, macrophages, dendritic, and NK cells, as stated in Table 1. Additionally, we examined two coding SNPs (rs1801274 and rs1050501) previously associated with malaria phenotypes and provided their structural annotations in Table 1. While rs1050501 was not identified as an expression quantitative trait locus (eQTL), the coding variant rs1801274 was found to be an eQTL for *FCGR* genes in whole blood (Supplemental Table S2). We also cross-referenced the positions of eQTL candidates with enhancer regions identified in the ENCODE database (Table 1) [49]. However, this eQTL was not located within an open genomic region in immune cells (Table 1 and Figure 1).

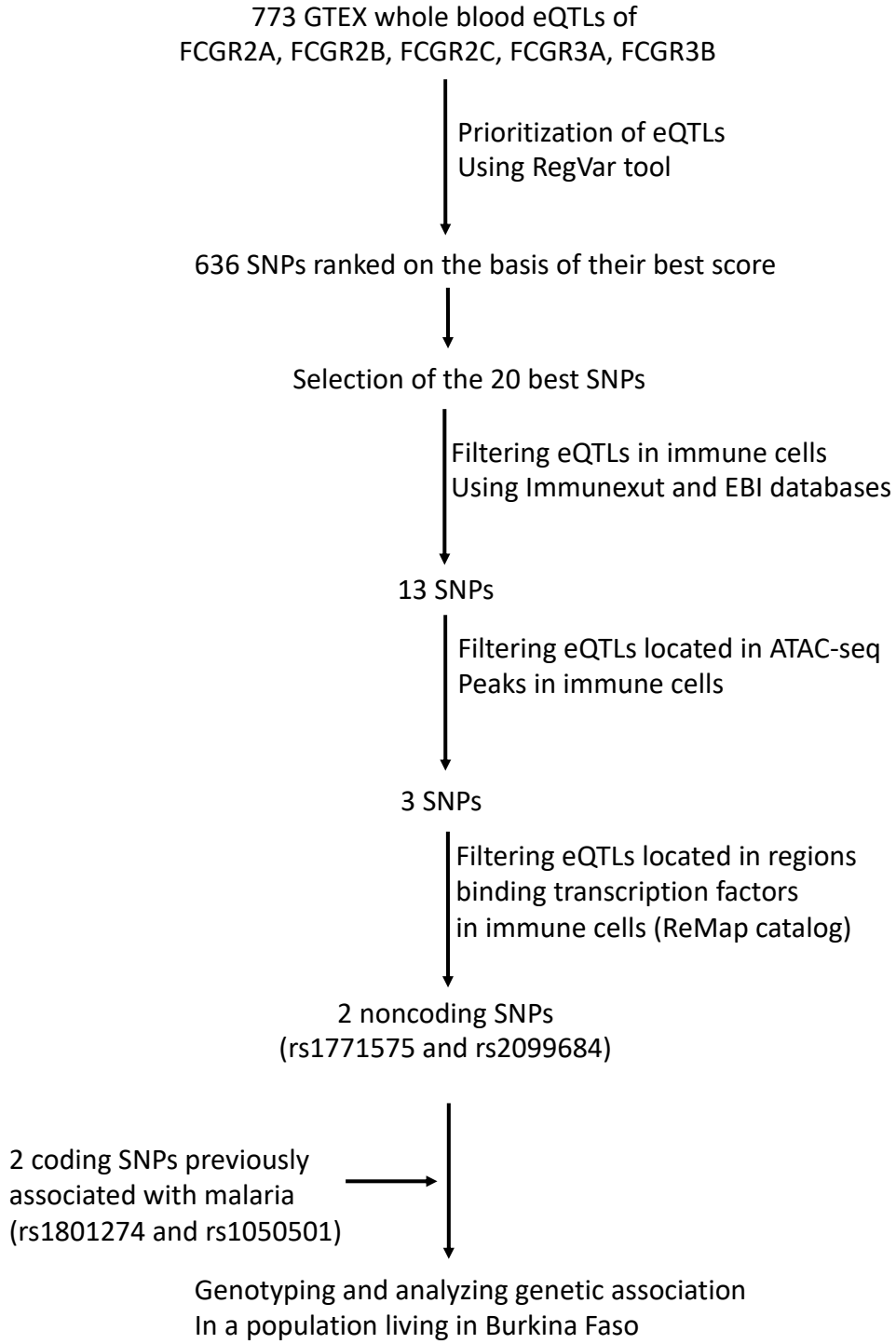


Figure 1. Work flow used to prioritize regulatory variants. A total of 773 SNPs carrying an eQTL annotation in whole blood for *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A*, and *FCGR3B* genes were searched by querying the current release of GTEX (V8) database. The RegVar tool further allowed gene-specific annotation and tissue-specific annotation to prioritize 636 SNPs. The 20 SNPs that displayed the best scores were selected using RegVar; eQTL annotations were retained to select variants that have annotation in 2 independent immune cell eQTL databases, ImmuNexUT and ebi eQTL catalog. The position of eQTL candidates was cross-referenced with the position of ATAC-seq regions in immune cells and positioning in regions that exhibit transcription factor binding activity in immune cells, using the ReMap catalog. ReMap data were filtered on primary NK, T and B lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophils, peripheral blood cells, and monocytic and lymphocytic cell lines to allow selection of 2 FCGR regulatory variants further used for association studies.

Table 1. Structural and functional annotations of the studied SNPs.

SNP	Position [a]	Annotation [b]	% Genotyped	Functional Regulatory Annotation		
				ATAC-Seq [c]	ReMap [c]	Encode Regulatory Element
rs1771575 (T > C)	161647707	intergenic	100.0	DC, Mo, NK, B	Mo, Ma, N, B	E1391464
rs2099684 (A > G)	161530340	intergenic	96.5	DC, NK	Mo, B	E1391397
rs1801274 (G > A)	161509955	*FCGR2A* exon, missense H-R	97.4	-	-	-
rs1050501 (T > C)	161674008	*FCGR2B* exon, missense I-N	97.5	-	-	-

[a] Data represent the position on chromosome 1 according to human hg38 coordinates. [b] Structural annotation and amino acid change for missense mutations. [c] The cell types, in which the SNP is located in ATAC-seq peaks [47] and TF binding regions from the ReMap catalog [48], are stated. B cells (B); Dendritic Cells (DC); Monocytes (Mo); Macrophages (Ma); Natural Killer cells (NK); Neutrophils (N).

In contrast, the rs1771575 variant was situated in open genomic regions in various immune cells, including monocytes, macrophages, neutrophils, and dendritic cells (Table 1). It was also identified as an eQTL for *FCGR2B* and *FCGR3A*, as well as *FCGR3B* target genes in neutrophils, using data from the ImmuNexUT database (Table 2). However, its effects on gene expression were found to be less pronounced in naive monocytes when eQTL data from the EBI catalog were utilized. Individuals with the rs1771575-TT genotype exhibited significantly enhanced gene expression of *FCGR3A* and *FCGR2B* in neutrophils compared to those with the CC/CT genotype. However, this variant did not show any significant impact on *FCGR3A* expression in NK cells or *FCGR2B* gene expression in B cells. Furthermore, the rs1771575 mutation did not have a substantial effect on *FCGR3B* or *FCGR2A* transcripts, which encode activating receptors, in neutrophils. Similarly, the rs2099684 variant was found within open regions in B lymphocytes, dendritic cells, monocytes, and NK cells (Table 1), and it was identified as an eQTL for *FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C*, and *FCGR3B* in neutrophils, monocytes, macrophages (Table 2), and NK cells. The rs2099684 GG genotype was highly associated with enhanced expression of *FCGR2A* transcripts in neutrophils and monocytes and was also significantly associated with enhanced *FCGR2C* and *FCGR3B* transcript expression in NK cells, according to the ImmuNexUT database.

Table 2. eQTLs in immune cells according to ImmuNexUT database and EBI catalogue.

	eQTLs from ImmuNexUT Database			eQTLs from EBI Catalog		
	Target Gene	Cell Type	*p* Value [a]	Target Gene	Cell Type	*p* Value [b]
rs1771575	*FCGR2B*	Neutrophils	3.10×10^{-38}	*FCGR2B*	Neutrophils	1.15×10^{-10}
	FCGR3A	Neutrophils	6.02×10^{-26}	*FCGR2B*	Monocyte, naive	9.77×10^{-7}
	FCGR2C	Dendritic cells	2.77×10^{-17}	-	-	-
	FCGR3B	NK cells	1.16×10^{-5}	-	-	-
	FCGR2A	Dendritic cells	2.87×10^{-4}	-	-	-
rs2099684	*FCGR3B*	NK cells	8.54×10^{-78}	*FCGR3B*	Monocyte, naive	6.31×10^{-23}
	FCGR2C	NK cells	2.63×10^{-17}	*FCGR3B*	Monocyte, LPS	1.35×10^{-18}
	FCGR2A	Neutrophils	6.68×10^{-15}	*FCGR3B*	Monocyte, IAV	3.24×10^{-18}
	FCGR2B	Neutrophils	1.227×10^{-5}	*FCGR3B*	Monocyte	3.55×10^{-17}
	-	-	-	*FCGR3B*	NK-cell, naive	4.68×10^{-16}
	-	-	-	*FCGR3B*	Macrophage, Salmonella	1.78×10^{-13}
	-	-	-	*FCGR3B*	Macrophage, naive	5.62×10^{-13}
	-	-	-	*FCGR3B*	Macrophage, Listeria	6.17×10^{-13}
	-	-	-	*FCGR3B*	CD16 Monocyte, naive	1.07×10^{-11}

[a] *p* values were obtained from the ImmuNexUT database. [b] *p* values were obtained from the eQTL EBI catalogue.

To gain deeper insights, we further investigated the presence of epigenetic markers (ATAC-seq, H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, and H3K27me3) and the transcription factor binding profile of CCCTC-binding factor (CTCF) for rs1771575, rs2099684, rs1801274,

and rs1050501 in blood monocytes and neutrophils (Figure 2) as well as in B and NK lymphocytes (Supplemental Figure S1). These cell-specific profiles were visualized using the CistromeDB database with the WashU epigenome browser [37].

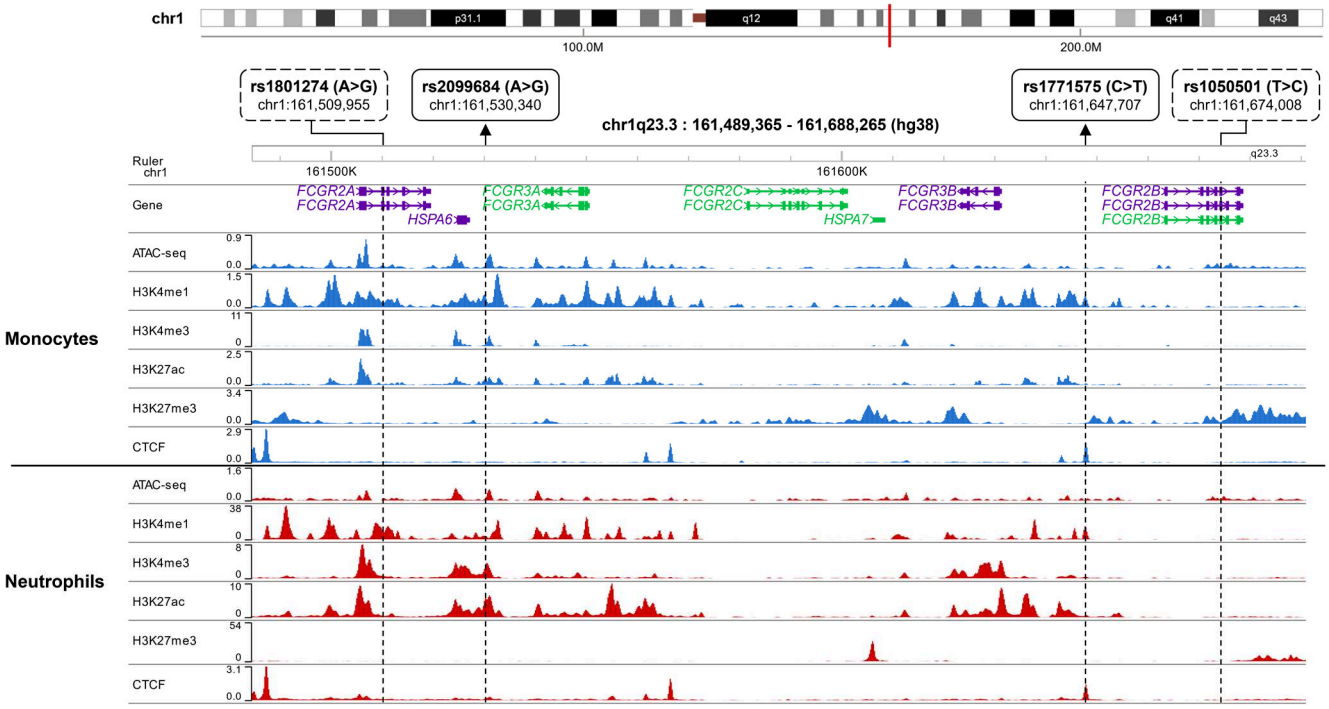


Figure 2. Epigenetic Landscape of the FCGR Locus in Monocytes and Neutrophils. The presence of epigenetic marks (ATAC-seq, H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, and H3K27me3) and CTCF transcription factor binding profiles for rs1771575, rs2099684, rs1801274, and rs1050501 in blood monocytes and neutrophils were visualized using the CistromeDB database in conjunction with the WashU epigenome browser. The genomic location of the FCGR locus on chromosome 1q23 is depicted as a red line. For both monocytes (**upper** panel) and neutrophils (**lower** panel), the following data is displayed: ATAC-Seq peaks, CTCF (CCCTC-binding factor) binding sites, ChIP-seq peaks, and Histone modifications associated with active regulatory regions: H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, and H3K27me3. The variant rs2099684 is situated within an active enhancer, whereas rs1771575 is found within both an active enhancer and a CTCF binding site. Additionally, the known coding variants rs1801274 and rs1050501 are also represented.

Interestingly, rs1771575 coincided with a peak of CTCF binding in monocytes, neutrophils, and NK cells, while rs2099684 was situated within peaks of H3K27ac, particularly in neutrophils. In contrast, rs1801274 and rs1050501 displayed weak associations with epigenomic marks linked to gene expression regulation.

Furthermore, we conducted an in-depth analysis to assess the impact of the rs1771575 and rs2099684 mutations on transcription factor binding. The RSAT analyses revealed that rs1771575 specifically influences the binding of several transcription factors, including the Nuclear Receptor Subfamily 3, Group C, Member 1 (NRC31), and the zinc finger protein 24 (ZNF24) (Supplemental Table S4).

Continuing our investigation, ChIP-seq experiments were extended to the GM12878 (B-LCL) cell line, unveiling the binding of ZNF24, CTCF, and cohesin subunits RAD21 and SMC3 at the rs1771575 site (Figure 3A). The interaction between CTCF and the cohesin complex is visually depicted in Figure 3B. Moreover, the analysis of ZNF24 binding via a position weight matrix reaffirmed a preference for binding to chromatin in the presence of the reference allele of rs1771575 (Figure 3C). We further augmented our understanding by conducting additional analysis of ChIP-seq data for CTCF binding, utilizing read counts from diverse immune cell lines as sourced from the ADASTRA database

(Supplemental Table S3). This meticulous examination revealed that the count of mapped reads carrying the rs1771575-C allele significantly differed when the alternative allele was present, indicating an allele-specific binding event. This observation underscores the preferential binding of CTCF to chromatin in the presence of the C allelic variant of rs1771575 (Figure 3D).

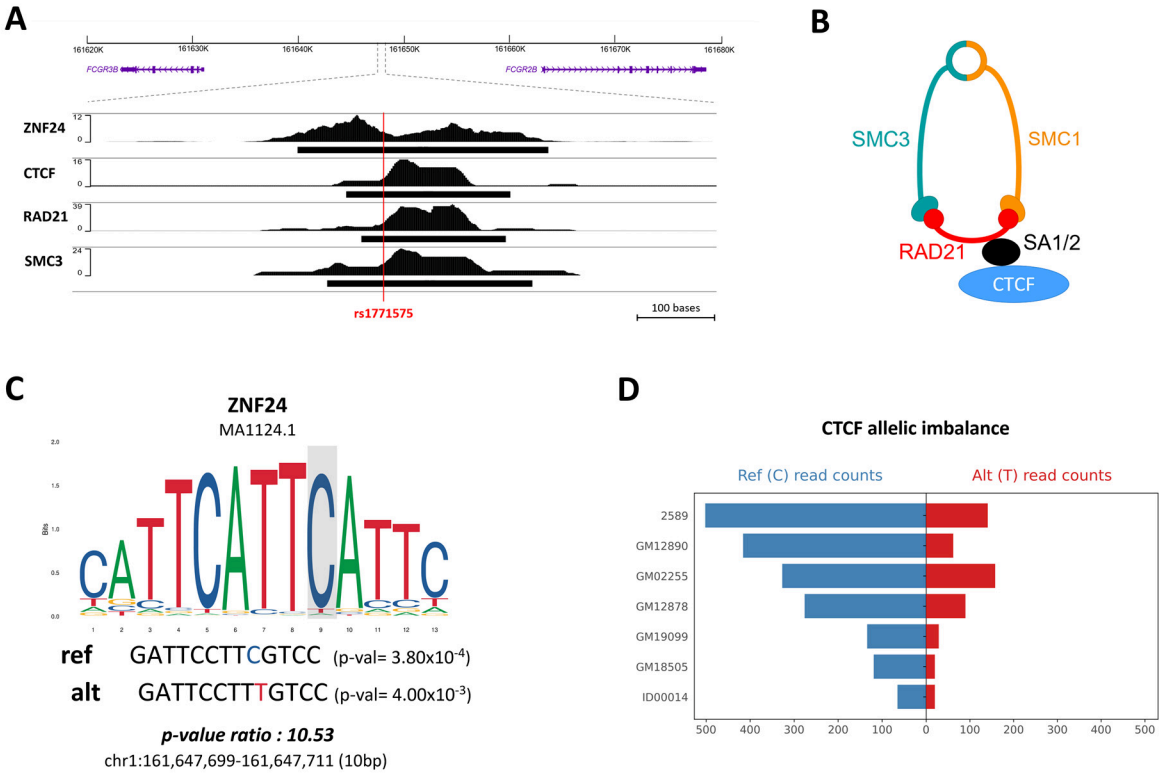


Figure 3. Alteration of transcription factor binding sites at position rs1771575. (**A**) ChIP-seq experiments in GM12878 (B-LCL Cell Line). ChIP-seq experiments were conducted in the GM12878 (B-LCL) cell line, revealing that ZNF24, CTCF, and cohesin subunits RAD21 and SMC3 bind to rs1771575. (**B**) Schematic interaction between CTCF and the cohesin complex. A schematic representation demonstrates the interaction between CTCF and the cohesin complex. (**C**) Position weight matrix of ZNF24 binding. The position weight matrix analysis of ZNF24 binding indicates a preference for binding to chromatin in the presence of the reference allele (**C**) of rs1771575. *p*-values for each putative site and their ratio (pval_ratio = worst_pval/best_pval) were calculated using the RSAT 'scan variations' tool. JASPAR matrix ID and genomic coordinates (GRCh38) are also provided. (**D**) CTCF binding ChIP-seq analysis. Analysis of ChIP-seq data for CTCF binding using read counts from several immune cell lines demonstrates allele-specific binding. The number of mapped reads carrying rs1771575-C is significantly different in the presence of the alternative allele, indicating an allele-specific binding event. These data were obtained from the ADASTRA database.

2.2. Analysis of Allelic and Genotypic Frequencies of Non-Coding Regulatory and Coding FCGR2A/2B Variants in Burkina Faso Population

Volunteer families were randomly selected from 3500 inhabitants residing in a malaria-endemic area in Burkina Faso. The analyzed cohort available for genotyping comprised 136 siblings and 98 parents from 49 families. All the participants belong to the Bobo ethnic group. Table 3 shows age and gender distribution.

The frequency of heterozygous or homozygous genotypes for the 4 target SNPs was analyzed among the 98 unique parents in the study conducted in Burkina Faso and illustrated with reference to frequencies observed in African and European populations analyzed within the 1000 Genomes Project (Figure 4). The genotype frequencies observed in Burkina Faso for the 4 SNPs of interest do not differ significantly when compared to

those available for African populations from the 1000 Genomes Project. The genotypes of the coding variant rs1050501 (Figure 4A) and the regulatory variant FCGR rs2099684 (Figure 4D) are significantly different from the Caucasian controls of the 1000 Genomes Project. However, the distribution of genotypes corresponding to the coding variant FCGR2A rs1801274 or the regulatory variant rs1771575 is comparable across the three populations (Figure 4B,C).

Table 3. Characteristics of Study participants.

		Parents	Children
		(N = 98)	(N = 136)
Gender			
N		98	136
Female		65	71
Male		33	65
Ethnic group: Bobo [a]	N	98	136
Age			
N		98	136
Median		39	8
(25–75th percentile)		(31–45)	(6–12)
Number of parasitaemia measurements per subject			
N		98	136
Median		18	20
(25th and 75th percentile)		(13–23)	(14–24)
Phenotypes related to infection levels (Prev*Pf*I)			
N		98	136
Median		0.14	0.57
(25th and 75th percentile)		(0.07–0.22)	(0.43–0.75)

[a] The Bobo are a Mande ethnic group living primarily in Burkina Faso. The prevalence of *P. falciparum* infection (Prev*Pf*I) was calculated for each individual as the number of positive blood samples divided by the total number of blood samples evaluated for each individual.

We conducted a haploview analysis to assess the linkage disequilibrium in the study population between the non-coding regulatory variants rs1771575 and rs2099684 on one hand and the coding variants rs1801274 and rs10505501 on the other hand. The results revealed no significant linkage disequilibrium between these variants in the study population (Supplemental Figure S2). Similar results were obtained when comparing them with the African 1000 genome population; the linkage disequilibrium coefficients were found to be very low ($r2 < 0.001$) for pairs containing a coding variant and a non-coding variant. Furthermore, there were no deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium for rs1771575, rs2099684, rs1801274, or rs1050501 ($p > 0.175$).

Given the potential impact of rs1771575 and rs2099684 on both IgG receptors and antibody-dependent immune cell activation, we proceeded to evaluate whether these non-coding variants could be associated with the control of *P. falciparum* infection in the study cohort.

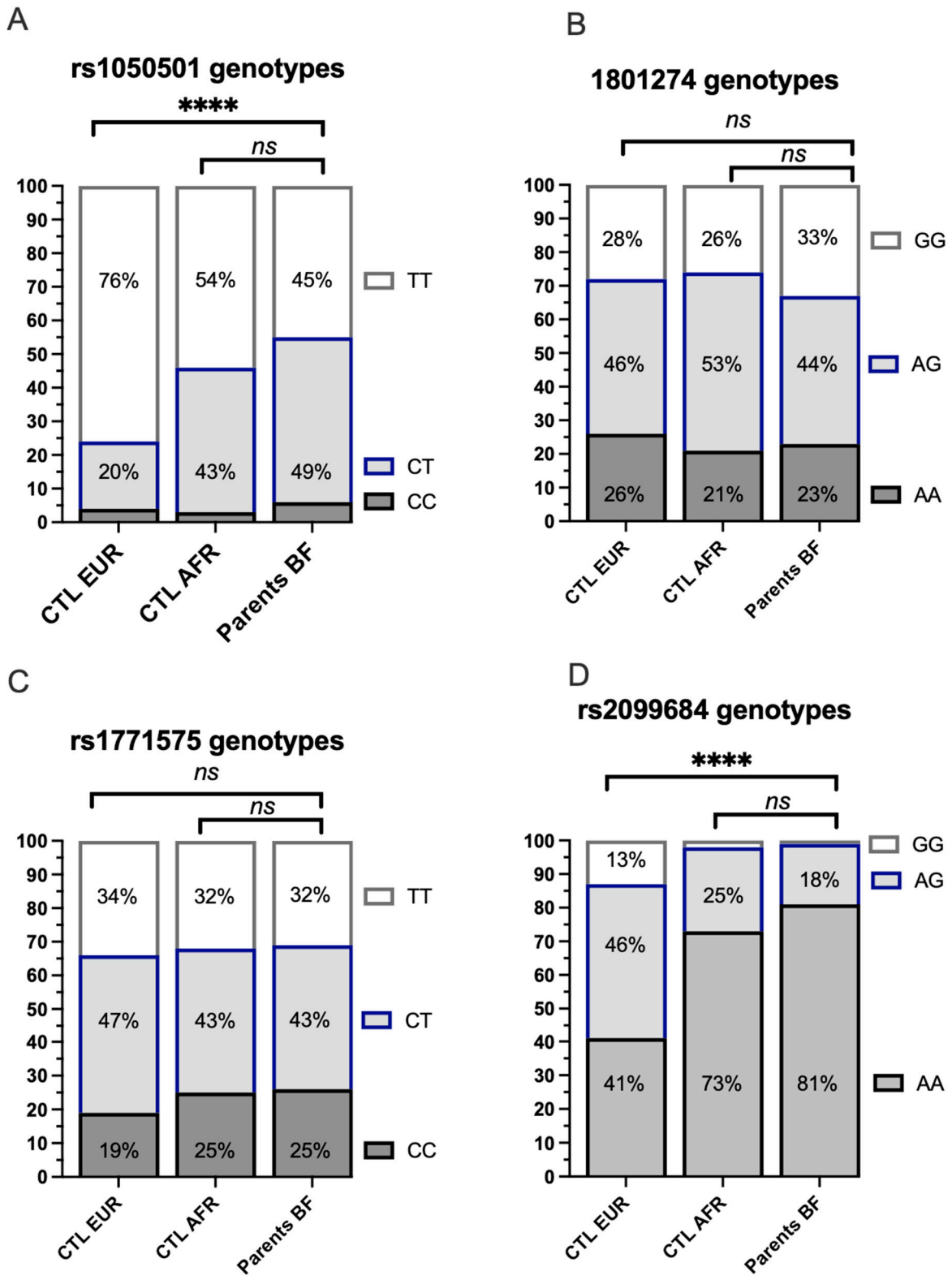


Figure 4. Comparison of genotype frequencies of the analyzed variants among individuals from Europe, Africa (1000 Genomes Project), and the study population from Burkina Faso (Bobo ethnic group). (**A**) Distribution of the coding *FCGR2B* rs1050501 genotype. The distribution of the coding *FCGR2B* rs1050501 genotype was analyzed in individuals from European (CTL EUR), African (CTL AFR), and unique parents from the study cohort enrolled in Burkina Faso. CC: The individual has two copies of the C allele at rs10505501, encoding an isoleucine (I) in the transmembrane domain of the FCgR2B receptor. CT: The individual has one copy of the C allele and one copy of the T allele at

rs10505501.TT: The individual has two copies of the T allele at rs10505501, which encodes a threonine (T) at position 232. **** $p < 10^{-4}$; Ns: non significative. (**B**) Distribution of the coding *FCGR2A* rs1801274 genotype. The distribution of the coding *FCGR2A* rs1801274 genotype was examined in individuals from European (CTL EUR), African (CTL AFR), and unique parents from the study cohort enrolled in Burkina Faso. AA: The individual has two copies of the A allele, encoding a histidine (I) in exon 4 of the FcγR2A receptor. AG: The individual has one copy of the A allele and one copy of the G allele. GG: The individual has two copies of the G allele, resulting in an arginine substitution (R) at position 131. (**C**) Distribution of the rs1771575 regulatory variant genotype. The distribution of the rs1771575 regulatory variant genotype was assessed in individuals from European (CTL EUR), African (CTL AFR), and unique parents from the study cohort enrolled in Burkina Faso. CC: The individual has two copies of the C allele. CT: The individual has one copy of the C allele and one copy of the T allele. TT: The individual has two copies of the T allele. (**D**) Distribution of the rs2099684 regulatory variant genotype. The distribution of the rs2099684 regulatory variant genotype was investigated in individuals from European (CTL EUR), African (CTL AFR), and unique parents from the study cohort enrolled in Burkina Faso. AA: The individual has two copies of the A allele. AG: The individual has one copy of the A allele and one copy of the G allele. GG: The individual has two copies of the G allele.

2.3. The Non-Coding rs1771575 Regulatory Variant Is Associated with Plasmodium falciparum Infection

The distribution of non-coding variants (rs2099684 and rs1771575) and coding variants (rs1801274 and rs1050501) was analyzed in relation to the prevalence of *P. falciparum* infection (Prev*Pf*I) in a cohort of 136 children and their parents, with parasite measurements taken at different time points. It should be stressed that parasitemia was measured for all the participants during the dry and rainy seasons, which correspond to the seasons of low and high transmission.

It was found that Prev*Pf*I was not influenced by gender, but it showed an inverse correlation with age in both adults and children ($p < 0.0001$). Consequently, higher Prev*Pf*I values were observed in children compared to their parents (Figure 5A).

In the univariate analysis, it was observed that the CC genotype of the rs1050501 *FCGR2B* coding variant was associated with higher Prev*Pf*I in adults. However, the genotypes of the non-coding variants (rs2099684 and rs1771575) or the coding variant (rs1801274 *FCGR2A*) did not show any significant association with Prev*Pf*I when considering the parent's group (Figure 5B).

In contrast, while the rs1050501 and rs1801274 coding variants, as well as the rs2099684 non-coding variant, were not significantly associated with Prev*Pf*I in children, the regulatory rs1771575 genotypes were found to be associated with infant Prev*Pf*I. Particularly, the rs1771575 CC genotype was significantly associated with enhanced Prev*Pf*I in children compared to those carrying the T allele ($p = 0.012$, Table 4 and Figure 5C). Similar association results were obtained for rs1771575 CC when Prev*Pf*I values were adjusted for age in children (Figure 5D).

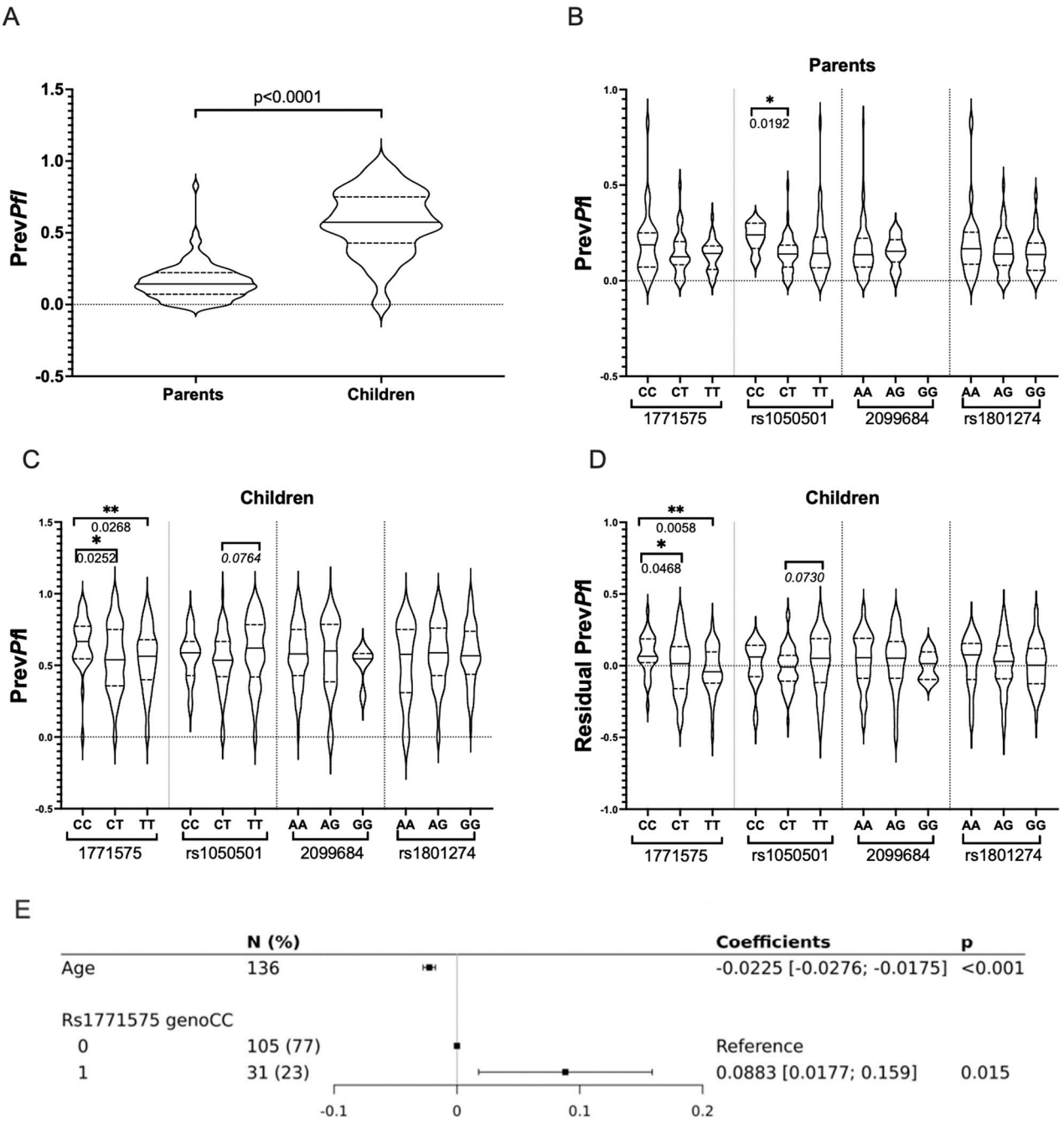


Figure 5. Prevalence of *P. falciparum* Infection (Prev*Pf*I) Across Variant Genotypes in Infants and Adults from Burkina Faso. (**A**) Comparative analysis of *P. falciparum* infection prevalence (Prev*Pf*I) in parents and children. A comparative analysis of *P. falciparum* infection prevalence (median Prev*Pf*I values) was conducted in parents and children using the nonparametric Mann–Whitney U-test for non-normally distributed data. Significant *p*-values ($\leq$0.05) are indicated. The prevalence of *P. falciparum* infection (Prev*Pf*I) for each individual was calculated as the number of positive blood samples divided by the total number of blood samples evaluated for each individual. This was considered the quantitative phenotype outcome variable. (**B**) Comparative analysis of *P. falciparum* infection prevalence (Prev*Pf*I) in parents across rs1771575, rs1050501, rs2099684, and rs1801274 genotypes. A comparative analysis of *P. falciparum* infection prevalence (median Prev*Pf*I values) in parents was performed across rs1771575, rs1050501, rs2099684, and rs1801274 genotypes. Significant *p*-values (<0.05) are indicated, and trends ($p < 0.100$) are indicated in italics. * refers to *p* values $\leq$ 0.05. (**C**) Comparative analysis of *P. falciparum* infection prevalence (Prev*Pf*I) in children across rs1771575,

rs1050501, rs2099684, and rs1801274 genotypes. A comparative analysis of *P. falciparum* infection prevalence (median Prev*Pf*I values) in children was conducted across rs1771575, rs1050501, rs2099684, and rs1801274 genotypes. Significant *p*-values (<0.05) are indicated, and trends ($p < 0.100$) are indicated in italics. * refers to pvalues ≤ 0.05, ** refers to p values ≤ 0.01 (**D**) Comparative analysis of residual *P. falciparum* infection prevalence (Prev*Pf*I adjusted for age effect) in children across rs1771575, rs1050501, rs2099684, and rs1801274 genotypes. A comparative analysis of residual *P. falciparum* infection prevalence (median Prev*Pf*I values) adjusted for age effect was performed in children across rs1771575, rs1050501, rs2099684, and rs1801274 genotypes. Residuals of Prev*Pf*I were calculated for each person after conducting a linear regression analysis between Prev*Pf*I and age. * refers to p values ≤ 0.05, ** refers to pvalues ≤ 0.01 (**E**) Multiple linear regression analysis to test effect on outcome variable Prev*Pf*I. Multiple linear regression was carried out to assess the effect on the outcome variable Prev*Pf*I, taking into account age and the recessive model (CC: encoded 1) vs. (CT/TT: encoded 0) explanatory variables.

Table 4. Univariate and Multivariate Analysis of rs1771575 Association with Prevalence of *P. falciparum* Infection (Prev*Pf*I).

Explanatory Variable: Prev*Pf*I [a]	Univariate Analysis	Linear Multiple Regression Adjusted to Age		Family Based Linear Mixed Model	
	p	b Coefficient (IC)	*p*	b Coefficient (IC)	*p*
[b] Recessive Model					
Children age	<0.001 *	−0.0225 [−0.0276; −0.0175]	<0.001 *	−0.023 (−0.028; −0.018)	<0.001 *
rs1771575-CC vs. CT/TT	0.012 *	0.0883 [0.0177; 0.159]	0.015 *	0.087 (0.017; 0.158)	0.016 *
[c] Additive Model					
Children age	<0.001 *	−0.0227 [−0.0277; −0.0177]	<0.001 *	−0.023 (−0.028; −0.018)	<0.001 *
rs1771575- CC vs. -CT vs. -TT	0.0252 *	−0.0525 [−0.0941; −0.0108]	0.014 *	−0.052 (−0.094; −0.010)	0.016 *

[a] Prevalence of *P. falciparum* infection (Prev*Pf*I) was calculated for each individual as the number of positive blood samples divided by the total number of blood samples evaluated for each individual. It was considered as the quantitative phenotype outcome explanatory variable. Children age was used as a significant adjustment variable in both Linear Multiple Regression and Family Based Linear Mixed Model multivariate analyses. Genotype-based analysis for [b] recessive (rs1771575-CC vs. CT/TT) or [c] additive (rs1771575 -CC vs. -CT vs. -TT). Significant p values < 0.05 are indicated. * p remained significant after correcting for multiple tests.

Taking into account the impact of children's age on parasitemia, an association of rs1771575 (and rs1050501) genotypes with Prev*Pf*I was further tested using multiple linear regression models. When using a recessive model, testing rs1771575 CC versus CT and TT genotypes in children, a significant association between rs1771575 and Prev*Pf*I was confirmed (Table 4, illustrated in Figure 5E). Using an additive genetic model, a significant association was found between rs1771575 and Prev*Pf*I (Table 4), while no significant association was observed with rs1050501; however, a trend for a higher Prev*Pf*I was seen in children with the TT genotype. This result was consistent with the univariate analysis based on Prev*Pf*I adjusted for age (Figure 5D), which showed a higher infection value for rs1771575 CC individuals. It was thus demonstrated that the CC genotype of rs1771575 was significantly associated with lower Prev*Pf*I in children, even when taking into account rs1050501.

To account for the family effect, multivariate family-based association tests were conducted. Using a mixed model that incorporated the family effect, the association between Prev*Pf*I and rs1771575 in children was detected based on both the additive and recessive models (Table 4). The QTDT approach confirmed this association ($p = 0.009$) using the additive model. However, Prev*Pf*I was not associated with rs2099689, rs1801274, or rs1050501 using family-based association tests.

After correcting for all the statistical tests performed, the association between rs1771575 and Prev*Pf*I remained significant using the multiple linear regression and mixed model methods, as well as the QTDT approach.

3. Discussion

Interaction between FcγR and the Fc domain of IgG plays a significant role in activating innate immune cells against parasites. Several studies have explored the association between FCGR gene variants in coding regions and protection against malaria [29]. However, discrepancies have been observed, indicating different associations in children and adults and variations across ethnic groups, both within and outside Africa [50,51]. Among the commonly investigated coding mutations is *FCGR2A*-H131R (rs1801274), which affects FcγRIIA/CD32a-mediated activation of monocytes and leads to changes in IgG recognition and IgG parasite phagocytosis. While a meta-analysis suggested that the H allelic variants resulting from the rs101274 variation may be protective against blood-stage malaria infection [28], our study in adults and infants from Burkina Faso did not observe such an association. This finding aligns with previous reports by Cherif et al., who found no significant association between the rs1801274 variant and *P. falciparum* prevalence in children from the Mossi ethnic group in Burkina Faso [52]. In that study, a frequency of 14.6% was documented for the FCGR2A-131HH (rs1801274-AA) homozygous genotype. These divergences in the correlation between FcγR haplotypes and malaria susceptibility might be partially attributed to discrepancies in the prevalence of the FCGR2A-131HH homozygous genotype across various populations. For instance, the Yoruba group in Niger, which shares geographical proximity with the Burkina Faso ethnic group (unavailable in the 1000 Genomes African project), displayed a frequency of 20.5% for this genotype. The observed frequency of 23% for the rs1801274-AA homozygous genotype in our current study of Burkinabe populations aligns with the prevalence of the same combination observed in the Yoruba subpopulation analyzed within the 1000 Genomes African project. In contrast, the Luhya African population in Kenya, as analyzed in the 1000 Genomes project, showed a higher frequency of 32% for the *FCGR2A*-131HH homozygous genotype [50].

In this study, we observed that the CC-genotype at position rs1050501 in the *FCGR2B* gene was associated with enhanced parasitemia in adults. However, this association did not remain significant when considering age as a covariable. Our findings align with the previously described protective effect of the *FCGR2B* rs1050501-TT genotype against malaria and infant susceptibility to HIV infection [40,41], but we did not find evidence of its protective role in controlling parasitemia in children analyzed in Burkina Faso, mainly belonging to the Bobo ethnic subgroup. These discrepancies may partly depend on age-related factors, which manifest differently in adults with a more mature immune response controlling the parasite.

Malaria has significantly shaped FCGR variability in Africans in endemic regions. The lack of association between *FCGR2A* and *FCGR2B* coding variants with parasitemia could also be attributed to ethnic variations [51], sample size, or the diversity of observed malaria phenotypes, including parameters such as socioeconomic status, access to healthcare, and control measures in previously described cohorts. Studies on the population diversity of FcγR variants have shown differences in ethnic variation, allele distribution, and linkage disequilibrium at the FCGR gene locus, especially for *FCGR2B* and *FCGR2C*, among Kenyan, Nigerian, South African, and Caucasian populations [40,41]. The rs1050501 SNP in *FCGR2B* has notably been shown to be under malaria-driven selective evolutionary pressure [27], and minor allele frequencies of FcγRIIb-232T and FcγRIIIb-HNA1 FCGR variants associated with protection against clinical malaria were reported to be more prevalent in malaria-endemic regions than in non-endemic regions.

In addition to these ethnic variations, the lack of strong associations with coding mutations that alter the function of FcγR in controlling parasitemia may suggest the involvement of other regulatory genetic and epigenetic mechanisms that could potentially fine-tune cell- and individual-specific acquisition of host immune responsiveness to *P. falciparum* exposure in a given environment.

These population-specific variations in genotype frequencies may play a significant role in the observed differences in malaria susceptibility and protection. They highlight the importance of considering the genetic diversity of different populations when studying

the role of FcγR haplotypes in disease susceptibility or protection. Furthermore, such differences underscore the need for more extensive genetic studies of functional and regulatory variants across diverse populations to gain a comprehensive understanding of the complex interactions between FcγR variants and malaria outcomes.

Conflicting findings concerning coding FCGR polymorphisms and malaria control suggest that other co-regulatory mechanisms may play a role in controlling the balance between activating FcγR and inhibitory FcγRIIB-signaling in response to *P. falciparum* exposure. Coding mutations in the *FCGR2B* gene have been shown to modulate immune activation in response to *Pf* challenge. influencing the capacity to dampen the function of activating Fcγ receptors. However, compared to the *FCGR2A* rs1801274 counterpart, *FCGR2B*, and *FCGR3B* polymorphisms have only been assessed in a limited number of studies [30,40,53,54].

In this context, our current investigation aimed to explore the potential influence of non-coding genetic variants on the regulatory networks shaping the cell-specific FcγR repertoire of immune cells. The main finding of our study is that the rs1771575 non-coding cis-regulatory variant, identified as an expression quantitative trait locus (eQTL) selective for several FCGR gene targets using in silico approaches, results in different capacities to control parasitemia according to infant genotype. Our bioinformatic analysis also reveals that the rs1771575 regulatory variant is associated with ATAC-seq and H3K4me1 modifications in active regulatory regions of monocytes and neutrophils, indicating potential cell-specific enhancer activity in these cell types. Additionally, the rs1771575 mutation affects allele-specific binding of various transcription factors (SOX2-10-15, NCR3C1, POU5F1, and ZNF24) that may influence the cell-specific tuning of host immune responsiveness upon pathogen encounter. We also identify a preferential binding of CTCF to chromatin when the rs177157C allelic variant is present, which may influence enhancer-promoter interactions, favoring coordinated and cell-specific activation of the targeted FCGR gene expression that contributes to the acquisition of an efficient immune response.

In this study, we utilized various tools to conduct a large-scale immune cell-specific analysis of expression quantitative trait loci (eQTL), providing valuable insights into the impact of the rs1771575 variant on the coordinated expression of the FCGR gene repertoire in neutrophils. Our analysis of the ImmuNexUT database revealed that the rs1771575-CC variant is significantly associated with lower gene expression of *FCGR2B* inhibitory receptors and *FCGR3A* activating receptor transcripts in neutrophils. However, the effect on activating *FCGR3B* and *FCGR2A* gene expression in this cell type was less significant.

Previous research suggests that Fcγ receptors on peripheral blood neutrophils play a crucial role as effector phagocytes against *P. falciparum* blood-stage merozoites, contributing to the elimination of malaria-infected cells and protecting against febrile malaria [11]. However, the relationship between neutrophil phagocytosis and protection against malaria is not fully understood. When antibodies bound to malaria-infected cells interact with Fc-receptors on neutrophils, it triggers the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines, promoting phagocytosis of the antibody-coated infected cells or activating reactive oxygen species (ROS) granule release of antimicrobial molecules [10,14], contributing to the destruction of malaria parasites and infected cells. *FCGR2A* receptor expression by neutrophils is reported as the dominant activating FcγR mechanism that allows the elimination of merozoites [47]. Additionally, studies have shown significant changes in intermediate/inflammatory monocyte phenotypes and proinflammatory and anti-inflammatory transcriptional profiles associated with the regulation of monocyte subset phagocytic function in response to *P. falciparum* infection in children living in malaria-endemic areas [51]. Proper control of this balance in the immune response is crucial in the context of malaria infection, as dysregulated activation of neutrophils can also contribute to the severity of the disease [10,14], leading to the destruction of malaria parasites and infected cells.

Despite evidence linking coding variants to neutrophil or monocyte immune function, our current understanding of the genetic and epigenetic mechanisms that coregulate the expression levels of FcγRs and their impact on the activatory-to-inhibitory balance

of the FcγR repertoire, enabling immune cells to control the parasite, remains limited. Our findings indicate that the variation at the rs1771575 locus may have a lesser impact on *FCGR2A* gene expression in monocytes, dendritic cells, and neutrophils compared to other activating receptors, such as *FCGR3A*, *FCGR3B*, and *FCGR2C*. This suggests that the rs1771575 regulatory variant may not significantly affect the CD32a-mediated activation pathway but rather influences the balance between *FCGR2B*/CD32b inhibitory and *FCGR3A*/CD16a, *FCGR3B*/CD16b activating signaling in neutrophils.

Further research is needed to fully comprehend the complex mechanisms associating the polymorphism of the rs1771575 regulatory variant with its functional impact on immune cells. Therefore, a more in-depth analysis of the rs1771575 eQTL profiles may offer valuable insights into the coordinated fine-tuning of the FcγR-mediated immune cell activation in neutrophils and $CD16^+$ monocytes in response to pathogen challenges. Such investigations of regulatory mechanisms are crucial for a better understanding of how immune cells respond to malaria infection and may have implications for the development of targeted therapies or interventions to combat the disease.

It is essential to acknowledge that our study has several limitations. Firstly, we focused solely on single-gene polymorphisms of FcγR regulatory variants, particularly on the commonly assessed *FCGR2A* and *FCGR2B* coding variants. However, we did not consider the additional complexity of haplotypic diversity described for *FCGR3A*, *FCGR3B*, and *FCGR2C*, nor did we investigate gene duplication/deletion mechanisms that affect gene copy number variations (CNVs) in the 1q23 cluster. These factors may also directly impact the expression level and function of these receptors [21,50,54]. In light of the mentioned haplotypic combinations, it is worth noting that a specific FcγRIIA-131R/FcγRIIIA-176F, FcγRIIIb-NA2 haplotype was linked to increased susceptibility to malaria in children from western Kenya [25]. Conversely, studies have shown that the absence of the G3m6 (+)/FcγRIIA-131H/FcγRIICT/FcγRIIIA-176F/FcγRIIIB-NA2 haplotypic combination provides natural protection to young Fulani individuals from northern Benin with decreased susceptibility to malaria infections [55].

Despite these limitations, our study provides initial evidence that the rs1771575 eQTL, located in an intergenic regulatory region, is the sole FCGR polymorphic variant analyzed significantly associated with blood-stage parasitemia in children living in Burkina Faso, regardless of age and the presence of *FCGR2A*/*FCGR2B* coding allelic variants previously associated with protective immunity against malaria. The regulatory variant appears to allow coordinated host-specific regulation of both activating and inhibitory FcγR gene expression in various immune cell types, particularly neutrophils.

Understanding these regulatory mechanisms is crucial to characterizing interindividual variability in host responsiveness and gaining better insights into genetic features that confer disease susceptibility or vaccination efficacy in children. Therefore, further exploration is needed to enhance our understanding of the hidden regulatory functions of FCGR eQTL mapping during dynamic and cell-specific immune processes, which may explain why some children are more susceptible to parasite burden in malaria-endemic regions. Thus, comprehending how non-coding variants regulate the variability in the FcγR-dependent capacity of children to control parasitemia becomes a crucial challenge.

In conclusion, our study sheds light on the potential role of non-coding genetic variants in influencing the coordinated expression of FcγRs in immune cells and their impact on the immune response to *P. falciparum* infection. Further investigations into the genetic and epigenetic mechanisms that regulate FcγR expression and function may open new avenues for understanding the complexity of host-parasite interactions and contribute to the development of more targeted approaches for malaria control and prevention.

4. Materials and Methods

4.1. Study Population

The study participants reside in Logoforousso, a rural village located to the southwest of Bobo-Dioulasso in Burkina Faso. All participants belong to the Bobo ethnic group, a Mande ethnic group living primarily in Burkina Faso. The local population and the extent of parasite exposure in the area have been thoroughly documented [56]. Volunteer families were randomly selected from a total of 3500 inhabitants. Before the study, informed consent was obtained from all participants individually or from their parents if they were minors. The research protocol was duly approved by the national medical authorities of Burkina Faso.

For the mosquito capture, four specific sites were chosen, and mosquitoes were collected outdoors over four days each month, occurring on two nights every two weeks. The inoculation rate was set at 230 infective bites per person per year. Malaria transmission occurred mainly during the rainy season.

Initially, the study encompassed 234 subjects from 49 pedigrees, forming 50 nuclear families comprising 98 parents and 136 siblings. These individuals were selected for genotyping of variants and retained for genetic association analysis. The characteristics of the genotyped individuals can be found in Table 3.

4.2. Phenotyping

Parasitemia was measured as described [57]. During the 18 months of the study, each family in the rural area was visited 28 times. In other words, each family was visited once every three weeks during the dry and rainy seasons. Blood samples were collected from all individuals present, and only measurements of asymptomatic *P. falciparum* parasitemia were included in this study. The median values of asymptomatic *P. falciparum* parasitemia per subject were 18 for parents and 20 for children. Fingerprint peripheral blood samples were obtained from all family members present, and thick and thin blood films were stained with Giemsa for analysis. The determination and quantification of parasites were performed independently by two individuals in a blind manner. Only asexual forms of *P. falciparum* were considered to calculate parasitemia. Parasitemia was defined as the count of parasitized erythrocytes observed per µL in thin blood films.

For each individual, the prevalence of *P. falciparum* infection (Prev*Pf*I) was calculated as the ratio of positive blood samples to the total number of blood samples evaluated. It is important to note that PrevPfI was assessed in 98 adult parents and 136 infants (Table 3). In certain analyses, PrevPfI was adjusted for age effects. Specifically, residuals of Prev*Pf*I were computed for each individual following a linear regression analysis between Prev*Pf*I and age.

4.3. Bioinformatic Identification of Non-Coding Variants

The selection of Fc gamma receptor SNPs was conducted using a series of filtering criteria. SNPs with expression quantitative trait locus (eQTL) annotation in whole blood for *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *FCGR3A*, and *FCGR3B* genes were obtained by querying the GTEX version 8 database [32] (Supplemental Table S1). Subsequently, the RegVar tool [33], which utilizes the GTEX version 7 database, was employed to prioritize the SNPs based on gene-specific and tissue-specific annotations. The top 20 SNPs with the highest scores were selected (Supplemental Table S2). While a RegVar threshold of 0.23, optimized for sensitivity and specificity, was recommended for whole blood, we found that the specificity at this threshold was too low, with a false positive rate of 31% [33]. Therefore, a decision was made to substantially reduce the false positive rate to 0.2%, guided by the specificity study conducted by Lu et al. [33]. Furthermore, the eQTL annotations of these 20 selected SNPs were cross-checked in two independent immune cell eQTL databases, namely ImmuNexUT [45] and the ebi eQTL catalog [46]. SNPs were retained if they had annotations in both of the aforementioned databases. The positions of the eQTL candidates were cross-referenced with ATAC-seq regions in immune cells [47] and regions binding

transcription factors in immune cells using the ReMap catalog [54]. The ReMap data were filtered by primary NK, T, and B lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophils, peripheral blood cells, and monocytic and lymphocytic cell lines. The RSAT tool [55] was then employed to assess whether the allele of an SNP influenced the affinity of the transcription factor for the sequence containing the polymorphism. The databases of selected transcription factor motifs in the RSAT parameters were JASPAR and ENCODE. All other parameters were set to their default values. The presence of epigenetic marks (ATAC-seq, H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, and H3K27me3) in monocytes, macrophages, NK cells, and B cells was investigated using the WashU Epigenome Browser and data from the CistromeDB database and ENCODE portal [49]. The threshold allele frequency for the minority allele was set at 10% to ensure sufficient statistical power for the analysis of malaria cohorts. This criterion avoids selecting SNPs with very low representation in the cohorts used. LDlink, a tool including LD information from the 1000 Genome project, was used to identify the SNPs in linkage disequilibrium (LD) [58]. Through this comprehensive selection process, the most relevant and informative Fc gamma receptor SNPs were identified and prioritized for further analysis in the context of malaria infection.

4.4. Genotyping of FCGR Variants

Blood samples were collected using venipuncture, and DNA was extracted from mononuclear cells separated by a Ficoll-Hypaque density gradient following the described procedure (27). Before genotyping, the samples underwent whole-genome amplification using the primer extension pre-amplification method. The genotyping of the *FCGR2B*-232I/T (rs1050501) SNPs was performed using a homemade TaqMan discrimination assay. The TaqMan assay was designed using Software Primer Express v3.0 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA 94404 USA). The TaqMan genotyping assay for *FCGR2B* included a sense primer (TGGGGATCATTGTGGCTGTG), an antisense primer (TACACTGCTCTCCC-CAAGAC), and two probes, MGB (ACTGGGACTGCTGTAG for the C allele coding for Thre and ACTGGGATTGCTGTAG for the T allele coding for Iso). The TaqMan genotyping assays were carried out on the QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems Inc.) with the following protocol: [50 °C, 2 min—95 °C, 10 min—[95 °C, 15 s—61 °C, 1 min] *40 cycles]. The specificity and accuracy of the TaqMan assays were validated by confirming a perfect match (100%) with the genotypes obtained by Sanger sequencing in 20 randomly selected human subjects. In each TaqMan assay, positive controls included two homozygous FCG2B alleles (TT and CC) and one heterozygous TC FCG2B allele.

For the genotyping of variations at rs1771575, rs2099684, and rs1801274. TaqMan genotyping assays (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, MA, USA) with IDs C_26275257_10, C_16118535_20, and C_9077561_20, respectively, were used. PCR amplification was performed on the QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systems (Life Technologies, Waltham, MA, USA) in a final volume of 5 µL, containing 2.1 µL of Master Mix (Life Technologies, Waltham, MA, USA), 0.06 µL of TaqMan probe, 1.84 µL of H_2O, and 1 µL of DNA (10–15 ng/µL).

4.5. Statistical Analyses

Univariate analyses were carried out using Graphpad Prism to assess the association between malaria-related phenotypes and genotypes. Non-parametric Mann-Whitney tests were used to compare median values of Prev*Pf*I across genotypes. A simple linear regression was carried out to calculate the residual for Prev*Pf*I when including age in the model. The residuals were used as phenotypes for some association analyses. As age was shown to influence the prevalence of *P. falciparum* infection, the age effect was further taken into account. Multiple linear regression was carried out to test the effect on the outcome variable Prev*Pf*I, taking into account age and rs1771575. CC:0, CT:1, TT:2, (additive model) or CC:1 vs. CT/TT 0 (recessive model) are the explanatory variables.

Linear mixed models and transmission/disequilibrium (QTDT 2.6.0 program) approaches based on the standard variance components method were used to take into

account the family effect [59]. Variance components were used to construct a test that utilizes information from all available offspring. Total association effects can be partitioned into two orthogonal components, which measure between- and within-family effects. Stratification in the population can be assessed by comparing between- and within-family components. Within-family association and association including within- and between-family components can be performed using the orthogonal model and the total association model, respectively. Evidence of association can be evaluated by the likelihood ratio test (null hypothesis likelihood L0 versus alternative hypothesis likelihood L1). Asymptotically, the quantity 2(lnL1-lnL0) is distributed as a chi-square with df equal to the difference in number of parameters estimated. The q values were calculated based on all the statistical tests performed to control for the false discovery rate. A threshold of 0.1 was applied to correct for multiple tests.

5. Conclusions

In conclusion, our study presents preliminary evidence of an association between an intergenic variant that selectively regulates *FCGR* gene expression and the prevalence of malaria infection in children residing in Burkina Faso. By highlighting the crucial role of non-coding genetic regulatory variants in controlling *FCGR* expression, this research sheds light on the intricate interactions governing immune responses and disease susceptibility. It also acts as a catalyst for further investigations into the functional implications of these regulatory variants, thereby advancing our understanding of the genetic mechanisms influencing the highly variable capacity of individuals to resist *P. falciparum* infection in African populations.

This work holds significant promise for contributing to a broader understanding of the specific genetic and epigenetic factors that influence immune responses. Consequently, it may guide the development of personalized treatments and vaccine strategies tailored to the diverse host responses to infectious diseases like malaria.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms242115711/s1.

Author Contributions: Conceptualization: P.R. and P.P.; Methodology: P.P., P.R., C.P. and M.A.; Validation: P.P., S.A.S. and P.R.; Investigation: C.P., M.T., F.G., J.C., M.A., C.D. and Z.M.; Resources/data curation: P.R., P.P., S.A.S. and M.A.; Writing—original draft preparation: P.P.; Writing—review and editing: P.P., P.R., S.A.S. and C.D.; Visualization: P.P. and C.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' (INSERM). J.C. was supported by Institut MarMaRa, Marseille, France. C.D. was supported by a joint scholarship from the PACA regional council and INSERM. This work received support from the French government under the France 2030 investment plan as part of the initiative d'Excellence d'Aix-Marseille Université—A*MIDEX (AMX-19-IET-007).

Institutional Review Board Statement: All subjects provided informed consent before participating in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the observational study protocol received approval from the National Medical Authorities of Burkina Faso Ethics Committee in 1994, prior to the initiation of enrollment in the observational study.

Informed Consent Statement: Informed consent for multiple immuno-parasitological and clinical surveys was obtained individually from all participants included in the study.

Data Availability Statement: The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We thank all volunteer families of Burkina Faso who gave their individual consent to participate in the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest and confirm that the funders had no role in the design of the study, the collection, analysis, or interpretation of data, the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. World Malaria Report. 2022. Available online: https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022 (accessed on 4 April 2023).
2. Kwiatkowski, D.P. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am. J. Hum. Genet.* **2005**, *77*, 171–192. [CrossRef] [PubMed]
3. Esoh, K.K.; Apinjoh, T.O.; Amambua-Ngwa, A.; Nyanjom, S.G.; Chimusa, E.R.; Amenga-Etego, L.; Wonkam, A.; Achidi, E.A. Genome-wide association study identifies novel candidate malaria resistance genes in Cameroon. *Hum. Mol. Genet.* **2023**, *32*, 1946–1958. [CrossRef] [PubMed]
4. Damena, D.; Agamah, F.E.; Kimathi, P.O.; Kabongo, N.E.; Girma, H.; Choga, W.T.; Golassa, L.; Chimusa, E.R. Insilico Functional Analysis of Genome-Wide Dataset from 17,000 Individuals Identifies Candidate Malaria Resistance Genes Enriched in Malaria Pathogenic Pathways. *Front. Genet.* **2021**, *12*, 676960. [CrossRef]
5. Moncunill, G.; Scholzen, A.; Mpina, M.; Nhabomba, A.; Hounkpatin, A.B.; Osaba, L.; Valls, R.; Campo, J.J.; Sanz, H.; Jairoce, C.; et al. Antigen-stimulated PBMC transcriptional protective signatures for malaria immunization. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaay8924. [CrossRef]
6. Tran, T.M.; Guha, R.; Portugal, S.; Skinner, J.; Ongoiba, A.; Bhardwaj, J.; Jones, M.; Moebius, J.; Venepally, P.; Doumbo, S.; et al. A Molecular Signature in Blood Reveals a Role for p53 in Regulating Malaria-Induced Inflammation. *Immunity* **2019**, *51*, 750–765.e10. [CrossRef]
7. Antonelli, L.R.V.; Leoratti, F.M.S.; Costa, P.A.C.; Rocha, B.C.; Diniz, S.Q.; Tada, M.S.; Pereira, D.B.; Teixeira-Carvalho, A.; Golenbock, D.T.; Gonçalves, R.; et al. The $CD14^{+}CD16^{+}$ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium* vivax malaria. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004393. [CrossRef]
8. Dechavanne, C.; Nouatin, O.; Adamou, R.; Edslev, S.; Hansen, A.; Meurisse, F.; Sadissou, I.; Gbaguidi, E.; Milet, J.; Cottrell, G.; et al. Placental Malaria is Associated with Higher LILRB2 Expression in Monocyte Subsets and Lower Anti-Malarial IgG Antibodies During Infancy. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 909831. [CrossRef]
9. Royo, J.; Rahabi, M.; Kamaliddin, C.; Ezinmegnon, S.; Olagnier, D.; Authier, H.; Massougbodji, A.; Alao, J.; Ladipo, Y.; Deloron, P.; et al. Changes in monocyte subsets are associated with clinical outcomes in severe malarial anaemia and cerebral malaria. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17545. [CrossRef]
10. Nziza, N.; Tran, T.M.; DeRiso, E.A.; Dolatshahi, S.; Herman, J.D.; Lacerda, L.d.; Junqueira, C.; Lieberman, J.; Ongoiba, A.; Doumbo, S.; et al. Accumulation of Neutrophil Phagocytic Antibody Features Tracks with Naturally Acquired Immunity Against Malaria in Children. *J. Infect. Dis.* **2023**, *228*, 759–768. [CrossRef]
11. Garcia-Senosiain, A.; Kana, I.H.; Singh, S.; Das, M.K.; Dziegiel, M.H.; Hertegonne, S.; Adu, B.; Theisen, M. Neutrophils dominate in opsonic phagocytosis of P. falciparum blood-stage merozoites and protect against febrile malaria. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 984. [CrossRef]
12. Chimma, P.; Roussilhon, C.; Sratongno, P.; Ruangveerayuth, R.; Pattanapanyasat, K.; Pérignon, J.-L.; Roberts, D.J.; Druilhe, P. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000631. [CrossRef] [PubMed]
13. Waisberg, M.; Molina-Cruz, A.; Mizurini, D.M.; Gera, N.; Sousa, B.C.; Ma, D.; Leal, A.C.; Gomes, T.; Kotsyfakis, M.; Ribeiro, J.M.C.; et al. *Plasmodium falciparum* infection induces expression of a mosquito salivary protein (Agaphelin) that targets neutrophil function and inhibits thrombosis without impairing hemostasis. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004338. [CrossRef] [PubMed]
14. Ofori, E.A.; Garcia-Senosiain, A.; Naghizadeh, M.; Kana, I.H.; Dziegiel, M.H.; Adu, B.; Singh, S.; Theisen, M. Human blood neutrophils generate ROS through FcγR-signaling to mediate protection against febrile P. falciparum malaria. *Commun. Biol.* **2023**, *6*, 743. [CrossRef] [PubMed]
15. Tangteerawatana, P.; Krudsood, S.; Kanchanakhan, N.; Troye-Blomberg, M.; Khusmith, S. Low monocyte to neutrophil ratio in peripheral blood associated with disease complication in primary Plasmodium falciparum infection. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health* **2014**, *45*, 517–530.
16. Feng, G.; Wines, B.D.; Kurtovic, L.; Chan, J.-A.; Boeuf, P.; Mollard, V.; Cozijnsen, A.; Drew, D.R.; Center, R.J.; Marshall, D.L.; et al. Mechanisms and targets of Fcγ-receptor mediated immunity to malaria sporozoites. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1742. [CrossRef]
17. Dick, J.K.; Hart, G.T. Natural Killer Cell Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) Activity Against Plasmodium falciparum-Infected Red Blood Cells. *Methods Mol. Biol.* **2022**, *2470*, 641–657. [CrossRef]
18. Bouharoun-Tayoun, H.; Druilhe, P. Antibody-Dependent Cell-Mediated Inhibition (ADCI) of *Plasmodium falciparum*: One- and Two-Step ADCI Assays. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1325*, 131–144. [CrossRef]
19. Pleass, R.J. Fc-receptors and immunity to malaria: From models to vaccines. *Parasite. Immunol.* **2009**, *31*, 529–538. [CrossRef]
20. Tiendrebeogo, R.W.; Adu, B.; Singh, S.K.; Dziegiel, M.H.; Nébié, I.; Sirima, S.B.; Christiansen, M.; Dodoo, D.; Theisen, M. Antibody-Dependent Cellular Inhibition Is Associated with Reduced Risk against Febrile Malaria in a Longitudinal Cohort Study Involving Ghanaian Children. *Open Forum. Infect. Dis.* **2015**, *2*, ofv044. [CrossRef]
21. Nagelkerke, S.Q.; Schmidt, D.E.; Haas, M.d.; Kuijpers, T.W. Genetic Variation in Low-To-Medium-Affinity Fcγ Receptors: Functional Consequences, Disease Associations, and Opportunities for Personalized Medicine. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2237. [CrossRef]
22. Anania, J.C.; Chenoweth, A.M.; Wines, B.D.; Hogarth, P.M. The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 464. [CrossRef] [PubMed]

23. Gillis, C.; Gouel-Chéron, A.; Jönsson, F.; Bruhns, P. Contribution of Human FcγRs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 254. [CrossRef] [PubMed]
24. Schuldt, K.; Esser, C.; Evans, J.; May, J.; Timmann, C.; Ehmen, C.; Loag, W.; Ansong, D.; Ziegler, A.; Agbenyega, T.; et al. FCGR2A functional genetic variant associated with susceptibility to severe malarial anaemia in Ghanaian children. *J. Med. Genet.* **2010**, *47*, 471–475. [CrossRef]
25. Munde, E.O.; Okeyo, W.A.; Raballah, E.; Anyona, S.B.; Were, T.; Ong'echa, J.M.; Perkins, D.J.; Ouma, C. Association between Fcγ receptor IIA, IIIA and IIIB genetic polymorphisms and susceptibility to severe malaria anemia in children in western Kenya. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 289. [CrossRef]
26. Ouma, C.; Keller, C.C.; Opondo, D.A.; Were, T.; Otieno, R.O.; Otieno, M.F.; Orago, A.S.S.; Ong'Echa, J.M.; Vulule, J.M.; Ferrell, R.E.; et al. Association of FCgamma receptor IIA (CD32) polymorphism with malarial anemia and high-density parasitemia in infants and young children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *74*, 573–577. [CrossRef] [PubMed]
27. Sinha, S.; Mishra, S.K.; Sharma, S.; Patibandla, P.K.; Mallick, P.K.; Sharma, S.K.; Mohanty, S.; Pati, S.S.; Mishra, S.K.; Ramteke, B.K.; et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcgammaRIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malar. J.* **2008**, *7*, 13. [CrossRef]
28. Zhao, J.; Ma, L.; Chen, S.; Xie, Y.; Xie, L.; Deng, Y.; He, Y.; Li, T.; Wang, J.; Li, S.; et al. Association between Fc-gamma receptor IIa (CD32) gene polymorphism and malaria susceptibility: A meta-analysis based on 6928 subjects. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *23*, 169–175. [CrossRef]
29. Amiah, M.A.; Ouattara, A.; Okou, D.T.; N'Guetta, S.-P.A.; Yavo, W. Polymorphisms in Fc Gamma Receptors and Susceptibility to Malaria in an Endemic Population. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 561142. [CrossRef]
30. Fall, A.K.D.J.; Courtin, D.; Adamou, R.; Edslev, S.; Hansen, A.; Domingo, N.; Christiansen, M.; Adu, B.; Milet, J.; Garcia, A.; et al. Fc Gamma Receptor IIIB NA1/NA2/SH Polymorphisms Are Associated with Malaria Susceptibility and Antibody Levels to *P. falciparum* Merozoite Antigens in Beninese Children. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14882. [CrossRef]
31. Smith, K.G.C.; Clatworthy, M.R. FcgammaRIIB in autoimmunity and infection: Evolutionary and therapeutic implications. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 328–343. [CrossRef]
32. Fall, A.K.D.J.; Kana, I.H.; Dechavanne, C.; Garcia-Senosiain, A.; Guitard, E.; Milet, J.; Massougbodji, A.; Garcia, A.; Dugoujon, J.-M.; Migot-Nabias, F.; et al. Naturally acquired antibodies from Beninese infants promote *Plasmodium falciparum* merozoite-phagocytosis by human blood leukocytes: Implications for control of asymptomatic malaria infections. *Malar. J.* **2022**, *21*, 356. [CrossRef] [PubMed]
33. Nasr, A.; Aljada, A.; Hamid, O.; Elsheikh, H.A.; Masuadi, E.; Al-Bawab, A.; Alenazi, T.H.; Abushouk, A.; Salah, A.M. Significant differences in FcγRIIa, FcγRIIIa and FcγRIIIb genes polymorphism and anti-malarial IgG subclass pattern are associated with severe *Plasmodium falciparum* malaria in Saudi children. *Malar. J.* **2021**, *20*, 376. [CrossRef] [PubMed]
34. Cherif, M.K.; Sanou, G.S.; Maiga, B.; Israelsson, E.; Ouédraogo, A.L.; Bougouma, E.C.; Diarra, A.; Ouédraogo, A.; Ouattara, A.S.; Troye-Blomberg, M.; et al. FcγRIIa polymorphism and anti-malaria-specific IgG and IgG subclass responses in populations differing in susceptibility to malaria in Burkina Faso. *Scand. J. Immunol.* **2012**, *75*, 606–613. [CrossRef] [PubMed]
35. Simpson, A.P.; Roghanian, A.; Oldham, R.J.; Chan, H.T.C.; Penfold, C.A.; Kim, H.J.; Inzhelevskaya, T.; Mockridge, C.I.; Cox, K.L.; Bogdanov, Y.D.; et al. FcγRIIB controls antibody-mediated target cell depletion by ITIM-independent mechanisms. *Cell Rep.* **2022**, *40*, 111099. [CrossRef] [PubMed]
36. Xu, L.; Li, G.; Wang, J.; Fan, Y.; Wan, Z.; Zhang, S.; Shaheen, S.; Li, J.; Wang, L.; Yue, C.; et al. Through an ITIM-independent mechanism the FcγRIIB blocks B cell activation by disrupting the colocalized microclustering of the B cell receptor and CD19. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 5179–5191. [CrossRef]
37. Willcocks, L.C.; Smith, K.G.C.; Clatworthy, M.R. Low-affinity Fcgamma receptors, autoimmunity and infection. *Expert Rev. Mol. Med.* **2009**, *11*, e24. [CrossRef]
38. Clatworthy, M.R.; Willcocks, L.; Urban, B.; Langhorne, J.; Williams, T.N.; Peshu, N.; Watkins, N.A.; Floto, R.A.; Smith, K.G.C. Systemic lupus erythematosus-associated defects in the inhibitory receptor FcgammaRIIb reduce susceptibility to malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7169–7174. [CrossRef]
39. Gelabert, P.; Olalde, I.; de-Dios, T.; Civit, S.; Lalueza-Fox, C. Malaria was a weak selective force in ancient Europeans. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1377. [CrossRef]
40. Willcocks, L.C.; Carr, E.J.; Niederer, H.A.; Rayner, T.F.; Williams, T.N.; Yang, W.; Scott, J.A.G.; Urban, B.C.; Peshu, N.; Vyse, T.J.; et al. A defunctioning polymorphism in FCGR2B is associated with protection against malaria but susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 7881–7885. [CrossRef]
41. Ebonwu, J.; Lassaunière, R.; Paximadis, M.; Strehlau, R.; Gray, G.E.; Kuhn, L.; Tiemessen, C.T. FCGR3A gene duplication, FcγRIIb-232TT and FcγRIIIb-HNA1a associate with an increased risk of vertical acquisition of HIV-1. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0273933. [CrossRef]
42. Hu, W.; Zhang, Y.; Sun, X.; Zhang, T.; Xu, L.; Xie, H.; Li, Z.; Liu, W.; Lou, J.; Chen, W. FcγRIIB-I232T polymorphic change allosterically suppresses ligand binding. *Elife* **2019**, *8*, e46689. [CrossRef] [PubMed]
43. GTEx Consortium The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 580–585. [CrossRef] [PubMed]
44. Lu, H.; Ma, L.; Quan, C.; Li, L.; Lu, Y.; Zhou, G.; Zhang, C. RegVar: Tissue-specific Prioritization of Noncoding Regulatory Variants. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2023**, *21*, 385–395. [CrossRef] [PubMed]

45. Ota, M.; Nagafuchi, Y.; Hatano, H.; Ishigaki, K.; Terao, C.; Takeshima, Y.; Yanaoka, H.; Kobayashi, S.; Okubo, M.; Shirai, H.; et al. Dynamic landscape of immune cell-specific gene regulation in immune-mediated diseases. *Cell* **2021**, *184*, 3006–3021.e17. [CrossRef] [PubMed]
46. Kerimov, N.; Hayhurst, J.D.; Peikova, K.; Manning, J.R.; Walter, P.; Kolberg, L.; Samoviča, M.; Sakthivel, M.P.; Kuzmin, I.; Trevanion, S.J.; et al. A compendium of uniformly processed human gene expression and splicing quantitative trait loci. *Nat. Genet.* **2021**, *53*, 1290–1299. [CrossRef] [PubMed]
47. Calderon, D.; Nguyen, M.L.T.; Mezger, A.; Kathiria, A.; Müller, F.; Nguyen, V.; Lescano, N.; Wu, B.; Trombetta, J.; Ribado, J.V.; et al. Landscape of stimulation-responsive chromatin across diverse human immune cells. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 1494–1505. [CrossRef]
48. Hammal, F.; de Langen, P.; Bergon, A.; Lopez, F.; Ballester, B. ReMap 2022: A database of Human, Mouse, Drosophila and Arabidopsis regulatory regions from an integrative analysis of DNA-binding sequencing experiments. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D316–D325. [CrossRef]
49. Sloan, C.A.; Chan, E.T.; Davidson, J.M.; Malladi, V.S.; Strattan, J.S.; Hitz, B.C.; Gabdank, I.; Narayanan, A.K.; Ho, M.; Lee, B.T.; et al. ENCODE data at the ENCODE portal. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D726–D732. [CrossRef]
50. Lassaunière, R.; Tiemessen, C.T. Variability at the FCGR locus: Characterization in Black South Africans and evidence for ethnic variation in and out of Africa. *Genes. Immun.* **2016**, *17*, 93–104. [CrossRef]
51. Tai, K.Y.; Dhaliwal, J.; Balasubramaniam, V. Leveraging Mann-Whitney U test on large-scale genetic variation data for analysing malaria genetic markers. *Malar. J.* **2022**, *21*, 79. [CrossRef]
52. Cherif, M.K.; Sanou, G.S.; Bougouma, E.C.; Diarra, A.; Ouédraogo, A.; Dolo, A.; Troye-Blomberg, M.; Cavanagh, D.R.; Theisen, M.; Modiano, D.; et al. Is Fc gamma receptor IIA (FcγRIIA) polymorphism associated with clinical malaria and *Plasmodium falciparum* specific antibody levels in children from Burkina Faso? *Acta Trop.* **2015**, *142*, 41–46. [CrossRef] [PubMed]
53. Dwomoh, D.; Adu, B.; Dodoo, D.; Theisen, M.; Iddi, S.; Gerds, T.A. Evaluating the predictive performance of malaria antibodies and FCGR3B gene polymorphisms on *Plasmodium falciparum* infection outcome: A prospective cohort study. *Malar. J.* **2020**, *19*, 307. [CrossRef] [PubMed]
54. Adu, B.; Jepsen, M.P.G.; Gerds, T.A.; Kyei-Baafour, E.; Christiansen, M.; Dodoo, D.; Theisen, M. Fc gamma receptor 3B (FCGR3B-c.233C>A-rs5030738) polymorphism modifies the protective effect of malaria specific antibodies in Ghanaian children. *J. Infect. Dis.* **2014**, *209*, 285–289. [CrossRef] [PubMed]
55. Fall, A.K.D.J.; Dechavanne, C.; Sabbagh, A.; Garcia, A.; Courtin, D.; Migot-Nabias, F. Combined polymorphisms involving the IgG heavy chain and Fc gamma receptors among Fulani and non-Fulani in Benin: Implications for the natural protection of young Fulani against *Plasmodium falciparum* malaria infections. *Infect. Genet. Evol.* **2023**, *112*, 105461. [CrossRef] [PubMed]
56. Atkinson, A.; Garnier, S.; Afridi, S.; Fumoux, F.; Rihet, P. Genetic variations in genes involved in heparan sulphate biosynthesis are associated with *Plasmodium falciparum* parasitaemia: A familial study in Burkina Faso. *Malar. J.* **2012**, *11*, 108. [CrossRef] [PubMed]
57. Rihet, P.; Abel, L.; Traoré, Y.; Traoré-Leroux, T.; Aucan, C.; Fumoux, F. Human malaria: Segregation analysis of blood infection levels in a suburban area and a rural area in Burkina Faso. *Genet. Epidemiol.* **1998**, *15*, 435–450. [CrossRef]
58. Machiela, M.J.; Chanock, S.J. LDlink: A web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3555–3557. [CrossRef]
59. Abecasis, G.R.; Cardon, L.R.; Cookson, W.O. A general test of association for quantitative traits in nuclear families. *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *66*, 279–292. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article 6: An Expression Quantitative Trait Locus Of Fc Gamma Receptor Genes Is Associated With Anti-Malarial IgG Responses And Infection Levels In Burkinabe Families.

Christelle Dieppois, **Mathieu Adjemout**, Jules Cretin, Frederic Gallardo, Magali Torres, Christophe Picard, Serge Aimé Sawadogo, Pascal Rihet, Pascale Paul

The Journal of Infectious Diseases, 2024, https://doi.org/10.1093/infdis/jiae528

Publié le : 25 octobre 2024

Comme nous avons pu le voir plus tôt, l'interaction entre les anticorps et les récepteurs *FCGR* joue un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immunitaire contre le paludisme. Ainsi dans un deuxième temps, nous avons exploré l'impact des variants non codants identifiés plus tôt sur le niveau d'expression des anticorps. Les analyses ont identifié le variant rs1771575 comme étant associé aux niveaux totaux d'IgG, tandis que rs1771575 et rs1801274 sont liés aux niveaux d'IgG2, et rs1050501 aux niveaux d'IgG1. De plus, l'haplotype combinant rs2099684 et rs6700241 est positivement associé aux niveaux d'IgG1.

Nos résultats révèlent le variant rs1771575 comme un acteur clé dans la régulation de la réponse immunitaire contre le paludisme. Ce SNP cis-régulateur influence non seulement l'expression des récepteurs FcγRs dans les cellules myéloïdes et neutrophiles, mais est également associé à des niveaux accrus d'infection chez les enfants du Burkina Faso. Plus fascinant encore, rs1771575 module les niveaux totaux d'IgG et d'IgG2, démontrant un lien direct entre la régulation génique et la production d'anticorps. Cette découverte souligne l'importance cruciale des variants non codants dans le contrôle de l'infection palustre. Elle ouvre de nouvelles perspectives pour des stratégies d'identification de SNPs régulateurs par une approche gène candidat ne se focalisant pas uniquement sur les variants codants.

Contribution : Dans cet article, ma contribution a été de réaliser les analyses d'association familiale.

The Journal of Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE

An Expression Quantitative Trait Locus of Fc Gamma Receptor Genes Is Associated With Antimalarial IgG Responses and Infection Levels in Burkinabe Families

Christelle Dieppois,[1,] Mathieu Adjemout,[1] Jules Cretin,[1] Frederic Gallardo,[1] Magali Torres,[1] Christophe Picard,[2,3] Serge Aimé Sawadogo,[4,5] Pascal Rihet,[1] and Pascale Paul[1,]

[1]Theories and Approaches of Genomic Complexity, Aix Marseille University, INSERM U1090, Marseille, France; [2]Anthropologie bio-culturelle, droit, éthique et santé, Établissement Français du Sang, Centre National de la Recherche Scientifique, Aix Marseille University, Marseille, France; [3]Immunogenetics Laboratory, Etablissement Français du Sang, Marseille, France; [4]Unité de Formation en Sciences de la Santé, Université Joseph Ki-Zerbo, Ouagadougou, Burkina Faso; and [5]Centre Pour la Pecherche et l'Pnnovation en Pmmunologie Pédicale de Puagadougou-Nelson Mandela, Ouagadougou, Burkina Faso

Background. The interaction between antibodies and Fcγ receptors (FcγRs) plays a critical role in regulating immune responses to *Plasmodium falciparum*. Polymorphisms in genes encoding FcγRs influence the host's capacity to control parasite infection. This study investigates whether noncoding variants influencing FcγR expression are associated with antimalarial immunization and infection traits.

Methods. We utilized eQTL databases and functional annotations to identify noncoding variants, specifically rs1771575, rs2099684, and rs6700241, within the *FCGR* gene cluster. In addition, we examined the coding variants rs1801274 (p.His167Arg) and rs1050501 (p.Ile231Thr), which affect the affinity of FcγRIIa and FcγRIIb for IgG. These variants were genotyped in 163 individuals from Burkinabe families. Family-based linear mixed regression and Quantitative Transmission Disequilibrium Tests (QTDT) analyses were performed to assess associations with IgG levels and malaria infection, accounting for relevant covariates.

Results. Linear mixed models identified rs1771575 as associated with total IgG levels, while both rs1771575 and rs1801274 were linked to IgG2, and rs1050501 to IgG1 levels. A haplotype combining rs2099684 and rs6700241 was positively associated with IgG1. The rs1771575-CC and rs1050501-TT genotypes correlated with higher infection levels in children. QTDT models confirmed the association of rs1771575 with IgG2 and infection in children.

Conclusions. Our findings suggest that the intergenic variant rs1771575 serves as an independent marker for IgG levels and blood infection in children. This highlights the interplay between regulatory variants and coding mutations in *FCGR*, which may influence immune function and antibody production. These results underscore the potential for personalized strategies to monitor humoral responses in malaria-endemic regions.

Keywords. Fc gamma receptors; *Plasmodium falciparum* immunization; *FCGR* expression quantitative trait locus; *FCGR* gene polymorphism; malaria.

The malaria parasite *Plasmodium falciparum* is a leading cause of child mortality worldwide [1], exerting significant selective pressure on the human genome in endemic regions. Repeated exposure to *P. falciparum* triggers a humoral response, parasitemia, and clinical malaria. Naturally acquired or vaccinal immunity to *P. falciparum*, primarily mediated by immunoglobulin G (IgG) antibodies, relies on memory B cells for protective responses that inhibit parasite replication [2, 3]. Immune activation is triggered by the recognition of the Fc domains of IgG subclasses 1–4 by Fcγ receptors (FcγRs). Each IgG subclass has unique characteristics that determine their interaction with FcγRs, resulting in varying capacities to stimulate immune functions [4–7] and neutralize toxins [8]. Cytophilic IgG1 and IgG3 antibody subclasses have high affinity to most FcγRs and play critical roles in pathogen opsonization, complement activation, and antibody-dependent cellular cytotoxicity [9–11]. In contrast, IgG2 and IgG4 antibodies exhibit lower affinity for both complement and FcγRs, functioning primarily as neutralizing antibodies with limited protective efficacy against malaria [5, 12].

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) can affect the expression and function of Fc receptors, thereby influencing the antibody-dependent activation of host monocytes and natural killer (NK) cells. These genetic variations modulate the immune response, contributing to the effective destruction of parasites. Studies have identified associations between coding mutations

Received 21 August 2024; editorial decision 22 October 2024; accepted 22 October 2024; published online 25 October 2024

Correspondence: Pascale Paul, PhD, TAGC, Aix Marseille University, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 9, France (pascale.paul@inserm.fr). Pascal Rihet, PhD, TAGC, Aix Marseille University, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 9, France (pascal.rihet@univ-amu.fr).

The Journal of Infectious Diseases®

© The Author(s) 2024. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For commercial re-use, please contact reprints@oup.com for reprints and translation rights for reprints. All other permissions can be obtained through our RightsLink service via the Permissions link on the article page on our site—for further information please contact journals.permissions@oup.com.

https://doi.org/10.1093/infdis/jiae528

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

that result in amino acid substitutions in activating FcγRs, such as p.His167Arg (rs1801274) in FcγRIIa and p.Phe176Val (rs396991) in FcγRIIIa, and their effects on IgG levels, affinity for IgG antibody subclasses, and the host's ability to control parasite density and malaria severity [13–19].

The c.692T > C (p.Ile231Thr-rs1050501) variant in *FCGR2B* leads to the substitution of isoleucine with threonine in the transmembrane domain of the FcγRIIb inhibitory receptor. FcγRIIb, expressed on B cells, dendritic cells, monocytes, macrophages, and mast cells, modulates inhibitory signaling pathways, balancing activation signals from receptors such as FcγRIIa and FcγRIIIa, or regulating antibody production by B cells [20–22]. The c.692T > C variant exhibits variable allelic frequencies across populations, suggesting malaria-driven selective pressure in endemic regions [23]. An association has been observed between decreased susceptibility to severe malaria and homozygosity for the C allele [24]. The protective effect is believed to be due to both immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)-dependent and independent suppression of B-cell activation, enhanced antibody-mediated responses, and increased parasite elimination through improved phagocytosis of *P. falciparum*-infected erythrocytes [24, 25].

A genome-wide association study identified variants in *FCGR2B* associated with circulating immunoglobulin levels [26]. More recently, the noncoding variant c.-73 + 446C > T (rs1771575), an expression quantitative trait locus (eQTL) for several *FCGR* genes in immune cells was linked to *P. falciparum* infection [27].

In this study, we investigated whether intergenic eQTL variants within the chromosome 1q23 *FCGR* gene cluster, along with known coding *FCGR2A/FCGR2B* variants, influence anti-*P. falciparum* antigen IgG levels in families from Burkina Faso. Additionally, we aimed to explore the relationship between *P. falciparum* infection, IgG levels, and *FCGR* genetic variants.

METHODS

Study Population, Blood Samples, and Parasitological Phenotypes

The study was conducted in Logofourousso, a village of 3500 inhabitants near Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, where population and malaria transmission data have been previously published [28]. The study received approval from the Ethics Committee for Health Research (reference 2023000192/MSHP/MESRI/CERS) and the Committee for Informatics and Liberties of Burkina Faso (reference 2024-341/CIL/SG/DAJC). Participant families were randomly selected from the endemic village, and individuals were included only after voluntary informed consent was obtained from participants or their guardians. Over a period of 2 years, each family was visited 28 times. If participants developed a fever, additional visits were conducted, and they were treated for malaria if diagnosed positive. Parasitemia data collected during mild malaria episodes were excluded from the analysis.

A total of 163 participants from 38 pedigrees were included, comprising 68 parents and 95 siblings. The annual incidence of infective mosquito bites per person exceeded 230. During the 28 visits, peripheral blood samples were collected from all volunteers present during each visit, and thin blood films were stained with Giemsa to assess parasite density (PD), as described previously [28]. PD was quantified microscopically by counting infected red blood cells per μL of blood. The mean adjusted parasite density (MaPD) for each participant was calculated through a logarithmic transformation of PD using log (1 + PD) (LPD). To account for visit-specific effects, the mean LPD for each visit was subtracted from the individual LPD, allowing the calculation of MaPD for each participant as a quantitative phenotype without a specific threshold.

IgG and IgG Subclass Level Phenotype Determination

Blood samples were collected from 68 parents and 95 siblings to allow antibody measurements at the end of the dry season (P1) and the end of the rainy season (P2) [19]. *P. falciparum* antigens were extracted from a synchronized culture of the W2 strain and coated on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plates. Levels of immunoglobulin G isotypes (IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4) were measured using specific monoclonal antibodies, while total IgG was measured using a goat F(ab′)2 anti-human IgG. Enzymatic activities were measured with *p*-nitrophenyl phosphate, and optical densities were read at 405 nm. Standard curves were drawn using a pool of 200 sera, and antibody levels were expressed as arbitrary units (AU). A logarithmic transformation based on log (1 + AU) (LAU) was applied to account for zero values. Standardization of LAU at P1 and P2 and calculation of the mean adjusted LAU (MaLAU) for each participant were performed to correct for visit effects [19].

Bioinformatic Identification of Noncoding Regulatory Variants

Noncoding SNPs with potential regulatory function were identified through a linkage disequilibrium (LD) analysis using genotyping data from the 1000 Genomes Project. LD data of 5 African populations (Esan in Nigeria [ESN], Gambian in Western Division – Mandinka [GWD], Luhya in Webuye, Kenya [LWK], Mende in Sierra Leone [MSL], Yoruba in Ibadan, Nigeria [YRI]) were downloaded from the Ensembl browser (https://www.ensembl.org/index.html). The analysis was limited to SNPs in strong LD (D′ > 0.9) in at least 2 populations. eQTL data from the GTEx Project (https://gtexportal.org/home/) and ImmuNexUT (https://www.immunexut.org/) were used to specify eQTL associations in whole blood and immune cell types. RegVar (https://regvar.omic.tech/) and VarNote-REG (http://www.mulinlab.org/varnote/index.html) were used to prioritize SNPs based on their regulatory potential and tissue/cell-type–specific impact on gene expression. A threshold of 0.6 was set for the RegVar score and the

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

cepip score from VarNote-REG. Positions and annotations of ENCODE candidate cis-regulatory elements (cCREs) were obtained through the UCSC Table Browser to locate variants within regulatory regions. Chromatin status in primary cells were visualized with Roadmap Epigenomics tracks (https://egg2.wustl.edu/roadmap/web_portal/). ReMap ChIP-seq tracks were used to visualize overlapping transcription factor binding sites (TFBS) in primary cells and immune cell lines in the UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu/) on Human GRCh37/hg19. The RSAT software (https://rsat.france-bioinformatique.fr/metazoa/) was used to predict the impact of candidate variants on TFBS, using motif collections from ENCODE and JASPAR. Only TFBS supported by ChIP-seq data were considered relevant.

Genotyping of *FCGR* Variants

Blood samples were collected using venipuncture, and DNA was extracted from mononuclear cells separated by a Ficoll-Hypaque density gradient. The samples underwent whole-genome amplification using the primer extension preamplification method prior genotyping. For genotyping variations located on chromosome 1q23.3 (NC_000001.10), Taqman assays C_26275257_10, C_16118535_20, C_57479994_10, and C_9077561_20 were used as recommended by the manufacturer (Thermo Fisher Scientific) for the specific variations g.161617497C > T (c.-73 + 446C > T, rs1771575), g.161500130A > G (rs2099684), g.161500975A > G (rs6700241), and g.161479745A > G (p.His167Arg-rs1801274), respectively. PCR amplification and genotyping of g.161643798T > C (p.Ile231Thr- rs1050501) were performed as described, using a homemade TaqMan discrimination assay [27].

Statistical Analyses

Multiple linear mixed regression models were used to investigate the effects of genotypes on IgG antibody levels and parasitemia-associated phenotypes. Three genetic inheritance models—additive, dominant, and recessive—were constructed, except in cases where the low frequency of the minor G alleles at rs6700241 and rs2099684 lacked sufficient power to build additive and recessive models. Each model incorporated familial effects and potential confounding variables such as age and sex. Residuals from these models were calculated to visualize the distribution of total IgG and IgG4 antibody levels, as well as to explore the relationship between genotypes and the MaPD phenotype. Nonparametric Mann-Whitney *U* tests were performed to compare median IgG levels and MaPD across different genotypes.

The Quantitative Transmission Disequilibrium Test (QTDT) program was used for a comprehensive assessment of allelic transmission effects on quantitative phenotypes within families, taking into account familial relationships and potential confounding factors [29]. The Family Based Association Test (FBAT) program allowed us to assess haplotype transmission effects on phenotypes within families [30]. To tackle multiple test issue, the adaptive false discovery rate (FDR) method was applied [31]. All nominal *P* values were included in this procedure, with a significance threshold of .046 corresponding to an FDR of 10%. LD statistics and plots were generated using Haploview version 4.2 (https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview) [32].

RESULTS

Prioritization and Annotation of Putative Regulatory SNPs in the Noncoding *FCGR* Regions

To elucidate the role of specific SNPs in regulating *FCGR* gene expression, we focused on identifying and annotating putative regulatory SNPs. In a previous study, we identified 2 noncoding SNPs, rs2099684 and rs1771575, associated with *FCGR* gene expression and influencing transcription factor binding sites in immune cells [27]. Our current study aimed to identify additional regulatory variants through LD analysis in African populations. This revealed 1 SNP, rs380125, in high LD with rs1771575, and 3 SNPs—rs6700241, rs10919543, and rs10919544—in strong linkage with rs2099684 (Supplementary Table 1). Among these, only rs6700241 showed high regulatory potential based on RegVar and cepip scores; the others were excluded due to lower scores (Supplementary Table 2). We used ENCODE cCREs data to locate regulatory regions overlapping with rs6700241, which was identified within a distal enhancer downstream of rs2099684 (Figure 1*A*). Epigenomic mapping showed rs6700241 in an open chromatin region and H3K27ac peaks in monocytes, B cells, NK cells, and neutrophils. The ReMap ChIP-seq catalogue indicated multiple transcription factors binding at this variant location. RSAT analysis predicted that rs6700241-G significantly enhanced the binding of transcription factor 3 (TCF3/E2A), a key regulator in B-cell development and differentiation (Supplementary Figure 1). This aligns with ImmuNexUT eQTL data, associating this allele with increased FCGR expression in B cells (Supplementary Table 3).

Analysis of Genotypic Frequencies of Noncoding and Coding *FCGR* Variants in Burkina Faso Population

To establish the genetic diversity and distribution of *FCGR* variants in the local population, we analyzed genotypic frequencies. The study analyzed 95 siblings and 68 parents from the Bobo ethnic group, who underwent genotyping and IgG data collection. Age and sex distribution, as well as phenotypic and genotypic data, are presented in Table 1.

We assessed the heterozygous and homozygous genotype frequencies for 5 target SNPs among the 68 parents, finding no deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (Supplementary Table 4). Haploview analysis confirmed strong LD between rs2099684 and rs6700241 (Figure 1*B* and Supplementary

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

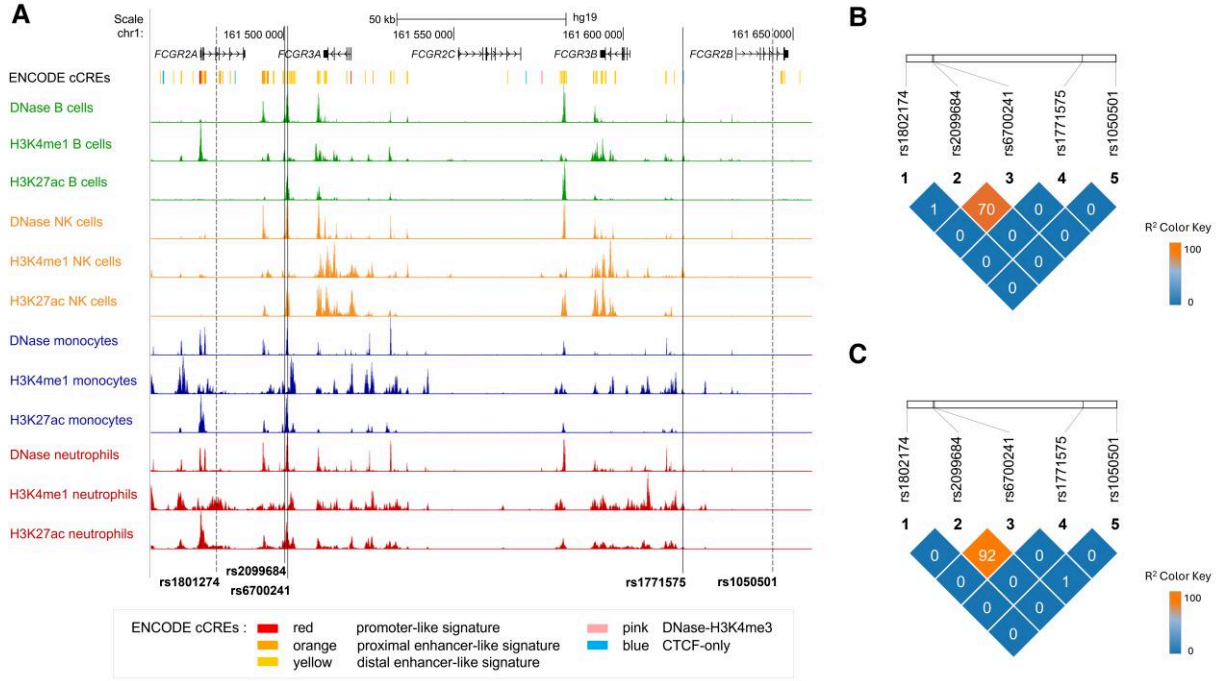


Figure 1. Epigenetic and linkage disequilibrium profiling of *FCGR* variants. *A*, Candidate variants rs2099684, rs6700241, and rs1771575 are in DNase I hypersensitivity sites and overlap with histone marks (H3K4me1 or H3K27ac) found in B cells, NK cells, monocytes, and neutrophils. The variants are also in regulatory regions defined by ENCODE cCREs. The positions of *FCGR2A* and *FCGR2B* coding variants, rs1801274 and rs1050501, are also shown. *B* and *C*, rs2099684 and rs6700241 are in strong linkage disequilibrium in (*B*) the studied population and (*C*) African populations from the 1000 Genomes Project. Linkage disequilibrium plots show correlation coefficient between a pair of variants, represented in each square by the R^2 value × 100. The color key also provides a visual reference with a blue to orange gradient reflecting lower to higher values. Abbreviations: cCRE, candidate cis-regulatory element; CTCF, CCCTC binding factor; H3K27ac, histone H3 lysine 27 acetylation; H3K4me1, histone H3 lysine 4 monomethylation.

Table 5), consistent with observations in other African populations (Figure 1*C*).

These genotype frequencies were compared to African and European populations from the 1000 Genomes Project. Genotype distributions for rs1771575 and rs1801274 were similar across Burkina Faso, African, and European populations (Figure 2*A* and 2*E*), while those of the rs2099684 and rs6700241 noncoding variants (Figure 2*B* and 2*C*), and *FCGR2B* coding variant rs1050501 (p.Ile231Thr) differed significantly between the 3 populations (Figure 2*D*).

Analysis of *FCGR* Variants and IgG Immunization

To investigate the impact of genetic variants on immune response, we analyzed the association between specific eQTL and coding variants with IgG immunization against *P. falciparum*. We analyzed the association between specific eQTL variants and coding variants FcγRIIa p.His167Arg (rs1801274) and FcγRIIb p.Ile231Thr (rs1050501) with IgG immunization against *P. falciparum*.

Total IgG levels were higher in females but not significantly correlated with age (Figure 3*A*). Using linear mixed models, we found a significant association between rs1771575 and total IgG levels (Table 2), with the CC genotype associated with higher IgG levels (Figure 3*B*). No significant associations were found for other SNPs.

IgG subclass analyses revealed that total IgG was primarily driven by IgG1 and IgG3 (Supplementary Table 6). Notably, higher IgG2 levels were associated with rs1771575-CC (Figure 3*C*) and rs1801274-AA genotypes (Figure 3*D* and Table 2), both in the full population and in children. QTDT analysis confirmed a significant association between rs1771575 and IgG2 levels ($P = .041$; Supplementary Table 7).

Lower IgG1 levels were linked to the rs1050501-CT/CC genotypes, but only in children (Table 2 and Supplementary Figure 2), a result not corroborated by QTDT analysis (Supplementary Table 7). Furthermore, haplotype analysis of rs2099684-A allele combined with rs6700241-A identified a positive association with IgG1 levels ($P = .046$) (Supplementary Table 8). No other significant associations were found with the other SNPs or haplotypes analyzed (Supplementary Tables 7 and 8).

Association of the rs1771575-T Allele With Lower Levels of *P. falciparum* Infection

To explore the relationship between genetic variants and malaria infection levels, we modeled the impact of genetic variants

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

Table 1. Characteristics of Participants

Characteristic	All (n = 163)	Parents (n = 68)	Children (n = 95)
Sex			
Female	93 (57)	44 (65)	49 (52)
Male	70 (43)	24 (35)	46 (48)
Age, years, median (IQR)	14.0 (7.50 to 39.0)	40.0 (31.2 to 45.7)	8.00 (6.00 to 12.0)
IgG level (AI), median (IQR)			
Total IgG	0.054 (−0.540 to 0.523)	0.188 (−0.626 to 0.778)	0.013 (−0.443 to 0.361)
IgG1	0.074 (−0.457 to 0.521)	0.130 (−0.390 to 0.538)	0.070 (−0.461 to 0.509)
IgG2	0.165 (−0.608 to 0.605)	−0.058 (−0.426 to 0.504)	0.333 (−0.906 to 0.726)
IgG3	0.105 (−0.436 to 0.694)	−0.030 (−0.455 to 0.618)	0.199 (−0.363 to 0.750)
IgG4	−0.116 (−0.560 to 0.405)	−0.203 (−0.611 to 0.276)	−0.092 (−0.522 to 0.450)
Parasitemia, median (IQR)			
No of postive parasite measurement per individual (mean value)	21.0 (15.5 to 24.0)	20.0 (16.0 to 24.0)	21.0 (15.0 to 24.0)
MaPD	−0.395 (−0.744 to 0.231)	−0.778 (−0.828 to −0.709)	0.115 (−0.318 to −0.512)
Noncoding variants			
rs1771575 (C > T)			
CC	36 (22)	14 (21)	22 (23)
CT	73 (45)	28 (41)	45 (47)
TT	54 (33)	26 (38)	28 (29)
rs2099684 (A > G)			
AA	124 (77)	54 (79)	70 (75)
AG	33 (20)	13 (19)	20 (21)
GG	5 (3)	1 (2)	4 (4)
rs6700241 (A > G)			
AA	117 (74)	49 (74)	68 (73)
AG	37 (23)	15 (23)	22 (24)
GG	5 (3)	2 (3)	3 (3)
Coding variants			
rs1050501 (T > C)			
CC	12 (7)	5 (8)	7 (8)
CT	75 (48)	33 (50)	42 (46)
TT	70 (45)	28 (42)	42 (46)
rs1801274 (A > G)			
AA	26 (16)	13 (19)	13 (14)
AG	77 (49)	32 (48)	45 (49)
GG	56 (35)	22 (33)	34 (37)

Qualitative variables are No. (%). As indicated, quantitative variables are median (IQR, 25th-75th percentile).

Abbreviations: IgG, immunoglobulin G; IQR, interquartile range; MaPD, mean adjusted parasite density.

on *P. falciparum* blood infection levels (MaPD) in children, who showed a 31-fold higher variance in MaPD than parents (Supplementary Figure 3). The analysis accounted for age, antibody levels, and family structure.

Children with the rs1771575-T allele (CT/TT genotypes) had lower infection levels than those with the CC genotype. After adjusting for age, MaPD was inversely correlated with total IgG ($P = .023$) and IgG4 ($P = .004$), but not with IgG1, IgG2, or IgG3 levels (Supplementary Table 9). Individuals with both rs1771575-CC and rs1050501-TT genotypes had higher MaPD compared to those with rs1771575-CT/TT and rs1050501-CT/CC, even after adjusting for age, total IgG, and/or IgG4 levels (Table 3 and Figure 4).

QTDT confirmed a significant association between rs1771575-C and higher MaPD ($P = .006$), persisting after adjusting for IgG4 levels ($P = .012$). However, QTDT did not replicate the rs1050501 association observed in mixed models or any other variant besides rs1771575 (Supplementary Table 7). FBAT analysis further linked higher MaPD to the haplotype rs2099684-A, rs6700241-A, and rs1771575-C (Supplementary Table 8).

DISCUSSION

Recent research has highlighted the complex relationship between FcγR genetic variations and humoral immune responses, particularly in malaria [14]. While much focus has been on coding variants affecting IgG subclass affinity, this study explores noncoding variants regulating FcγR gene expression.

Using bioinformatic tools, we identified eQTL variants with regulatory potential that influence the expression of activating and inhibitory FcγRs. We then examined these variants' associations with malaria phenotypes using both family-based linear

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

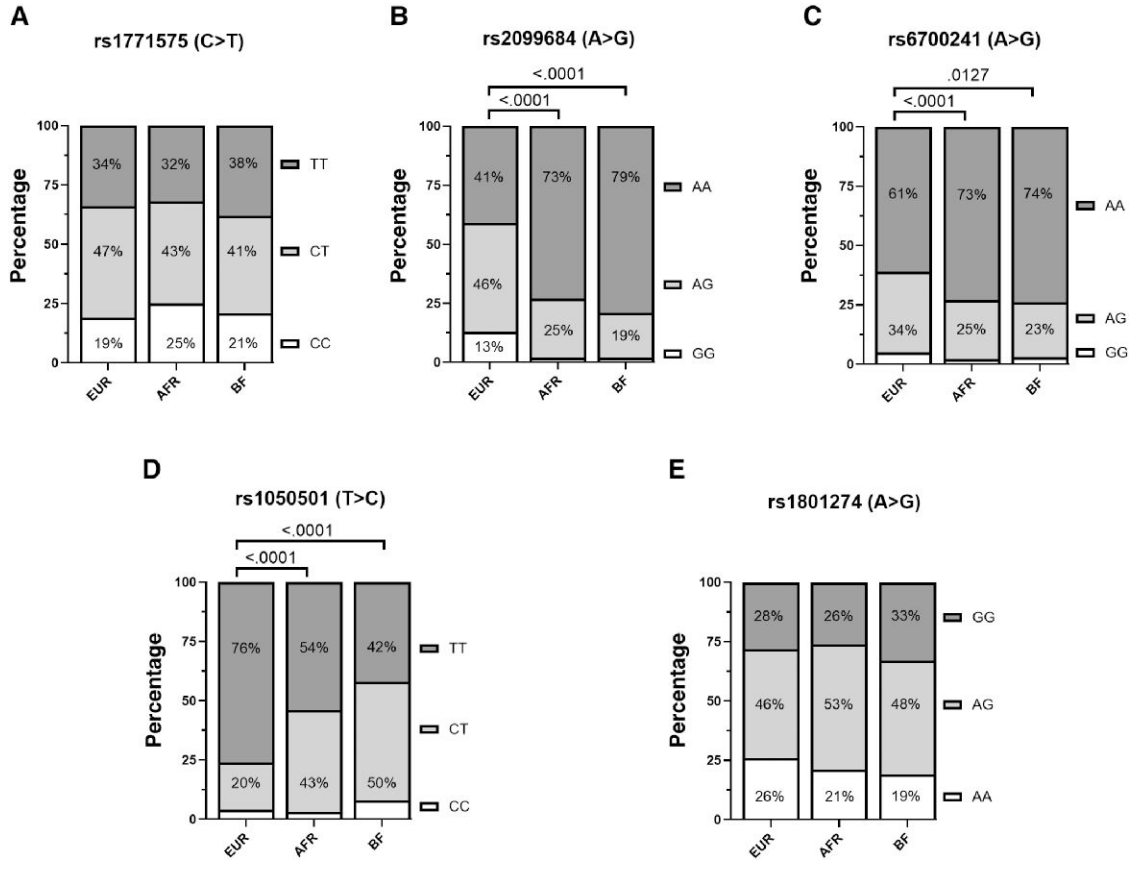


Figure 2. Distribution of *FCGR* genotypes analyzed in the parental cohort. The genotype frequencies of analyzed variants among individuals from Europe, Africa (1000 Genomes Project), and the study population of parents from the cohort enrolled in Burkina Faso (n = 68) were compared. This includes the distribution of genotypes for noncoding variants rs1771575 (*A*), rs2099684 (*B*), and rs6700241 (*C*), as well as coding variants rs1050501 (*D*) and rs1801274 (*E*). Genotype frequencies were analyzed using the χ^2 test. For rs2099684 and rs6700241, GG homozygous were combined with heterozygous, and for rs1050501, CC homozygous were combined with heterozygous. Only significant differences (*P* values < .05) are shown. Abbreviations: AFR, Africans; BF, Burkina Faso; EUR, Europeans.

mixed models and QTDT and FBAT tests, which assess allele transmission. As previously reported [4], total IgG levels were associated with lower parasitemia. However, QTDT analyses did not confirm significant associations of total IgG with the studied variants in the study cohort.

The rs1801274-AA genotype was associated with elevated antiplasmodial IgG2 levels but not with infection levels. This genotype corresponds to p.167His in FcγRIIa, known for enhancing IgG2 binding, unlike the alternative p.167Arg isoform, which binds cytophilic IgG1 more efficiently [12]. The association between rs1801274 and IgG2 has been reported in malaria contexts [13, 15, 17, 33, 34], aligning with our observations. However, the role of FcγRIIa-IgG2–mediated immune activation remains debated. Some studies suggest that p.167Arg, which binds IgG1 more effectively, may offer better protection against high parasite densities and clinical malaria compared to p.167His [8, 35–37]. Conversely, other studies have linked this isoform with malaria protection [15, 38, 39], particularly in Fulani populations [40]. Our findings align with those in southern Benin [41] and Allada populations [16], showing that rs1801274 did not exhibit a protective effect. These inconsistencies in African subpopulations likely stem from differences in sample size, ethnic origin, genetic diversity, clinical definitions of malaria, gene-environment interactions, or the lack of family-based studies for this FcγRIIa variant concerning parasitemia and clinical malaria. This highlights the variability in how coding variants influence FcγR-dependent humoral immune responses across populations.

In contrast to the extensively studied FcγRIIa variant, our family-based study identified the noncoding rs1771575 variant as the only significant marker associated with both parasitemia and IgG2 levels. This association between rs1771575 and blood infection levels is consistent with our previous results showing its association with malaria infection prevalence [27].

In exposed children, rs1771575-CC individuals had higher infection and IgG2 levels compared to CT/TT individuals. Although this suggests that this variant influences FcγRIIb-dependent inhibition of FcγRIIa-mediated immune activation during parasite challenge, this hypothesis is unsupported by the lack of association between IgG2 levels and infection rates in children.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

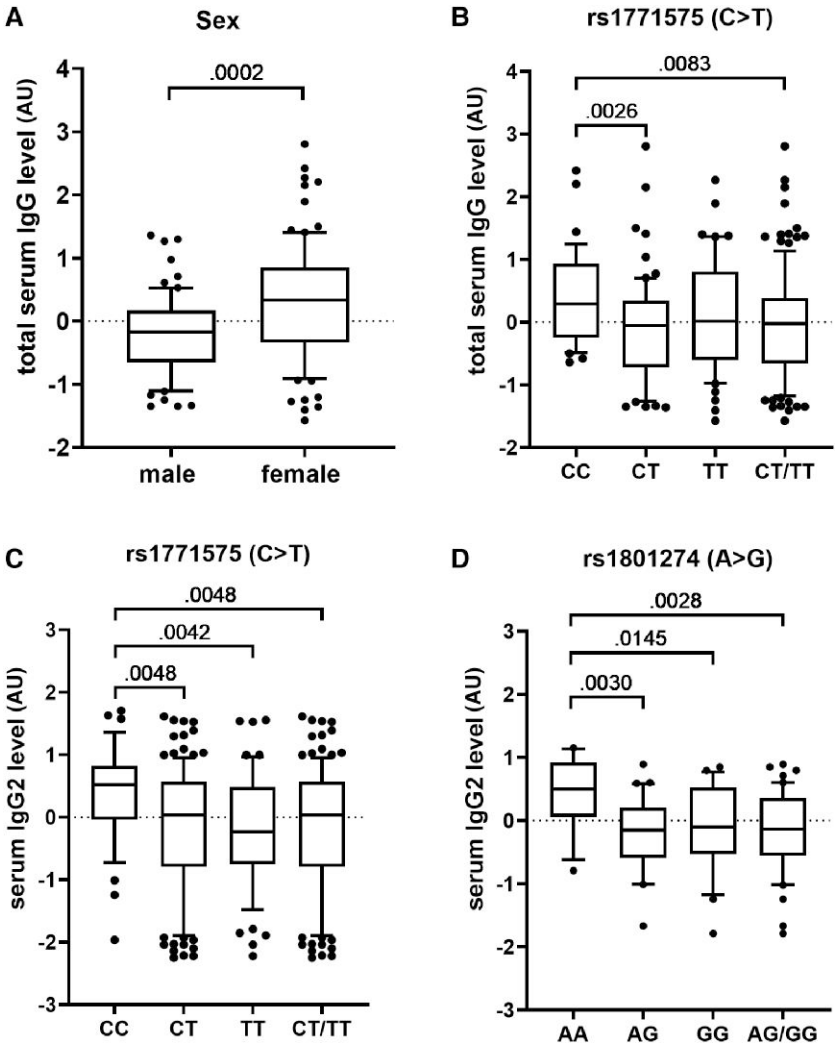


Figure 3. Comparative analysis of IgG levels across genotypes. Box plots show total serum IgG levels in males and females (*A*) and across rs1771575 genotypes (*B*) or serum IgG2 levels according to rs1771575 (*C*) and rs1801274 genotypes (*D*). Boxes depict the interquartile range with medians as lines within the boxes, whiskers extending to the 10th and 90th percentiles, and outliers as individual points. *P* values (<.046), which remained significant after correcting for multiple tests, are shown in the plots and resulted from nonparametric Mann-Whitney *U* tests. Abbreviations: AU, arbitrary units; IgG, immunoglobulin G; IgG2, immunoglobulin G subclass 2.

The mechanisms by which rs1771575 influences IgG2 and infection levels remain unclear. However, as we previously described [27], allele-specific binding of CCCTC-binding factor (CTCF) may contribute to the regulatory potential of this eQTL variant to modulate the expression of inhibitory (FcγRIIb) and activating (FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, FcγRIIIb) receptors on immune cells involved in parasite clearance, such as neutrophils, dendritic cells, monocytes, and NK cells. This complexity makes it difficult to decipher how rs1771575 influences the balance between inhibitory and activating signals, particularly in conjunction with coding functional variants. Public eQTL data reveal that the rs1771575-CC genotype is linked to lower gene expression of activating *FCGR2A*, *FCGR2C*, and *FCGR3A* and inhibitory *FCGR2B* in various immune cell types. This genotype is expected to reduce FcγRIIb expression on monocytes and neutrophils, potentially lessening the impairment of FcγRIIa-mediated parasite phagocytosis. Furthermore, rs1771575 is linked to *FCGR2B* expression in dendritic cells, which may affect antigen presentation, T-lymphocyte activation, and B-cell–dependent antibody production.

Finally, eQTL associations in the ImmuNexUT database suggest that the rs1771575-TT genotype may upregulate *FCGR2C* expression on immune cells. *FCGR2C* was long considered a pseudogene due to a splice variant polymorphism preventing expression in most individuals, while an open reading frame mutation allows its expression on immune cells. Although less studied, FcγRIIc expression on immune cells promotes humoral activation. Polymorphisms in *FCGR2C* have been associated with its expression in human B cells and with vaccinal protection against human immunodeficiency virus (HIV) and anthrax trials [42–

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

Table 2. Family-Based Association Between IgG and IgG2 Levels and *FCGR* Variants

Explanatory variables included in the linear mixed models	All (n = 163)	Children (n = 95)
rs1771575[a]		
Total IgG	.46 (.10, .83); .013	.14 (−.21, .49); .444
Total IgG adjusted to sex	.39 (.12, .70); .036	.08 (−.27, .42); .665
Sex	.41 (.12, .70); .013	.37 (.09, .65); .011
IgG2 subclass	.60 (.23, .97); .002	.66 (.13, 1.19); .017
rs1801274[b]		
IgG2 subclass	.33 (.11, .55); .004	.40 (.06, .74); .022
rs1050501[c]		
IgG1 subclass	−.18 (−.50, .13); .262	−.44 (−.84, −.05); .031

Data are β coefficients (95% confidence intervals provided as lower, upper bounds); *P* value. Family-based linear mixed models were used to test the association of coding and noncoding variants with immunoglobulins levels, when considering family structure. *P* values < .046 were considered significant after correcting for multiple tests.

Abbreviation: IgG, immunoglobulin G.

[a]Analysis according to the recessive model, comparing genotype CC versus CT/TT.

[b]Analysis according to the additive model, comparing genotype GG versus AG versus AA.

[c]Analysis according to the dominant model, comparing genotype TT versus CT/CC.

Table 3. Family-Based Association Between MaPD and *FCGR* Variants

Explanatory variables included in the linear mixed models	MaPD Adjusted for Age and Total IgG	MaPD Adjusted for Age, Total IgG, and IgG4
rs1771575[a]	.23 (.01, .45); .045	.23 (.02, .04); .036
Age	−.06 (−.07, −.04); <.001	−.05 (−.07, −.04); <.001
Total IgG	−.17 (−.30, −.04); .012	−.13 (−.26, −.003); .049
IgG4	…	−.12 (−.20, −.03); .011
rs1050501[b]	−.26 (−.45, −.08); .007	−.25 (−.44, −.07); .007
Age	−.06 (−.08, −.04); <.001	−.06 (−0.07, −0.04); <.001
Total IgG	−.17 (−.30, −.05); .009	−.13 (−.26, .003); .058
IgG4	…	−.11 (−.21, −.02); .024
rs1771575–rs1050501[c]	−.23 (−.41, −.05); .017	−.23 (−.41, −.05); .013
Age	−.06 (−.07, −.04); <.001	−.05 (−.07, −.04); <.001
Total IgG	−.16 (−.28, −.03); 0.017	−.12 (−.24, .01); .069
IgG4	…	−.12 (−.20, −.03); .010

Data are β coefficients (95% confidence intervals provided as lower, upper bounds); *P* value. Family-based linear mixed models were used to test the association of coding and noncoding variants with MaPD in children, when considering family structure, age, total IgG, or IgG4. *P* values < .046 were considered significant after correcting for multiple tests.

Abbreviations: IgG, immunoglobulin G; MaPD, mean of adjusted parasite density.

[a]Analysis according to the recessive model, comparing genotype CC versus CT/TT.

[b]Analysis according to the dominant model, comparing genotype TT versus CT/CC.

[c]Analysis comparing combined genotypes rs1771575-CC and rs1050501-TT with combined genotypes rs1771575-CT/TT and rs1050501-CT/CC.

44], and were recently identified as predictors of sepsis outcomes in infectious diseases [45]. Our results suggest that rs1771575-TT may enhance IgG and FcγRIIc-dependent activation of NK or B lymphocytes in individuals with this open reading frame polymorphism.

Lower infection levels were observed in children carrying the rs1050501-C allele compared to TT homozygotes, and in those carrying both rs1050501-C and the rs1771575-T alleles, compared to individuals with rs1050501-TT and rs1771575-CC genotypes. Consistent with our observations, homozygosity for the FcγRIIb rs1050501-CC polymorphism (T-to-C in exon 5 leading to the p.Ile231Thr substitution) has been associated with protection against severe malaria in East Africa [25]. This protective genotype is more prevalent in malaria-endemic regions but also linked to an increased risk of autoimmune diseases like systemic lupus erythematosus in Caucasian and Southeast Asian populations [24, 25].

We observed a higher frequency of the rs1050501-C allele in Burkina Faso compared to European populations in the 1000 Genomes Project. This increased frequency has been attributed to malaria-driven selective pressure [23]. In regions with high malaria exposure, this polymorphism may influence host capacity to mount protective immune responses against parasites, which could explain the prevalence of the rs1050501-CC genotype in Logofourousso, Burkina Faso.

Interestingly, the rs1050501-CC genotype was previously associated with enhanced humoral responses, notably with herpes simplex virus type 1-specific IgG3 antibodies in Alzheimer disease [46]. Although the rs1050501-TT genotype was associated with higher serum IgG1 levels and increased infection rates, this association did not persist in QTDT models, and IgG1 levels were not correlated with protection in our cohort.

Haplotype analysis revealed a positive association between IgG1 levels and the haplotype containing rs2099684-A and rs6700241-A alleles, suggesting this haplotype may influence IgG1 production. While the underlying mechanisms remain unclear, the reduced expression of FcγRIIb associated with this haplotype may alleviate its inhibitory effect on B cells, promoting increased B cell activation and higher IgG1 levels. As previously observed [47], although no specific variants were associated with IgG4 levels, elevated IgG4 were linked to lower parasitemia. Multivariate analysis suggests that the association between rs1771575 and parasitemia appears to be partially independent of IgG4. The mechanisms by which this variant and IgG4 may cooperate to influence parasitemia remain unclear, but prior research indicates that IgG4 may indirectly contribute to increased *FCGR2B* expression and the differentiation of M2 macrophages, which produce immunosuppressive cytokines [48].

One limitation of this study is that the identification of regulatory variants using the GTEx dataset predominantly represents individuals of European ancestry, which restricts the ability to capture population-specific eQTLs relevant to African populations. However, it is important to note that the rs1771575 variant identified in our study does not show significant differences in allele frequencies between populations in endemic regions and European populations. Despite the relatively small sample size, analyses based on QTDT and mixed model methods demonstrated sufficient statistical power to

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

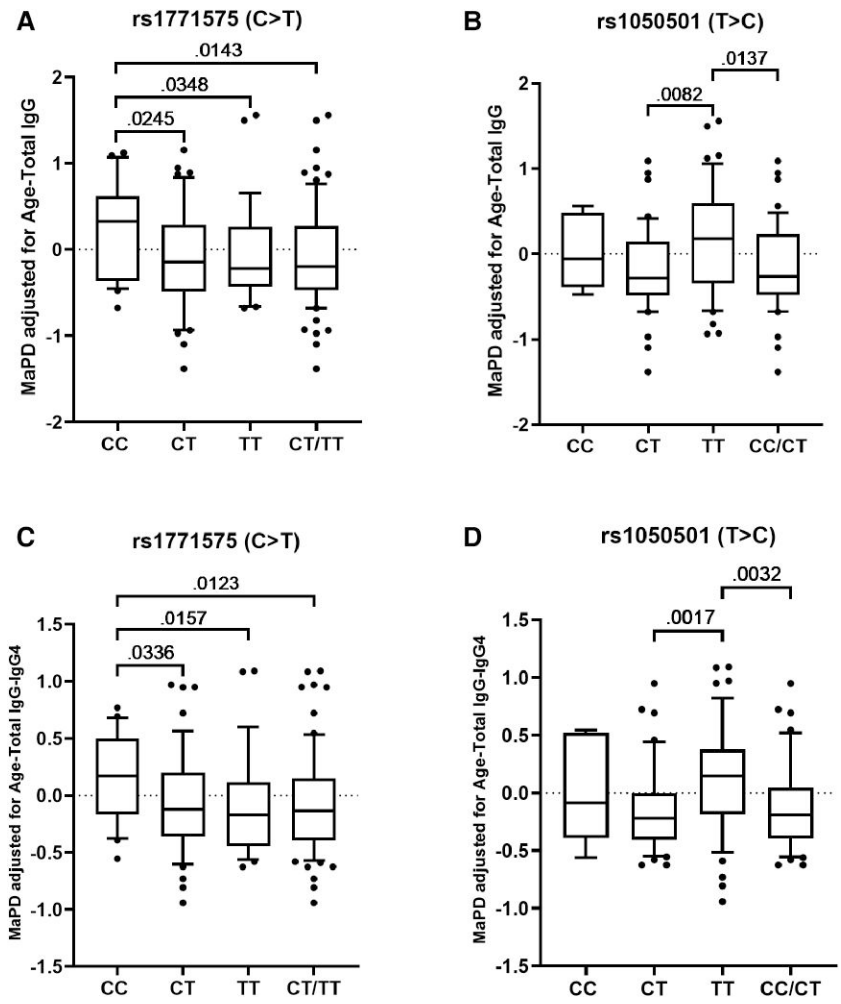


Figure 4. Genotypic comparison of *Plasmodium falciparum* blood infection levels in children. Box plots show parasitemia (MaPD) adjusted for age and total IgG according to rs1771575 (*A*) or rs1050501 genotypes (*B*). MaPD adjusted for age, total IgG, and IgG4 was also compared across rs1771575 (*C*) and rs1050501 genotypes (*D*). Boxes represent the interquartile range with medians indicated by lines, whiskers extending to the 10th and 90th percentiles, and outliers as individual points. Significant differences in MaPD between genotypes were tested with the nonparametric Mann-Whitney *U* test, with *P* values < .046 considered significant after correcting for multiple tests. The mean adjusted parasite density (MaPD) in the Y-axis was calculated for each participant through a logarithmic transformation of PD using log (1 + PD) (LPD). To account for visit-specific effects, the mean LPD for each visit was subtracted from the individual LPD, allowing the calculation of MaPD for each participant as a quantitative phenotype without a specific threshold. Abbreviations: IgG, immunoglobulin G; IgG4, immunoglobulin G subclass 4; MaPD, mean of adjusted parasite density.

detect the association of the rs1771575-T allele with both lower IgG2 levels and reduced parasitemia in children. Another limitation is the lack of information on confounding factors, such as coinfections and prior infection history, which could influence parasitemia levels.

In conclusion, this study provides compelling evidence that, alongside the known coding variants rs1050501 and rs1801274, noncoding intergenic variants may significantly influence the expression of both activating and inhibitory Fc receptors, as well as overall immune functions. Notably, our findings indicate that rs1771575 is an independent factor associated with IgG2 levels and blood infection rates. These results highlight the intricate interplay between coding and noncoding genetic determinants in shaping FcγR-mediated humoral immune responses against malaria in children. Moreover, they suggest that IgG2 may play a nuanced role in immunity, potentially influencing antibody-mediated responses to combat the parasite in individuals with specific *FCGR2A* or *FCGR2B* genetic backgrounds. Further research is essential to validate the association of rs1771575 with malaria phenotypes and to assess responses to natural or vaccine-induced immunization in independent populations residing in malaria-endemic regions.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (http://jid.oxfordjournals.org/). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Author contributions. P. P. and P. R. contributed conceptualization, funding acquisition, supervision, and wrote original draft. P. P., C. D., S. S., P. R., C. P., and M. A. curated data. M. A., P. P., C. D., P. R., M. T., F. G., and C. P. performed formal analysis. C. D., J. C., F. G., and M. T. performed investigations. P. R., P. P., and S. S. contributed methodology. C. D., M. A., P. P., J. C., P. R., M. T., F. G., C. P., and S. S. performed writing review and editing.

Acknowledgments. We thank all the families who participated in the study.

Financial support. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Aix-Marseille University; and the French Government under the France 2030 Investment Plan, as part of the initiative Excellence d'Aix Marseille Université (grant number AMX-19-IET-007). C. D. was supported by a PhD fellowship Emploi Jeune Doctorant 2023-2026 from the Région Sud Alpes Cote Azur. P. M. A. was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of Research. J. C. was supported by a masters fellowship from the Marmara Institute. This project was carried out in the framework of the INSERM GOLD Cross-Cutting Programme transversal Variabilité génomique 2018 (to P. R.).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. World Health Organization. World malaria report 2023. https://www.who.int/publications/i/item/9789240086173.
2. Gonzales SJ, Reyes RA, Braddom AE, Batugedara G, Bol S, Bunnik EM. Naturally acquired humoral immunity against *Plasmodium falciparum* malaria. Front Immunol **2020**; 11: 594653.
3. Julien J-P, Wardemann H. Antibodies against *Plasmodium falciparum* malaria at the molecular level. Nat Rev Immunol **2019**; 19:761–75.
4. Gbaguidi MLE, Adamou R, Edslev S, et al. Igg and IgM responses to the *Plasmodium falciparum* asexual stage antigens reflect respectively protection against malaria during pregnancy and infanthood. Malar J **2024**; 23:154.
5. Dobaño C, Santano R, Vidal M, et al. Differential patterns of IgG subclass responses to *Plasmodium falciparum* antigens in relation to malaria protection and RTS,S vaccination. Front Immunol **2019**; 10:439.
6. Leonard CM, Uhomoibhi P, Abubakar A, et al. Dynamics of IgG antibody response against *Plasmodium* antigens among Nigerian infants and young children. Front Immunol **2023**; 14:1208822.
7. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Front Immunol **2014**; 5:520.
8. Pleass RJ. Fc-receptors and immunity to malaria: from models to vaccines. Parasite Immunol **2009**; 31:529–38.
9. Hviid L, Lopez-Perez M, Larsen MD, Vidarsson G. No sweet deal: the antibody-mediated immune response to malaria. Trends Parasitol **2022**; 38:428–34.
10. Kana IH, Garcia-Senosiain A, Singh SK, et al. Cytophilic antibodies against key *Plasmodium falciparum* blood stage antigens contribute to protection against clinical malaria in a high transmission region of Eastern India. J Infect Dis **2018**; 218:956–65.
11. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. J Exp Med **1990**; 172:1633–41.
12. Damelang T, Brinkhaus M, van Osch TLJ, et al. Impact of structural modifications of IgG antibodies on effector functions. Front Immunol **2023**; 14:1304365.
13. Anania JC, Chenoweth AM, Wines BD, Hogarth PM. The human FcγRII (CD32) family of leukocyte FcR in health and disease. Front Immunol **2019**; 10:464.
14. Amiah MA, Ouattara A, Okou DT, N'Guetta S-PA, Yavo W. Polymorphisms in Fc gamma receptors and susceptibility to malaria in an endemic population. Front Immunol **2020**; 11:561142.
15. Zhao J, Ma L, Chen S, et al. Association between Fc-gamma receptor IIa (CD32) gene polymorphism and malaria susceptibility: a meta-analysis based on 6928 subjects. Infect Genet Evol **2014**; 23:169–75.
16. Fall AKDJ, Courtin D, Adamou R, et al. Fc gamma receptor IIIB NA1/NA2/SH polymorphisms are associated with malaria susceptibility and antibody levels to *P. falciparum* merozoite antigens in Beninese children. Int J Mol Sci **2022**; 23: 14882.
17. Afridi S, Atkinson A, Garnier S, Fumoux F, Rihet P. Malaria resistance genes are associated with the levels of IgG subclasses directed against *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in Burkina Faso. Malar J **2012**; 11:308.
18. Nagelkerke SQ, Schmidt DE, de Haas M, Kuijpers TW. Genetic variation in low-to-medium-affinity Fcγ receptors: functional consequences, disease associations, and opportunities for personalized medicine. Front Immunol **2019**; 10:2237.
19. Aucan C, Traoré Y, Fumoux F, Rihet P. Familial correlation of immunoglobulin G subclass responses to *Plasmodium*

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

falciparum antigens in Burkina Faso. Infect Immun **2001**; 69: 996–1001.
20. Roghanian A, Stopforth RJ, Dahal LN, Cragg MS. New revelations from an old receptor: immunoregulatory functions of the inhibitory Fc gamma receptor, FcγRIIB (CD32B). J Leukoc Biol **2018**; 103:1077–88.
21. Simpson AP, Roghanian A, Oldham RJ, et al. FcγRIIB controls antibody-mediated target cell depletion by ITIM-independent mechanisms. Cell Rep **2022**; 40: 111099.
22. Wang J, Li Z, Xu L, Yang H, Liu W. Transmembrane domain dependent inhibitory function of FcγRIIB. Protein Cell **2018**; 9:1004–12.
23. Gelabert P, Olalde I, de-Dios T, Civit S, Lalueza-Fox C. Malaria was a weak selective force in ancient Europeans. Sci Rep **2017**; 7:1377.
24. Willcocks LC, Carr EJ, Niederer HA, et al. A defunctioning polymorphism in FCGR2B is associated with protection against malaria but susceptibility to systemic lupus erythematosus. Proc Natl Acad Sci U S A **2010**; 107:7881–5.
25. Clatworthy MR, Willcocks L, Urban B, et al. Systemic lupus erythematosus-associated defects in the inhibitory receptor FcγRIIb reduce susceptibility to malaria. Proc Natl Acad Sci U S A **2007**; 104:7169–74.
26. Jonsson S, Sveinbjornsson G, de Lapuente Portilla AL, et al. Identification of sequence variants influencing immunoglobulin levels. Nat Genet **2017**; 49:1182–91.
27. Cretin J, Adjemout M, Dieppois C, et al. A non-coding Fc gamma receptor cis-regulatory variant within the 1q23 gene cluster is associated with *Plasmodium falciparum* infection in children residing in Burkina Faso. Int J Mol Sci **2023**; 24:15711.
28. Atkinson A, Garnier S, Afridi S, Fumoux F, Rihet P. Genetic variations in genes involved in heparan sulphate biosynthesis are associated with *Plasmodium falciparum* parasitaemia: a familial study in Burkina Faso. Malar J **2012**; 11:108.
29. Abecasis GR, Cardon LR, Cookson WO. A general test of association for quantitative traits in nuclear families. Am J Hum Genet **2000**; 66:279–92.
30. Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. Genet Epidemiol **2000**; 19(Suppl 1):S36–42.
31. Black MA. A note on the adaptive control of false discovery rates. J R Stat Soc Ser B Stat Methodol **2004**; 66:297–304.
32. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics **2005**; 21:263–5.
33. Fall AKDJ, Dechavanne C, Sabbagh A, Garcia A, Courtin D, Migot-Nabias F. Combined polymorphisms involving the IgG heavy chain and Fc gamma receptors among Fulani and non-Fulani in Benin: implications for the natural protection of young Fulani against *Plasmodium falciparum* malaria infections. Infect Genet Evol **2023**; 112:105461.
34. Nasr A, Aljada A, Hamid O, et al. Significant differences in FcγRIIa, FcγRIIIa and FcγRIIIb genes polymorphism and anti-malarial IgG subclass pattern are associated with severe *Plasmodium falciparum* malaria in Saudi children. Malar J **2021**; 20:376.
35. Cooke GS, Aucan C, Walley AJ, et al. Association of Fcgamma receptor IIa (CD32) polymorphism with severe malaria in West Africa. Am J Trop Med Hyg **2003**; 69:565–8.
36. Ntoumi F, Flori L, Mayengue PI, et al. Influence of carriage of hemoglobin AS and the Fc gamma receptor IIa-R131 allele on levels of immunoglobulin G2 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Gabonese children. J Infect Dis **2005**; 192:1975–80.
37. Ouma C, Keller CC, Opondo DA, et al. Association of Fcgamma receptor IIA (CD32) polymorphism with malarial anemia and high-density parasitemia in infants and young children. Am J Trop Med Hyg **2006**; 74:573–7.
38. Maiga B, Dolo A, Touré O, et al. Fc gamma receptor IIa-H131R polymorphism and malaria susceptibility in sympatric ethnic groups, Fulani and Dogon of Mali. Scand J Immunol **2014**; 79:43–50.
39. Sinha S, Mishra SK, Sharma S, et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIa correlate with the severity of *falciparum* malaria in the ethnically diverse Indian population. Malar J **2008**; 7:13.
40. Nasr A, Iriemenam NC, Giha HA, et al. FcγRIIa (CD32) polymorphism and anti-malarial IgG subclass pattern among Fulani and sympatric ethnic groups living in eastern Sudan. Malar J **2009**; 8:43.
41. Fall AKDJ, Dechavanne C, Sabbagh A, et al. Susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria: influence of combined polymorphisms of IgG3 Gm allotypes and Fc gamma receptors IIA, IIIA, and IIIB. Front Immunol **2020**; 11: 608016.
42. Peng X, Li SS, Gilbert PB, Geraghty DE, Katze MG. FCGR2C polymorphisms associated with HIV-1 vaccine protection are linked to altered gene expression of Fc-γ receptors in human B cells. PLoS One **2016**; 11:e0152425.
43. Ebonwu J, Lassaunière R, Paximadis M, et al. An HIV vaccine protective allele in FCGR2C associates with increased odds of perinatal HIV acquisition. Front Immunol **2021**; 12:760571.
44. Lassaunière R, Paximadis M, Ebrahim O, Chaisson RE, Martinson NA, Tiemessen CT. The FCGR2C allele that modulated the risk of HIV-1 infection in the Thai RV144 vaccine trial is implicated in HIV-1 disease progression. Genes Immun **2019**; 20:651–9.
45. Liu S, Zhang YL, Zhang LY, Zhao GJ, Lu ZQ. FCGR2C: an emerging immune gene for predicting sepsis outcome. Front Immunol **2022**; 13:1028785.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

46. Costa AS, Agostini S, Guerini FR, Mancuso R, Clerici M, Pandey JP. Relation between FCGRIIB rs1050501 and HSV-1 specific IgG antibodies in Alzheimer's disease. J Transl Med **2020**; 18:325.
47. Dobaño C, Quelhas D, Quintó L, et al. Age-dependent IgG subclass responses to *Plasmodium falciparum* EBA-175 are differentially associated with incidence of malaria in Mozambican children. Clin Vaccine Immunol **2012**; 19:157–66.
48. Bianchini R, Roth-Walter F, Ohradanova-Repic A, et al. IgG4 drives M2a macrophages to a regulatory M2b-like phenotype: potential implication in immune tolerance. Allergy **2019**; 74:483–94.

Downloaded from https://academic.oup.com/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiae528/7840803 by Inserm U 36 user on 23 January 2025

V. Optimisation De L'approche ScRNA-Seq Pour Étudier La Réponse Immunitaire Dans Le Paludisme

Mathieu Adjemout[1], Lorena Quattreville[1], Magali Torres[1], Charline Gard[2], Camille Cohen[3], Brigitte Tumamo[4], Pascal Rihet[1], Lionel Spinelli[5], Sandrine Nsango[4], Antoine Claessens[3], Sandrine Marquet[1]

[1]Aix Marseille Univ, INSERM, TAGC, Marseille, France
[2]Aix Marseille Univ, INSERM, TAGC, TGML, Marseille, France
[3]LPHI, MIVEGEC, INSERM, CNRS, IRD, University of Montpellier, Montpellier, France.
[4]Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroon
[5]Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, CIML, Marseille, France

Cette partie, bien que n'ayant pas encore fait l'objet d'une publication, constitue une étape clé d'un projet ambitieux intitulé MADBIO (Analyse intégrative pour la découverte de biomarqueurs expliquant le devenir de l'infection palustre). Financé par le PRI Inserm "MalariaOmics" (coordinatrice S. Marquet) et l'ANR (ANR-22-CE15-0025, coordinatrice S. Marquet), ce projet s'inscrit dans une démarche innovante de recherche collaborative et multidisciplinaire. MADBIO réunit des experts de divers domaines, notamment nos partenaires de Montpellier, qui se concentrent sur l'analyse des données parasitaires. En parallèle, nous réalisons des analyses approfondies sur la réponse de l'hôte, afin d'étudier les interactions Hôte-Pathogène et produire une vision à la fois duale et longitudinale des mécanismes impliqués dans l'infection palustre.

Jusqu'à présent, nos travaux se sont concentrés sur l'effet des SNPs et sur l'identification des gènes qu'ils régulent, à partir de loci candidats ou de données d'associations pangénomiques. Ici, nous adoptons une approche différente en partant des gènes dérégulés pour identifier les gènes différentiellement exprimés, dans le but de découvrir les régions régulatrices et les variants causaux impliqués.

Au cours des 15 dernières années, les avancées technologiques ont radicalement transformé notre capacité à explorer le transcriptome. Si les premières études s'appuyaient sur des technologies de microarrays, l'émergence récente du RNA-seq a marqué une nouvelle étape. Malgré cela, seules deux études à ce jour ont tenté d'adopter une approche de double transcriptome, ciblant à la fois l'hôte et le parasite. Ces efforts d'élucider les gènes dérégulés ont été entravés par une hétérogénéité des protocoles expérimentaux, des outils techniques et des méthodologies analytiques. Bien que certains résultats cohérents aient émergé, les découvertes restent limitées, avec une forte prédominance de gènes déjà connus ou suspectés de jouer un rôle dans le paludisme.

Un obstacle majeur réside dans l'analyse des échantillons riches en types cellulaires divers et complexes, où les approches traditionnelles masquent la variabilité intercellulaire essentielle pour comprendre les mécanismes pathologiques. Les méthodes de déconvolution, bien qu'utilisées pour surmonter ce défi, se heurtent à des limites inhérentes à leur capacité de prédire avec précision la composition cellulaire. C'est dans ce contexte que les technologies

de scRNA-seq ont émergé, offrant une résolution sans précédent pour capturer l'hétérogénéité des populations cellulaires dans des échantillons complexes tels que le sang total.

Pourtant, même avec ces avancées, les études transcriptomiques actuelles n'ont pas encore répondu à une question clé : pourquoi certaines infections par *P. falciparum* restent-elles asymptomatiques alors que d'autres évoluent vers des formes cliniques ? L'intégration de ces nouvelles technologies dans une stratégie scientifique ciblée représente une opportunité unique de combler cette lacune et de faire émerger des mécanismes encore inconnus.

Le projet MADBIO vise à décrypter les mécanismes complexes de l'interaction hôte-parasite dans les infections par *Plasmodium falciparum*, en incluant les individus symptomatiques mais également les individus asymptomatiques chroniques, qui constituent le principal réservoir du parasite et qui représentent un obstacle majeur à l'éradication du paludisme. En collaboration avec le Centre Pasteur du Cameroun et l'institut LPHI de Montpellier, une cohorte de 30 enfants d'une école de la périphérie de Yaoundé a été suivie durant 3 mois pour explorer la variabilité interindividuelle dans l'évolution des infections.

Grâce aux techniques de séquençage à cellule unique (scRNA-seq), le projet MADBIO vise à explorer les transcriptomes des PBMC de l'hôte humain et du parasite *P. falciparum* à différents stades de l'infection. Ce projet longitudinal, le premier de ce type, vise à identifier des biomarqueurs prédictifs de l'issue des infections et de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre le parasite et son hôte naturel. Les travaux s'articulent autour de trois objectifs principaux : prédire l'issue des infections à partir du transcriptome de l'hôte, analyser le rôle de la variation antigénique du parasite dans la réponse immunitaire, et comprendre l'adaptation transcriptionnelle mutuelle entre l'hôte et le parasite.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons utilisé une approche développée par 10X Genomics reposant sur le scRNA-seq, une technologie capable de mesurer l'expression génique avec une résolution cellulaire. Cette méthode permet de révéler les subtilités de l'hétérogénéité cellulaire, invisibles dans les analyses traditionnelles de RNA-seq. Un aspect clé de ce projet auquel j'ai participé est l'optimisation des protocoles de fixation des cellules. J'ai ensuite mis en place des stratégies analytiques robustes, garantissant une interprétation précise et fiable des données générées.

En appliquant cette technologie à un individu, qui après plusieurs jours d'infection a évolué vers une forme symptomatique, mes analyses ont révélé des différences significatives dans les réponses immunitaires, en particulier au niveau des monocytes. Ces résultats suggèrent que certains gènes spécifiques pourraient jouer un rôle crucial dans la régulation des différences d'expression observées entre le stade asymptomatique et symptomatique, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour mieux comprendre les mécanismes pathologiques du paludisme.

Contribution : Dans cette partie, ma contribution a été de réaliser la fixation des cellules avec Magali Torres et Sandrine Marquet et de participer aux expériences de scRNA-seq avec Charlyne Gard, Magali Torres et Sandrine Marquet. J'ai ensuite généré les fichiers FASTQ, effectué le démultiplexage des données et généré les matrices de compte. Enfin, j'ai réalisé l'analyse des données de l'individu A74 à deux temps. L'analyse des autres individus a été confiée à Loréna Quatreville, qui effectue cette analyse en partie grâce au pipeline que j'ai développé.

V.1. Méthodes

V.1.1. Information Clinique

Dans le cadre de cette étude, une campagne de recrutement a été menée au Cameroun, près de Yaoundé, dans une école (Fig. résultat.1). Tous les enfants de l'école (environ 150 enfants) ont été testés pour évaluer leur parasitémie. La quasi-totalité des enfants étaient infectés, ils ont alors été traités contre le paludisme ainsi que contre les infections aux helminthes. Après un délai de 2 semaines, l'absence de parasite a été vérifiée par des tests rapides de diagnostic et vérification de la parasitémie par qPCR, un prélèvement sanguin veineux a été effectué pour établir un échantillon de base désigné comme temps 0 (T0). Trente enfants ont été intégrés à la cohorte d'études et suivis sur une période de trois mois avec des contrôles réalisés tous les 10 jours. L'identification de réinfection par *plasmodiums* comprenait des prélèvements par goutte épaisse, ou des tests qPCR pour détecter une parasitémie. Dès qu'un enfant redevenait positif pour le parasite, un second prélèvement sanguin veineux (T1) était réalisé. Trois évolutions de l'infection ont été observées au sein de cette cohorte : l'élimination naturelle du parasite où un prélèvement était réalisé au moment de l'élimination, les enfants restés asymptomatiques durant toute la durée de l'étude qui ont été prélevés en fin d'étude, et les enfants ayant développé des symptômes tels que de la fièvre pour lesquels un prélèvement était réalisé suivi d'un traitement afin d'éviter toute complication.

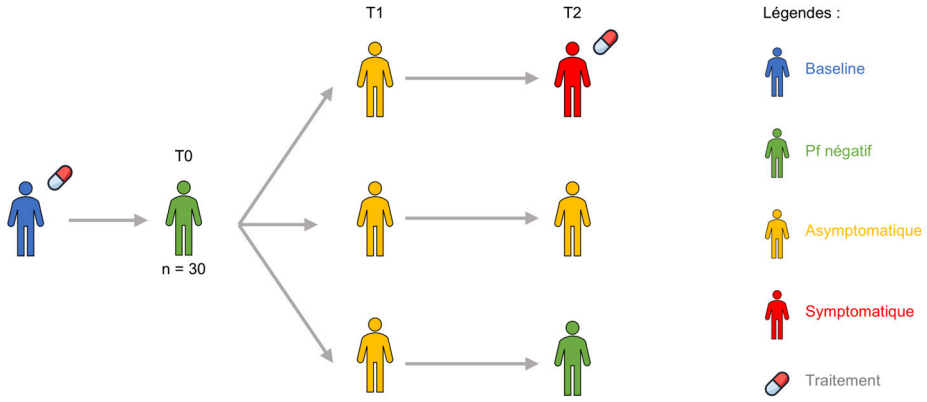


Figure résultat.1 : Design du recrutement de la cohorte du Cameroun

Cette figure présente la description de la cohorte d'étude réalisée auprès de 30 enfants dans le cadre du suivi d'une infection palustre. Après un traitement initial contre le paludisme, l'efficacité du traitement a été vérifiée deux semaines plus tard par des tests pour évaluer la parasitémie. Les enfants ont subi un premier prélèvement sanguin veineux (T0), suivi de contrôles réguliers tous les 10 jours pendant trois mois, afin de détecter une réinfection par *Plasmodium falciparum*. Trois types d'évolution de l'infection ont été observés. Certains enfants, initialement asymptomatiques au temps T1, ont développé des symptômes au temps T2, nécessitant un traitement antipaludique. D'autres enfants sont restés asymptomatiques tout au long de l'étude. Enfin, certains enfants ont éliminé naturellement le parasite. Des prélèvements veineux ont été effectués lors de la réinfection, lorsque l'enfant a développé des symptômes, ou après l'élimination naturelle du parasite, ou encore à la fin de l'étude pour ceux présentant des infections chroniques.

V.1.2. Détail Expérimental

V.1.2.1. Isolation Des Cellules Mononucléaire Périphérique

Les prélèvements veineux ont été centrifugés et les plasmas ont été récupérés et stockés à -80°C. Les PBMCs ont été isolés par la méthode du Ficoll et l'utilisation de tube SepMate (STEMCell Technologies) et ceci dans les plus brefs délais après le prélèvement. (cellules mononucléées du sang périphérique). Les PBMCs ont été cryoconservées avec un stockage en azote liquide. Les globules rouges infectés qui sont situés au fond du tube sont récupérés après le Ficoll. Les échantillons cryoconservés stockés dans des dryshippers pour le rapatriement en France.

V.1.2.2. Préparation Des Cellules Pour Single-Cell RNA-Seq

Les cellules ont été décongelées dans du milieu RPMI-1640 + 10 % de FBS, préchauffé à 37 °C, par pipetage doux. La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du Countess II FL et d'une coloration au bleu de trypan à 2 %, avec un ratio de 1:1. Les cellules présentant une viabilité supérieure à 80 % ont été centrifugées à 400 g pendant 5 minutes à 4 °C, puis lavées avec 5 ml de PBS préalablement refroidies à 4 °C. Une seconde centrifugation à 400 g a été effectuée pour éliminer le surnageant. Les cellules récupérées ont ensuite été fixées dans du formaldéhyde pendant 18 heures à 4 °C selon la recommandation du kit 10x Genomics (Next GEM Single Cell Fixed RNA Sample Preparation Kit). Après fixation, elles ont été lavées et conservées dans un tampon contenant du glycérol, conformément aux recommandations du protocole 10x Genomics. Enfin, les cellules fixées ont été stockées à -80 °C jusqu'à leur utilisation pour le scRNA-seq.

V.1.2.3. Single-Cell RNA-Seq Avec La Technique Next GEM Flex (Fixed RNA Profiling)

L'expérience a été réalisée conformément au protocole de 10x Genomics (CG00527 Rev E). En bref, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) fixées ont été décongelées, puis incubées avec des sondes spécifiques permettant de multiplexer les échantillons et de quantifier les transcrits (Single Cell WTA Probes, 10x Genomics). Une solution d'hybridation comprenant Hyb Buffer B et Enhancer a été préparée et ajoutée aux cellules, suivie d'une incubation de 16 à 24 heures à 42°C pour permettre l'hybridation des sondes. Après cette étape, les cellules ont été lavées et regroupées en pools de 4 échantillons. Pour générer les GEMs (Gel Bead-in-Emulsions), la puce Chromium Next GEM (10x Genomics) a été chargée avec une solution contenant les cellules et les billes, à une concentration visant 10 000 cellules encapsulées par échantillon. Les GEMs de 10x Genomics sont des microgouttelettes contenants chacune une bille recouverte d'oligonucleotides uniques, permettant de capturer

et de marquer individuellement l'ARN d'une cellule. Après génération, les GEMs (transcrits avec barcodes cellulaires) ont été soumises à un protocole de destruction, suivi d'une amplification PCR préliminaire. Enfin, les produits amplifiés ont été purifiés avec des billes SPRIselect et soumis à une indexation par PCR pour la préparation des librairies, qui ont été qualifiées et quantifiées à l'aide d'un Agilent Bioanalyzer avant le séquençage final sur une plateforme Illumina. Les quantifications cellulaires ont été effectuées à l'aide d'un compteur Countess, et toutes les étapes critiques ont été réalisées en conditions stériles, conformément aux recommandations du fabricant. Deux expériences distinctes de scRNA-seq et de séquençage ont été réalisées pour cette étude. La première incluant 4 échantillons multiplexés (Figure résultat.2), dont la librairie a été séquencée sur un NextSeq 2000 avec une puce P3 Flow Cell, offrant une capacité de 1,1 milliard de reads, par la plateforme TGML de notre laboratoire. La seconde expérience comprenant 12 échantillons regroupés en 3 pools, chaque pool contenant 4 échantillons multiplexés (Fig. résultat.2). Les librairies issues de cette seconde expérience ont été séquencées sur un NovaSeq avec une puce S2 Flow Cell, capable de générer jusqu'à 4,2 milliards de reads, par la plateforme de l'IHU- Méditerranée infection (hôpital de la Timone, Marseille). Malheureusement en raison du critère de viabilité des cellules, nous n'avons pas pu analyser tous les individus aux 2 temps T1 et T2 (figure 2).

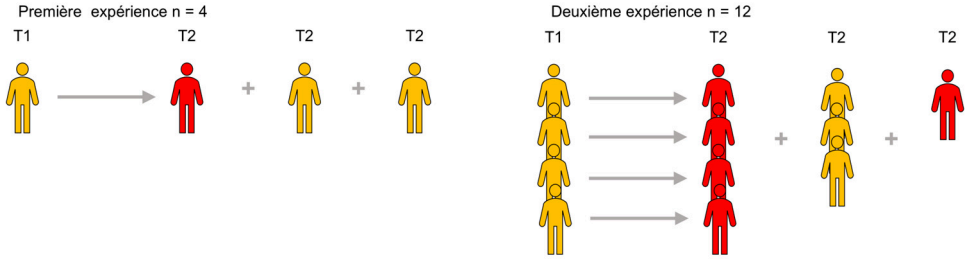


Figure résultat.2 : Design expérimental des expériences de scRNA-seq

Le design expérimental comprend deux expériences distinctes. La première a porté sur 4 échantillons : une paire d'individus suivis à deux temps (passant d'un état asymptomatique, en jaune, à symptomatique, en rouge) et deux individus asymptomatiques au temps 2 (en jaune). La seconde expérience a inclus 12 échantillons, répartis en 3 pools de 4 échantillons multiplexés chacun : quatre individus suivis à deux temps (asymptomatique, en jaune, vers symptomatique, en rouge), trois individus asymptomatiques au temps 2 (en jaune) et un individu symptomatique au temps 2 (en rouge).

V.1.3. Analyses Des Données Et Statistique

V.1.3.1. Traitement Des Données Single-Cell RNA-Seq (Alignement, Attribution Des Codes-Barres)

Les données brutes de séquençage, sous forme de fichiers BCL, ont été converties en fichiers FASTQ à l'aide de l'outil BCL2Fastq (Illumina). Cette étape permet de démultiplexer les reads en fonction des index d'échantillons et de produire des fichiers lisibles pour les analyses en aval. Les fichiers FASTQ obtenus ont ensuite été traités avec Cellranger Multi (10x Genomics), qui a permis d'aligner les reads sur le génome de référence (refdata-gex-GRCh38-2020-A / Chromium Human Transcriptome Probe Set v1.0.1 GRCh38-2020-A.csv), d'assigner les

barcodes cellulaires et de générer des matrices de comptage d'expression génique pour chaque échantillon. Ces matrices constituent la base pour l'analyse downstream des données de scRNA-seq.

V.1.3.2. Clustering Non-Supervisé

Le développement du script d'analyse a été réalisé sur un individu à deux temps (asymptomatique et symptomatique). Les données ont été analysées à l'aide d'un environment Docker basée sur la distribution rocker/tidyverse (https://github.com/rocker-org/rocker-versioned2) constitué de R 4.2.2, Seurat V4 et des logiciels divers pour l'analyse des données. Les gènes exprimés dans moins de 3 cellules et les cellules avec moins de 200 gènes ont été filtrés. Les données ont ensuite été normalisées (*NormalizeData*) par log-normalisation et centrées (*ScaleData*). Les 2000 gènes les plus variables ont été identifiés à l'aide de la méthode VST (Variance Stabilizing Transformation) (*FindVariableFeatures*) afin de réaliser l'analyse en composantes principales (*RunPCA*). La réduction de dimension a permis de générer les UMAPs (*RunUMAP*) basés sur les 30 premières composantes principales. Pour identifier les doublets cellulaires, *DoubletFinder* a été utilisé. Enfin, le clustering a été effectué à l'aide de la méthode de Louvain (*FindNeighbors* et *FindClusters*), et les gènes marqueurs ont été caractérisés pour chaque cluster en utilisant le test de Wilcoxon (*FindAllMarkers*).

En complément, nous avons utilisé le package R SciGeneX (Bavais *et al.*, 2024) pour aider au clustering et détecter des populations rares. L'identification des gènes informatifs a été réalisée en utilisant la méthode *select_genes* de SciGeneX, avec un paramètre de voisinage (k) fixé à 80 et un calcul de distance de Pearson. Les gènes informatifs ont été regroupés en modules fonctionnels à l'aide de la fonction *gene_clustering* avec la méthode *closest_neighborhood* et une inflation fixée à 1,8. Les modules résultants ont été filtrés pour une taille minimale de cluster de 4 gènes et un écart-type minimum de 0. Les gènes les plus représentatifs de chaque module ont été visualisés à l'aide de *FeaturePlot_scCustom* sur la représentation UMAP. Les scores des modules ont été calculés pour chaque cellule à l'aide de la fonction *AddModuleScore*, permettant une cartographie fonctionnelle sur l'UMAP. Pour l'analyse fonctionnelle, les modules géniques ont été enrichis pour les ontologies GO (Gene Ontology), incluant les processus biologiques, fonctions moléculaires et composants cellulaires, à l'aide de la fonction *enrich_go*.

V.1.3.3. Analyses Des Marqueurs Des Clusters Et Annotation Des Types Cellulaire

Les types cellulaires ont été identifiés en fonction de l'expression de gènes marqueurs spécifiques, permettant de classifier précisément les cellules en différents groupes. Par exemple, les monocytes CD14+ ont été identifiés par l'expression de *CD14* et *LYZ*, tandis que les monocytes CD16+ étaient caractérisés par *FCGR3A* et *MS4A7*. Les cellules T naïves CD4+ ont été distinguées par les marqueurs *CCR7*, *SELL* et *CD4*, et les cellules T régulatrices, ainsi que les sous-populations Th2 et Th17, ont été définies par l'expression combinée de *CD4*, *CCR6*, *CCR4*, *FOXP3*, *IL2RA* et *ICOS*. Les cellules T CD8+ effectrices ont été associées à *CD8A* et *GZMK*, tandis que les cellules T CD4+ cytotoxiques ont été identifiées par *CD4*, *GNLY*, *GZMB* et *GZMK*. Les cellules B matures ont été caractérisées par *MS4A1* et *CD19*, et les cellules B naïves par *MS4A1*, *TCL1A* et *FCRL1*. Les cellules NK ont été différenciées en

sous-populations CD56 dim et bright grâce aux marqueurs *NKG7*, *ITGAD*, *NCAM1* et *KLRF1*. Par ailleurs, les cellules dendritiques ont été identifiées par *CD1C* et *CST3*, les plaquettes par PF4 et PPBP, et les plasmablastes par *MZB1* et *IGHG1*. Enfin, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ont été caractérisées par *LILRA4*, *IL3RA* et *CLEC4C*. Cette annotation basée sur des marqueurs spécifiques a permis une classification rigoureuse des populations cellulaires, facilitant leur analyse fonctionnelle dans le cadre de l'étude.

V.1.3.4. Intégration, Analyse Des Gènes Exprimés Différemment (Degs) Et Enrichissement GO

Les deux jeux de données ont été intégrés à l'aide de la fonction *merge* de Seurat V4. L'analyse a été entièrement reprise selon la méthode décrite ci-dessus. Pour assurer une intégration optimale des données et réduire les biais techniques, l'outil Harmony a été utilisé afin de forcer l'intégration des deux jeux de données. Cette approche a permis de combiner efficacement les informations provenant des différents échantillons tout en tenant compte des variations inter-échantillons. Enfin, les gènes différentiellement exprimés ont été détectés à l'aide du test de Wilcoxon. Ce test non paramétrique a permis d'identifier les gènes dont l'expression varie de manière significative entre les différents clusters entre les deux temps. L'analyse d'enrichissement fonctionnel a été réalisée à l'aide de la fonction *enrichGO* du package R clusterProfiler. Nous avons utilisé les gènes différentiellement exprimés et la base de données d'annotation humaine org.Hs.eg.db, en couvrant les trois ontologies de Gene Ontology (BP, MF, CC).

V.2. Résultats

V.2.1. Obtention De Résultats Robustes Et De Haute Qualité Pour L'analyse Des Mécanismes D'infection Par *Plasmodium*

Pour explorer les mécanismes d'infection par *Plasmodium* chez les enfants atteints, nous avons concentré notre analyse sur un individu ayant présenté une évolution d'une forme asymptomatique (temps 1) vers une forme symptomatique six jours plus tard (temps 2). Les résultats du séquençage révèlent les métriques suivantes pour les échantillons analysés. Le nombre total de cellules détectées a été de 9706 cellules pour échantillon 1 (asymptomatique) et de 10569 cellules pour échantillons 2. La saturation de séquençage approche les 60% tandis que le nombre médian de gènes détectés par cellule est proche de 3000 pour les deux échantillons. Ces chiffres mettent en évidence une couverture élevée et une qualité robuste pour l'identification des transcrits au niveau cellulaire. Nous avons dans un premier temps filtré les cellules de mauvaise qualité en nous basant sur le nombre total de transcrit, le nombre de gènes exprimés, et le pourcentage d'expression des gènes mitochondriaux. À l'issue de ce processus, 9 539 cellules ont été retenues pour le temps 1 et 10 311 pour le temps 2 (Fig. résultat 3A).

Après avoir réalisé une réduction de dimension et une projection UMAP, les principaux types cellulaires ont été identifiés à l'aide de gènes marqueurs spécifiques : cellules B, monocytes, lymphocytes CD4+ et CD8+. Cependant, la présence de doublets cellulaires (mélanges de deux types cellulaires) a posé un problème d'interprétation. Par exemple, certains clusters exprimaient simultanément des marqueurs CD8 et des marqueurs de cellules B. Pour résoudre ce problème, l'outil DoubletFinder a été utilisé pour identifier et éliminer la majorité des doublets, clairement visibles dans les données (Fig. résultat 3B). Malgré cela, certains doublets ont persisté après filtration. Notamment, au temps 2, des monocytes exprimaient encore des marqueurs de cellules T, ce qui indiquait un mélange résiduel. Afin d'affiner l'élimination de ces doublets, l'outil ScigeneX a été employé pour détecter des modules de co-expression génique spécifiques. Cette analyse a permis d'identifier quatre modules distincts au sein du cluster des monocytes et des cellules dendritiques : CD14+, CD16+, pDC et cellules T. Le module 4, en particulier, présentait une signature génique caractéristique des cellules T (*IL7R*, *CD3E*, *CD3G*). Grâce à cette approche, les cellules exprimant des marqueurs à la fois de monocytes et de cellules T ont pu être précisément détectées et éliminées, réduisant ainsi les biais potentiels dans l'analyse (Fig. résultat 3C).

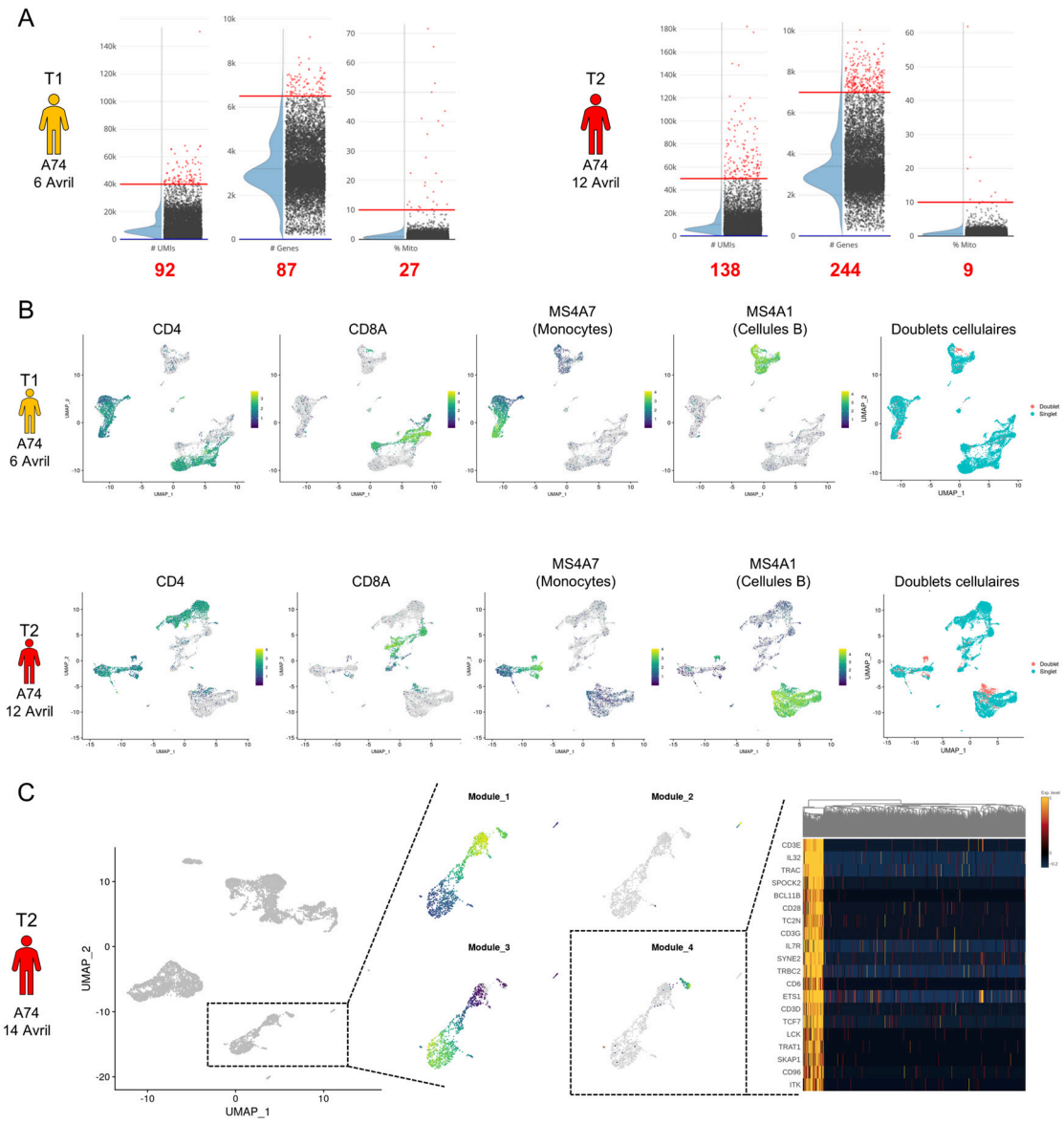


Figure résultat.3 : Stratégie de filtrage des cellules et identification des doublons

(A) Le schéma présente les différentes catégories de critères utilisés pour éliminer les cellules de mauvaise qualité. Ces critères incluent le nombre de transcrit par cellule (UMI count), le nombre de gènes détectés par cellule, le pourcentage d'ARN mitochondrial exprimé par cellule. Les chiffres en rouge indiquent le nombre de cellules éliminées après l'application des filtres pour chaque paramètre.
(B) FeaturePlot illustrant l'expression des marqueurs spécifiques des différents types cellulaires, tels que les lymphocytes T CD4, CD8, les monocytes, et les cellules B. Il montre également l'identification des doublons à l'aide de l'outil DoubletFinder, ces derniers ayant été exclus des analyses ultérieures.
(C) Une analyse approfondie a ensuite été réalisée pour identifier et éliminer les derniers doublons restants. Ceux-ci étaient principalement des monocytes présentant une signature aberrante de lymphocytes T, identifiée grâce à l'analyse de co-expression des gènes via SciGeneX. Le module **4**, en particulier, regroupe des cellules co-exprimant à la fois des marqueurs de lymphocytes T et des marqueurs de monocytes du module 1 et 3. Ces cellules ont été exclues afin d'assurer la qualité et la précision des analyses suivantes.

L'étape clé à ce stade consiste désormais à identifier les différents types cellulaires dans chaque jeu de données. Cette identification repose sur des gènes marqueurs issus de la littérature et de différentes bases de données. Pour garantir une classification fiable, les types cellulaires ont été déterminés avant l'intégration des jeux de données. Au temps 1, 19 types cellulaires ont été identifiés. Au temps 2 (symptomatique), tous les clusters sont retrouvés à l'exception des monocytes ITGAX-positifs semblent absents de ce jeu de données (Fig résultat.4A). L'outil SciGeneX a permis d'affiner l'identification des populations cellulaires. Par exemple, nous avons détecté des modules de co-expression de gènes spécifiques aux cellules B atypiques. De plus, des clusters composés de très peu de cellules, comme les pré-DC et les cDC1, ont pu être identifiés (Fig. résultat.5B).

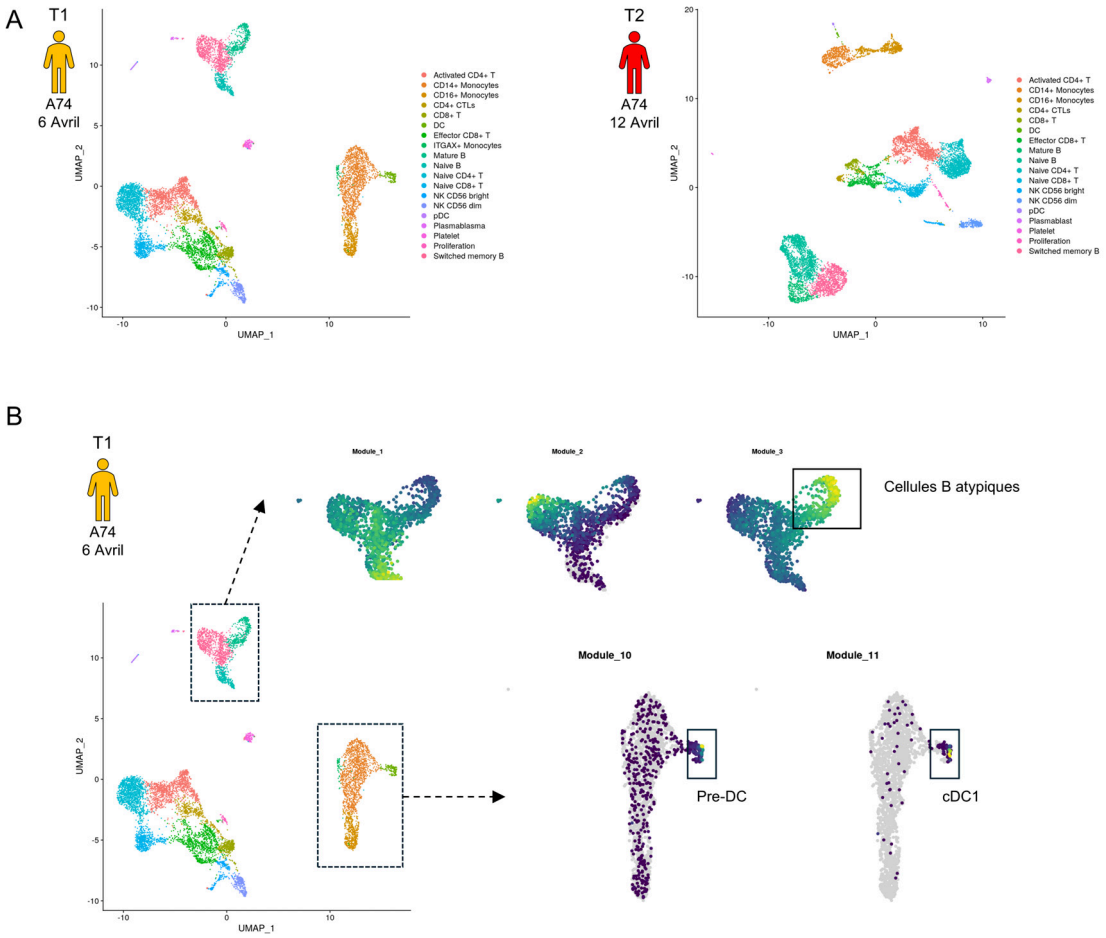


Figure résultat.4 : Analyse approfondie des types cellulaires et identification de sous-populations spécifiques

(A) Les types cellulaires ont été identifiés en utilisant une combinaison de marqueurs spécifiques identifiés par FindAllMarkers de Seurat v4, en s'appuyant sur les données de la littérature. L'analyse a permis d'identifier 19 clusters pour le premier point temporel (T1) et 18 clusters pour le second (T2). Une différence notable entre les deux jeux de données est l'absence des monocytes ITGAX-positifs dans le second jeu de données (T2).
(B) Une analyse approfondie des types cellulaires présents dans nos jeux de données a été réalisée à l'aide de l'outil SciGeneX, et a permis d'identifier des populations cellulaires spécifiques. Cette analyse a révélé la présence de populations de B atypiques, ainsi que des populations précurseurs, comme les pré-DC ou d'autres sous-populations de cellules dendritiques cDC1.

V.2.2. Réponse Différentielle Et Augmentation Des Monocytes Au Cours Des Stades De L'infection Par Plasmodium

Afin d'explorer les mécanismes cellulaires et transcriptionnels liés à la transition de l'état asymptomatique vers l'état symptomatique, une intégration des deux jeux de données a été réalisée (Fig. résultat.5).

En utilisant une simple combinaison des deux temps, nous observons globalement une bonne intégration des données, ce qui démontre une limitation de l'effet de lot dans notre jeu de données. En effet, les types cellulaires, identifiés de manière indépendante avant la fusion, se regroupent parfaitement entre eux, à l'exception des monocytes. Cette observation suggère un rôle biologique spécifique des monocytes, soulignant une réponse distincte contre le parasite entre les deux temps.

Dans l'optique d'intégrer à l'avenir plusieurs jeux de données provenant de différents patients, j'ai également réalisé une intégration forcée, sans modification profonde du jeu de données, à l'aide de la méthode Harmony, qui permet de regrouper les cellules proches. Nous avons constaté que cette homogénéisation a parfaitement fonctionné, offrant ainsi une approche robuste pouvant être utilisée si nécessaire dans nos futures analyses.

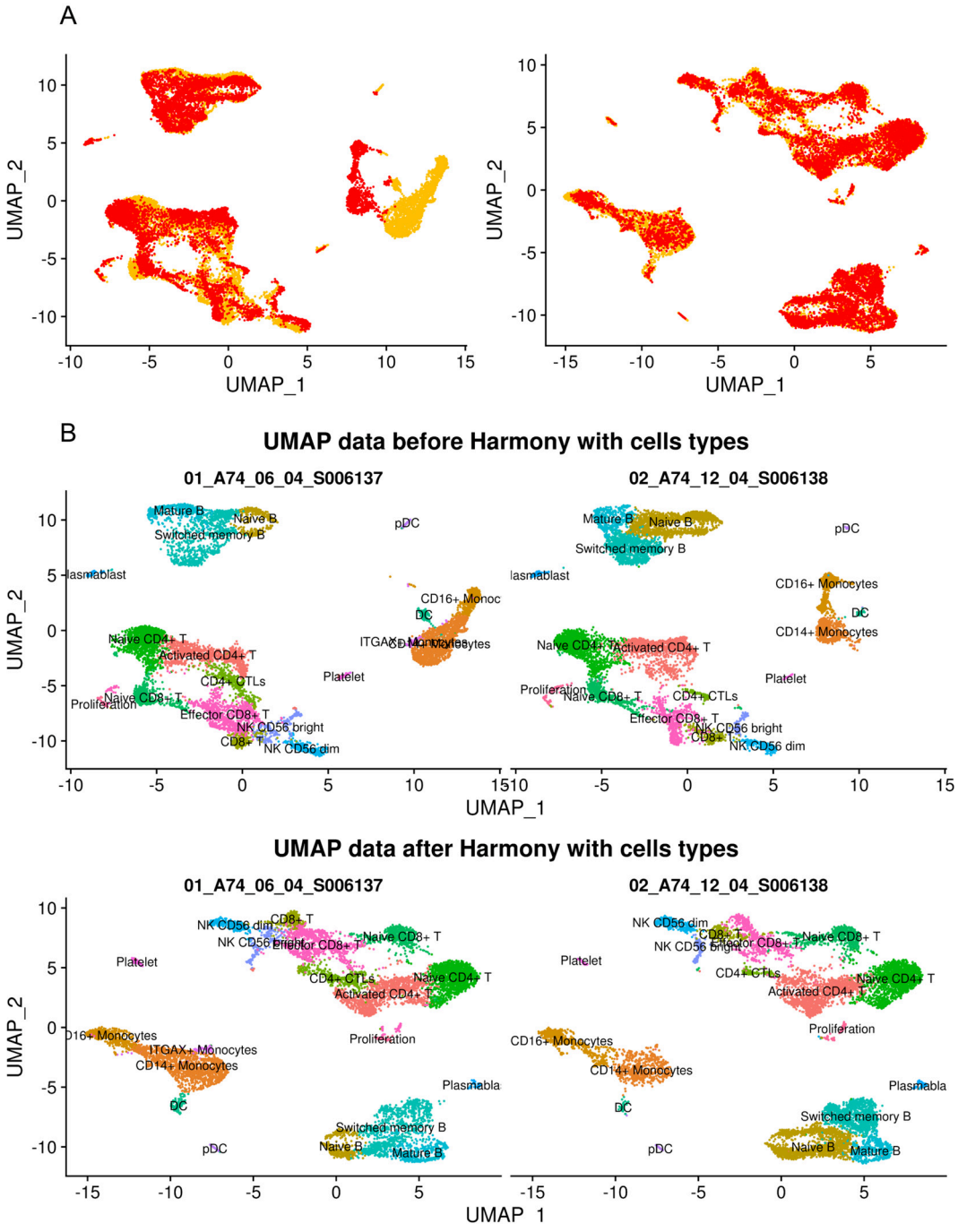


Figure résultat.5 : Intégration des jeux de données T1 et T2 du même individu et analyse de l'homogénéité cellulaire

L'intégration des jeux de données T1 (jaune - 01_A74_06_04) et T2 (rouge - 02_A74_12_04) a été réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, une simple combinaison des données a été effectuée à l'aide de l'outil *merge* de Seurat v4, permettant une première évaluation de la cohérence des données fusionnées. Ensuite, l'outil Harmony a été appliqué afin d'améliorer l'intégration et d'harmoniser les variations inter-échantillons. Avant l'application d'Harmony, l'intégration apparaissait globalement satisfaisante, mais une distinction marquée était observée au niveau des monocytes, suggérant une potentielle implication de ces cellules dans la réponse au paludisme.

Après cette étape, l'analyse révèle une variation du pourcentage de cellules, notamment au niveau des monocytes et des cellules B (Fig. résultat.6A). L'analyse des gènes différentiellement exprimés suggère des dérégulations significatives entre différentes conditions. En particulier, nous avons observé des différences marquées dans les populations de monocytes entre le temps symptomatique et le temps asymptomatique (Fig. résultat.6B). L'analyse d'enrichissement des gènes différentiellement exprimés a révélé l'implication de certaines voies métaboliques. Parmi celles-ci, on observe une régulation positive de la production de cytokines et une réponse inflammatoire accrue. De manière plus spécifique, chez les monocytes CD16+, une réponse immunitaire dirigée contre les protozoaires est particulièrement enrichie en gènes différentiellement exprimés (Fig. résultat.6B). Cela s'aligne avec le rôle des monocytes dans la défense contre le parasite du paludisme. Ces résultats suggèrent que la réponse immunitaire des monocytes varie selon le stade de l'infection, ce qui met en évidence leur rôle crucial dans la défense contre le parasite, bien que ce rôle reste à confirmer.

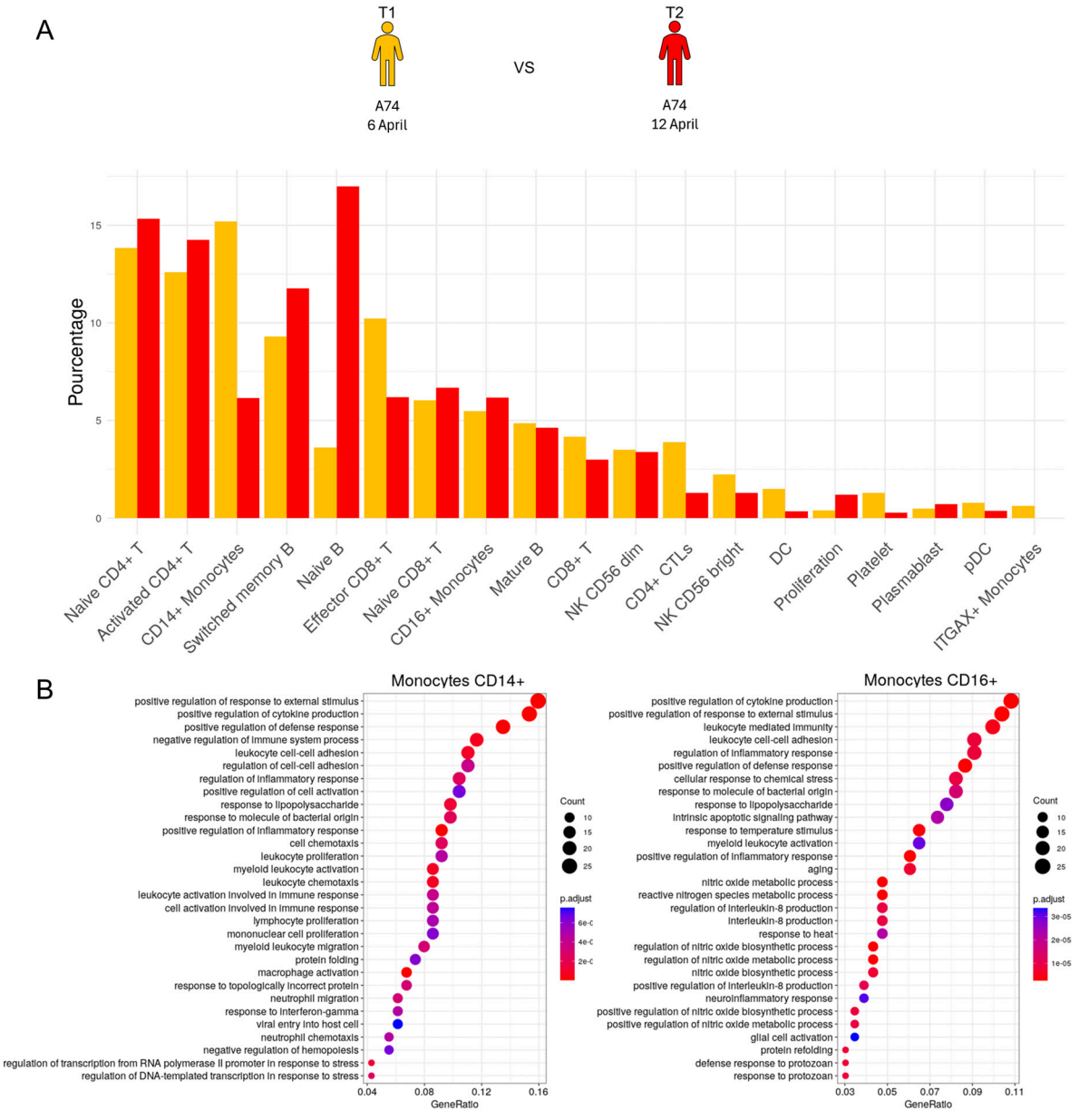


Figure résultat.6 : Analyse comparative des profils cellulaires et transcriptionnels entre états asymptomatique et symptomatique du paludisme

(A) La figure montre la répartition des cellules dans les deux groupes d'échantillons : asymptomatique et symptomatique. Une différence marquée de proportions est observée, en particulier pour les monocytes et les cellules B naïves, suggérant une possible implication de ces populations dans la réponse immunitaire au paludisme.
(B) Les résultats de l'analyse d'enrichissement des termes Gene Ontology (GO) pour les gènes différentiellement exprimés dans les monocytes CD14, CD16, indiquent une activation des voies inflammatoires. De plus, des voies spécifiques aux monocytes CD16, telles que la défense contre les protozoaires, apparaissent significativement enrichies, mettant en lumière des mécanismes immunitaires potentiellement liés à l'infection palustre.

V.3. Discussion

Cette étude met en évidence des changements cellulaires et transcriptionnels significatifs entre les états asymptomatique et symptomatique d'un individu infecté par *Plasmodium falciparum*. Après filtration et élimination des cellules de mauvaise qualité et des doublets, l'analyse des données scRNA-seq a révélé des variations notables dans les populations de monocytes et de cellules B. Les monocytes CD16+ ont montré une régulation accrue de la production de cytokines et une réponse inflammatoire dirigée contre les protozoaires, soulignant leur rôle central dans l'immunité antiparasitaire. Ces résultats suggèrent que les monocytes adaptent leur réponse immunitaire en fonction du stade de l'infection, offrant de nouvelles perspectives sur les mécanismes de résistance et de progression du paludisme.

Tout d'abord, nous avons réalisé des analyses de Single Cell RNA-Seq sur cellules fixées, une technologie développée par 10x Genomics, et avons, pour la première fois au laboratoire, optimisé ce protocole afin d'en améliorer l'efficacité et la reproductibilité. Une alternative à cette approche a été envisagée en utilisant des noyaux isolés à partir de PBMCs. Cependant, cette méthode présente une limitation majeure, car elle ne permet d'analyser que les gènes présents dans le noyau, entraînant ainsi une perte significative d'informations sur les transcrits cytosoliques. Néanmoins, l'optimisation de l'isolation des noyaux à partir des PBMCs ouvre de nouvelles perspectives, notamment pour des analyses multi-omiques, en permettant le couplage du scRNA-Seq avec le scATAC-Seq, afin d'étudier simultanément la transcription et l'accessibilité de la chromatine.

Le scRNA-seq sur cellules fixées représente une avancée majeure, car la fixation des cellules permet de préserver le transcriptome de la dégradation. En effet, la méthode nécessite une bonne viabilité cellulaire, qui peut diminuer si le temps de manipulation est trop long, entraînant des modifications du transcriptome et introduisant ainsi des biais dans les résultats. Bien que des techniques de tri, comme celles développées par Miltenyi, permettent d'éliminer les cellules mortes, elles comportent le risque de perdre les cellules les plus fragiles, telles que les monocytes, et exigent un temps expérimental plus long. De plus, le scRNA-seq sur cellules fixées facilite le multiplexage d'échantillons en les fixant en amont permettant ainsi de traiter davantage d'échantillons en parallèle lors de la réalisation du scRNA-seq sans les altérer. Ceci optimise les coûts en exploitant pleinement les capacités des puces du Chromium X/Xi de 10x Genomics.

Par ailleurs, les échantillons sont désormais multiplexés à l'aide de sondes spécifiques, remplaçant la méthode initiale basée sur des anticorps avec la technique HTO (Hashtag Oligonucleotide). La méthode HTO présente une limitation majeure : elle repose sur une connaissance préalable des protéines de surface exprimées par les cellules. Pour surmonter cette contrainte, 10x Genomics a introduit la technologie CellPlex, qui utilise des sondes ciblant directement les ARN transcrits pour le multiplexage, offrant ainsi une plus grande flexibilité et une meilleure standardisation des analyses. De plus, dans les premières approches de scRNA-seq, il n'existait pas de méthodes efficaces pour éliminer les ARN ribosomiques, contrairement au RNA-seq classique qui utilisait couramment la ribodéplétion. Désormais, la technique basée sur des sondes permet l'élimination de gènes ribosomaux, ce qui constitue un avantage. Leur suppression permet d'optimiser l'espace disponible sur la puce de séquençage, augmentant ainsi la profondeur de lecture et la détection de transcrits d'intérêt. Cependant, cette technologie présente une limite, elle est tributaire des sondes disponibles, et à ce jour, aucune d'entre elles ne cible les gènes du CMH (HLA), pourtant essentiels dans l'étude du paludisme. On estime qu'environ 1 000 gènes sont concernés par cette limitation mais les informations ne sont pas clairement disponibles. Enfin, cette approche permet d'obtenir un nombre important de cellules analysées, pouvant atteindre jusqu'à 10 000 cellules par échantillon, ce que nous avons pu observer dans nos propres expériences. Cependant, une avancée récente réalisée par 10x Genomics avec la technologie GEM-X Flex permet désormais d'analyser jusqu'à 20 000 cellules par échantillon, tout en offrant la possibilité de coupler l'analyse transcriptomique avec la protéomique grâce aux sondes TotalSeq-C de BioLegend.

Nos résultats montrent que les données générées sont d'excellente qualité, tant en termes de séquençage que de taux d'encapsidation. Bien que les résultats ne soient pas présentés ici, les données obtenues sur les 16 échantillons sont très satisfaisantes, avec un nombre de cellules proche de 10 000 par échantillon. De plus, la viabilité cellulaire, évaluée sur la base des pourcentages de gènes mitochondriaux, confirme que la technologie Next GEM Flex fournit des résultats fiables et reproductibles.

Pour analyser les résultats de manière reproductible, J'ai développé un pipeline complet pour l'analyse des données de scRNA-Seq. Cela inclut le prétraitement des données, l'élimination des doublets cellulaires et l'intégration de plusieurs jeux de données. À ce stade, une différence a été identifiée au niveau des monocytes, tant en termes de proportion cellulaire que de profils transcriptionnels.

Cependant, ces résultats restent préliminaires, étant basés sur l'analyse d'un seul individu à deux moments distincts. Il est donc essentiel de reproduire ces observations sur un échantillon plus large et d'approfondir notre compréhension. Pour cela, des outils tels que SciGeneX seront cruciaux pour mieux caractériser les sous-types cellulaires, les signatures géniques et les modules de co-expression. Cela nous permettra de mieux saisir le rôle précis des monocytes dans le cadre de notre étude.

Les monocytes jouent un rôle central dans l'immunité contre *Plasmodium*, notamment par leur capacité à phagocyter les globules rouges infectés et les mérozoïtes. Cette activité est facilitée par des récepteurs tels que CD36 et FcγR, qui permettent à la fois la phagocytose dépendante des anticorps ou non. Les monocytes contribuent également à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-6, essentielles pour contrôler la charge parasitaire. Cependant, une réponse excessive peut entraîner des complications sévères telles que l'anémie ou le neuropaludisme, mettant en évidence le double rôle des monocytes comme médiateurs de protection et de pathogénicité.

Les différentes sous-populations de monocytes apportent des réponses diversifiées face à l'infection. Les monocytes classiques (CD14++CD16–), qui représentent la majorité des monocytes circulants, sont particulièrement efficaces pour produire des cytokines inflammatoires et pour initier des réponses adaptatives en se différenciant en macrophages. À l'inverse, les monocytes intermédiaires (CD14++CD16+) apparaissent comme les meilleurs candidats pour phagocyter les globules rouges infectés et pour assurer la présentation antigénique via le CMH-II. Enfin, les monocytes non classiques (CD14+CD16++) sont impliqués dans la surveillance endothéliale et la réparation tissulaire, mais leur contribution spécifique à la pathogénèse ou au contrôle du parasite reste débattue. Ces observations soulignent l'importance de la diversité fonctionnelle des monocytes dans l'évolution de la maladie.

Les résultats d'une étude sur les monocytes dans le contexte de la vasculopathie associée à *STING* (SAVI) apportent des éclairages complémentaires sur leur rôle dans l'immunité (de Cevins *et al.*, 2023). Un sous-cluster spécifique de monocytes, a été identifié, avec une expression élevée de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6, CCL3, et CCL4, ainsi qu'une activation marquée de la réponse de stress intégré (ISR). Ces monocytes présentent des perturbations transcriptionnelles significatives, incluant l'activation des voies liées à l'inflammation et au stress cellulaire. Ces mécanismes pourraient éclairer certains aspects de la réponse des monocytes dans le paludisme. Par exemple, l'hyperactivation des monocytes observée dans le SAVI, qui favorise la production excessive de cytokines pro-inflammatoires, reflète des processus similaires dans le paludisme sévère. Cette hyperactivation pourrait contribuer à des complications systémiques comme l'anémie et le neuropaludisme, en amplifiant l'inflammation endothéliale et en favorisant la séquestration.

En conclusion, nos résultats mettent en évidence le rôle clé des monocytes dans la réponse au paludisme et ouvrent des perspectives pour mieux comprendre les mécanismes impliqués. Il est essentiel de poursuivre les recherches afin d'identifier les processus sous-jacents, entre les individus symptomatiques et asymptomatiques mais aussi en explorant les infections asymptomatiques chroniques. Comprendre pourquoi certains individus éliminent le parasite tandis que d'autres deviennent porteurs chroniques pourrait permettre de développer des stratégies de traitement adaptées. De plus, l'analyse des premières étapes de l'infection pourrait révéler des biomarqueurs prédictifs de l'évolution clinique, offrant ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques pour prévenir les formes graves du paludisme.

Discussion

Les travaux présentés dans cette thèse apportent une contribution significative à la compréhension des mécanismes génétiques impliqués dans la susceptibilité au paludisme. En s'appuyant sur les résultats des données d'association pangénomique et de l'analyse de loci candidats, j'ai développé une stratégie dans le but d'identifier plusieurs variants causaux. Cette stratégie innovante s'articule autour de plusieurs étapes clés (Fig. 40) : l'identification et la priorisation des variants candidats au sein d'un locus spécifique grâce à une approche de bioinformatique intégrative, la validation expérimentale de l'effet régulateur des meilleurs candidats, et l'évaluation de leur association avec des phénotypes liés aux formes cliniques du paludisme. Ainsi, ma méthode se distingue par son caractère intégratif et ciblé, combinant des outils de bioinformatique avancés et des validations expérimentales rigoureuses. Elle permet non seulement d'identifier des variants causaux avec une grande précision, mais aussi de mettre en évidence des effets fonctionnels spécifiques à des types cellulaires précis, ce qui constitue une avancée majeure dans l'étude des mécanismes génétiques des maladies complexes. Cette approche se positionne comme une stratégie puissante pour élucider les bases génétiques impliquées dans la résistance ou la susceptibilité au paludisme. Nous sommes fermement convaincus qu'en élargissant cette approche à d'autres pathologies, elle pourrait améliorer notre compréhension des bases génétiques et ouvrir des perspectives inédites en médecine personnalisée. De plus, l'intégration future de données multi-omiques, combinée à l'utilisation d'algorithmes d'apprentissage automatique qui commence à être développé (Xu *et al.*, 2020; Meng, Xiao and Deng, 2021; Wang and Chen, 2022), permettra non seulement d'accroître la robustesse de cette stratégie, mais également d'en étendre les applications, consolidant ainsi son rôle central dans l'élucidation des mécanismes complexes à l'origine de diverses maladies humaines.

Après avoir élaboré et mis en œuvre cette stratégie intégrative, nous avons identifié des variants dont l'effet régulateur résulte de la combinaison de plusieurs variants, soit physiquement proches et formant un haplotype, soit localisés dans des gènes distincts d'un même locus. Nous avons également mis en évidence l'interaction de plusieurs variants situés sur différents chromosomes, jouant un rôle clé dans la régulation d'une même fonction biologique. Nos travaux illustrent la complexité des mécanismes de régulation, à la fois au niveau moléculaire et cellulaire dans un contexte physiopathologique.

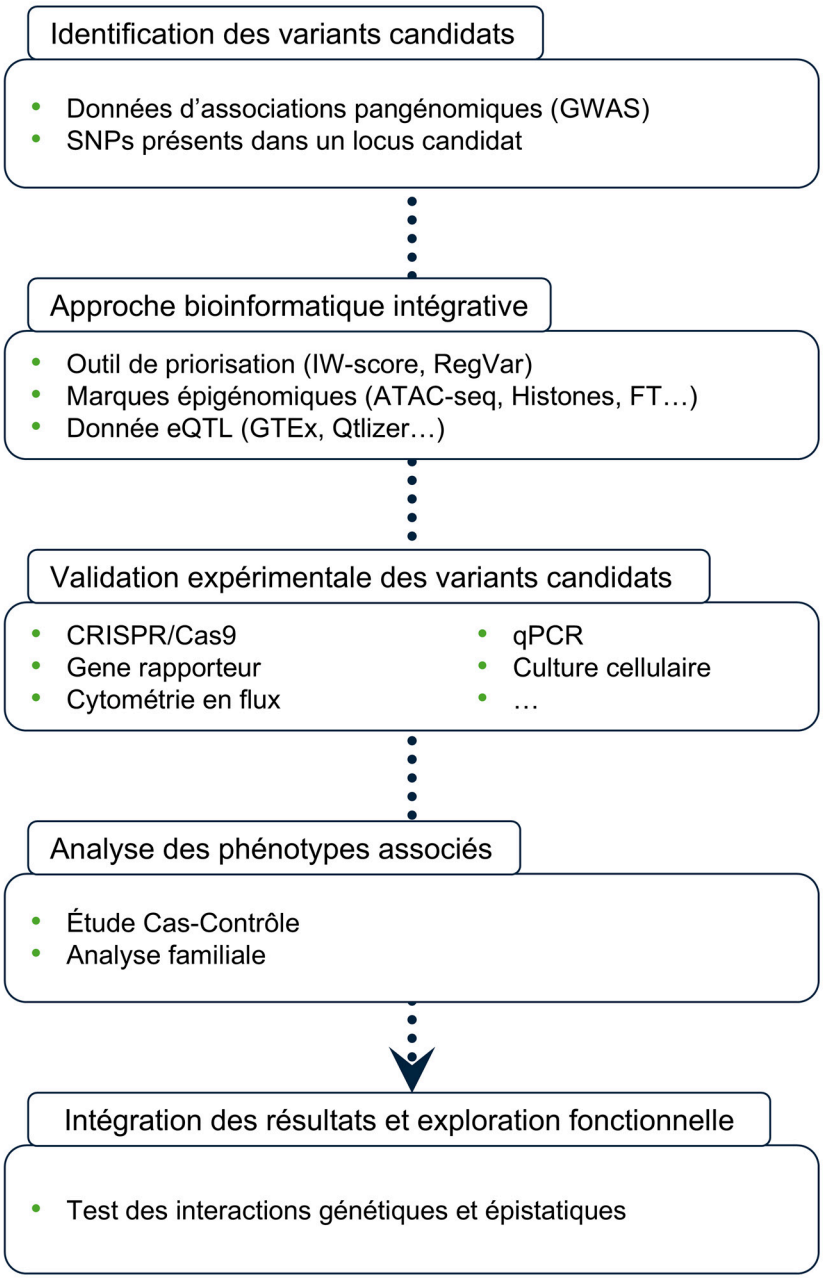


Figure 40 : stratégie d'analyse développée au cours de ma thèse

La stratégie commence par l'identification et la priorisation des variants candidats dans un locus spécifique, grâce à une analyse bioinformatique intégrative qui combine des données pangénomiques et des analyses ciblées. Ensuite, les meilleurs candidats sont soumis à une validation expérimentale pour évaluer leur potentiel effet régulateur sur l'expression génique. Enfin, leur association avec des phénotypes cliniques du paludisme est examinée pour établir leur rôle dans la susceptibilité ou la résistance à la maladie. Enfin, une dernière étape consiste à évaluer les interactions génétiques et fonctionnelles.

I. Identification D'un Variant Causal Influençant L'immunité Médiée Par Les Récepteurs Fc Gamma Des IgGs Dans Le Contexte Du Paludisme

En premier lieu, le variant rs1771575, que nous avons identifié, est un eQTL spécifique des monocytes, des neutrophiles et des cellules dendritiques révélant que le génotype mineur est significativement associé à une plus grande expression des récepteurs inhibiteurs *FCGR2B* et activateurs *FCGR2A*, *FCGR2C*, et *FCGR3A*. Ce SNP est localisé dans une région ouverte de la chromatine avec des marques histone activatrice H3K4me1 et coïncide avec des sites de liaison de facteurs, tels que CTCF, suggérant un rôle du variant dans la régulation de la structure de la chromatine au sein du cluster *FCGR*. Ces résultats suggèrent que ce variant peut influencer les interactions enhancer-promoteur via la modification des domaines d'interactions, favorisant l'activation coordonnée et spécifique de l'expression des gènes *FCGR* ciblés, contribuant à une réponse immunitaire efficace. Des études dans des loci spécifiques ont montré que l'élimination des protéines impliquées dans la régulation de l'architecture 3D du génome, telles que CTCF et la cohésine, a un impact sur la structure 3D de la chromatine (Hsieh *et al.*, 2022). Ceci soulève la question de savoir comment le variant modifie les interactions promoter-enhancer dans un domaine d'interaction avec un contexte cellule spécifique. Une hypothèse, est que ce processus est médié par des facteurs coopérants, qui sont souvent exprimés d'une manière spécifique au type cellulaire, suivi par le recrutement de co-modulateur généraux et de modificateurs de la chromatine médié par les facteurs de transcription. Cette hypothèse peut nous laisser penser que le variant ne modifie pas uniquement le site de fixation du CTCF mais déstabilise tout un complexe protéique conduisant à une modification des domaines d'interaction et augmentant l'expression de récepteurs activateurs et inhibiteur du locus *FCGR.* La Figure 41 illustre ce mécanisme pour les gènes *FCGR3A* et *FCGR2B*. De plus, le variant rs1771575 semble favoriser la production d'IgG2, déjà associée à une meilleure protection contre la parasitémie (Aucan *et al.*, 2000). Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer comment le variant rs1771575 agit au niveau cellulaire. En effet, le variant augmente l'expression de *FCGR2B*, un récepteur inhibiteur, ce qui pourrait réduire la réponse immune contre le *Plasmodium*.

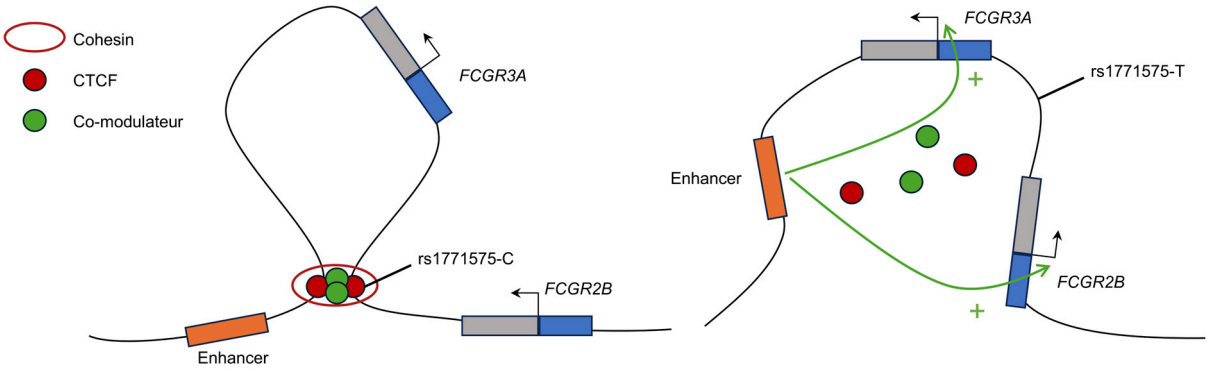


Figure 41 : modèle de régulation des gènes FCGR2B/3A par le variant structural rs1771575

En présence de l'allèle C du rs1771575, le complexe CTCF-Cohésine, médié par des co-modulateurs, est recruté et isole les gènes *FCGRs* de la régulation externe, telle que celle des enhancers (en orange). En revanche, en présence de l'allèle T du rs1771575, le complexe est perturbé, permettant l'amplification de l'activité promotrice (en bleu) par les enhancers.

Cependant, nous savons que les mécanismes de régulation ne se limitent pas à un seul variant, et que des haplotypes peuvent exister, où plusieurs variants agissent de concert plutôt qu'indépendamment. Des études ont notamment examiné ces interactions génétiques, mettant en évidence des synergies potentielles entre des variants au sein du cluster *FCGR*. Parmi elles, l'une a démontré que quatre combinaisons spécifiques de variants situés dans les gènes *FCGR2A*, *FCGR3A* et *FCGR3B* étaient associées à un risque accru d'infection palustre (Fall *et al.*, 2020). En revanche, lorsque ces variants étaient considérés individuellement, seul le variant de *FCGR3A* montrait une association significative avec le risque d'infection. Ce résultat met en évidence l'importance de considérer les interactions génétiques dans leur ensemble, car elles peuvent offrir une meilleure compréhension des mécanismes biologiques et des risques associés à des maladies complexes comme le paludisme.

II. Identification De Variants Régulateurs Du Gène *ARL14* Et Leur Potentiel Impact Sur La Réponse Immunitaire A L'infection Palustre

Il est essentiel de prendre en considération ces interactions génétiques dans nos analyses, et ne pas se limiter à l'analyse individuelle des SNPs, afin de mieux comprendre leur rôle dans la modulation des mécanismes biologiques. En effet, la combinaison de plusieurs SNPs au sein d'un même locus, comme le cluster *FCGR*, démontre comment les haplotypes peuvent interagir de manière synergique pour moduler des mécanismes physiopathologiques. Cette approche holistique devient d'autant plus essentielle lorsque l'on considère les limites des méthodes classiques, telles que les analyses eQTL, qui se basent principalement sur une approche variant unique, risquant ainsi de négliger l'effet d'haplotypes coopératifs susceptibles de modifier l'expression génique, même si aujourd'hui les premières études haplotypiques apparaissent (Al Bkhetan *et al.*, 2021; Ehsan *et al.*, 2024). De plus, ces analyses eQTL

reposent généralement sur des données provenant de populations occidentales, ce qui limite leur capacité à détecter des variants communs en Afrique mais rares en Europe. Ces limites sont illustrées par l'exemple du gène *ARL14*, où les analyses traditionnelles n'ont pas permis de mettre en évidence les SNPs rs116525449 et rs79644959 comme des variants eQTLs. Mais grâce à notre approche, nous avons pu contourner ces obstacles, démontrant ainsi l'intérêt d'une stratégie intégrative pour explorer les mécanismes régulateurs complexes qui échappent aux méthodes eQTL classiques.

Ainsi, nous avons réalisé des analyses en intégrant les deux SNPs, d'autant qu'ils sont en déséquilibre de liaison complet. Analyser ces variants de manière indépendante n'aurait pas été pertinent, ne reflétant pas la réalité génétique des populations africaines, dans lesquelles uniquement deux haplotypes existent. Cette approche nous a permis de démontrer le rôle régulateur des variants rs116525449 et rs79644959, bien qu'ils n'aient pas été identifiés comme eQTLs, même dans des cohortes de grande envergure telles que le consortium GTEx, comprenant des centaines d'individus. Notre stratégie est également renforcée par des résultats génétiques solides. En effet, les analyses basées sur une régression logistique ont révélé que l'association entre le paludisme sévère et le tagSNP rs116423146 était expliquée par les variants rs116525449 et rs79644959, suggérant leur rôle causal. Les individus hétérozygotes pour ces SNPs présentent une diminution du risque de développer des formes graves de paludisme, avec un odd ratio supérieur à 2. Les deux SNPs régulateurs identifiés dans le promoteur du gène *ARL14*, une GTPase essentielle au transport des complexes du CMH de classe II dans les cellules dendritiques, ont démontré un rôle spécifique dans la modulation de l'expression de ce gène dans les cellules myéloïdes. Cette spécificité s'explique par la présence de facteurs de transcription spécifiques à ces types cellulaires, soutenant ainsi notre hypothèse initiale d'un rôle cellule spécifique des variants via l'expression de facteur de transcription. Pour expliquer le résultat de la protection des individus hétérozygotes, nous proposons qu'une augmentation modérée de l'expression d'*ARL14* améliore la présentation des antigènes du parasite aux lymphocytes T, renforçant ainsi la réponse immunitaire. En revanche, une expression excessive, potentiellement présente chez les homozygotes pour les allèles mineurs, pourrait entraîner une suractivation des lymphocytes T, conduisant à des effets délétères. Cette hypothèse justifie pourquoi la protection conférée par ces SNPs est limitée aux individus hétérozygotes et met en lumière la fine balance nécessaire dans la régulation de l'expression d'*ARL14*. Par ailleurs, il est intéressant de noter que nos résultats s'alignent sur des observations précédentes montrant que l'avantage hétérozygote est souvent sous-estimé dans les GWAS (Akoth, Odhiambo and Omolo, 2023). Cette sous-estimation, due à la réduction de puissance des tests alléliques en conditions d'hétérosis, pourrait également expliquer les difficultés à répliquer l'association d'*ARL14* dans plusieurs GWAS. Ainsi, nos résultats confirment l'efficacité et la pertinence de notre approche pour surmonter les limites des méthodes traditionnelles et identifier des SNPs causaux dans le cadre de maladies complexes.

Cependant, nos découvertes ne s'arrêtent pas là. La région promotrice du gène *ARL14* présente une particularité remarquable : elle agit non seulement comme un promoteur, mais également comme un enhancer, formant un élément appelé "Epromoteur". Ce double rôle ajoute un niveau supplémentaire de complexité dans la régulation de l'expression génique. Bien que nous n'ayons pas pu démontrer un effet direct de nos SNPs sur l'activité enhancer de cette région, il est plausible que d'autres variants présents dans cette région influencent spécifiquement cette fonction enhancer.

Cette hypothèse est soutenue par des études montrant que les variants régulateurs situés dans des Epromoteurs sont fréquemment associés à un plus grand nombre de maladies et de caractéristiques physiologiques que les promoteurs classiques (Malfait, Wan and Spicuglia, 2023; Wan *et al.*, 2024). Ces observations élargissent notre compréhension des mécanismes transcriptionnels en montrant que les variants ne se limitent pas à moduler indépendamment les activités de promoteur, d'enhancer ou d'insulateur. Dans le cas des Epromoteurs, ils peuvent simultanément impacter les fonctions promotrices et amplificatrices, ajoutant un niveau de régulation inédit à prendre en compte. Nous avons d'ailleurs démontré ce principe dans une autre région Epromotrice, celle du gène *ATP2B4*, où un haplotype de cinq SNPs joue un rôle clé.

III. Effet Régulateur Médié Par L'interaction De Plusieurs Variants En Cis Ou En Trans Dans Les Globules Rouges Et Les Lymphocytes T

Pour rappel, l'analyse réalisée précédemment au sein de notre laboratoire, a permis d'identifier une région régulatrice contenant cinq SNPs fonctionnels dans le gène *ATP2B4* (rs11240734, rs1541252, rs1541253, rs1541254, et rs1541255) associés au paludisme sévère dans une population sénégalaise (Nisar *et al.*, 2022). Contrairement au cas d'*ARL14*, où les variants sont en complet déséquilibre de liaison, les cinq SNPs, en fort déséquilibre de liaison, forment plusieurs haplotypes distincts, dont deux prédominants : le majeur (TCCGA) et le mineur (CTTCG). Ce qui est particulièrement frappant, c'est que nous avons démontré que l'effet régulateur d'un haplotype est supérieur à celui des SNPs considérés individuellement. L'haplotype majeur entraîne une diminution significative de l'effet promoteur, bien plus forte que celle observée lorsque les SNPs sont analysés individuellement (Nisar *et al.*, 2022). De manière surprenante, cette régulation de l'activité promotrice est inversement corrélée à l'activité enhancer. L'haplotype majeur conduit ainsi à une augmentation de l'effet enhancer (Nisar *et al.*, 2022). *ATP2B4* jouent un rôle clé dans la modulation de l'homéostasie calcique à travers plusieurs types cellulaires, dont les globules rouges, essentiels à l'invasion et la multiplication de *Plasmodium falciparum*. L'haplotype de mineur de l'Epromoteur perturbe la réinvasion parasitaire et la multiplication du parasite en diminuant l'expression de PMCA4, augmentant la concentration calcique, réduisant ainsi la parasitémie. Ces résultats soulignent non seulement la complexité des éléments régulateurs, mais également l'importance d'étudier les haplotypes en tant qu'unités fonctionnelles pour mieux comprendre les mécanismes transcriptionnels afin d'en élucider les mécanismes biologiques associés.

En approfondissant nos analyses, nous avons découvert que ce que nous pensions être un Epromoteur au locus *ATP2B4* est en réalité bien plus. Ce nouvel élément cis-régulateur, que nous avons nommé "ESpromoter," possède une double fonction transcriptionnelle inédite. Dans un même type cellulaire, il agit à la fois comme amplificateur et comme répresseur, modulant non seulement l'expression d'*ATP2B4* mais aussi celle de *LAX1*. A notre connaissance, aucun élément cis-régulateur présentant une double fonction simultanée d'enhancer et de silencer dans un même type cellulaire n'a été clairement décrit et expliqué chez l'homme, bien que des observations fragmentaires aient été rapportées. Tout d'abord, certains éléments régulateurs ayant une double fonction, capables d'agir comme activateur ou répresseur selon le type de tissu ou le contexte cellulaire, ont été identifiés chez la drosophile

(Gisselbrecht *et al.*, 2020), chez la souris (Kehayova *et al.*, 2011), et chez l'homme (Huang and Ovcharenko, 2022), mais ces fonctions ne se manifestent jamais simultanément dans un même type cellulaire. De plus, une étude a identifié un élément régulateur qui pourrait avoir les mêmes fonctions que notre ESpromoteur, en effet la suppression d'un Epromoteur de *TAGLN2* semble modifier l'expression de plusieurs gènes : une réduction significative de *PIGM* et *PEA15* et une augmentation de *DUSP23* (Dao *et al.*, 2017). Cependant, les auteurs n'ont pas porté plus d'attention à ce résultat. Ainsi, nos résultats marquent une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes régulateurs en identifiant un élément cis-régulateur inédit, un ESpromoter, capable d'agir simultanément comme amplificateur et répresseur transcriptionnel dans un même type cellulaire, mettant en lumière sa capacité unique à orchestrer des réponses transcriptionnelles complexes dans un contexte cellulaire spécifique.

Toutefois, nos analyses ont montré que l'effet répresseur sur le gène *LAX1* est indépendant de l'haplotype, majeur ou mineur, du ESpromoter. *LAX1* est un gène particulièrement intéressant dans le contexte du paludisme, en raison de son rôle clé en tant que régulateur négatif de l'activation lymphocytaire. Motivés par cette observation, nous avons appliqué notre stratégie d'analyse à ce gène, ce qui nous a permis d'identifier un SNP impliqué dans sa régulation. Nous avons identifié un variant, le rs11240391 localisé dans le promoteur de *LAX1*, qui influence directement l'expression de ce gène et qui est associé au paludisme sévère. Ce variant est également indétectable par les approches GWAS traditionnelles, en raison de l'absence de déséquilibre de liaison avec d'autres SNPs dans les populations africaines et du fait qu'il n'est pas génotypé directement dans les études classiques d'association pangénomique, soulignant les limites des méthodes conventionnelles. Nos analyses ont révélé que ce variant altère la liaison des facteurs de transcription FOS:JUN (AP-1), modulant ainsi l'expression de *LAX1*. Plus précisément, l'allèle mineur G de rs11240391 est associé à une diminution de l'expression de *LAX1*, corrélée à un risque accru de développer des formes graves de paludisme. Une expression réduite de *LAX1* pourrait favoriser une hyperactivation des lymphocytes T, exacerbant les symptômes cliniques. En effet, nos travaux ont montré qu'en présence de l'allèle G, une hyperactivation des lymphocytes T humains est observée, corroborée par des études antérieures démontrant une augmentation des flux calciques dans des modèles murins déficients en *LAX1* (Zhu *et al.*, 2005).

Bien que nos premières analyses aient montré un effet régulateur répresseur indépendant des haplotypes sur l'expression de *LAX1* via le ESpromoteur, en présence du variant rs11240391, cet effet répresseur est modulé suggérant une interaction épistatique. Nos résultats indiquent que la fonction répressive de l'ESpromoter est significativement amplifiée en présence de l'allèle mineur G pour rs11240391, combiné à l'haplotype mineur du ESpromoter. De plus, nous avons découvert une interaction génétique où les individus porteurs des deux génotypes protecteurs présentent une protection accrue par rapport aux variants pris séparément. Par ailleurs, les résultats d'interaction génétique apportent des informations supplémentaires afin de comprendre en partie l'interprétation de l'effet épistatique observé. Dans ce contexte, l'épistasie désigne une interaction entre plusieurs variants génétiques où l'effet d'un variant sur l'expression d'un gène dépend de la présence ou de l'absence d'un autre variant. Ici, l'haplotype associé à l'expression la plus basse de *LAX1*, qui représente 6,25 % des individus ayant une forme grave, n'est pas celui associé au risque le plus élevé de paludisme. Une hypothèse est que la suractivation des lymphocytes T induite par la diminution de l'expression de *LAX1* pourrait atteindre un plateau au-delà duquel elle n'augmente plus significativement ou que l'expression de *LAX1* impacte de manière indirecte la concentration en calcium (Zhu *et al.*, 2005). En effet, la concentration intracellulaire de calcium, qui est plus élevée lorsque

ATP2B4 est moins exprimé, joue un rôle central dans l'activation des lymphocytes T mais également dans la susceptibilité au paludisme pouvant ainsi expliquer les résultats génétiques. L'haplotype mineur est associé à une diminution du risque de développer des formes graves de paludisme, en inhibant la réinvasion du parasite. Ainsi, l'haplotype mineur, couplé à l'allèle G, peut induire une suractivation des lymphocytes T, mais cette activation est compensée par une réduction de la parasitémie grâce à l'augmentation de la concentration de calcium dans les globules rouges, offrant ainsi une forme de protection intermédiaire, même avec une expression plus faible de *LAX1*. À l'opposé, l'haplotype majeur favorisant une parasitémie plus élevée, couplé avec l'allèle G conduit à une diminution de l'expression de *LAX1*, restant cependant moins marquée que dans le cas de l'haplotype mineur conduit aussi à une suractivation des lymphocytes T. Ainsi, la combinaison de la suractivation des lymphocytes T et de l'élévation de la parasitémie représente le profil le plus à risque, ce que nos résultats d'interaction génétique confirment clairement (Fig. 42)

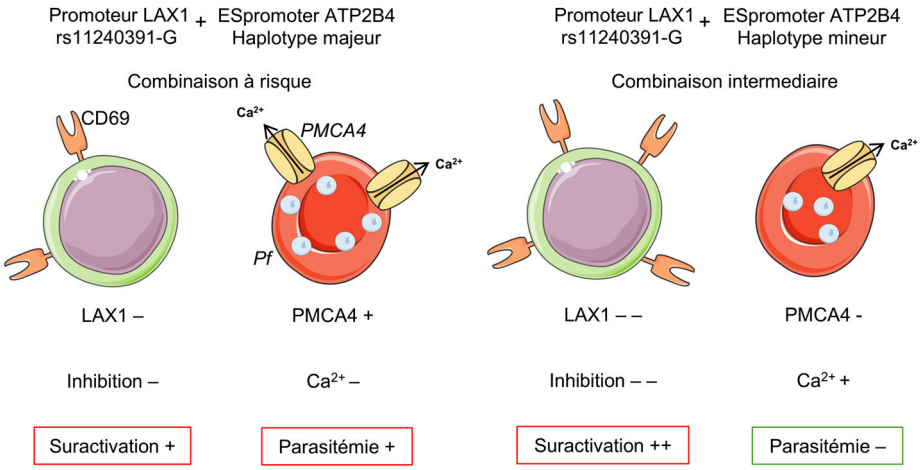


Figure 42 : Modèle hypothétique de régulation de *LAX1* et *ATP2B4* dans la susceptibilité au paludisme

L'haplotype majeur, en augmentant la parasitémie par un faible niveau de calcium intracellulaire dans les globules rouges, est également associé à une diminution de l'expression de *LAX1* conduisant une suractivation des lymphocytes T. Cette combinaison d'une suractivation des lymphocytes T et d'une parasitémie élevée constitue un profil génétique à haut risque. En revanche, l'haplotype mineur, qui est associé à une expression encore plus faible de *LAX1*, favorise également la suractivation des lymphocytes T plus importante. Toutefois, il réduit la parasitémie grâce à une élévation du calcium intracellulaire dans les globules rouges, limitant la réinvasion du parasite. Ce mécanisme offre une protection intermédiaire contre les formes graves de paludisme.

En conclusion, nos travaux soulignent l'importance cruciale de considérer l'ensemble du contexte génétique d'un locus, même lorsque les SNPs semblent indépendants c'est-à-dire en faible déséquilibre de liaison. Bien que certains variants puissent ne pas être détectés par les approches classiques telles que les GWAS en particulier dans les populations africaines dans lesquelles les blocs de déséquilibre de liaison sont différents des populations européennes, notre stratégie intégrative a permis de découvrir des interactions complexes entre les variants qui, pris isolément, n'auraient pas pu révéler leur rôle déterminant dans l'infection palustre. L'exemple d'interaction entre le rs11240391 et l'haplotype du ESpromoter, qui influence l'expression de *LAX1*, et qui est associé au paludisme sévère, démontre que les approches

conventionnelles, basées sur l'analyse individuelle des SNPs ont leurs limites. Ainsi, nos résultats mettent en évidence l'importance d'adopter une méthodologie intégrative en tenant compte des interactions haplotypiques et épistatiques, dans l'étude des maladies complexes afin de découvrir de nouveaux variants et de nouveaux mécanismes de régulation

Par ailleurs, ce locus se distingue par une caractéristique supplémentaire car *LAX1* et *ATP2B4* sont impliqués dans une même voie biologique. En effet, au-delà de l'effet de *LAX1* sur l'activation des lymphocytes T, *ATP2B4* joue également un rôle essentiel dans ce processus (Merino-Wong, Niemeyer and Alansary, 2021). Une altération de son expression pourrait ainsi modifier l'activation et la différenciation des lymphocytes T, en interaction avec les variations d'expression de *LAX1*. Toutefois, nous avons pu constater que l'haplotype identifié n'a pas d'impact sur l'activité enhancer de l'ESpromoter sur l'expression de *ATP2B4* dans les lymphocytes T. Par ailleurs, des données épigénomiques suggèrent que *LAX1* et *ATP2B4* sont également exprimés dans les lymphocytes B, ce qui ouvre de nouvelles perspectives de recherche. Les lymphocytes B, qui produisent des anticorps, jouent un rôle clé dans la réponse immune et l'exploration des effets du variant rs11240391 sur ce type cellulaire pourrait révéler des mécanismes complémentaires impliqués dans le paludisme. Cette hypothèse souligne l'importance d'élargir nos investigations pour comprendre pleinement les rôles multifonctionnels de *LAX1* et *ATP2B4* dans différents types cellulaires.

Cette observation met en évidence la nécessité d'explorer comment des variants génétiques, qui ne sont pas en déséquilibre de liaison, interagissent dans des réseaux biologiques communs. Ainsi, ces variants sont capables d'altérer des voies de signalisation partagées, comme l'activation des lymphocytes ou l'homéostasie calcique, via leurs effets combinés ou synergiques. L'impact de plusieurs variants de différents gènes dans une même fonction biologique, peut également être le résultat d'une interaction entre des gènes de régions chromosomiques différentes comme nous l'avons montré dans le cas *PIEZO1* et *ATP2B4.*

ATP2B4 joue un rôle central dans la régulation de l'homéostasie calcique à travers divers types cellulaires, notamment les globules rouges, des cellules essentielles pour l'invasion et la multiplication de *Plasmodium falciparum*. Notre laboratoire a montré que la délétion de la région Epromoteur dans les cellules K562 entraîne une diminution de l'expression du transcrit, l'absence de la protéine en surface et une augmentation du calcium intracellulaire (Nisar *et al.*, 2022). Une autre étude a révélé que les globules rouges porteurs de l'allèle mineur du rs1541252, l'un des cinq SNPs de l'haplotype étudié dans notre laboratoire, présentaient une diminution de la croissance parasitaire in vitro (Joof *et al.*, 2023). Cette observation est soutenue par des travaux montrant que l'inhibition de l'expression de PMCA4 affecte légèrement la prolifération des parasites dans des cellules érythroïdes dérivées de cellules souches humaines, établissant un lien direct entre le développement parasitaire et l'homéostasie calcique des globules rouges (Pance *et al.*, 2023). Ces données démontrent que l'augmentation intracellulaire de calcium inhibe efficacement le processus de réinvasion et de multiplication parasitaire, entraînant une réduction significative de la parasitémie. Toutefois, *ATP2B4* n'est pas le seul acteur clé de l'homéostasie calcique dans les globules rouges : *PIEZO1* contribue également de manière significative à ce processus biologique.

PIEZO1 est un canal calcique qui détecte les stimuli mécaniques dans de nombreux organismes (Coste *et al.*, 2010; Cahalan *et al.*, 2015). Il joue un rôle essentiel dans le contrôle du volume des globules rouges via l'homéostasie du calcium (Cahalan *et al.*, 2015). Le variant E756Del de *PIEZO1*, associé à une activité accrue de ce canal mécanosensible, entraîne une augmentation significative des concentrations intracellulaires de calcium dans les globules rouges (Ma *et al.*, 2018). Les avancées récentes sur la structure de PIEZO1, résolue par cryo-

microscopie électronique, ont permis de mieux caractériser la mutation E756Del (Shan *et al.*, 2024). Ce variant résulte en la suppression d'un acide glutamique dans une région reliant deux unités transmembranaires (THU4 et THU5), modifiant les propriétés d'inactivation rapide du canal. En conséquence, le canal reste actif plus longtemps après activation, augmentant le flux d'ions, notamment de calcium intracellulaire (Shan *et al.*, 2024). Or, maintenant nous savons qu'une élévation de la concentration de calcium dans le globule rouge conduit à une protection accrue des formes graves de paludisme médiées par la déshydratation de ces derniers (Nisar *et al.*, 2022; Joof *et al.*, 2023; Lohia *et al.*, 2023; Pance *et al.*, 2023). Tout d'abord, une étude a confirmé l'association entre ce variant E756Del et le paludisme sévère. Nous avons également validé cette association et apporté une précision supplémentaire. En effet, l'étude précédente s'était concentrée sur le paludisme sévère, tandis que nous avons pu démontrer que ce variant est spécifiquement associé au neuropaludisme. Ce résultat est supporté par une étude montrant que l'expression du variant de *PIEZO1* dans les cellules sanguines chez la souris confère une protection contre le neuropaludisme, avec une barrière hémato-encéphalique intacte et moins d'œdème cérébrale comparé aux souris sauvages (Ma *et al.*, 2021). De plus, nous avons observé que ce variant est surreprésenté dans les populations africaines par rapport aux autres populations dans le monde, avec une fréquence allélique de 19%, suggérant que cette mutation pourrait être sous sélection positive en Afrique.

De plus, nos travaux ont permis de détecter une interaction génétique statistiquement significative entre l'haplotype mineur d'*ATP2B4* et la mutation *PIEZO1*. Les porteurs de la combinaison protectrice des variants *PIEZO1* et *ATP2B4* sont mieux protégés ($P = 9 \times 10^{-4}$, OR = 0,15) que ceux porteurs soit de l'allèle protecteur de *PIEZO1* (P = 0.007, OR = 0,36 (0,17–0,76) soit de l'haplotype protecteur d'*ATP2B4* (P = 0,04, OR = 0.50 (0,26–0,93)), soulignant l'interaction génétique entre ces deux gènes impliqués dans l'homéostasie calcique des globules rouges. Par ailleurs, la combinaison de ces haplotypes favorise une augmentation du calcium intracellulaire dans les globules rouges. Nous avons montré que l'activation de PIEZO1 par Yoda1 élève le calcium intracellulaire, réduisant ainsi l'efficacité de la réinvasion des globules rouges par les parasites. De plus, l'inhibition de PMCA4 par ATA augmente également le calcium intracellulaire et diminue la parasitémie. Enfin, l'effet combiné de ces deux traitements—l'activation de PIEZO1 par Yoda1 et l'inhibition de PMCA4 par ATA—est plus efficace pour inhiber la réinvasion des globules rouges par les parasites que l'utilisation des drogues seules.

La régulation du calcium intracellulaire dans les globules rouges joue un rôle clé dans le contrôle de la parasitémie. En temps normal, le calcium est maintenu à des niveaux bas à l'intérieur des globules rouges (concentration intracellulaire de calcium d'environ 60 nM par rapport à une concentration extracellulaire de 1,2 mM) permettant une fonction cellulaire optimale. L'augmentation du calcium intracellulaire peut rendre les globules rouges moins favorables à l'invasion par les parasites (Fig. 43). Les mécanismes tels que l'activation de PIEZO1 et l'inhibition de PMCA4, via les variants découverts, peuvent induire une élévation du calcium, activer le canal GARDOS augmentant le flux de potassium qui entraîne une déshydratation des globules rouges réduisant leurs réinvasion par les parasites et diminuant ainsi la parasitémie. Les globules rouges ainsi altérés subissent un phénomène d'eryptose (Alghareeb, Alfhili and Fatima, 2023) et sont éliminés par les macrophages au niveau de la rate (Ghosh and Stumhofer, 2021)**.** Notre approche intégrative révèle des interactions génétiques de variants impliqués dans un même réseau biologique, bien que localisés sur des chromosomes différents, amplifiant ainsi les effets protecteurs de chacun d'entre eux (effet synergique). Ceci ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension de manière globale des mécanismes biologiques sous-jacents à la résistance au paludisme.

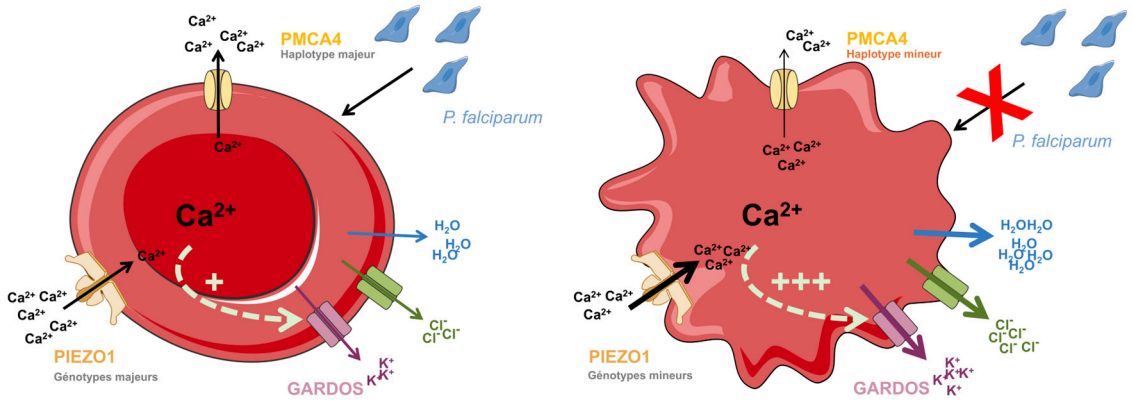


Figure 43 : Influence des variants *ATP2B4* et *PIEZO1* sur la réinvasion des globules rouges par *Plasmodium falciparum*

Dans des conditions normales, correspondant au génotype homozygote majeur de PIEZO1 et haplotype majeur PMCA4, les pompes PMCA4 fonctionnent efficacement, assurant une régulation optimale du flux calcique. Cela permet de maintenir une faible concentration intracellulaire de calcium dans les globules rouges, créant ainsi un environnement favorable à l'invasion par Plasmodium. En revanche, chez les individus porteurs du génotype mineur de PIEZO1 et de l'haplotype mineur de PMCA4, on observe une augmentation de la concentration intracellulaire calcique. Cette accumulation intracellulaire de calcium entraîne l'activation de canaux ioniques, tels que GARDOS, favorisant un flux de potassium, la déshydratation des globules rouges. Ces altérations rendent l'invasion par Plasmodium moins favorable.

Toutefois, le modèle génétique sous-jacent à cette résistance conférée par la mutation de *PIEZO1* n'est pas aussi évident en raison de la complexité et de la diversité du fond génétique des populations humaines et de la complexité des phénotypes cliniques. En effet, une autre étude cas-témoins n'a pas identifié d'association entre le variant E756Del et le paludisme sévère (P = 0,19 ; OR = 0,91 (0,79–1,05)) (Thye *et al.*, 2022). Une hypothèse possible pour expliquer ces divergences est que l'association observée pourrait être spécifique au neuropaludisme, tandis que l'étude en question s'est concentrée sur le paludisme sévère, qui englobe plusieurs phénotypes cliniques différents (tels que le neuropaludisme, la détresse respiratoire, l'anémie, etc.). L'étude inclut 1325 individus, dont 916 présentant une anémie sévère, 280 atteints de neuropaludisme, et 129 présentant une combinaison des deux formes. Or, nos résultats suggèrent que le variant E756Del joue un rôle principalement dans la protection contre le neuropaludisme, qui représente une petite fraction des individus (21,1%) dans cette étude. Cette hypothèse est supportée par une étude montrant que l'expression du variant gain de fonction de PIEZO1 dans les cellules sanguines chez la souris confère une protection contre le neuropaludisme, avec une barrière hémato-encéphalique intacte et moins d'œdème cérébral comparé aux souris sauvages (Ma *et al.*, 2021).

En complément de cette étude d'association, une méta-analyse récente sur le paludisme sévère a répliqué l'association en incluant cinq populations différentes dans un modèle hétérozygote (p = 0,018), mettant en lumière la complexité de l'interprétation des résultats (Leffler *et al.*, 2024). De plus, d'autres variants dans la région ont été rapportés, bien que moins fréquents, et avec des effets de risque modestes (Q745del : OR = 1,14 (1,00–1,30), p = 0,046 ; E756ins : OR = 1,18 (0,98–1,43), p = 0,076). De manière intéressante, nous avons également détecté la présence de ces variants dans notre cohorte, mais en trop faible fréquence pour mettre en évidence une association significative par manque de puissance statistique. Enfin,

les auteurs de la méta-analyse ont testé l'interaction avec E756del, et le génotype rs1541254. Ils ont observé une interaction suggestive entre le variant E756del de *PIEZO1* et le génotype rs1541254 d'*ATP2B4* en relation avec le paludisme sévère. Cette interaction a montré une tendance à améliorer le modèle (test du rapport de vraisemblance, p = 0,055), bien qu'elle ne soit pas statistiquement significative. Une explication possible de ce résultat est que nous avons démontré que l'haplotype d'*ATP2B4*, incluant le variant rs1541254, joue un rôle plus marqué que les variants considérés individuellement. Il serait donc intéressant que les auteurs ne se limitent pas à un seul SNP, mais qu'ils considèrent l'ensemble du contexte génétique de la région d'*ATP2B4* afin d'améliorer la compréhension des résultats et d'affiner les analyses.

Ces résultats soulignent l'importance cruciale de considérer les interactions entre les SNPs impliqués dans une même voie biologique, malgré le fait qu'ils ne se trouvent pas dans le même locus, pour mieux comprendre les mécanismes génétiques de la susceptibilité et de la résistance au paludisme. En particulier, *PIEZO1* et *ATP2B4*, en modulant l'homéostasie calcique des globules rouges, illustrent comment des variants génétiques peuvent agir de manière synergique pour influencer la physiopathologie de l'infection par *Plasmodium falciparum*. Négliger l'impact combiné de ces SNPs pourrait conduire à des conclusions biaisées ou partielles, notamment dans les études d'association génétique. L'intégration systématique des interactions entre loci partageant des fonctions biologiques similaires est essentielle pour identifier avec précision les mécanismes sous-jacents aux phénotypes complexes, comme le paludisme. Notre étude a mis en évidence l'importance cruciale des interactions génétiques dans la compréhension des mécanismes de susceptibilité au paludisme. Bien qu'il existe des scores polygéniques, qui sont des outils permettant d'estimer le risque génétique d'une maladie en combinant l'effet de multiples variants, ils ne prennent pas en compte la complexité biologique des interactions entre gènes, limitant ainsi leur puissance. Comme le soulignent Herzig et al. (2022) (Herzig, Clerget-Darpoux and Génin, 2022), ces scores reposent souvent sur des hypothèses simplifiées, notamment l'additivité des effets génétiques, qui ne reflètent pas toujours la structure 3D de la chromatine ou bien les réseaux biologiques perturbés par les variants. En les adaptant pour mieux intégrer les interactions fonctionnelles entre SNPs et les effets contextuels, ces outils pourraient néanmoins capturer de manière plus précise la contribution cumulative des variants identifiés dans les études GWAS. Appliquer cette méthode aux résultats existants sur le paludisme renforcerait la puissance statistique et permettrait d'identifier de nouveaux loci d'intérêt, en particulier dans des contextes où les effets des variants individuels sont modestes mais collectivement significatifs.

IV. Impact Des Variants Génétiques Sur La Physiopathologie Du Paludisme

Dans cette discussion, nous avons détaillé les mécanismes moléculaires et cellulaires, ainsi que les bases génétiques de la réponse immunitaire contre *Plasmodium*. Nous avons analysé l'impact des variants génétiques sur des processus clés, mais il est essentiel de les replacer dans un contexte physiopathologique pour en comprendre l'impact global. Nous explorons ici comment ces interactions moléculaires et cellulaires influencent les dynamiques de protection et de susceptibilité, en particulier au cours des stades hépatique et érythrocytaire de l'infection, et comment elles contribuent aux manifestations cliniques, notamment les formes graves telles que le neuropaludisme (Fig. 44).

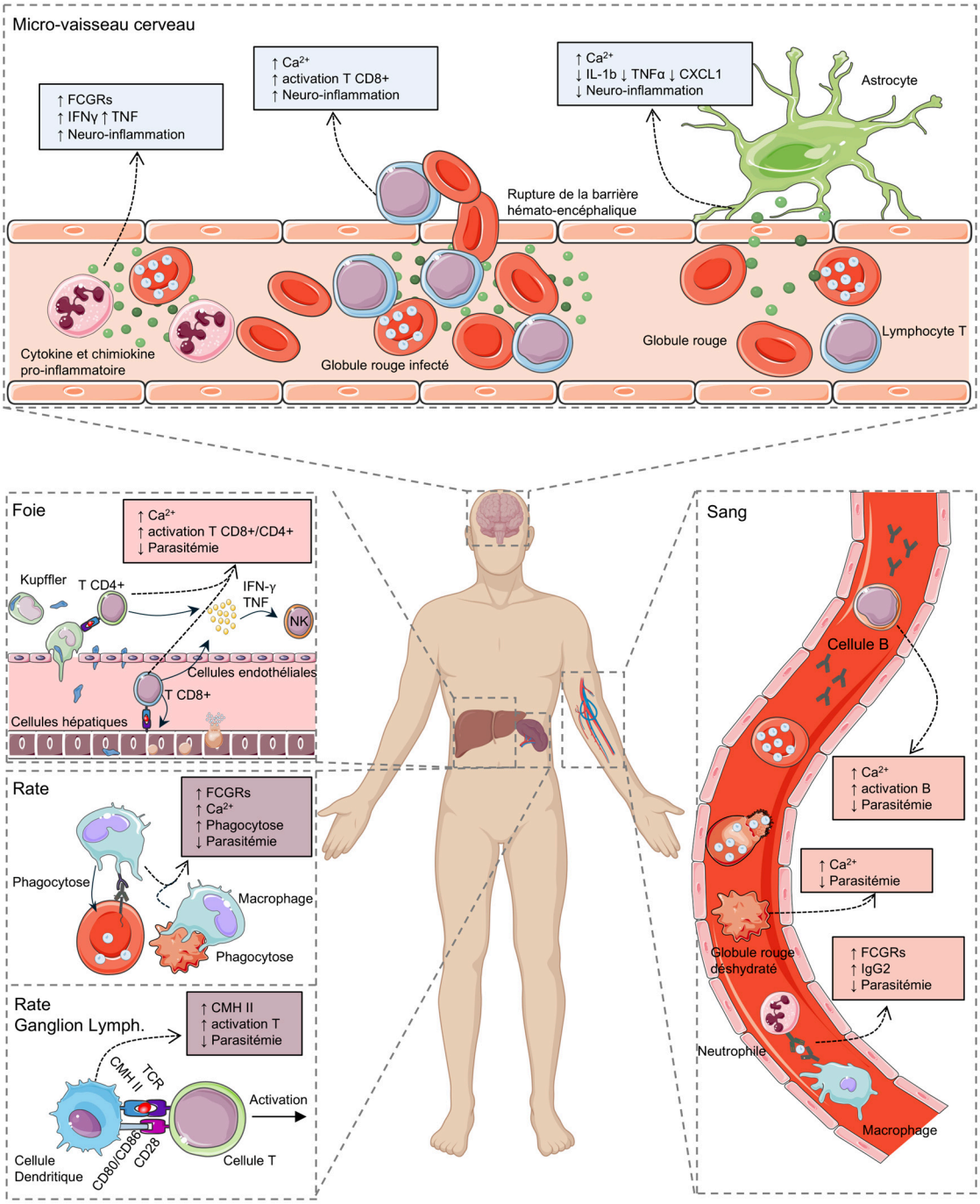


Figure 44 : Impact probable des variants génétiques sur les mécanismes physiopathologiques de l'infection par *Plasmodium falciparum*

Représentation des voies pouvant être impactées par les variants pendant une infection palustre dans différents organes et cellules du corps humain, incluant le cerveau, le foie, la rate et le sang.

Micro-vaisseaux du cerveau : L'élévation du calcium intracellulaire dans les lymphocytes T CD8+ conduit à une suractivation de ces cellules, à une augmentation de la neuro-inflammation et ainsi à la rupture de la barrière hémato-encéphalique. L'élévation du calcium intracellulaire dans les astrocytes conduit à une diminution des cytokines pro-inflammatoires, contribuant à une diminution de la neuro-inflammation locale. L'élévation des récepteurs des fragments Fc (FcGRs) des IgGs et des cytokines pro-inflammatoires (IFNγ, TNF) amplifie la réponse inflammatoire.

Foie : L'activation des lymphocytes T CD8+ et CD4+ en réponse à l'augmentation du calcium intracellulaire et la suractivation des cellules diminue la charge parasitaire.
Rate : L'augmentation de l'expression des récepteurs FCGR améliore la phagocytose des globules rouges infectés par le parasite, conduisant à l'élimination du paludisme. Par ailleurs, l'élévation du calcium intracellulaire entraîne une déformation des globules rouges, permettant leur élimination par les macrophages.
Rate et Ganglion lymphatique : Les cellules dendritiques présentent les antigènes via le complexe CMH II, activant les cellules T par les interactions CD80/CD86-CD28 et CMH II-TCR. L'augmentation de l'expression d'*ARL14* peut conduire à une surexpression des CMH de type II, et ainsi diminuer la parasitémie médiée par l'activation des lymphocytes T.
Sang : L'activation des lymphocytes B et la production d'immunoglobulines (IgG2) en réponse à l'infection parasitaire sont favorisées par l'augmentation du calcium intracellulaire. L'augmentation du calcium intracellulaire dans les globules rouges diminue la parasitémie via une réinvasion moins efficace des parasites. Les neutrophiles et les monocytes participent à l'élimination des parasites, médiée par les FcgRs. Une augmentation de leur expression peut conduire à une réponse plus efficace

IV.1. Rôle Des Variants Dans La Protection Contre Le Parasite Au Stade Hépatique

Au niveau du foie, les lymphocytes T jouent un rôle central dans l'élimination du parasite et la réduction du risque de formes cliniques (Fernandez-Ruiz *et al.*, 2016). Les lymphocytes T se distinguent par l'expression simultanée des gènes *ATP2B4*, *PIEZO1*, et *LAX1*, dont les variants pourraient agir en synergie sur l'activation des lymphocytes T et favoriser la clairance du parasite. Les variants de *PIEZO1* et *ATP2B4*, par exemple, augmentent le calcium intracellulaire, ce qui peut amplifier l'activation des lymphocytes T. En effet, la réduction de PMCA4 augmente l'expression de NFAT, contribue à une activation précoce des lymphocytes T (Fig. 45) (Merino-Wong, Niemeyer and Alansary, 2021). De plus, l'activation de PIEZO1 par un agoniste Yoda1 entraîne une augmentation de l'expression du TCR ainsi que du marqueur CD69 (Liu *et al.*, 2018). En complément, le variant de *LAX1*, qui réduit l'expression de cette protéine, provoque une suractivation des lymphocytes T (Fig. 45). Ensemble, ces variants pourraient agir de manière coordonnée sur activation des lymphocytes et conférer un effet protecteur essentiel au stade hépatique.

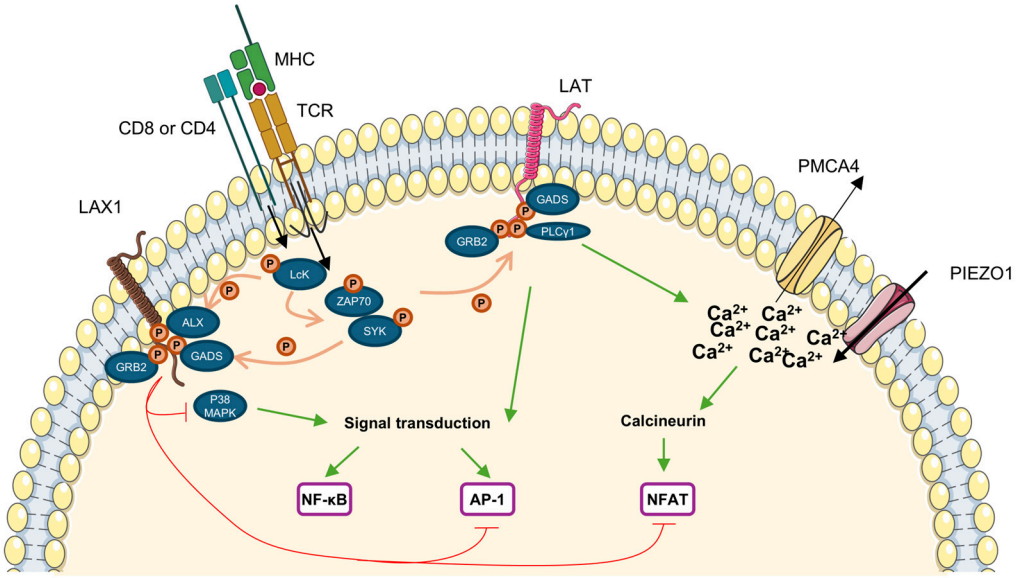


Figure 45 : Régulation de l'activation des lymphocytes T par les gènes *PIEZO1*, *ATP2B4* et *LAX1*

LAX1 (Lymphocyte Transmembrane Adaptor 1) est une protéine adaptatrice localisée dans la membrane plasmique et partage un grand nombre de similitudes avec LAT, une protéine recrutée lors de l'activation des cellules T après reconnaissance du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) par le récepteur des lymphocytes T (TCR). LAX1 peut recruter Grb2 (Zhu *et al.*, 2002). LAX1 est également capable d'être phosphorylée par GADS grâce à ZAP-70 et Syk, mais aussi par Lck via ALX (Zhu *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 2008). Cependant, à la différence de LAT, LAX1 est un régulateur négatif de l'activation des cellules T. En effet, LAX1 inhibe la voie p38 MAPK, nécessaire à l'activation transcriptionnelle d'AP1 et de NFAT (Zhu *et al.*, 2002). De plus, lors de l'activation des lymphocytes T, PLCγ1 augmente le flux de calcium, qui peut être médié par PMCA4 et PIEZO1. Ainsi, l'allèle C dans le promoteur de *LAX1* conduit à une diminution de l'inhibition et à une augmentation de l'activation lymphocytaire. Par ailleurs, le variant E756Del de *PIEZO1* et l'haplotype mineur *d'ATP2B4* augmentent la concentration intracellulaire de calcium, conduisant à une activation accrue de la voie de la calcineurine, à une augmentation de l'expression de NFAT et à la suractivation des lymphocytes.

Par ailleurs, les cellules dendritiques jouent également un rôle important dans ce contexte. La différenciation des lymphocytes T peut également être contrôlée de manière indirecte, via l'action des cellules dendritiques au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques. Il a été démontré que les cellules dendritiques expriment *PIEZO1* et régulent la formation des Th1 et Treg. En effet, la délétion de *PIEZO1* dans les cellules dendritiques inhibe la production de cellules Th1 et favorise le développement des Treg (Wang *et al.*, 2022). Ce phénomène s'explique par une augmentation de l'activité de TGF-β1 (qui favorise les Treg) et une diminution de l'activité d'IL-12 (qui réduit les Th1). À l'inverse, le traitement avec l'agoniste Yoda1 induit une surexpression d'IL-12 et une réduction de TGF-β1, favorisant ainsi les Th1 au détriment des Treg allant dans le sens d'un mécanisme protecteur contre les formes cliniques. De plus, une expression accrue des molécules du CMH de classe II par l'augmentation de l'expression des variants de *ARL14*, pourrait favoriser une activation plus importante des lymphocytes T, renforçant encore leur capacité à éliminer le parasite. Ce mécanisme est également présent au stade érythrocytaire, où les cellules immunitaires

continuent à être activées, contribuant ainsi à la destruction des globules rouges infectés. La rate est aussi impliquée dans l'élimination des globules rouges infectés facilitée par la reconnaissance des IgGs et leur phagocytose par les macrophages, renforçant ainsi la clairance du parasite dans la circulation sanguine. En résumé, ces variants génétiques pourraient agir de concert et jouer un rôle protecteur au stade hépatique mais aussi au stade érythrocytaire comme nous allons le voir dans la prochaine partie, en maximisant l'activation des lymphocytes T et en facilitant l'élimination précoce du parasite.

IV.2. Rôle Dual Des Variants Sur La Susceptibilité Au Paludisme Liée A La Réponse Immune Dirigée Contre Le Parasite Au Stade Erythrocytaire

Au stade érythrocytaire, les lymphocytes T jouent aussi un rôle important en permettant l'élimination des globules rouges infectés par intermédiaire des T CD4+mais aussi cette fois-ci un rôle délétère, les lymphocytes T CD8+ contribuant à la survenue du neuropaludisme en favorisant la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Rénia, Grau and Wassmer, 2020). La suractivation lymphocytes T, causée par les variants de *LAX1*, *PIEZO1*, et *ATP2B4*, peut amplifier la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Fig 45). Cette cascade pro-inflammatoire fragilise la barrière hémato-encéphalique, augmentant le risque d'œdèmes cérébraux, d'hémorragies, et de formes neurologiques graves du paludisme. En parallèle, les neutrophiles, activés par l'augmentation des récepteurs FCGRs induite par le variant, contribueraient également à la neuro-inflammation. Leur suractivation entraîne un relâchement accru IFN-γ et de TNF, deux médiateurs inflammatoires qui exacerbent l'inflammation dans les microvaisseaux cérébraux (Babatunde and Adenuga, 2022).

Cependant, les effets des variants ne sont pas exclusivement négatifs. D'autres cellules exprimant *PIEZO1* et *ATP2B4*, comme les astrocytes, modulent la réponse inflammatoire (Fresu *et al.*, 1999). Par exemple, l'activation de *PIEZO1* dans les astrocytes via l'agoniste Yoda1 entraîne une diminution de la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, le TNF-α et la CXCL1 (Velasco-Estevez *et al.*, 2020). Cette modulation réduit l'inflammation locale et limite les dommages cellulaires, suggérant un rôle potentiellement protecteur dans la régulation de l'inflammation cérébrale.

En parallèle, d'autres mécanismes immunitaires liés aux variants se manifestent au niveau du sang. Nous avons déjà évoqué l'action directe des variants *ATP2B4* et *PIEZO1* dans les globules rouges, où ils réduisent la parasitémie en limitant la réinvasion des parasites et leur multiplication. De plus, l'expression accrue des récepteurs FCGRs dans les neutrophiles et les monocytes pourrait jouer un rôle clé dans l'élimination du parasite. Ces récepteurs améliorent la reconnaissance des parasites via les anticorps, ce qui favorise une phagocytose plus efficace et un relargage d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Fall *et al.*, 2022; Ofori *et al.*, 2023). Ensemble, ces mécanismes renforcent la réponse immunitaire au stade érythrocytaire et contribuent directement à l'élimination des parasites.

De manière complémentaire, les lymphocytes B, tout comme les lymphocytes T, expriment également *ATP2B4*, *PIEZO1*, et *LAX1*, mais avec des rôles distincts. Bien que *ATP2B4* ne soit pas essentiel à l'activation des lymphocytes B (Korthals *et al.*, 2021), PIEZO1 joue un rôle crucial dans leur réponse. Lors de la reconnaissance d'antigènes, PIEZO1 s'active et induit un afflux de calcium intracellulaire, essentiel pour l'expression des récepteurs BCR et l'expression de CD69, un marqueur d'activation (Kwak *et al.*, 2023). LAX1, quant à lui, agit comme un régulateur négatif des lymphocytes B également. Chez des souris déficientes en *Lax1*, une hyperactivation des lymphocytes B a été observée, indiquant son rôle clé dans la régulation de la réponse immunitaire (Zhu *et al.*, 2005). Les variants modulant l'expression ou la fonction de *LAX1* et *PIEZO1* pourraient ainsi jouer un rôle dans l'expression des anticorps par les lymphocytes B comme les IgG ou les IgE et ainsi influencer considérablement l'efficacité de la réponse contre le parasite, renforçant ou affaiblissant la clairance du parasite.

Toutes ces hypothèses ouvrent de nouvelles pistes pour comprendre l'impact des variants génétiques dans d'autres types cellulaires. Toutefois, elles nécessitent encore des investigations approfondies pour être confirmées. L'étude des variants régulateurs dans le contexte du paludisme en Afrique présente une complexité en raison de la diversité génétique propre aux populations africaines comme nous avons pu le voir. Cette diversité est le fruit d'une évolution distincte de celle des populations occidentales. Malheureusement, les données génétiques disponibles pour les populations africaines sont encore insuffisantes. Cela limite notre compréhension des mécanismes régulateurs spécifiques liés au paludisme. Bien que mes analyses aient permis de proposer des variants régulateurs expliquant plusieurs signaux d'association, elles soulignent également le besoin urgent d'accroître le nombre d'études de ce type pour les populations africaines, en exploitant si possible les approches de séquençage de génomes individuels entiers d'une part et les techniques disponibles à l'échelle de la cellule unique d'autre part. Dans le cadre de ma thèse, nous avons entrepris une étude de scRNA-Seq sur une cohorte africaine afin de pallier ce déficit de données. L'objectif de ces recherches est de fournir aux scientifiques les outils et les données nécessaires pour élucider les mécanismes régulateurs impliqués dans le paludisme, en tenant compte des spécificités génétiques africaines d'une part et de variants régulateurs potentiellement spécifiques de types cellulaires dans le sang d'autre part. Cette approche permettra, à terme, de mieux comprendre le devenir de l'infection par Plasmodium falciparum et les formes cliniques du paludisme en tenant compte également des caractéristiques génomiques et transcriptomiques du parasite.

Perspectives : Utilisation D'approches Multi-Omiques A L'échelle Des Cellules Uniques

Les approches multi-omiques, combinant des technologies comme le scRNA-Seq et le scATAC-Seq permettrait de lier l'expression génique aux données sur les régions chromosomiques ouvertes dans une même cellule, ce qui fournirait des informations précieuses sur la régulation génétique. 10x Genomics a récemment développé une technique combinant le scRNA-Seq et le scATAC-Seq dans la même cellule permettant ainsi de relier les dérégulations transcriptionnelles aux régions ouvertes de la chromatine qui sont susceptibles de correspondre à des régions régulatrices. En effet, les expériences de scRNA-Seq, bien que performantes pour identifier des gènes dérégulés, ne permettent pas à elles seules de localiser les SNPs responsables de cette dérégulation, en particulier dans les éléments régulateurs tels que les promoteurs ou enhancers. L'ajout de techniques comme le scATAC-Seq et le développement de technologies comme le scChIP-Seq pourraient également permettre de caractériser les régions régulatrices spécifiques à chaque type cellulaire. Une telle approche multi-omique pourrait mener à l'identification de variants régulateurs spécifiques à certains types cellulaires et de nouvelles voies et mécanismes régulateurs encore inconnus, ouvrant la voie à des découvertes majeures sur le paludisme.

Mes travaux récents de scRNA-seq constituent une étape dans cette perspective. Cette approche, en permettant l'analyse de l'expression génique à une résolution cellulaire unique, apporte une précision inédite et ouvre la voie à l'identification de nouveaux gènes candidats jusque-là insoupçonnés avec les approches classiques. Les premières données générées sur les 2 échantillons révèlent déjà des signatures transcriptionnelles spécifiques, potentiellement liées à des mécanismes de régulation cruciaux dans des types cellulaires distincts. Toutefois, il est impératif de mener une analyse approfondie et intégrative des 16 échantillons. Cela inclut l'intégration des données scRNA-seq et scATAC-seq avec des analyses génétiques, l'identification et la priorisation des gènes candidats en fonction de leur pertinence biologique, ainsi que la validation fonctionnelle de ces candidats à l'aide d'approches expérimentales complémentaires. Ce travail permettra de décortiquer les voies moléculaires activées ou inhibées par ces gènes, révélant des cibles thérapeutiques potentielles et fournissant des informations sans précédent sur les interactions cellulaires dans le contexte du paludisme.

En combinant les données obtenues par des approches single-cell (scRNA-seq et scATAC-seq) avec des outils d'intelligence artificielle et de bioinformatique avancée, nous pourrions améliorer les performances des prédictions de la causalité des variants, y compris à l'échelle des cellules uniques. Ces analyses représentent une opportunité unique de transformer notre compréhension des mécanismes immunitaires et génétiques, consolidant ainsi la pertinence et l'innovation de notre stratégie. Actuellement, les outils disponibles sont principalement axés sur des tissus comme le sang ou le foie. Toutefois, il faut noter que, depuis peu, une petite minorité d'outils prend désormais en compte des types cellulaires spécifiques. En combinant les données issues de cette recherche avec les technologies d'apprentissage automatique (telles que les réseaux neuronaux ou les forêts aléatoires), il serait possible de créer un outil de machine learning capable de prédire l'impact des SNPs sur la régulation cellulaire spécifique. Cela permettrait de prédire de manière plus fidèle et à plus grande échelle les

variants, optimisant ainsi l’allocation des ressources en se concentrant sur les variants clés dans les cellules pertinentes. Ces approches faciliteraient la confirmation du rôle de ces SNPs dans des cellules spécifiques, offrant un moyen rapide et précis de comprendre leur contribution au paludisme et à d'autres maladies complexes.

Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse constituent une avancée significative dans la compréhension des mécanismes génétiques complexes impliqués dans le paludisme. Grâce à une approche intégrative novatrice combinant analyses bioinformatiques avancées, des validations expérimentales rigoureuses et une prise en compte des interactions des variants en cis et trans ainsi que leur effet épistatique sur des réseaux moléculaires, nous avons pu révéler des mécanismes jusqu'ici inexplorés et élargir les horizons de la recherche génétique.

Contrairement aux approches traditionnelles, notre stratégie se distingue par sa capacité à identifier et caractériser des variants causaux pouvant être indétectables par les méthodes classiques. En élucidant des mécanismes spécifiques à certains types cellulaires et en intégrant des réseaux biologiques communs pouvant être perturbés par des variants, nos résultats ont permis de démontrer l'importance cruciale des interactions génétiques dans la modulation des réponses physiopathologiques. L'identification de nouveaux éléments régulateurs, tels que le concept inédit d'ESpromoteur, illustre non seulement la complexité des mécanismes transcriptionnels, mais ouvre également des perspectives pour des recherches futures.

Cette thèse apporte une contribution essentielle à l'étude du paludisme et pourrait aider à décortiquer les mécanismes physiopathologiques d'autres maladies complexes. Ma stratégie ouvre la voie pour l'intégration future de données multi-omiques, l'utilisation de techniques à l'échelle de la cellule unique et d'algorithmes d'apprentissage automatique, et ainsi à des avancées inédites en médecine personnalisée.

Bibliographie

Abel, L., Demenais, F., Prata, A., Souza, A. E., & Dessein, A. (1991). Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by Schistosoma mansoni. *American Journal of Human Genetics*, *48*(5), 959–970.

Aidoo, M., McElroy, P. D., Kolczak, M. S., Terlouw, D. J., ter Kuile, F. O., Nahlen, B., Lal, A. A., & Udhayakumar, V. (2001). Tumor necrosis factor-alpha promoter variant 2 (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality, and malaria morbidity in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project IX. *Genetic Epidemiology*, *21*(3), 201–211.

Akoth, M., Odhiambo, J., & Omolo, B. (2023). Genome-wide association testing in malaria studies in the presence of overdominance. *Malaria Journal*, *22*(1), 119.

Al Bkhetan, Z., Chana, G., Soon Ong, C., Goudey, B., & Ramamohanarao, K. (2021). eQTLHap: a tool for comprehensive eQTL analysis considering haplotypic and genotypic effects. *Briefings in Bioinformatics*, *22*(5). https://doi.org/10.1093/bib/bbab093

Alghareeb, S. A., Alfhili, M. A., & Fatima, S. (2023). Molecular Mechanisms and Pathophysiological Significance of Eryptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6). https://doi.org/10.3390/ijms24065079

Allen, S. J., O'Donnell, A., Alexander, N. D., Alpers, M. P., Peto, T. E., Clegg, J. B., & Weatherall, D. J. (1997). alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(26), 14736–14741.

Allen, S. J., O'Donnell, A., Alexander, N. D., Mgone, C. S., Peto, T. E., Clegg, J. B., Alpers, M. P., & Weatherall, D. J. (1999). Prevention of cerebral malaria in children in Papua New Guinea by southeast Asian ovalocytosis band 3. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *60*(6), 1056–1060.

Allison, A. C. (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malareal infection. *British Medical Journal*, *1*(4857), 290–294.

Allison, A. C. (1964). POLYMORPHISM AND NATURAL SELECTION IN HUMAN POPULATIONS. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *29*, 137–149.

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.

Anania, J. C., Chenoweth, A. M., Wines, B. D., & Hogarth, P. M. (2019). The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*, *10*, 464.

Andersson, R., Chen, Y., Core, L., Lis, J. T., Sandelin, A., & Jensen, T. H. (2015). Human Gene Promoters Are Intrinsically Bidirectional [Review of *Human Gene Promoters Are Intrinsically Bidirectional*]. *Molecular Cell*, *60*(3), 346–347.

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), 1929–1940.

Antonio-Nkondjio, C., Fossog, B. T., Ndo, C., Djantio, B. M., Togouet, S. Z., Awono-Ambene, P., Costantini, C., Wondji, C. S., & Ranson, H. (2011). Anopheles gambiae distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. *Malaria Journal*, *10*, 154.

Apinjoh, T. O., Anchang-Kimbi, J. K., Njua-Yafi, C., Mugri, R. N., Ngwai, A. N., Rockett, K. A., Mbunwe, E., Besingi, R. N., Clark, T. G., Kwiatkowski, D. P., Achidi, E. A., & MalariaGEN Consortium. (2013). Association of cytokine and Toll-like receptor gene polymorphisms with severe malaria in three regions of Cameroon. *PloS One*, *8*(11), e81071.

Ariff, A., Song, Y., Aguilar, R., Nhabomba, A., Manaca, M. N., Khoo, S.-K., Wiertsema, S., Bassat, Q., Barbosa, A., Quintó, L., Laing, I. A., Guinovart, C., Alonso, P. L., Dobaño, C., Le Souëf, P., & Zhang, G. (2023). Genetic variants of TLR4, including the novel variant, rs5030719, and related genes are associated with susceptibility to clinical malaria in African children. *Malaria Journal*, *22*(1), 177.

Arora, G., Hart, G. T., Manzella-Lapeira, J., Doritchamou, J. Y., Narum, D. L., Thomas, L. M., Brzostowski, J., Rajagopalan, S., Doumbo, O. K., Traore, B., Miller, L. H., Pierce, S. K., Duffy, P. E., Crompton, P. D., Desai, S. A., & Long, E. O. (2018). NK cells inhibit growth in red blood cells via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *ELife*, *7*. https://doi.org/10.7554/eLife.36806

Atkinson, A., Garnier, S., Afridi, S., Fumoux, F., & Rihet, P. (2012). Genetic variations in genes involved in heparan sulphate biosynthesis are associated with Plasmodium falciparum parasitaemia: a familial study in Burkina Faso. *Malaria Journal*, *11*, 108.

Aucan, C., Traoré, Y., Tall, F., Nacro, B., Traoré-Leroux, T., Fumoux, F., & Rihet, P. (2000). High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria. *Infection and Immunity*, *68*(3), 1252–1258.

Aucan, C., Walley, A. J., Hennig, B. J. W., Fitness, J., Frodsham, A., Zhang, L., Kwiatkowski, D., & Hill, A. V. S. (2003). Interferon-alpha receptor-1 (IFNAR1) variants are associated with protection against cerebral malaria in the Gambia. *Genes and Immunity*, *4*(4), 275–282.

Awandare, G. A., Ouma, C., Keller, C. C., Were, T., Otieno, R., Ouma, Y., Davenport, G. C., Hittner, J. B., Ong'echa, J. M., Ferrell, R., & Perkins, D. J. (2006). A macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphism is associated with high-density parasitemia in children with malaria. *Genes and Immunity*, *7*(7), 568–575.

Baaklini, S., Afridi, S., Nguyen, T. N., Koukouikila-Koussounda, F., Ndounga, M., Imbert, J., Torres, M., Pradel, L., Ntoumi, F., & Rihet, P. (2017). Beyond genome-wide scan: Association of a cis-regulatory NCR3 variant with mild malaria in a population living in the Republic of Congo. *PloS One*, *12*(11), e0187818.

Babatunde, K. A., & Adenuga, O. F. (2022). Neutrophils in malaria: A double-edged sword role. *Frontiers in Immunology*, *13*, 922377.

Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson, A. B., Jr, van Rooijen, N., Schnieder, T., & Frevert, U. (2007). Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver. *Cellular Microbiology*, *9*(2), 397–412.

Band, G., Le, Q. S., Jostins, L., Pirinen, M., Kivinen, K., Jallow, M., Sisay-Joof, F., Bojang, K., Pinder, M., Sirugo, G., Conway, D. J., Nyirongo, V., Kachala, D., Molyneux, M., Taylor, T., Ndila, C., Peshu, N., Marsh, K., Williams, T. N., … Malaria Genomic Epidemiology Network. (2013). Imputation-based meta-analysis of severe malaria in three African populations. *PLoS Genetics*, *9*(5), e1003509.

Banerji, J., Olson, L., & Schaffner, W. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell*, *33*(3), 729–740.

Barbier, M., Delahaye, N. F., Fumoux, F., & Rihet, P. (2008). Family-based association of a low producing lymphotoxin-alpha allele with reduced Plasmodium falciparum parasitemia. *Microbes and Infection*, *10*(6), 673–679.

Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B., Bi, X., Ma, X. C., Feldman, M., Taraschi, T. F., & Howard, R. J. (1995). Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*, *82*(1), 77–87.

Bavais, J., Chevallier, J., Spinelli, L., van de Pavert, S. A., & Puthier, D. (2024). SciGeneX: Enhancing transcriptional analysis through gene module detection in single-cell and spatial transcriptomics data. In *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2024.03.19.585667

Belnoue, E., Kayibanda, M., Vigario, A. M., Deschemin, J.-C., van Rooijen, N., Viguier, M., Snounou, G., & Rénia, L. (2002). On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *169*(11), 6369–6375.

Berendt, A. R., Simmons, D. L., Tansey, J., Newbold, C. I., & Marsh, K. (1989). Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum. *Nature*, *341*(6237), 57–59.

Bernabeu, M., Danziger, S. A., Avril, M., Vaz, M., Babar, P. H., Brazier, A. J., Herricks, T., Maki, J. N., Pereira, L., Mascarenhas, A., Gomes, E., Chery, L., Aitchison, J. D., Rathod, P. K., & Smith, J. D. (2016). Severe adult malaria is associated with specific PfEMP1 adhesion types and high parasite biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(23), E3270-9.

Bienzle, U., Effiong, C., & Luzzatto, L. (1976). Erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD type A-) and neonatal jaundice. *Acta Paediatrica Scandinavica*, *65*(6), 701–703.

Black, J. C., Van Rechem, C., & Whetstine, J. R. (2012). Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Molecular Cell*, *48*(4), 491–507.

Boisier, P., Jambou, R., Raharimalala, L., & Roux, J. (2002). Relationship between parasite density and fever risk in a community exposed to a low level of malaria transmission in Madagascar highlands. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *67*(2), 137–140.

Boldt, A. B. W., Luty, A., Grobusch, M. P., Dietz, K., Dzeing, A., Kombila, M., Kremsner, P. G., & Kun, J. F. J. (2006). Association of a new mannose-binding lectin variant with severe malaria in Gabonese children. *Genes and Immunity*, *7*(5), 393–400.

Bouharoun-Tayoun, H., Attanath, P., Sabchareon, A., Chongsuphajaisiddhi, T., & Druilhe, P. (1990). Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, *172*(6), 1633–1641.

Bouharoun-Tayoun, H., Oeuvray, C., Lunel, F., & Druilhe, P. (1995). Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *The Journal of Experimental Medicine*, *182*(2), 409–418.

Boyden, L. M., Choi, M., Choate, K. A., Nelson-Williams, C. J., Farhi, A., Toka, H. R., Tikhonova, I. R., Bjornson, R., Mane, S. M., Colussi, G., Lebel, M., Gordon, R. D., Semmekrot, B. A., Poujol, A., Välimäki, M. J., De Ferrari, M. E., Sanjad, S. A., Gutkin, M., Karet, F. E., … Lifton, R. P. (2012). Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature*, *482*(7383), 98–102.

Brand, A. H., Breeden, L., Abraham, J., Sternglanz, R., & Nasmyth, K. (1985). Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell*, *41*(1), 41–48.

Brant, F., Miranda, A. S., Esper, L., Gualdrón-López, M., Cisalpino, D., de Souza, D. da G., Rachid, M. A., Tanowitz, H. B., Teixeira, M. M., Teixeira, A. L., & Machado, F. S. (2016). Suppressor of cytokine signaling 2 modulates the immune response profile and development of experimental cerebral malaria. *Brain, Behavior, and Immunity*, *54*, 73–85.

Brisebarre, A., Kumulungui, B., Sawadogo, S., Atkinson, A., Garnier, S., Fumoux, F., & Rihet, P. (2014). A genome scan for Plasmodium falciparum malaria identifies quantitative trait loci on chromosomes 5q31, 6p21.3,

17p12, and 19p13. *Malaria Journal*, *13*, 198.
Broekema, R. V., Bakker, O. B., & Jonkers, I. H. (2020). A practical view of fine-mapping and gene prioritization in the post-genome-wide association era. *Open Biology*, *10*(1), 190221.
Brouwer, K. C., Lal, A. A., Mirel, L. B., Otieno, J., Ayisi, J., Van Eijk, A. M., Lal, R. B., Steketee, R., Nahlen, B. L., & Shi, Y. P. (2004). Polymorphism of Fc receptor IIa for immunoglobulin G is associated with placental malaria in HIV-1-positive women in western Kenya. *The Journal of Infectious Diseases*, *190*(6), 1192–1198.
Buffet, P. A., Safeukui, I., Deplaine, G., Brousse, V., Prendki, V., Thellier, M., Turner, G. D., & Mercereau-Puijalon, O. (2011). The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*, *117*(2), 381–392.
Buniello, A., MacArthur, J. A. L., Cerezo, M., Harris, L. W., Hayhurst, J., Malangone, C., McMahon, A., Morales, J., Mountjoy, E., Sollis, E., Suveges, D., Vrousgou, O., Whetzel, P. L., Amode, R., Guillen, J. A., Riat, H. S., Trevanion, S. J., Hall, P., Junkins, H., … Parkinson, H. (2019). The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D1005–D1012.
Cabantous, S., Doumbo, O., Poudiougou, B., Louis, L., Barry, A., Oumar, A. A., Traore, A., Marquet, S., & Dessein, A. (2017). Gene Expression Analysis Reveals Genes Common to Cerebral Malaria and Neurodegenerative Disorders. *The Journal of Infectious Diseases*, *216*(6), 771–775.
Cabantous, S., Poudiougou, B., Bergon, A., Barry, A., Oumar, A. A., Traore, A. M., Chevillard, C., Doumbo, O., Dessein, A., & Marquet, S. (2020). Understanding Human Cerebral Malaria through a Blood Transcriptomic Signature: Evidences for Erythrocyte Alteration, Immune/Inflammatory Dysregulation, and Brain Dysfunction. *Mediators of Inflammation*, *2020*, 3280689.
Cahalan, S. M., Lukacs, V., Ranade, S. S., Chien, S., Bandell, M., & Patapoutian, A. (2015). Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *ELife*, *4*. https://doi.org/10.7554/eLife.07370
Cai, Y., Zhang, Y., Loh, Y. P., Tng, J. Q., Lim, M. C., Cao, Z., Raju, A., Lieberman Aiden, E., Li, S., Manikandan, L., Tergaonkar, V., Tucker-Kellogg, G., & Fullwood, M. J. (2021). H3K27me3-rich genomic regions can function as silencers to repress gene expression via chromatin interactions. *Nature Communications*, *12*(1), 719.
Carlier, M. S. A., Nyamu, W., Makale, J., Williams, T. N., Rowe, J. A., & Kariuki, S. N. (2024). Dantu Blood Group Erythrocytes Form Large Plasmodium falciparum Rosettes Less Commonly. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *110*(3), 436–443.
Carlson, C. J., Bannon, E., Mendenhall, E., Newfield, T., & Bansal, S. (2023). Rapid range shifts in African mosquitoes over the last century. *Biology Letters*, *19*(2), 20220365.
Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C. A. M., Taylor, M. S., Engström, P. G., Frith, M. C., Forrest, A. R. R., Alkema, W. B., Tan, S. L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., … Hayashizaki, Y. (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature Genetics*, *38*(6), 626–635.
Casals-Pascual, C., Allen, S., Allen, A., Kai, O., Lowe, B., Pain, A., & Roberts, D. J. (2001). Short report: codon 125 polymorphism of CD31 and susceptibility to malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *65*(6), 736–737.
Chan, J.-A., Howell, K. B., Reiling, L., Ataide, R., Mackintosh, C. L., Fowkes, F. J. I., Petter, M., Chesson, J. M., Langer, C., Warimwe, G. M., Duffy, M. F., Rogerson, S. J., Bull, P. C., Cowman, A. F., Marsh, K., & Beeson, J. G. (2012). Targets of antibodies against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in malaria immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(9), 3227–3238.
Cheboune, Y., Pagnier, J., Trabuchet, G., Faure, C., Verdier, G., Labie, D., & Nigon, V. (1988). Structural analysis of the 5' flanking region of the beta-globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(12), 4431–4435.
Chen, Q., Barragan, A., Fernandez, V., Sundström, A., Schlichtherle, M., Sahlén, A., Carlson, J., Datta, S., & Wahlgren, M. (1998). Identification of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite P. falciparum. *The Journal of Experimental Medicine*, *187*(1), 15–23.
Chen, Q., Fernandez, V., Sundström, A., Schlichtherle, M., Datta, S., Hagblom, P., & Wahlgren, M. (1998). Developmental selection of var gene expression in Plasmodium falciparum. *Nature*, *394*(6691), 392–395.
Cheng, M. P., & Yansouni, C. P. (2013). Management of severe malaria in the intensive care unit. *Critical Care Clinics*, *29*(4), 865–885.
Clark, I. A., Virelizier, J. L., Carswell, E. A., & Wood, P. R. (1981). Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria. *Infection and Immunity*, *32*(3), 1058–1066.
Clatworthy, M. R., Willcocks, L., Urban, B., Langhorne, J., Williams, T. N., Peshu, N., Watkins, N. A., Floto, R. A., & Smith, K. G. C. (2007). Systemic lupus erythematosus-associated defects in the inhibitory receptor FcgammaRIIb reduce susceptibility to malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(17), 7169–7174.
Consoli, L., Lefèvre, A., Zivy, M., de Vienne, D., & Damerval, C. (2002). QTL analysis of proteome and transcriptome variations for dissecting the genetic architecture of complex traits in maize. *Plant Molecular Biology*, *48*(5–6), 575–581.
Cooke, G. S., Aucan, C., Walley, A. J., Segal, S., Greenwood, B. M., Kwiatkowski, D. P., & Hill, A. V. S. (2003).

Association of Fcgamma receptor IIa (CD32) polymorphism with severe malaria in West Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *69*(6), 565–568.

Copernicus: 2024 is the first year to exceed 1.5°C above pre-industrial level. (n.d.). Retrieved January 16, 2025, from https://climate.copernicus.eu/copernicus-2024-first-year-exceed-15degc-above-pre-industrial-level

Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J. R., Bennett, B. L., Lawrence, R., Esko, J. D., Billker, O., & Sinnis, P. (2007). Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to Plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host & Microbe*, *2*(5), 316–327.

Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6000), 55–60.

Cottrell, G., Kouwaye, B., Pierrat, C., le Port, A., Bouraïma, A., Fonton, N., Hounkonnou, M. N., Massougbodji, A., Corbel, V., & Garcia, A. (2012). Modeling the influence of local environmental factors on malaria transmission in Benin and its implications for cohort study. *PloS One*, *7*(1), e28812.

Courtin, D., Milet, J., Bertin, G., Vafa, M., Sarr, J. B., Watier, L., Deloron, P., Troye-Blomberg, M., Garcia, A., & Migot-Nabias, F. (2011). G6PD A-variant influences the antibody responses to Plasmodium falciparum MSP2. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *11*(6), 1287–1292.

da Silva Santos, S., Clark, T. G., Campino, S., Suarez-Mutis, M. C., Rockett, K. A., Kwiatkowski, D. P., & Fernandes, O. (2012). Investigation of host candidate malaria-associated risk/protective SNPs in a Brazilian Amazonian population. *PloS One*, *7*(5), e36692.

Daëron, M., Jaeger, S., Du Pasquier, L., & Vivier, E. (2008). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunological Reviews*, *224*, 11–43.

Dao, L. T. M., Galindo-Albarrán, A. O., Castro-Mondragon, J. A., Andrieu-Soler, C., Medina-Rivera, A., Souaid, C., Charbonnier, G., Griffon, A., Vanhille, L., Stephen, T., Alomairi, J., Martin, D., Torres, M., Fernandez, N., Soler, E., van Helden, J., Puthier, D., & Spicuglia, S. (2017). Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions. *Nature Genetics*, *49*(7), 1073–1081.

Datoo, M. S., Dicko, A., Tinto, H., Ouédraogo, J.-B., Hamaluba, M., Olotu, A., Beaumont, E., Ramos Lopez, F., Natama, H. M., Weston, S., Chemba, M., Compaore, Y. D., Issiaka, D., Salou, D., Some, A. M., Omenda, S., Lawrie, A., Bejon, P., Rao, H., … R21/Matrix-M Phase 3 Trial Group. (2024). Safety and efficacy of malaria vaccine candidate R21/Matrix-M in African children: a multicentre, double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, *403*(10426), 533–544.

de Cevins, C., Delage, L., Batignes, M., Riller, Q., Luka, M., Remaury, A., Sorin, B., Fali, T., Masson, C., Hoareau, B., Meunier, C., Parisot, M., Zarhrate, M., Pérot, B. P., García-Paredes, V., Carbone, F., Galliot, L., Nal, B., Pierre, P., … Ménager, M. M. (2023). Single-cell RNA-sequencing of PBMCs from SAVI patients reveals disease-associated monocytes with elevated integrated stress response. *Cell Reports. Medicine*, *4*(12), 101333.

Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., & Kleckner, N. (2002). Capturing chromosome conformation. *Science (New York, N.Y.)*, *295*(5558), 1306–1311.

Delahaye, N. F., Barbier, M., Fumoux, F., & Rihet, P. (2007). Association analyses of NCR3 polymorphisms with P. falciparum mild malaria. *Microbes and Infection*, *9*(2), 160–166.

Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S., & Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, *485*(7398), 376–380.

Doni Jayavelu, N., Jajodia, A., Mishra, A., & Hawkins, R. D. (2020). Candidate silencer elements for the human and mouse genomes. *Nature Communications*, *11*(1), 1061.

Dostie, J., Richmond, T. A., Arnaout, R. A., Selzer, R. R., Lee, W. L., Honan, T. A., Rubio, E. D., Krumm, A., Lamb, J., Nusbaum, C., Green, R. D., & Dekker, J. (2006). Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Research*, *16*(10), 1299–1309.

Doumbe-Belisse, P., Kopya, E., Ngadjeu, C. S., Sonhafouo-Chiana, N., Talipouo, A., Djamouko-Djonkam, L., Awono-Ambene, H. P., Wondji, C. S., Njiokou, F., & Antonio-Nkondjio, C. (2021). Urban malaria in sub-Saharan Africa: dynamic of the vectorial system and the entomological inoculation rate. *Malaria Journal*, *20*(1), 364.

Duncan, C. J. A., & Draper, S. J. (2012). Controlled human blood stage malaria infection: current status and potential applications. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *86*(4), 561–565.

Dunst, J., Kamena, F., & Matuschewski, K. (2017). Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 324.

Dunstan, S. J., Rockett, K. A., Quyen, N. T. N., Teo, Y. Y., Thai, C. Q., Hang, N. T., Jeffreys, A., Clark, T. G., Small, K. S., Simmons, C. P., Day, N., O'Riordan, S. E., Kwiatkowski, D. P., Farrar, J., Phu, N. H., Hien, T. T., & MalariaGEN Consortium. (2012). Variation in human genes encoding adhesion and proinflammatory molecules are associated with severe malaria in the Vietnamese. *Genes and Immunity*, *13*(6), 503–508.

Ehsan, N., Kotis, B. M., Castel, S. E., Song, E. J., Mancuso, N., & Mohammadi, P. (2024). Haplotype-aware modeling of cis-regulatory effects highlights the gaps remaining in eQTL data. *Nature Communications*, *15*(1), 522.

Elagib, A. A., Kider, A. O., Akerström, B., & Elbashir, M. I. (1998). Association of the haptoglobin phenotype (1-1) with falciparum malaria in Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *92*(3), 309–311.

Elnour, F. A., Alagib, M. E. A., Bansal, D., Farag, E. A. B. A., & Malik, E. M. (2019). Severe malaria management: current situation, challenges and lessons learned from Gezira State, Sudan. *Malaria Journal*, *18*(1), 170.
Enevold, A., Alifrangis, M., Sanchez, J. J., Carneiro, I., Roper, C., Børsting, C., Lusingu, J., Vestergaard, L. S., Lemnge, M. M., Morling, N., Riley, E., & Drakeley, C. J. (2007). Associations between alpha+-thalassemia and Plasmodium falciparum malarial infection in northeastern Tanzania. *The Journal of Infectious Diseases*, *196*(3), 451–459.
Esoh, K. K., Apinjoh, T. O., Amambua-Ngwa, A., Nyanjom, S. G., Chimusa, E. R., Amenga-Etego, L., Wonkam, A., & Achidi, E. A. (2023). Genome-wide association study identifies novel candidate malaria resistance genes in Cameroon. *Human Molecular Genetics*, *32*(12), 1946–1958.
Falk, N., Kaestli, M., Qi, W., Ott, M., Baea, K., Cortés, A., & Beck, H.-P. (2009). Analysis of Plasmodium falciparum var genes expressed in children from Papua New Guinea. *The Journal of Infectious Diseases*, *200*(3), 347–356.
Fall, A. K. D. J., Dechavanne, C., Sabbagh, A., Guitard, E., Milet, J., Garcia, A., Dugoujon, J.-M., Courtin, D., & Migot-Nabias, F. (2020). Susceptibility to Malaria: Influence of Combined Polymorphisms of IgG3 Gm Allotypes and Fc Gamma Receptors IIA, IIIA, and IIIB. *Frontiers in Immunology*, *11*, 608016.
Fall, A. K. D. J., Kana, I. H., Dechavanne, C., Garcia-Senosiain, A., Guitard, E., Milet, J., Massougbodji, A., Garcia, A., Dugoujon, J.-M., Migot-Nabias, F., Theisen, M., & Courtin, D. (2022). Naturally acquired antibodies from Beninese infants promote Plasmodium falciparum merozoite-phagocytosis by human blood leukocytes: implications for control of asymptomatic malaria infections. *Malaria Journal*, *21*(1), 356.
Fançony, C., Brito, M., & Gil, J. P. (2016). Plasmodium falciparum drug resistance in Angola. *Malaria Journal*, *15*, 74.
Fang, R., Yu, M., Li, G., Chee, S., Liu, T., Schmitt, A. D., & Ren, B. (2016). Mapping of long-range chromatin interactions by proximity ligation-assisted ChIP-seq. *Cell Research*, *26*(12), 1345–1348.
Farrington, L., Vance, H., Rek, J., Prahl, M., Jagannathan, P., Katureebe, A., Arinaitwe, E., Kamya, M. R., Dorsey, G., & Feeney, M. E. (2017). Both inflammatory and regulatory cytokine responses to malaria are blunted with increasing age in highly exposed children. *Malaria Journal*, *16*(1), 499.
Feintuch, C. M., Saidi, A., Seydel, K., Chen, G., Goldman-Yassen, A., Mita-Mendoza, N. K., Kim, R. S., Frenette, P. S., Taylor, T., & Daily, J. P. (2016). Activated Neutrophils Are Associated with Pediatric Cerebral Malaria Vasculopathy in Malawian Children. *MBio*, *7*(1), e01300-15.
Fernandez-Reyes, D., Craig, A. G., Kyes, S. A., Peshu, N., Snow, R. W., Berendt, A. R., Marsh, K., & Newbold, C. I. (1997). A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Human Molecular Genetics*, *6*(8), 1357–1360.
Fernandez-Ruiz, D., Ng, W. Y., Holz, L. E., Ma, J. Z., Zaid, A., Wong, Y. C., Lau, L. S., Mollard, V., Cozijnsen, A., Collins, N., Li, J., Davey, G. M., Kato, Y., Devi, S., Skandari, R., Pauley, M., Manton, J. H., Godfrey, D. I., Braun, A., … Heath, W. R. (2016). Liver-Resident Memory CD8 T Cells Form a Front-Line Defense against Malaria Liver-Stage Infection. *Immunity*, *45*(4), 889–902.
Figueiredo, M. M., Costa, P. A. C., Diniz, S. Q., Henriques, P. M., Kano, F. S., Tada, M. S., Pereira, D. B., Soares, I. S., Martins-Filho, O. A., Jankovic, D., Gazzinelli, R. T., & Antonelli, L. R. do V. (2017). T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during Plasmodium vivax infection. *PLoS Pathogens*, *13*(7), e1006484.
Flatz, G. (1967). Hemoglobin E: distribution and population dynamics. *Humangenetik*, *3*(3), 189–234.
Flint, J., Hill, A. V., Bowden, D. K., Oppenheimer, S. J., Sill, P. R., Serjeantson, S. W., Bana-Koiri, J., Bhatia, K., Alpers, M. P., & Boyce, A. J. (1986). High frequencies of alpha-thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature*, *321*(6072), 744–750.
Flori, L., Delahaye, N. F., Iraqi, F. A., Hernandez-Valladares, M., Fumoux, F., & Rihet, P. (2005). TNF as a malaria candidate gene: polymorphism-screening and family-based association analysis of mild malaria attack and parasitemia in Burkina Faso. *Genes and Immunity*, *6*(6), 472–480.
Flori, L., Kumulungui, B., Aucan, C., Esnault, C., Traoré, A. S., Fumoux, F., & Rihet, P. (2003). Linkage and association between Plasmodium falciparum blood infection levels and chromosome 5q31-q33. *Genes and Immunity*, *4*(4), 265–268.
Fontana, M. F., de Melo, G. L., Anidi, C., Hamburger, R., Kim, C. Y., Lee, S. Y., Pham, J., & Kim, C. C. (2016). Macrophage Colony Stimulating Factor Derived from CD4+ T Cells Contributes to Control of a Blood-Borne Infection. *PLoS Pathogens*, *12*(12), e1006046.
Franke-Fayard, B., Janse, C. J., Cunha-Rodrigues, M., Ramesar, J., Büscher, P., Que, I., Löwik, C., Voshol, P. J., den Boer, M. A. M., van Duinen, S. G., Febbraio, M., Mota, M. M., & Waters, A. P. (2005). Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(32), 11468–11473.
Fresu, L., Dehpour, A., Genazzani, A. A., Carafoli, E., & Guerini, D. (1999). Plasma membrane calcium ATPase isoforms in astrocytes. *Glia*, *28*(2), 150–155.
Frevert, U., Usynin, I., Baer, K., & Klotz, C. (2006). Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cellular Microbiology*, *8*(10), 1537–1546.
Fried, M., Nosten, F., Brockman, A., Brabin, B. J., & Duffy, P. E. (1998). Maternal antibodies block malaria. *Nature*, *395*(6705), 851–852.
Fried, Michal, & Duffy, P. E. (2017). Malaria during Pregnancy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(6). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025551
Fukaya, T., Lim, B., & Levine, M. (2016). Enhancer Control of Transcriptional Bursting. *Cell*, *166*(2), 358–368.

Fullwood, M. J., Liu, M. H., Pan, Y. F., Liu, J., Xu, H., Mohamed, Y. B., Orlov, Y. L., Velkov, S., Ho, A., Mei, P. H., Chew, E. G. Y., Huang, P. Y. H., Welboren, W.-J., Han, Y., Ooi, H. S., Ariyaratne, P. N., Vega, V. B., Luo, Y., Tan, P. Y., … Ruan, Y. (2009). An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature*, *462*(7269), 58–64.

Gai, P. P., van Loon, W., Siegert, K., Wedam, J., Kulkarni, S. S., Rasalkar, R., Boloor, A., Kumar, A., Jain, A., Mahabala, C., Baliga, S., Devi, R., Shenoy, D., Gai, P., & Mockenhaupt, F. P. (2019). Duffy antigen receptor for chemokines gene polymorphisms and malaria in Mangaluru, India. *Malaria Journal*, *18*(1), 328.

Garcia, A., Cot, M., Chippaux, J. P., Ranque, S., Feingold, J., Demenais, F., & Abel, L. (1998). Genetic control of blood infection levels in human malaria: evidence for a complex genetic model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *58*(4), 480–488.

Garcia, A., Marquet, S., Bucheton, B., Hillaire, D., Cot, M., Fievet, N., Dessein, A. J., & Abel, L. (1998). Linkage analysis of blood Plasmodium falciparum levels: interest of the 5q31-q33 chromosome region. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *58*(6), 705–709.

Garcia, André, Milet, J., Courtin, D., Sabbagh, A., Massaro, J. D., Castelli, E. C., Migot-Nabias, F., Favier, B., Rouas-Freiss, N., Donadi, E. A., & Moreau, P. (2013). Association of HLA-G 3'UTR polymorphisms with response to malaria infection: a first insight. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *16*, 263–269.

Garcia, J. E., Puentes, A., & Patarroyo, M. E. (2006). Developmental biology of sporozoite-host interactions in Plasmodium falciparum malaria: implications for vaccine design. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(4), 686–707.

Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., … Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature*, *419*(6906), 498–511.

Gatton, M. L., & Cheng, Q. (2002). Evaluation of the pyrogenic threshold for Plasmodium falciparum malaria in naive individuals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *66*(5), 467–473.

Genetic Linkage. (n.d.). Retrieved January 20, 2025, from https://learn.genetics.utah.edu/content/pigeons/geneticlinkage/

Genton, B., al-Yaman, F., Mgone, C. S., Alexander, N., Paniu, M. M., Alpers, M. P., & Mokela, D. (1995). Ovalocytosis and cerebral malaria. *Nature*, *378*(6557), 564–565.

Ghosh, D., & Stumhofer, J. S. (2021). The spleen: "epicenter" in malaria infection and immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, *110*(4), 753–769.

Gilles, H. M., Fletcher, K. A., Hendrickse, R. G., Lindner, R., Reddy, S., & Allan, N. (1967). Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria. *Lancet (London, England)*, *1*(7482), 138–140.

Gillies, S. D., Morrison, S. L., Oi, V. T., & Tonegawa, S. (1983). A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell*, *33*(3), 717–728.

Gisselbrecht, S. S., Palagi, A., Kurland, J. V., Rogers, J. M., Ozadam, H., Zhan, Y., Dekker, J., & Bulyk, M. L. (2020). Transcriptional Silencers in Drosophila Serve a Dual Role as Transcriptional Enhancers in Alternate Cellular Contexts. *Molecular Cell*, *77*(2), 324-337.e8.

Greene, J. A., Sam-Agudu, N., John, C. C., Opoka, R. O., Zimmerman, P. A., & Kazura, J. W. (2012). Toll-like receptor polymorphisms and cerebral malaria: TLR2 Δ22 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria in a case control study. *Malaria Journal*, *11*, 47.

Grover-Kopec, E. K., Blumenthal, M. B., Ceccato, P., Dinku, T., Omumbo, J. A., & Connor, S. J. (2006). Web-based climate information resources for malaria control in Africa. *Malaria Journal*, *5*, 38.

GTEx Consortium. (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature Genetics*, *45*(6), 580–585.

Gyan, B., Goka, B., Cvetkovic, J. T., Perlmann, H., Lefvert, A.-K., Akanmori, B., & Troye-Blomberg, M. (2002). Polymorphisms in interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist genes and malaria in Ghanaian children. *Scandinavian Journal of Immunology*, *56*(6), 619–622.

Hafalla, J. C. R., Cockburn, I. A., & Zavala, F. (2006). Protective and pathogenic roles of CD8+ T cells during malaria infection. *Parasite Immunology*, *28*(1–2), 15–24.

Haldane, J. B. S. (2010). The rate of mutation of human genes. *Hereditas*, *35*(S1), 267–273.

Hammal, F., de Langen, P., Bergon, A., Lopez, F., & Ballester, B. (2022). ReMap 2022: a database of Human, Mouse, Drosophila and Arabidopsis regulatory regions from an integrative analysis of DNA-binding sequencing experiments. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D316–D325.

Hananantachai, H., Patarapotikul, J., Looareesuwan, S., Ohashi, J., Naka, I., & Tokunaga, K. (2001). Lack of association of -308A/G TNFA promoter and 196R/M TNFR2 polymorphisms with disease severity in Thai adult malaria patients. *American Journal of Medical Genetics*, *102*(4), 391–392.

Handoko, L., Xu, H., Li, G., Ngan, C. Y., Chew, E., Schnapp, M., Lee, C. W. H., Ye, C., Ping, J. L. H., Mulawadi, F., Wong, E., Sheng, J., Zhang, Y., Poh, T., Chan, C. S., Kunarso, G., Shahab, A., Bourque, G., Cacheux-Rataboul, V., … Wei, C.-L. (2011). CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells. *Nature Genetics*, *43*(7), 630–638.

Harrison, T. E., Mørch, A. M., Felce, J. H., Sakoguchi, A., Reid, A. J., Arase, H., Dustin, M. L., & Higgins, M. K. (2020). Structural basis for RIFIN-mediated activation of LILRB1 in malaria. *Nature*, *587*(7833), 309–312.

Hart, G. T., Tran, T. M., Theorell, J., Schlums, H., Arora, G., Rajagopalan, S., Sangala, A. D. J., Welsh, K. J., Traore,

B., Pierce, S. K., Crompton, P. D., Bryceson, Y. T., & Long, E. O. (2019). Adaptive NK cells in people exposed to correlate with protection from malaria. *The Journal of Experimental Medicine*, *216*(6), 1280–1290.
Heintzman, N. D., & Ren, B. (2009). Finding distal regulatory elements in the human genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, *19*(6), 541–549.
Hernandez-Valladares, M., Rihet, P., ole-MoiYoi, O. K., & Iraqi, F. A. (2004). Mapping of a new quantitative trait locus for resistance to malaria in mice by a comparative mapping approach with human Chromosome 5q31-q33. *Immunogenetics*, *56*(2), 115–117.
Herzig, A. F., Clerget-Darpoux, F., & Génin, E. (2022). The False Dawn of Polygenic Risk Scores for Human Disease Prediction. *Journal of Personalized Medicine*, *12*(8). https://doi.org/10.3390/jpm12081266
Hill, A. V. (1992). Malaria resistance genes: a natural selection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *86*(3), 225–226, 232.
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.
Hirayasu, K., Ohashi, J., Kashiwase, K., Hananantachai, H., Naka, I., Ogawa, A., Takanashi, M., Satake, M., Nakajima, K., Parham, P., Arase, H., Tokunaga, K., Patarapotikul, J., & Yabe, T. (2012). Significant association of KIR2DL3-HLA-C1 combination with cerebral malaria and implications for co-evolution of KIR and HLA. *PLoS Pathogens*, *8*(3), e1002565.
Howland, S. W., Poh, C. M., & Rénia, L. (2015). Activated Brain Endothelial Cells Cross-Present Malaria Antigen. *PLoS Pathogens*, *11*(6), e1004963.
Hsieh, T.-H. S., Cattoglio, C., Slobodyanyuk, E., Hansen, A. S., Darzacq, X., & Tjian, R. (2022). Enhancer-promoter interactions and transcription are largely maintained upon acute loss of CTCF, cohesin, WAPL or YY1. *Nature Genetics*, *54*(12), 1919–1932.
Huang, D., & Ovcharenko, I. (2022). Enhancer-silencer transitions in the human genome. *Genome Research*, *32*(3), 437–448.
Huang, H.-C., Chao, C.-C., Wu, P.-H., Chung, H.-Y., Lee, H.-Y., Suen, C.-S., Hwang, M.-J., Cai, B.-H., & Kannagi, R. (2019). Epigenetic silencing of the synthesis of immunosuppressive Siglec ligand glycans by NF-κB/EZH2/YY1 axis in early-stage colon cancers. *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, *1862*(2), 173–183.
Hussain, S., Sadouni, N., van Essen, D., Dao, L. T. M., Ferré, Q., Charbonnier, G., Torres, M., Gallardo, F., Lecellier, C.-H., Sexton, T., Saccani, S., & Spicuglia, S. (2023). Short tandem repeats are important contributors to silencer elements in T cells. *Nucleic Acids Research*, *51*(10), 4845–4866.
Hutagalung, R., Wilairatana, P., Looareesuwan, S., Brittenham, G. M., Aikawa, M., & Gordeuk, V. R. (1999). Influence of hemoglobin E trait on the severity of Falciparum malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(1), 283–286.
Hviid, L., & Jensen, A. T. R. (2015). PfEMP1 - A Parasite Protein Family of Key Importance in Plasmodium falciparum Malaria Immunity and Pathogenesis. *Advances in Parasitology*, *88*, 51–84.
Ibrahim, A. O., Bello, I. S., Ajetunmobi, A. O., Ayodapo, A., Afolabi, B. A., & Adeniyi, M. A. (2023). Prevalence of asymptomatic malaria infection by microscopy and its determinants among residents of Ido-Ekiti, Southwestern Nigeria. *PloS One*, *18*(2), e0280981.
Inoue, S.-I., Niikura, M., Asahi, H., Kawakami, Y., & Kobayashi, F. (2018). γδ T cells modulate humoral immunity against Plasmodium berghei infection. *Immunology*, *155*(4), 519–532.
International HapMap Consortium, Frazer, K. A., Ballinger, D. G., Cox, D. R., Hinds, D. A., Stuve, L. L., Gibbs, R. A., Belmont, J. W., Boudreau, A., Hardenbol, P., Leal, S. M., Pasternak, S., Wheeler, D. A., Willis, T. D., Yu, F., Yang, H., Zeng, C., Gao, Y., Hu, H., … Stewart, J. (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, *449*(7164), 851–861.
Israelsson, E., Ekström, M., Nasr, A., Dolo, A., Kearsley, S., Arambepola, G., Homann, M. V., Maiga, B., Doumbo, O. K., Elghazali, G., Giha, H. A., Troye-Blomberg, M., Berzins, K., & Tornvall, P. (2009). Marked differences in CRP genotype frequencies between the Fulani and sympatric ethnic groups in Africa. *Malaria Journal*, *8*, 136.
Jagannathan, P., Kim, C. C., Greenhouse, B., Nankya, F., Bowen, K., Eccles-James, I., Muhindo, M. K., Arinaitwe, E., Tappero, J. W., Kamya, M. R., Dorsey, G., & Feeney, M. E. (2014). Loss and dysfunction of Vδ2$^+$ γδ T cells are associated with clinical tolerance to malaria. *Science Translational Medicine*, *6*(251), 251ra117.
Jallow, M., Teo, Y. Y., Small, K. S., Rockett, K. A., Deloukas, P., Clark, T. G., Kivinen, K., Bojang, K. A., Conway, D. J., Pinder, M., Sirugo, G., Sisay-Joof, F., Usen, S., Auburn, S., Bumpstead, S. J., Campino, S., Coffey, A., Dunham, A., Fry, A. E., … Malaria Genomic Epidemiology Network. (2009). Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. *Nature Genetics*, *41*(6), 657–665.
Jamrozik, E., de la Fuente-Núñez, V., Reis, A., Ringwald, P., & Selgelid, M. J. (2015). Ethical aspects of malaria control and research. *Malaria Journal*, *14*, 518.
Javierre, B. M., Burren, O. S., Wilder, S. P., Kreuzhuber, R., Hill, S. M., Sewitz, S., Cairns, J., Wingett, S. W., Várnai, C., Thiecke, M. J., Burden, F., Farrow, S., Cutler, A. J., Rehnström, K., Downes, K., Grassi, L., Kostadima, M., Freire-Pritchett, P., Wang, F., … Fraser, P. (2016). Lineage-Specific Genome Architecture Links Enhancers and Non-coding Disease Variants to Target Gene Promoters. *Cell*, *167*(5), 1369-1384.e19.
Jepson, A., Sisay-Joof, F., Banya, W., Hassan-King, M., Frodsham, A., Bennett, S., Hill, A. V., & Whittle, H. (1997). Genetic linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in Gambian children: study of

affected sibling pairs. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *315*(7100), 96–97.
John, C. C., Moormann, A. M., Pregibon, D. C., Sumba, P. O., McHugh, M. M., Narum, D. L., Lanar, D. E., Schluchter, M. D., & Kazura, J. W. (2005). Correlation of high levels of antibodies to multiple pre-erythrocytic Plasmodium falciparum antigens and protection from infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *73*(1), 222–228.
John, C. C., Tande, A. J., Moormann, A. M., Sumba, P. O., Lanar, D. E., Min, X. M., & Kazura, J. W. (2008). Antibodies to pre-erythrocytic Plasmodium falciparum antigens and risk of clinical malaria in Kenyan children. *The Journal of Infectious Diseases*, *197*(4), 519–526.
Joof, F., Hartmann, E., Jarvis, A., Colley, A., Cross, J. H., Avril, M., Prentice, A. M., & Cerami, C. (2023). Genetic variations in human ATP2B4 gene alter Plasmodium falciparum in vitro growth in RBCs from Gambian adults. *Malaria Journal*, *22*(1), 5.
Kadonaga, J. T. (2012). Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *1*(1), 40–51.
Kaestli, M., Cortes, A., Lagog, M., Ott, M., & Beck, H.-P. (2004). Longitudinal assessment of Plasmodium falciparum var gene transcription in naturally infected asymptomatic children in Papua New Guinea. *The Journal of Infectious Diseases*, *189*(10), 1942–1951.
Kanoi, B. N., Nagaoka, H., Morita, M., White, M. T., Palacpac, N. M. Q., Ntege, E. H., Balikagala, B., Yeka, A., Egwang, T. G., Horii, T., Tsuboi, T., & Takashima, E. (2018). Comprehensive analysis of antibody responses to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains. *Vaccine*, *36*(45), 6826–6833.
Kariuki, S. N., Macharia, A. W., Makale, J., Nyamu, W., Hoffman, S. L., Kapulu, M. C., Bejon, P., Rayner, J. C., Williams, T. N., & CHMI-SIKA Study Team. (2023). The Dantu blood group prevents parasite growth : Evidence from a controlled human malaria infection study. *ELife*, *12*. https://doi.org/10.7554/eLife.83874
Kehayova, P., Monahan, K., Chen, W., & Maniatis, T. (2011). Regulatory elements required for the activation and repression of the protocadherin-alpha gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(41), 17195–17200.
Kempaiah, P., Anyona, S. B., Raballah, E., Davenport, G. C., Were, T., Hittner, J. B., Ong'echa, J. M., & Perkins, D. J. (2012). Reduced interferon (IFN)-α conditioned by IFNA2 (-173) and IFNA8 (-884) haplotypes is associated with enhanced susceptibility to severe malarial anemia and longitudinal all-cause mortality. *Human Genetics*, *131*(8), 1375–1391.
Khor, C. C., Chapman, S. J., Vannberg, F. O., Dunne, A., Murphy, C., Ling, E. Y., Frodsham, A. J., Walley, A. J., Kyrieleis, O., Khan, A., Aucan, C., Segal, S., Moore, C. E., Knox, K., Campbell, S. J., Lienhardt, C., Scott, A., Aaby, P., Sow, O. Y., … Hill, A. V. S. (2007). A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nature Genetics*, *39*(4), 523–528.
Kikuchi, M., Looareesuwan, S., Ubalee, R., Tasanor, O., Suzuki, F., Wattanagoon, Y., Na-Bangchang, K., Kimura, A., Aikawa, M., & Hirayama, K. (2001). Association of adhesion molecule PECAM-1/CD31 polymorphism with susceptibility to cerebral malaria in Thais. *Parasitology International*, *50*(4), 235–239.
Kilpinen, H., Waszak, S. M., Gschwind, A. R., Raghav, S. K., Witwicki, R. M., Orioli, A., Migliavacca, E., Wiederkehr, M., Gutierrez-Arcelus, M., Panousis, N. I., Yurovsky, A., Lappalainen, T., Romano-Palumbo, L., Planchon, A., Bielser, D., Bryois, J., Padioleau, I., Udin, G., Thurnheer, S., … Dermitzakis, E. T. (2013). Coordinated effects of sequence variation on DNA binding, chromatin structure, and transcription. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6159), 744–747.
Kimenyi, K. M., Wamae, K., & Ochola-Oyier, L. I. (2019). Understanding Asymptomatic Infections: A Proposition for a Transcriptomic Approach. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2398.
Knight, J. C., Udalova, I., Hill, A. V., Greenwood, B. M., Peshu, N., Marsh, K., & Kwiatkowski, D. (1999). A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nature Genetics*, *22*(2), 145–150.
Koch, O., Rockett, K., Jallow, M., Pinder, M., Sisay-Joof, F., & Kwiatkowski, D. (2005). Investigation of malaria susceptibility determinants in the IFNG/IL26/IL22 genomic region. *Genes and Immunity*, *6*(4), 312–318.
Koch, Oliver, Awomoyi, A., Usen, S., Jallow, M., Richardson, A., Hull, J., Pinder, M., Newport, M., & Kwiatkowski, D. (2002). IFNGR1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to cerebral malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, *185*(11), 1684–1687.
Kongjam, P., Pabalan, N., Tharabenjasin, P., Jarjanazi, H., Chaijaroenkul, W., & Na-Bangchang, K. (2023). Tumor necrosis factor-α (TNF-α) -308G >a promoter polymorphism (rs1800629) promotes Asians in susceptibility to Plasmodium falciparum severe malaria: A meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *17*(11), e0011735.
Korthals, M., Tech, L., Langnaese, K., Gottfried, A., Hradsky, J., Thomas, U., Zenclussen, A. C., Brunner-Weinzierl, M. C., Tedford, K., & Fischer, K.-D. (2021). Plasma membrane Ca ATPase 1 (PMCA1) but not PMCA4 is critical for B-cell development and Ca homeostasis in mice. *European Journal of Immunology*, *51*(3), 594–602.
Koukouikila-Koussounda, F., Ntoumi, F., Ndounga, M., Tong, H. V., Abena, A.-A., & Velavan, T. P. (2013). Genetic evidence of regulatory gene variants of the STAT6, IL10R and FOXP3 locus as a susceptibility factor in uncomplicated malaria and parasitaemia in Congolese children. *Malaria Journal*, *12*, 9.
Krupka, M., Seydel, K., Feintuch, C. M., Yee, K., Kim, R., Lin, C.-Y., Calder, R. B., Petersen, C., Taylor, T., & Daily, J. (2012). Mild Plasmodium falciparum malaria following an episode of severe malaria is associated with

induction of the interferon pathway in Malawian children. *Infection and Immunity*, *80*(3), 1150–1155.
Kumaratilake, L. M., & Ferrante, A. (1992). IL-4 inhibits macrophage-mediated killing of Plasmodium falciparum in vitro. A possible parasite-immune evasion mechanism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *149*(1), 194–199.
Kun, J. F., Mordmüller, B., Lell, B., Lehman, L. G., Luckner, D., & Kremsner, P. G. (1998). Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet*, *351*(9098), 265–266.
Kurup, S. P., Butler, N. S., & Harty, J. T. (2019). T cell-mediated immunity to malaria. *Nature Reviews. Immunology*, *19*(7), 457–471.
Kurup, S. P., Obeng-Adjei, N., Anthony, S. M., Traore, B., Doumbo, O. K., Butler, N. S., Crompton, P. D., & Harty, J. T. (2017). Regulatory T cells impede acute and long-term immunity to blood-stage malaria through CTLA-4. *Nature Medicine*, *23*(10), 1220–1225.
Kwak, K., Sohn, H., George, R., Torgbor, C., Manzella-Lapeira, J., Brzostowski, J., & Pierce, S. K. (2023). B cell responses to membrane-presented antigens require the function of the mechanosensitive cation channel Piezo1. *Science Signaling*, *16*(804), eabq5096.
Kyei-Baafour, E., Kusi, K. A., Arthur, F. K. N., Sarkodie-Addo, T., Theisen, M., Dodoo, D., & Adu, B. (2022). Association of immunoglobulin G3 hinge region length polymorphism with cerebral malaria in Ghanaian children. *The Journal of Infectious Diseases*, *225*(10), 1786–1790.
Kyriacou, H. M., Stone, G. N., Challis, R. J., Raza, A., Lyke, K. E., Thera, M. A., Koné, A. K., Doumbo, O. K., Plowe, C. V., & Rowe, J. A. (2006). Differential var gene transcription in Plasmodium falciparum isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *150*(2), 211–218.
Lander, E., & Kruglyak, L. (1995). Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics*, *11*(3), 241–247.
Lee, H. J., Georgiadou, A., Otto, T. D., Levin, M., Coin, L. J., Conway, D. J., & Cunnington, A. J. (2018). Transcriptomic Studies of Malaria: a Paradigm for Investigation of Systemic Host-Pathogen Interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *82*(2). https://doi.org/10.1128/MMBR.00071-17
Lee, J. C., Espéli, M., Anderson, C. A., Linterman, M. A., Pocock, J. M., Williams, N. J., Roberts, R., Viatte, S., Fu, B., Peshu, N., Hien, T. T., Phu, N. H., Wesley, E., Edwards, C., Ahmad, T., Mansfield, J. C., Gearry, R., Dunstan, S., Williams, T. N., … Smith, K. G. C. (2013). Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell*, *155*(1), 57–69.
Leffler, E. M., Band, G., Busby, G. B. J., Kivinen, K., Le, Q. S., Clarke, G. M., Bojang, K. A., Conway, D. J., Jallow, M., Sisay-Joof, F., Bougouma, E. C., Mangano, V. D., Modiano, D., Sirima, S. B., Achidi, E., Apinjoh, T. O., Marsh, K., Ndila, C. M., Peshu, N., … Malaria Genomic Epidemiology Network. (2017). Resistance to malaria through structural variation of red blood cell invasion receptors. *Science (New York, N.Y.)*, *356*(6343). https://doi.org/10.1126/science.aam6393
Leffler, E. M., Band, G., Jeffreys, A. E., Rowlands, K., Hubbart, C., Bojang, K. A., Conway, D. J., Jallow, M., Sisay-Joof, F., D'Alessandro, U., Ndila, C. M., Macharia, A. W., Marsh, K., Williams, T. N., Kachala, D., Molyneux, M., Nyirongo, V., Taylor, T. E., Rockett, K. A., & Kwiatkowski, D. P. (2024). Large-scale genotyping and meta-analysis of*PIEZO1*short tandem repeat alleles suggest a modest association with malaria susceptibility. In *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2024.06.12.598682
Lengeler, C. (2004). Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2*, CD000363.
Leoratti, F. M. S., Farias, L., Alves, F. P., Suarez-Mútis, M. C., Coura, J. R., Kalil, J., Camargo, E. P., Moraes, S. L., & Ramasawmy, R. (2008). Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, *198*(5), 772–780.
Lessard, S., Gatof, E. S., Beaudoin, M., Schupp, P. G., Sher, F., Ali, A., Prehar, S., Kurita, R., Nakamura, Y., Baena, E., Ledoux, J., Oceandy, D., Bauer, D. E., & Lettre, G. (2017). An erythroid-specific ATP2B4 enhancer mediates red blood cell hydration and malaria susceptibility. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(8), 3065–3074.
Li, J., Hu, J., Xiang, D., Ji, B., Xu, S., Shi, L., & Zhao, S. (2019). KLHL3 single-nucleotide polymorphism is associated with essential hypertension in Chinese Han population. *Medicine*, *98*(20), e15766.
Liang, G., Lin, J. C. Y., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J. C., Nguyen, C. T., Weisenberger, D. J., Egger, G., Takai, D., Gonzales, F. A., & Jones, P. A. (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(19), 7357–7362.
Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B. R., Sabo, P. J., Dorschner, M. O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M. A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L. A., Lander, E. S., & Dekker, J. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, *326*(5950), 289–293.
Liu, C. S. C., Raychaudhuri, D., Paul, B., Chakrabarty, Y., Ghosh, A. R., Rahaman, O., Talukdar, A., & Ganguly, D. (2018). Cutting Edge: Piezo1 Mechanosensors Optimize Human T Cell Activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *200*(4), 1255–1260.
Lohia, R., Allegrini, B., Berry, L., Guizouarn, H., Cerdan, R., Abkarian, M., Douguet, D., Honoré, E., & Wengelnik, K. (2023). Pharmacological activation of PIEZO1 in human red blood cells prevents Plasmodium falciparum invasion. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *80*(5), 124.

Lönnberg, T., Svensson, V., James, K. R., Fernandez-Ruiz, D., Sebina, I., Montandon, R., Soon, M. S. F., Fogg, L. G., Nair, A. S., Liligeto, U., Stubbington, M. J. T., Ly, L.-H., Bagger, F. O., Zwiessele, M., Lawrence, N. D., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Bunn, P. T., Engwerda, C. R., Heath, W. R., … Teichmann, S. A. (2017). Single-cell RNA-seq and computational analysis using temporal mixture modelling resolves Th1/Tfh fate bifurcation in malaria. *Science Immunology*, *2*(9). https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aal2192

Louis-Dit-Picard, H., Barc, J., Trujillano, D., Miserey-Lenkei, S., Bouatia-Naji, N., Pylypenko, O., Beaurain, G., Bonnefond, A., Sand, O., Simian, C., Vidal-Petiot, E., Soukaseum, C., Mandet, C., Broux, F., Chabre, O., Delahousse, M., Esnault, V., Fiquet, B., Houillier, P., … Jeunemaitre, X. (2012). KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. *Nature Genetics*, *44*(4), 456–460, S1-3.

Luger, K., Rechsteiner, T. J., Flaus, A. J., Waye, M. M., & Richmond, T. J. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *Journal of Molecular Biology*, *272*(3), 301–311.

Lyke, K. E., Burges, R., Cissoko, Y., Sangare, L., Dao, M., Diarra, I., Kone, A., Harley, R., Plowe, C. V., Doumbo, O. K., & Sztein, M. B. (2004). Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infection and Immunity*, *72*(10), 5630–5637.

Lyke, K. E., Fernández-Viña, M. A., Cao, K., Hollenbach, J., Coulibaly, D., Kone, A. K., Guindo, A., Burdett, L. A., Hartzman, R. J., Wahl, A. R., Hildebrand, W. H., Doumbo, O. K., Plowe, C. V., & Sztein, M. B. (2011). Association of HLA alleles with Plasmodium falciparum severity in Malian children. *Tissue Antigens*, *77*(6), 562–571.

Ma, S., Cahalan, S., LaMonte, G., Grubaugh, N. D., Zeng, W., Murthy, S. E., Paytas, E., Gamini, R., Lukacs, V., Whitwam, T., Loud, M., Lohia, R., Berry, L., Khan, S. M., Janse, C. J., Bandell, M., Schmedt, C., Wengelnik, K., Su, A. I., … Patapoutian, A. (2018). Common PIEZO1 Allele in African Populations Causes RBC Dehydration and Attenuates Plasmodium Infection. *Cell*, *173*(2), 443-455.e12.

Ma, S., Dubin, A. E., Zhang, Y., Mousavi, S. A. R., Wang, Y., Coombs, A. M., Loud, M., Andolfo, I., & Patapoutian, A. (2021). A role of PIEZO1 in iron metabolism in mice and humans. *Cell*, *184*(4), 969-982.e13.

Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M., & O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *154*(10), 5071–5079.

Mac-Daniel, L., Buckwalter, M. R., Berthet, M., Virk, Y., Yui, K., Albert, M. L., Gueirard, P., & Ménard, R. (2014). Local immune response to injection of Plasmodium sporozoites into the skin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *193*(3), 1246–1257.

Mahanta, A., Kakati, S., & Baruah, S. (2013). The association of IL-8-251T/A polymorphism with complicated malaria in Karbi Anglong district of Assam. *Cytokine*, *65*(2), 210–216.

Malaria Genomic Epidemiology Network. (2019). Insights into malaria susceptibility using genome-wide data on 17,000 individuals from Africa, Asia and Oceania. *Nature Communications*, *10*(1), 5732.

Malaria Genomic Epidemiology Network, Band, G., Rockett, K. A., Spencer, C. C. A., & Kwiatkowski, D. P. (2015). A novel locus of resistance to severe malaria in a region of ancient balancing selection. *Nature*, *526*(7572), 253–257.

Malaria Genomic Epidemiology Network, & Malaria Genomic Epidemiology Network. (2014). Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study. *Nature Genetics*, *46*(11), 1197–1204.

Malfait, J., Wan, J., & Spicuglia, S. (2023). Epromoters are new players in the regulatory landscape with potential pleiotropic roles. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *45*(10), e2300012.

Mangano, V. D., Luoni, G., Rockett, K. A., Sirima, B. S., Konaté, A., Forton, J., Clark, T. G., Bancone, G., Sadighi Akha, E., Kwiatkowski, D. P., & Modiano, D. (2008). Interferon regulatory factor-1 polymorphisms are associated with the control of Plasmodium falciparum infection. *Genes and Immunity*, *9*(2), 122–129.

Manjurano, A., Sepulveda, N., Nadjm, B., Mtove, G., Wangai, H., Maxwell, C., Olomi, R., Reyburn, H., Riley, E. M., Drakeley, C. J., Clark, T. G., & MalariaGEN Consortium. (2015). African glucose-6-phosphate dehydrogenase alleles associated with protection from severe malaria in heterozygous females in Tanzania. *PLoS Genetics*, *11*(2), e1004960.

Manning, L., Cutts, J., Stanisic, D. I., Laman, M., Carmagnac, A., Allen, S., O'Donnell, A., Karunajeewa, H., Rosanas-Urgell, A., Siba, P., Davis, T. M. E., Michon, P., Schofield, L., Rockett, K., Kwiatkowski, D., & Mueller, I. (2016). A Toll-like receptor-1 variant and its characteristic cellular phenotype is associated with severe malaria in Papua New Guinean children. *Genes and Immunity*, *17*(1), 52–59.

Marquet, S., Doumbo, O., Cabantous, S., Poudiougou, B., Argiro, L., Safeukui, I., Konate, S., Sissoko, S., Chevereau, E., Traore, A., Keita, M. M., Chevillard, C., Abel, L., & Dessein, A. J. (2008). A functional promoter variant in IL12B predisposes to cerebral malaria. *Human Molecular Genetics*, *17*(14), 2190–2195.

Marsh, K., Forster, D., Waruiru, C., Mwangi, I., Winstanley, M., Marsh, V., Newton, C., Winstanley, P., Warn, P., & Peshu, N. (1995). Indicators of life-threatening malaria in African children. *The New England Journal of Medicine*, *332*(21), 1399–1404.

Martin, A. R., Gignoux, C. R., Walters, R. K., Wojcik, G. L., Neale, B. M., Gravel, S., Daly, M. J., Bustamante, C. D., & Kenny, E. E. (2017). Human Demographic History Impacts Genetic Risk Prediction across Diverse

Populations. *American Journal of Human Genetics*, *100*(4), 635–649.
Mastelic, B., do Rosario, A. P. F., Veldhoen, M., Renauld, J. C., Jarra, W., Sponaas, A.-M., Roetynck, S., Stockinger, B., & Langhorne, J. (2012). IL-22 Protects Against Liver Pathology and Lethality of an Experimental Blood-Stage Malaria Infection. *Frontiers in Immunology*, *3*, 85.
May, J., Evans, J. A., Timmann, C., Ehmen, C., Busch, W., Thye, T., Agbenyega, T., & Horstmann, R. D. (2007). Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. *JAMA*, *297*(20), 2220–2226.
Mayer, D. C. G., Cofie, J., Jiang, L., Hartl, D. L., Tracy, E., Kabat, J., Mendoza, L. H., & Miller, L. H. (2009). Glycophorin B is the erythrocyte receptor of Plasmodium falciparum erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(13), 5348–5352.
McGuire, W., Hill, A. V., Allsopp, C. E., Greenwood, B. M., & Kwiatkowski, D. (1994). Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*, *371*(6497), 508–510.
McGuire, W., Knight, J. C., Hill, A. V., Allsopp, C. E., Greenwood, B. M., & Kwiatkowski, D. (1999). Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(1), 287–290.
McVicker, G., van de Geijn, B., Degner, J. F., Cain, C. E., Banovich, N. E., Raj, A., Lewellen, N., Myrthil, M., Gilad, Y., & Pritchard, J. K. (2013). Identification of genetic variants that affect histone modifications in human cells. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6159), 747–749.
Megnekou, R., Staalsoe, T., Taylor, D. W., Leke, R., & Hviid, L. (2005). Effects of pregnancy and intensity of Plasmodium falciparum transmission on immunoglobulin G subclass responses to variant surface antigens. *Infection and Immunity*, *73*(7), 4112–4118.
Mekonen, B., Dugassa, S., Feleke, S. M., Dufera, B., Gidisa, B., Adamu, A., Mandefro, A., Tasew, G., & Golassa, L. (2024). Widespread pfhrp2/3 deletions and HRP2-based false-negative results in southern Ethiopia. *Malaria Journal*, *23*(1), 108.
Meng, X.-H., Xiao, H.-M., & Deng, H.-W. (2021). Combining artificial intelligence: deep learning with Hi-C data to predict the functional effects of non-coding variants. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *37*(10), 1339–1344.
Merino-Wong, M., Niemeyer, B. A., & Alansary, D. (2021). Plasma Membrane Calcium ATPase Regulates Stoichiometry of CD4 T-Cell Compartments. *Frontiers in Immunology*, *12*, 687242.
Merkenschlager, M., & Nora, E. P. (2016). CTCF and Cohesin in Genome Folding and Transcriptional Gene Regulation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *17*, 17–43.
Meyer, C. G., May, J., Luty, A. J., Lell, B., & Kremsner, P. G. (2002). TNFalpha-308A associated with shorter intervals of Plasmodium falciparum reinfections. *Tissue Antigens*, *59*(4), 287–292.
Meyer, Christian G., Calixto Fernandes, M. H., Intemann, C. D., Kreuels, B., Kobbe, R., Kreuzberg, C., Ayim, M., Ruether, A., Loag, W., Ehmen, C., Adjei, S., Adjei, O., Horstmann, R. D., & May, J. (2011). IL3 variant on chromosomal region 5q31-33 and protection from recurrent malaria attacks. *Human Molecular Genetics*, *20*(6), 1173–1181.
Mifsud, B., Tavares-Cadete, F., Young, A. N., Sugar, R., Schoenfelder, S., Ferreira, L., Wingett, S. W., Andrews, S., Grey, W., Ewels, P. A., Herman, B., Happe, S., Higgs, A., LeProust, E., Follows, G. A., Fraser, P., Luscombe, N. M., & Osborne, C. S. (2015). Mapping long-range promoter contacts in human cells with high-resolution capture Hi-C. *Nature Genetics*, *47*(6), 598–606.
Milet, J., Boland, A., Luisi, P., Sabbagh, A., Sadissou, I., Sonon, P., Domingo, N., Palstra, F., Gineau, L., Courtin, D., Massougbodji, A., Garcia, A., Deleuze, J.-F., & Perdry, H. (2019). First genome-wide association study of non-severe malaria in two birth cohorts in Benin. *Human Genetics*, *138*(11–12), 1341–1357.
Milet, J., Nuel, G., Watier, L., Courtin, D., Slaoui, Y., Senghor, P., Migot-Nabias, F., Gaye, O., & Garcia, A. (2010). Genome wide linkage study, using a 250K SNP map, of Plasmodium falciparum infection and mild malaria attack in a Senegalese population. *PloS One*, *5*(7), e11616.
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.
Mockenhaupt, F. P., Cramer, J. P., Hamann, L., Stegemann, M. S., Eckert, J., Oh, N.-R., Otchwemah, R. N., Dietz, E., Ehrhardt, S., Schröder, N. W. J., Bienzle, U., & Schumann, R. R. (2005). Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(1), 177–182.
Mockenhaupt, F. P., Ehrhardt, S., Gellert, S., Otchwemah, R. N., Dietz, E., Anemana, S. D., & Bienzle, U. (2004). Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria. *Blood*, *104*(7), 2003–2006.
Mockenhaupt, F. P., Hamann, L., von Gaertner, C., Bedu-Addo, G., von Kleinsorgen, C., Schumann, R. R., & Bienzle, U. (2006). Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. *The Journal of Infectious Diseases*, *194*(2), 184–188.
Modiano, D., Luoni, G., Sirima, B. S., Simporé, J., Verra, F., Konaté, A., Rastrelli, E., Olivieri, A., Calissano, C., Paganotti, G. M., D'Urbano, L., Sanou, I., Sawadogo, A., Modiano, G., & Coluzzi, M. (2001). Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. *Nature*, *414*(6861), 305–308.
Mohammadkhani, M., Khanjani, N., Bakhtiari, B., & Sheikhzadeh, K. (2016). The relation between climatic factors and malaria incidence in Kerman, South East of Iran. *Parasite Epidemiology and Control*, *1*(3), 205–210.
Montagna, G. N., Biswas, A., Hildner, K., Matuschewski, K., & Dunay, I. R. (2015). Batf3 deficiency proves the pivotal role of CD8α dendritic cells in protection induced by vaccination with attenuated Plasmodium sporozoites. *Parasite Immunology*, *37*(10), 533–543.
Morahan, G., Boutlis, C. S., Huang, D., Pain, A., Saunders, J. R., Hobbs, M. R., Granger, D. L., Weinberg, J. B.,

Peshu, N., Mwaikambo, E. D., Marsh, K., Roberts, D. J., & Anstey, N. M. (2002). A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production. *Genes and Immunity*, *3*(7), 414–418.

Morrell, C. N., Srivastava, K., Swaim, A., Lee, M. T., Chen, J., Nagineni, C., Hooks, J. J., & Detrick, B. (2011). Beta interferon suppresses the development of experimental cerebral malaria. *Infection and Immunity*, *79*(4), 1750–1758.

Morton, N. E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *American Journal of Human Genetics*, *7*(3), 277–318.

Multini, L. C., de Souza, A. L. da S., Marrelli, M. T., & Wilke, A. B. B. (2020). The influence of anthropogenic habitat fragmentation on the genetic structure and diversity of the malaria vector Anopheles cruzii (Diptera: Culicidae). *Scientific Reports*, *10*(1), 18018.

Mumbach, M. R., Rubin, A. J., Flynn, R. A., Dai, C., Khavari, P. A., Greenleaf, W. J., & Chang, H. Y. (2016). HiChIP: efficient and sensitive analysis of protein-directed genome architecture. *Nature Methods*, *13*(11), 919–922.

Nagao, T., Uemura, H., Yanagi, T., Oishi, K., Nagatake, T., & Kanbara, H. (1996). Loss of tumor necrosis factor production by human monocytes in falciparum malaria after their maturation in vitro. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *55*(5), 562–566.

Nagel, R. L., & Roth, E. F., Jr. (1989). Malaria and red cell genetic defects. *Blood*, *74*(4), 1213–1221.

Nagelkerke, S. Q., Bruggeman, C. W., den Haan, J. M. M., Mul, E. P. J., van den Berg, T. K., van Bruggen, R., & Kuijpers, T. W. (2018). Red pulp macrophages in the human spleen are a distinct cell population with a unique expression of Fc-γ receptors. *Blood Advances*, *2*(8), 941–953.

Nagelkerke, S. Q., Schmidt, D. E., de Haas, M., & Kuijpers, T. W. (2019). Genetic Variation in Low-To-Medium-Affinity Fcγ Receptors: Functional Consequences, Disease Associations, and Opportunities for Personalized Medicine. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2237.

Naka, I., Nishida, N., Patarapotikul, J., Nuchnoi, P., Tokunaga, K., Hananantachai, H., Tsuchiya, N., & Ohashi, J. (2009). Identification of a haplotype block in the 5q31 cytokine gene cluster associated with the susceptibility to severe malaria. *Malaria Journal*, *8*, 232.

Naka, I., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Imai, H., & Ohashi, J. (2014). Association of the endothelial protein C receptor (PROCR) rs867186-G allele with protection from severe malaria. *Malaria Journal*, *13*, 105.

Nasr, A., Iriemenam, N. C., Giha, H. A., Balogun, H. A., Anders, R. F., Troye-Blomberg, M., ElGhazali, G., & Berzins, K. (2009). FcgammaRIIa (CD32) polymorphism and anti-malarial IgG subclass pattern among Fulani and sympatric ethnic groups living in eastern Sudan. *Malaria Journal*, *8*, 43.

Natama, H. M., Rovira-Vallbona, E., Krit, M., Guetens, P., Sorgho, H., Somé, M. A., Traoré-Coulibaly, M., Valéa, I., Mens, P. F., Schallig, H. D. F. H., Berkvens, D., Kestens, L., Tinto, H., & Rosanas-Urgell, A. (2021). Genetic variation in the immune system and malaria susceptibility in infants: a nested case-control study in Nanoro, Burkina Faso. *Malaria Journal*, *20*(1), 94.

Ndila, C. M., Uyoga, S., Macharia, A. W., Nyutu, G., Peshu, N., Ojal, J., Shebe, M., Awuondo, K. O., Mturi, N., Tsofa, B., Sepúlveda, N., Clark, T. G., Band, G., Clarke, G., Rowlands, K., Hubbart, C., Jeffreys, A., Kariuki, S., Marsh, K., … MalariaGEN Consortium. (2018). Human candidate gene polymorphisms and risk of severe malaria in children in Kilifi, Kenya: a case-control association study. *The Lancet. Haematology*, *5*(8), e333–e345.

Neuberger, M. S. (1983). Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. *The EMBO Journal*, *2*(8), 1373–1378.

Nguetse, C. N., Purington, N., Ebel, E. R., Shakya, B., Tetard, M., Kremsner, P. G., Velavan, T. P., & Egan, E. S. (2020). A common polymorphism in the mechanosensitive ion channel is associated with protection from severe malaria in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(16), 9074–9081.

Nguyen, T. N., Baaklini, S., Koukouikila-Koussounda, F., Ndounga, M., Torres, M., Pradel, L., Ntoumi, F., & Rihet, P. (2017). Association of a functional TNF variant with Plasmodium falciparum parasitaemia in a congolese population. *Genes and Immunity*, *18*(3), 152–157.

Nisar, S., Torres, M., Thiam, A., Pouvelle, B., Rosier, F., Gallardo, F., Ka, O., Mbengue, B., Diallo, R. N., Brosseau, L., Spicuglia, S., Dieye, A., Marquet, S., & Rihet, P. (2022). Identification of Regulatory Element Containing Functional Genetic Variants Associated with Severe Malaria. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9). https://doi.org/10.3390/ijms23094849

Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., van Berkum, N. L., Meisig, J., Sedat, J., Gribnau, J., Barillot, E., Blüthgen, N., Dekker, J., & Heard, E. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature*, *485*(7398), 381–385.

Norman, P. J., Hollenbach, J. A., Nemat-Gorgani, N., Guethlein, L. A., Hilton, H. G., Pando, M. J., Koram, K. A., Riley, E. M., Abi-Rached, L., & Parham, P. (2013). Co-evolution of human leukocyte antigen (HLA) class I ligands with killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in a genetically diverse population of sub-Saharan Africans. *PLoS Genetics*, *9*(10), e1003938.

Nussenzweig, R. S., Vanderberg, J., Most, H., & Orton, C. (1967). Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. *Nature*, *216*(5111), 160–162.

Oakley, M. S., Sahu, B. R., Lotspeich-Cole, L., Majam, V., Thao Pham, P., Sengupta Banerjee, A., Kozakai, Y., Morris, S. L., & Kumar, S. (2014). T-bet modulates the antibody response and immune protection during murine malaria. *European Journal of Immunology*, *44*(9), 2680–2691.

Oakley, M. S., Sahu, B. R., Lotspeich-Cole, L., Solanki, N. R., Majam, V., Pham, P. T., Banerjee, R., Kozakai, Y.,

Derrick, S. C., Kumar, S., & Morris, S. L. (2013). The transcription factor T-bet regulates parasitemia and promotes pathogenesis during Plasmodium berghei ANKA murine malaria. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *191*(9), 4699–4708.

Obeng-Adjei, N., Portugal, S., Holla, P., Li, S., Sohn, H., Ambegaonkar, A., Skinner, J., Bowyer, G., Doumbo, O. K., Traore, B., Pierce, S. K., & Crompton, P. D. (2017). Malaria-induced interferon-γ drives the expansion of Tbethi atypical memory B cells. *PLoS Pathogens*, *13*(9), e1006576.

Ockenhouse, C. F., Hu, W.-C., Kester, K. E., Cummings, J. F., Stewart, A., Heppner, D. G., Jedlicka, A. E., Scott, A. L., Wolfe, N. D., Vahey, M., & Burke, D. S. (2006). Common and divergent immune response signaling pathways discovered in peripheral blood mononuclear cell gene expression patterns in presymptomatic and clinically apparent malaria. *Infection and Immunity*, *74*(10), 5561–5573.

Ofori, E. A., Garcia-Senosiain, A., Naghizadeh, M., Kana, I. H., Dziegiel, M. H., Adu, B., Singh, S., & Theisen, M. (2023). Human blood neutrophils generate ROS through FcγR-signaling to mediate protection against febrile P. falciparum malaria. *Communications Biology*, *6*(1), 743.

Ohno, S. (1972). So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symposia in Biology*, *23*, 366–370.

Omi, K., Ohashi, J., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Naka, I., Looareesuwan, S., & Tokunaga, K. (2002). Fcgamma receptor IIA and IIIB polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. *Parasitology International*, *51*(4), 361–366.

Omi, K., Ohashi, J., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Naka, I., Looareesuwan, S., & Tokunaga, K. (2003). CD36 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria. *American Journal of Human Genetics*, *72*(2), 364–374.

Onyango, C. O., Cheng, Q., Munde, E. O., Raballah, E., Anyona, S. B., McMahon, B. H., Lambert, C. G., Onyango, P. O., Schneider, K. A., Perkins, D. J., & Ouma, C. (2023). Human NCR3 gene variants rs2736191 and rs11575837 alter longitudinal risk for development of pediatric malaria episodes and severe malarial anemia. *BMC Genomics*, *24*(1), 542.

Pagnier, J., Mears, J. G., Dunda-Belkhodja, O., Schaefer-Rego, K. E., Beldjord, C., Nagel, R. L., & Labie, D. (1984). Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(6), 1771–1773.

Pain, A., Urban, B. C., Kai, O., Casals-Pascual, C., Shafi, J., Marsh, K., & Roberts, D. J. (2001). A non-sense mutation in Cd36 gene is associated with protection from severe malaria. *Lancet (London, England)*, *357*(9267), 1502–1503.

Pance, A., Ng, B. L., Mwikali, K., Koutsourakis, M., Agu, C., Rouhani, F. J., Montandon, R., Law, F., Ponstingl, H., & Rayner, J. C. (2023). Novel stem cell technologies are powerful tools to understand the impact of human factors on malaria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1287355.

Paton, R. S., Kamau, A., Akech, S., Agweyu, A., Ogero, M., Mwandawiro, C., Mturi, N., Mohammed, S., Mpimbaza, A., Kariuki, S., Otieno, N. A., Nyawanda, B. O., Mohamed, A. F., Mtove, G., Reyburn, H., Gupta, S., Bejon, P., Lourenço, J., & Snow, R. W. (2021). Malaria infection and severe disease risks in Africa. *Science (New York, N.Y.)*, *373*(6557), 926–931.

Paul, P., van den Hoorn, T., Jongsma, M. L. M., Bakker, M. J., Hengeveld, R., Janssen, L., Cresswell, P., Egan, D. A., van Ham, M., Ten Brinke, A., Ovaa, H., Beijersbergen, R. L., Kuijl, C., & Neefjes, J. (2011). A Genome-wide multidimensional RNAi screen reveals pathways controlling MHC class II antigen presentation. *Cell*, *145*(2), 268–283.

Penha-Gonçalves, C. (2019). Genetics of Malaria Inflammatory Responses: A Pathogenesis Perspective. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1771.

Perez-Mazliah, D., & Langhorne, J. (2014). CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. *Frontiers in Immunology*, *5*, 671.

Perkins, D. J., Weinberg, J. B., & Kremsner, P. G. (2000). Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *The Journal of Infectious Diseases*, *182*(3), 988–992.

Perkins, Douglas J., Were, T., Davenport, G. C., Kempaiah, P., Hittner, J. B., & Ong'echa, J. M. (2011). Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *International Journal of Biological Sciences*, *7*(9), 1427–1442.

Phillips, R. E., & Pasvol, G. (1992). Anaemia of Plasmodium falciparum malaria. *Bailliere's Clinical Haematology*, *5*(2), 315–330.

Piel, F. B., & Weatherall, D. J. (2014). The α-thalassemias. *The New England Journal of Medicine*, *371*(20), 1908–1916.

Pihen, P. A. (n.d.). *Bientôt la fin du paludisme ?* Retrieved January 16, 2025, from https://www.epsiloon.com/tous-les-numeros/n3/bientot_la_fin_du_paludisme/

Pradel, G., & Frevert, U. (2001). Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *33*(5), 1154–1165.

Radtke, A. J., Kastenmüller, W., Espinosa, D. A., Gerner, M. Y., Tse, S.-W., Sinnis, P., Germain, R. N., Zavala, F. P., & Cockburn, I. A. (2015). Lymph-node resident CD8α+ dendritic cells capture antigens from migratory malaria sporozoites and induce CD8+ T cell responses. *PLoS Pathogens*, *11*(2), e1004637.

Rani, A., Nawaz, S. K., Arshad, M., & Irfan, S. (2018). Role of rs4986790 Polymorphism of Gene in Susceptibility towards Malaria Infection in the Pakistani Population. *Iranian Journal of Public Health*, *47*(5), 735–741.

Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., Sanborn, A. L., Machol, I., Omer, A. D., Lander, E. S., & Aiden, E. L. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase

resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, *159*(7), 1665–1680.
Ravenhall, M., Campino, S., Sepúlveda, N., Manjurano, A., Nadjm, B., Mtove, G., Wangai, H., Maxwell, C., Olomi, R., Reyburn, H., Drakeley, C. J., Riley, E. M., Clark, T. G., & MalariaGEN. (2018). Novel genetic polymorphisms associated with severe malaria and under selective pressure in North-eastern Tanzania. *PLoS Genetics*, *14*(1), e1007172.
Razakandrainibe, R., Pelleau, S., Grau, G. E., & Jambou, R. (2012). Antigen presentation by endothelial cells: what role in the pathophysiology of malaria? *Trends in Parasitology*, *28*(4), 151–160.
Reiner, R. C., Jr, Geary, M., Atkinson, P. M., Smith, D. L., & Gething, P. W. (2015). Seasonality of Plasmodium falciparum transmission: a systematic review. *Malaria Journal*, *14*, 343.
Rénia, L., Grau, G. E., & Wassmer, S. C. (2020). CD8+ T cells and human cerebral malaria: a shifting episteme [Review of *CD8+ T cells and human cerebral malaria: a shifting episteme*]. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(3), 1109–1111.
Rieckmann, K. H., Beaudoin, R. L., Cassells, J. S., & Sell, K. W. (1979). Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bulletin of the World Health Organization*, *57 Suppl 1*(Suppl), 261–265.
Riggle, B. A., Manglani, M., Maric, D., Johnson, K. R., Lee, M.-H., Neto, O. L. A., Taylor, T. E., Seydel, K. B., Nath, A., Miller, L. H., McGavern, D. B., & Pierce, S. K. (2020). CD8+ T cells target cerebrovasculature in children with cerebral malaria. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(3), 1128–1138.
Rihet, P., Abel, L., Traoré, Y., Traoré-Leroux, T., Aucan, C., & Fumoux, F. (1998). Human malaria: segregation analysis of blood infection levels in a suburban area and a rural area in Burkina Faso. *Genetic Epidemiology*, *15*(5), 435–450.
Rihet, P., Traoré, Y., Abel, L., Aucan, C., Traoré-Leroux, T., & Fumoux, F. (1998). Malaria in humans: Plasmodium falciparum blood infection levels are linked to chromosome 5q31-q33. *American Journal of Human Genetics*, *63*(2), 498–505.
Rivera-Correa, J., Guthmiller, J. J., Vijay, R., Fernandez-Arias, C., Pardo-Ruge, M. A., Gonzalez, S., Butler, N. S., & Rodriguez, A. (2017). Plasmodium DNA-mediated TLR9 activation of T-bet B cells contributes to autoimmune anaemia during malaria. *Nature Communications*, *8*(1), 1282.
Rodríguez, L. E., Curtidor, H., Ocampo, M., Garcia, J., Puentes, A., Valbuena, J., Vera, R., López, R., & Patarroyo, M. E. (2005). Identifying Plasmodium falciparum merozoite surface antigen 3 (MSP3) protein peptides that bind specifically to erythrocytes and inhibit merozoite invasion. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *14*(7), 1778–1786.
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.
Rottmann, M., Lavstsen, T., Mugasa, J. P., Kaestli, M., Jensen, A. T. R., Müller, D., Theander, T., & Beck, H.-P. (2006). Differential expression of var gene groups is associated with morbidity caused by Plasmodium falciparum infection in Tanzanian children. *Infection and Immunity*, *74*(7), 3904–3911.
Rowe, J. A., Moulds, J. M., Newbold, C. I., & Miller, L. H. (1997). P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, *388*(6639), 292–295.
Rowe, J. A., Raza, A., Diallo, D. A., Baby, M., Poudiougo, B., Coulibaly, D., Cockburn, I. A., Middleton, J., Lyke, K. E., Plowe, C. V., Doumbo, O. K., & Moulds, J. M. (2002). Erythrocyte CR1 expression level does not correlate with a HindIII restriction fragment length polymorphism in Africans; implications for studies on malaria susceptibility. *Genes and Immunity*, *3*(8), 497–500.
Rowe, J. Alexandra, Handel, I. G., Thera, M. A., Deans, A.-M., Lyke, K. E., Koné, A., Diallo, D. A., Raza, A., Kai, O., Marsh, K., Plowe, C. V., Doumbo, O. K., & Moulds, J. M. (2007). Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(44), 17471–17476.
RTS,S Clinical Trials Partnership. (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet (London, England)*, *386*(9988), 31–45.
Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., & Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *21*(5), 331–344.
Sabeti, P., Usen, S., Farhadian, S., Jallow, M., Doherty, T., Newport, M., Pinder, M., Ward, R., & Kwiatkowski, D. (2002). CD40L association with protection from severe malaria. *Genes and Immunity*, *3*(5), 286–291.
Sachs, J., & Malaney, P. (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature*, *415*(6872), 680–685.
Sakoguchi, A., Saito, F., Hirayasu, K., Shida, K., Matsuoka, S., Itagaki, S., Nakai, W., Kohyama, M., Suenaga, T., Iwanaga, S., Horii, T., & Arase, H. (2021). Plasmodium falciparum RIFIN is a novel ligand for inhibitory immune receptor LILRB2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *548*, 167–173.
Sakuntabhai, A., Ndiaye, R., Casadémont, I., Peerapittayamongkol, C., Rogier, C., Tortevoye, P., Tall, A., Paul, R., Turbpaiboon, C., Phimpraphi, W., Trape, J.-F., Spiegel, A., Heath, S., Mercereau-Puijalon, O., Dieye, A., & Julier, C. (2008). Genetic determination and linkage mapping of Plasmodium falciparum malaria related traits in Senegal. *PloS One*, *3*(4), e2000.
Sanborn, A. L., Rao, S. S. P., Huang, S.-C., Durand, N. C., Huntley, M. H., Jewett, A. I., Bochkov, I. D., Chinnappan, D., Cutkosky, A., Li, J., Geeting, K. P., Gnirke, A., Melnikov, A., McKenna, D., Stamenova, E. K., Lander, E. S., & Aiden, E. L. (2015). Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

of America, *112*(47), E6456-65.
Sandquist, I., & Kolls, J. (2018). Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Research*, *7*, 205.
Sarangi, S., Nahak, S. K., Padhi, S., Nayak, N., Pradhan, B., Pati, A., Panigrahi, J., & Panda, A. K. (2023). TNF-α promoter variant (G-308A) is associated with susceptibility to infection and severe malaria: a meta-analysis and trial sequential analysis. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, *42*(5), 381–397.
Schoenfelder, S., Furlan-Magaril, M., Mifsud, B., Tavares-Cadete, F., Sugar, R., Javierre, B.-M., Nagano, T., Katsman, Y., Sakthidevi, M., Wingett, S. W., Dimitrova, E., Dimond, A., Edelman, L. B., Elderkin, S., Tabbada, K., Darbo, E., Andrews, S., Herman, B., Higgs, A., … Fraser, P. (2015). The pluripotent regulatory circuitry connecting promoters to their long-range interacting elements. *Genome Research*, *25*(4), 582–597.
Seasonal Climatic Suitability for Malaria Transmission. (n.d.). Retrieved January 16, 2025, from https://iridl.ldeo.columbia.edu/maproom/Health/Regional/Africa/Malaria/CSMT/index.html
Sebina, I., Fogg, L. G., James, K. R., Soon, M. S. F., Akter, J., Thomas, B. S., Hill, G. R., Engwerda, C. R., & Haque, A. (2017). IL-6 promotes CD4 T-cell and B-cell activation during Plasmodium infection. *Parasite Immunology*, *39*(10). https://doi.org/10.1111/pim.12455
Sebina, Ismail, James, K. R., Soon, M. S. F., Fogg, L. G., Best, S. E., Labastida Rivera, F. de, Montes de Oca, M., Amante, F. H., Thomas, B. S., Beattie, L., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Smyth, M. J., Hertzog, P. J., Hill, G. R., Hutloff, A., Engwerda, C. R., & Haque, A. (2016). IFNAR1-Signalling Obstructs ICOS-mediated Humoral Immunity during Non-lethal Blood-Stage Plasmodium Infection. *PLoS Pathogens*, *12*(11), e1005999.
Seydel, K. B., Kampondeni, S. D., Valim, C., Potchen, M. J., Milner, D. A., Muwalo, F. W., Birbeck, G. L., Bradley, W. G., Fox, L. L., Glover, S. J., Hammond, C. A., Heyderman, R. S., Chilingulo, C. A., Molyneux, M. E., & Taylor, T. E. (2015). Brain swelling and death in children with cerebral malaria. *The New England Journal of Medicine*, *372*(12), 1126–1137.
Shabani, E., Hanisch, B., Opoka, R. O., Lavstsen, T., & John, C. C. (2017). Plasmodium falciparum EPCR-binding PfEMP1 expression increases with malaria disease severity and is elevated in retinopathy negative cerebral malaria. *BMC Medicine*, *15*(1), 183.
Shan, Y., Guo, X., Zhang, M., Chen, M., Li, Y., Zhang, M., & Pei, D. (2024). Structure of human PIEZO1 and its slow inactivating channelopathy mutants. In *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2024.07.14.603468
Shapiro, M. J., Nguyen, C. T., Aghajanian, H., Zhang, W., & Shapiro, V. S. (2008). Negative regulation of TCR signaling by linker for activation of X cells via phosphotyrosine-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of Immunology*, *181*(10), 7055–7061.
Sharma, L., & Shukla, G. (2017). Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. *Frontiers in Medicine*, *4*, 117.
Shi, Y. P., Nahlen, B. L., Kariuki, S., Urdahl, K. B., McElroy, P. D., Roberts, J. M., & Lal, A. A. (2001). Fcgamma receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with protection of infants against high-density Plasmodium falciparum infection. VII. Asembo Bay Cohort Project. *The Journal of Infectious Diseases*, *184*(1), 107–111.
Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G., Paul, W. E., & Ihle, J. N. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*, *380*(6575), 630–633.
Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B., & de Laat, W. (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nature Genetics*, *38*(11), 1348–1354.
Smith, J. D., Craig, A. G., Kriek, N., Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagan, 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 of the United States of America*, *97*(4), 1766–1771.
Smith, J. D., Kyes, S., Craig, A. G., Fagan, T., Hudson-Taylor, D., Miller, L. H., Baruch, D. I., & Newbold, C. I. (1998). Analysis of adhesive domains from the A4VAR Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1 identifies a CD36 binding domain. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *97*(1–2), 133–148.
Smith, T. G., Ayi, K., Serghides, L., Mcallister, C. D., & Kain, K. C. (2002). Innate immunity to malaria caused by Plasmodium falciparum. *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique et Experimentale*, *25*(6), 262–272.
Sobota, R. S., Dara, A., Manning, J. E., Niangaly, A., Bailey, J. A., Kone, A. K., Thera, M. A., Djimdé, A. A., Vernet, G., Leissner, P., Williams, S. M., Plowe, C. V., & Doumbo, O. K. (2016). Expression of complement and toll-like receptor pathway genes is associated with malaria severity in Mali: a pilot case control study. *Malaria Journal*, *15*, 150.
Sonon, P., Tokplonou, L., Sadissou, I., M'po, K. K. G., Glitho, S. S. C., Agniwo, P., Ibikounlé, M., Souza, A. S., Massaro, J. D., Gonzalez, D., Tchégninougbo, T., Ayitchédji, A., Massougbodji, A., Moreau, P., Garcia, A., Milet, J., Sabbagh, A., Mendes-Junior, C. T., Moutairou, K. A., … Donadi, E. A. (2021). Human leukocyte antigen (HLA)-F and -G gene polymorphisms and haplotypes are associated with malaria susceptibility in the Beninese Toffin children. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *92*, 104828.
Spielman, R. S., McGinnis, R. E., & Ewens, W. J. (1993). Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin

gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *American Journal of Human Genetics*, *52*(3), 506–516.
Spring, M., Polhemus, M., & Ockenhouse, C. (2014). Controlled human malaria infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *209 Suppl 2*, S40-5.
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.
Suh, P. F., Elanga-Ndille, E., Tchouakui, M., Sandeu, M. M., Tagne, D., Wondji, C., & Ndo, C. (2023). Impact of insecticide resistance on malaria vector competence: a literature review. *Malaria Journal*, *22*(1), 19.
Swanson, P. A., 2nd, Hart, G. T., Russo, M. V., Nayak, D., Yazew, T., Peña, M., Khan, S. M., Janse, C. J., Pierce, S. K., & McGavern, D. B. (2016). CD8+ T Cells Induce Fatal Brainstem Pathology during Cerebral Malaria via Luminal Antigen-Specific Engagement of Brain Vasculature. *PLoS Pathogens*, *12*(12), e1006022.
Taher, A. T., Musallam, K. M., & Cappellini, M. D. (2021). β-Thalassemias. *The New England Journal of Medicine*, *384*(8), 727–743.
Tai, K. Y., Dhaliwal, J., & Balasubramaniam, V. (2022). Leveraging Mann-Whitney U test on large-scale genetic variation data for analysing malaria genetic markers. *Malaria Journal*, *21*(1), 79.
Taing, L., Dandawate, A., L'Yi, S., Gehlenborg, N., Brown, M., & Meyer, C. A. (2024). Cistrome Data Browser: integrated search, analysis and visualization of chromatin data. *Nucleic Acids Research*, *52*(D1), D61–D66.
Takeda, M., Kikuchi, M., Ubalee, R., Na-Bangchang, K., Ruangweerayut, R., Shibahara, S., Imai, S.-I., & Hirayama, K. (2005). Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, *58*(5), 268–271.
Tan, J., Pieper, K., Piccoli, L., Abdi, A., Perez, M. F., Geiger, R., Tully, C. M., Jarrossay, D., Maina Ndungu, F., Wambua, J., Bejon, P., Fregni, C. S., Fernandez-Rodriguez, B., Barbieri, S., Bianchi, S., Marsh, K., Thathy, V., Corti, D., Sallusto, F., … Lanzavecchia, A. (2016). A LAIR1 insertion generates broadly reactive antibodies against malaria variant antigens. *Nature*, *529*(7584), 105–109.
Tatem, A. J., Gething, P. W., Smith, D. L., & Hay, S. I. (2013). Urbanization and the global malaria recession. *Malaria Journal*, *12*, 133.
Tavares, J., Formaglio, P., Thiberge, S., Mordelet, E., Van Rooijen, N., Medvinsky, A., Ménard, R., & Amino, R. (2013). Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *The Journal of Experimental Medicine*, *210*(5), 905–915.
Taylor, S. M., & Ter Kuile, F. O. (2017). Stillbirths: the hidden burden of malaria in pregnancy [Review of *Stillbirths: the hidden burden of malaria in pregnancy*]. *The Lancet. Global Health*, *5*(11), e1052–e1053.
Taylor, W. R. J., Hanson, J., Turner, G. D. H., White, N. J., & Dondorp, A. M. (2012). Respiratory manifestations of malaria. *Chest*, *142*(2), 492–505.
Thiam, A., Baaklini, S., Mbengue, B., Nisar, S., Diarra, M., Marquet, S., Fall, M. M., Sanka, M., Thiam, F., Diallo, R. N., Torres, M., Dieye, A., & Rihet, P. (2018). polymorphism, haematological parameters, and severe malaria in Senegalese patients. *PeerJ*, *6*, e6048.
Thye, T., Evans, J. A., Ruge, G., Loag, W., Ansong, D., Agbenyega, T., Horstmann, R. D., May, J., & Schuldt, K. (2022). Human genetic variant E756del in the ion channel PIEZO1 not associated with protection from severe malaria in a large Ghanaian study. *Journal of Human Genetics*, *67*(1), 65–67.
Tiendrebeogo, R. W., Adu, B., Singh, S. K., Dziegiel, M. H., Nébié, I., Sirima, S. B., Christiansen, M., Dodoo, D., & Theisen, M. (2015). Antibody-Dependent Cellular Inhibition Is Associated With Reduced Risk Against Febrile Malaria in a Longitudinal Cohort Study Involving Ghanaian Children. *Open Forum Infectious Diseases*, *2*(2), ofv044.
Timmann, C., Evans, J. A., König, I. R., Kleensang, A., Rüschendorf, F., Lenzen, J., Sievertsen, J., Becker, C., Enuameh, Y., Kwakye, K. O., Opoku, E., Browne, E. N. L., Ziegler, A., Nürnberg, P., & Horstmann, R. D. (2007). Genome-wide linkage analysis of malaria infection intensity and mild disease. *PLoS Genetics*, *3*(3), e48.
Timmann, C., Thye, T., Vens, M., Evans, J., May, J., Ehmen, C., Sievertsen, J., Muntau, B., Ruge, G., Loag, W., Ansong, D., Antwi, S., Asafo-Adjei, E., Nguah, S. B., Kwakye, K. O., Akoto, A. O. Y., Sylverken, J., Brendel, M., Schuldt, K., … Horstmann, R. D. (2012). Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. *Nature*, *489*(7416), 443–446.
Tornabene, E., Helms, H. C. C., Pedersen, S. F., & Brodin, B. (2019). Effects of oxygen-glucose deprivation (OGD) on barrier properties and mRNA transcript levels of selected marker proteins in brain endothelial cells/astrocyte co-cultures. *PloS One*, *14*(8), e0221103.
Tornyigah, B., d'Almeida, T., Escriou, G., Viwami, F., Fievet, N., Luty, A. J. F., Massougbodji, A., Nielsen, M. A., Deloron, P., & Tuikue Ndam, N. (2021). VAR2CSA-Specific IgG Subclass Responses Reflect Protection Against Low Birth Weight and Pregnancy-Associated Malaria. *Frontiers in Immunology*, *12*, 610305.
Tran, T. M., Jones, M. B., Ongoiba, A., Bijker, E. M., Schats, R., Venepally, P., Skinner, J., Doumbo, S., Quinten, E., Visser, L. G., Whalen, E., Presnell, S., O'Connell, E. M., Kayentao, K., Doumbo, O. K., Chaussabel, D., Lorenzi, H., Nutman, T. B., Ottenhoff, T. H. M., … Crompton, P. D. (2016). Transcriptomic evidence for modulation of host inflammatory responses during febrile Plasmodium falciparum malaria. *Scientific Reports*, *6*, 31291.
Treutiger, C. J., Heddini, A., Fernandez, V., Muller, W. A., & Wahlgren, M. (1997). PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Nature Medicine*, *3*(12), 1405–1408.

Tsuji, M., & Zavala, F. (2003). T cells as mediators of protective immunity against liver stages of Plasmodium. *Trends in Parasitology*, *19*(2), 88–93.
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.
Tweedell, R. E., Qi, L., Sun, Z., & Dinglasan, R. R. (2018). Kupffer Cells Survive Sporozoite Exposure and Respond with a Rapid Cytokine Release. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *7*(4). https://doi.org/10.3390/pathogens7040091
Urban, B. C., Ferguson, D. J., Pain, A., Willcox, N., Plebanski, M., Austyn, J. M., & Roberts, D. J. (1999). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*, *400*(6739), 73–77.
Uyoga, S., Watson, J. A., Wanjiku, P., Rop, J. C., Makale, J., Macharia, A. W., Kariuki, S. N., Nyutu, G. M., Shebe, M., Mosobo, M., Mturi, N., Rockett, K. A., Woodrow, C. J., Dondorp, A. M., Maitland, K., White, N. J., & Williams, T. N. (2022). The impact of malaria-protective red blood cell polymorphisms on parasite biomass in children with severe Plasmodium falciparum malaria. *Nature Communications*, *13*(1), 3307.
Van den Steen, P. E., Deroost, K., Deckers, J., Van Herck, E., Struyf, S., & Opdenakker, G. (2013). Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Trends in Parasitology*, *29*(7), 346–358.
van der Sluis, S., Verhage, M., Posthuma, D., & Dolan, C. V. (2010). Phenotypic complexity, measurement bias, and poor phenotypic resolution contribute to the missing heritability problem in genetic association studies. *PloS One*, *5*(11), e13929.
Velasco-Estevez, M., Rolle, S. O., Mampay, M., Dev, K. K., & Sheridan, G. K. (2020). Piezo1 regulates calcium oscillations and cytokine release from astrocytes. *Glia*, *68*(1), 145–160.
Venkatesan, P. (2024). The 2023 WHO World malaria report. *The Lancet. Microbe*, *5*(3), e214.
Vento, S., Cainelli, F., & Cesario, F. (2006). Infections and thalassaemia. *The Lancet. Infectious Diseases*, *6*(4), 226–233.
Verra, F., Luoni, G., Calissano, C., Troye-Blomberg, M., Perlmann, P., Perlmann, H., Arcà, B., Sirima, B. S., Konaté, A., Coluzzi, M., Kwiatkowski, D., & Modiano, D. (2004). IL4-589C/T polymorphism and IgE levels in severe malaria. *Acta Tropica*, *90*(2), 205–209.
Verrelli, B. C., McDonald, J. H., Argyropoulos, G., Destro-Bisol, G., Froment, A., Drousiotou, A., Lefranc, G., Helal, A. N., Loiselet, J., & Tishkoff, S. A. (2002). Evidence for balancing selection from nucleotide sequence analyses of human G6PD. *American Journal of Human Genetics*, *71*(5), 1112–1128.
Vinuesa, C. G., & Cyster, J. G. (2011). How T cells earn the follicular rite of passage. *Immunity*, *35*(5), 671–680.
von Seidlein, L., Olaosebikan, R., Hendriksen, I. C. E., Lee, S. J., Adedoyin, O. T., Agbenyega, T., Nguah, S. B., Bojang, K., Deen, J. L., Evans, J., Fanello, C. I., Gomes, E., Pedro, A. J., Kahabuka, C., Karema, C., Kivaya, E., Maitland, K., Mokuolu, O. A., Mtove, G., … Dondorp, A. M. (2012). Predicting the clinical outcome of severe falciparum malaria in african children: findings from a large randomized trial. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *54*(8), 1080–1090.
Wahlgren, M., Goel, S., & Akhouri, R. R. (2017). Variant surface antigens of Plasmodium falciparum and their roles in severe malaria. *Nature Reviews. Microbiology*, *15*(8), 479–491.
Walk, J., & Sauerwein, R. W. (2019). Activatory Receptor NKp30 Predicts NK Cell Activation During Controlled Human Malaria Infection. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2864.
Walker, J. A., & McKenzie, A. N. J. (2018). T2 cell development and function. *Nature Reviews. Immunology*, *18*(2), 121–133.
Walther, M., Tongren, J. E., Andrews, L., Korbel, D., King, E., Fletcher, H., Andersen, R. F., Bejon, P., Thompson, F., Dunachie, S. J., Edele, F., de Souza, J. B., Sinden, R. E., Gilbert, S. C., Riley, E. M., & Hill, A. V. S. (2005). Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*, *23*(3), 287–296.
Wambua, S., Mwangi, T. W., Kortok, M., Uyoga, S. M., Macharia, A. W., Mwacharo, J. K., Weatherall, D. J., Snow, R. W., Marsh, K., & Williams, T. N. (2006). The effect of alpha+-thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya. *PLoS Medicine*, *3*(5), e158.
Wan, J., van Ouwerkerk, A., Mouren, J.-C., Heredia, C., Pradel, L., Ballester, B., Andrau, J.-C., & Spicuglia, S. (2024). Comprehensive mapping of genetic variation at Epromoters reveals pleiotropic association with multiple disease traits. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gkae1270
Wang, Ye, & Chen, L. (2022). DeepPerVar: a multi-modal deep learning framework for functional interpretation of genetic variants in personal genome. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *38*(24), 5340–5351.
Wang, Yuexin, Yang, H., Jia, A., Wang, Y., Yang, Q., Dong, Y., Hou, Y., Cao, Y., Dong, L., Bi, Y., & Liu, G. (2022). Dendritic cell Piezo1 directs the differentiation of T1 and T cells in cancer. *ELife*, *11*. https://doi.org/10.7554/eLife.79957
Weatherall, D. J., & Clegg, J. B. (2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, *79*(8), 704–712.
Website. (n.d.). https://www.rockland.com/resources/histone-modifications/
Wei, L., Laurence, A., Elias, K. M., & O'Shea, J. J. (2007). IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(48), 34605–34610.
Wellems, T. E., & Fairhurst, R. M. (2005). Malaria-protective traits at odds in Africa? [Review of *Malaria-protective*

traits at odds in Africa?]. *Nature Genetics*, *37*(11), 1160–1162.
White, N. J. (2018). Anaemia and malaria. *Malaria Journal*, *17*(1), 371.
White, N. J. (2022). Severe malaria. *Malaria Journal*, *21*(1), 284.
Willcocks, L. C., Carr, E. J., Niederer, H. A., Rayner, T. F., Williams, T. N., Yang, W., Scott, J. A. G., Urban, B. C., Peshu, N., Vyse, T. J., Lau, Y. L., Lyons, P. A., & Smith, K. G. C. (2010). A defunctioning polymorphism in FCGR2B is associated with protection against malaria but susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(17), 7881–7885.
Williams, T. N., Mwangi, T. W., Roberts, D. J., Alexander, N. D., Weatherall, D. J., Wambua, S., Kortok, M., Snow, R. W., & Marsh, K. (2005). An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait. *PLoS Medicine*, *2*(5), e128.
Wilson, J. N., Rockett, K., Jallow, M., Pinder, M., Sisay-Joof, F., Newport, M., Newton, J., & Kwiatkowski, D. (2005). Analysis of IL10 haplotypic associations with severe malaria. *Genes and Immunity*, *6*(6), 462–466.
World Health Organization. (2015). *Guidelines for the Treatment of Malaria. Third Edition*. World Health Organization.
Xiong, X., Buekens, P., Alexander, S., Demianczuk, N., & Wollast, E. (2000). Anemia during pregnancy and birth outcome: a meta-analysis. *American Journal of Perinatology*, *17*(3), 137–146.
Xu, C., Liu, Q., Zhou, J., Xie, M., Feng, J., & Jiang, T. (2020). Quantifying functional impact of non-coding variants with multi-task Bayesian neural network. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *36*(5), 1397–1404.
Zámbó, B., Várady, G., Padányi, R., Szabó, E., Németh, A., Langó, T., Enyedi, Á., & Sarkadi, B. (2017). Decreased calcium pump expression in human erythrocytes is connected to a minor haplotype in the ATP2B4 gene. *Cell Calcium*, *65*, 73–79.
Zhang, G., Manaca, M. N., McNamara-Smith, M., Mayor, A., Nhabomba, A., Berthoud, T. K., Khoo, S.-K., Wiertsema, S., Aguilar, R., Barbosa, A., Quintó, L., Candelaria, P., Schultz, E. N., Hayden, C. M., Goldblatt, J., Guinovart, C., Alonso, P. L., Lesouëf, P. N., & Dobaño, C. (2012). Interleukin-10 (IL-10) polymorphisms are associated with IL-10 production and clinical malaria in young children. *Infection and Immunity*, *80*(7), 2316–2322.
Zhu, M., Granillo, O., Wen, R., Yang, K., Dai, X., Wang, D., & Zhang, W. (2005). Negative regulation of lymphocyte activation by the adaptor protein LAX. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *174*(9), 5612–5619.
Zhu, M., Janssen, E., Leung, K., & Zhang, W. (2002). Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(48), 46151–46158.