



Thèse de doctorat de Université de Paris

Ecole doctorale 562 BioSPC

Institut Cochin INSERM U1016

Equipe Biologie de la Transmission de *Plasmodium*

Etude des propriétés mécaniques des globules rouges infectés par les gamétocytes de *Plasmodium falciparum*

Par Marie-Esther N'DRI

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par le Dr Catherine LAVAZEC

Présentée et soutenue publiquement à l'institut Cochin le 14 décembre 2021

Devant un jury composé de :

Pr Catherine BRETON-BRAUM, PU, Université de Montpellier	Rapporteure
Pr Rachel CERDAN, PU, Université de Montpellier	Rapporteure
Dr Stéphane EGEE, MCU-HDR, Sorbonne université	Examineur
Dr Alioune NDOUR, MCU, Université de Paris	Examineur
Dr Catherine LAVAZEC, DR2, Université de Paris	Directrice de thèse

LISTE DES ÉLÉMENTS SOUS DROITS

Liste de **tous les éléments retirés** de la version complète de la thèse
faute d'en détenir les droits

Document à intégrer dans la version partielle de la thèse

Illustrations, figures, images...

Légende de l'image	N° de l'image	Page(s) dans la thèse
Carte du taux d'incidence des cas de paludisme dans le monde en 2018	Figure 1	16
Classification des espèces de Plasmodium en fonction de leur hôte vertébré	Figure 2	17
Modèles de l'induction de l'engagement vers la voie sexué par l'expression ou non de PfAP2-G	Figure 5	24
Différents stades de développement des gamétocytes de <i>P. falciparum</i>	Figure 6	25
Images d'immunohistochimie réalisées sur des échantillons de moelle osseuse de patient impaludé	Figure 8	29
Structure de la rate et circulation sanguine ouverte ou lente des globules rouges.	Figure 9	32
Structure de la membrane d'un globule rouge infecté par des stades asexués de <i>P.falciparum</i>	Figure 13	43
Représentation schématique des onze familles de PDEs humaines, leur isoforme et leur substrat.	Figure 22	63

Résumé

La transmission de *P. falciparum* est assurée par les formes sexuées du parasite, appelées gamétocytes. Ils se développent d'abord dans la moelle osseuse puis sont retrouvés dans le sang périphérique. Plusieurs études ont suggéré que leur présence dans le sang était probablement due à un changement des propriétés mécaniques des globules rouges qu'ils infectent. En effet, les Globules Rouges Infectés par des Gamétocytes (GRIG) matures sont moins rigides et moins perméables que les GRIGs immatures. Le gain de déformabilité et la baisse de perméabilité des GRIGs matures leur permettraient respectivement d'échapper au contrôle de la rate et d'être moins sensibles à lyse osmotique. Notre équipe a montré que les propriétés mécaniques des GRIGs étaient régulées par la voie AMPc-PKA et qu'elles pouvaient être inversées chez les GRIGs matures par des inhibiteurs de phosphodiésthérases (PDE) comme le Sildénafil. Les mêmes phénotypes sont obtenus chez les GRIGs matures d'une souche transgénique dans laquelle le gène qui code pour *PfPDEδ* est délété. Ces propriétés mécaniques constituent donc une cible pour bloquer la transmission du parasite. Les objectifs de cette thèse sont de mieux comprendre la régulation des propriétés mécaniques des GRIGs matures en identifiant la cible de ces inhibiteurs dans les phénotypes observés et d'apporter la preuve de concept que les inhibiteurs de PDEs humaines peuvent servir de base pour des molécules anti-transmission spécifiques pour le parasite.

Tout d'abord, nous avons testé l'effet du Tadalafil sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures. Cet inhibiteur de PDE présente de meilleures propriétés pharmacocinétiques que le Sildénafil. Nous avons montré que cet inhibiteur est capable d'augmenter la rigidité et la perméabilité des GRIGs matures et que cet effet est dépendant de l'infection du globule rouge par le parasite.

Ensuite, nous avons utilisé un analogue du Tadalafil qui n'agit plus sur la PDE5 humaine (HsPDE5), présente dans le globule rouge, pour identifier la cible exacte du Tadalafil dans les phénotypes de déformabilité et de perméabilité. Nos résultats ont montré que les changements des propriétés mécaniques observés en présence du Tadalafil étaient dus à l'inhibition de HsPDE5H mais pas à l'inhibition d'une PDE plasmodiale. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé un analogue du Tadalafil modifié pour qu'il cible le parasite tout en

étant inactif sur HsPDE5. Nous avons pu montrer que l'analogue du Tadalafil spécifique du parasite entraîne une baisse de la viabilité des gamétocytes matures, une augmentation de la rigidité et de la perméabilité des GRIGs matures ainsi que leur accumulation dans la rate d'une souris humanisée.

Enfin nous avons caractérisé *PfPDEδ*, cible probable de l'analogue du Tadalafil spécifique pour le parasite. Nous avons montré que cette enzyme est capable d'hydrolyser l'AMPc et le GMPc avec une grande affinité pour l'AMPc. De plus cette protéine est exprimée de façon progressive chez les gamétocytes à partir du stade III avec un pic au stade V. Enfin, l'étude de la localisation *PfPDEδ* a montré qu'elle se situait à la membrane des GRIGs matures.

Cette étude a permis d'apporter de nouveaux éléments de compréhension au modèle de régulation des propriétés mécaniques des GRIGs matures et de confirmer l'utilisation possible d'inhibiteurs de PDEs comme molécules pour bloquer la transmission de *P. falciparum*.

Abstract

The transmission of *P. falciparum* is ensured by the sexual forms of the parasite called gametocytes. They first develop in the bone marrow and then, they are found in the peripheral blood. Several studies have suggested that their presence in the blood is probably due to a change in the mechanical properties of their red blood cell host. Indeed, mature Gametocyte-Infected Erythrocyte (GIE) are less rigid and less permeable than immature GRIGs. The increased deformability and decreased permeability of mature GRIGs would allow them to escape the control of the spleen and to be less sensitive to osmotic lysis, respectively. Our team has shown that the mechanical properties of GRIGs are regulated by the cAMP-PKA pathway and that they can be reversed in mature GRIGs by phosphodiesterase (PDE) inhibitors such as Sildenafil. The same phenotypes are obtained with mature GIE from a transgenic strain in which the gene that encodes *PfPDEδ* is deleted. These mechanical properties represent therefore a target for blocking parasite transmission. The objectives of this thesis are to better understand the regulation of the mechanical properties of mature GIE by identifying the target of these inhibitors in the observed phenotypes and to provide the proof of concept that inhibitors targeting human PDEs can serve as the basis for *Plasmodium*-specific anti-transmission molecules.

First, we tested the effect of Tadalafil on the mechanical properties of mature GRIGs. This PDE inhibitor exhibits better pharmacokinetic properties than Sildenafil. We showed that this inhibitor is able to increase the stiffness and the permeability of mature GRIGs and that this effect is dependent on red blood cell infection by the parasite.

Then, we used a Tadalafil analog that no longer acts on human PDE5 (HsPDE5), which is present in the red blood cell, to identify the exact target of Tadalafil in the deformability and permeability phenotypes. Our results showed that the mechanical changes triggered by Tadalafil are due to the inhibition of HsPDE5. Next, we used a Tadalafil analogue engineered to target the parasite while being inactive on HsPDE5. We showed that the parasite-specific Tadalafil analogue triggered a decrease in viability of mature gametocytes, an increased stiffness and permeability of mature GIE, and their accumulation in the spleen of a humanized mouse.

Finally, we characterized *Pf*PDE δ , a likely target of the parasite-specific Tadalafil analog. We showed that this enzyme is able to hydrolyze cAMP and cGMP with a higher affinity for cAMP. Moreover, this protein is progressively expressed in gametocytes from stage III with a peak at stage V. Finally, the study of the localization of *Pf*PDE δ showed that it is located at the membrane of mature GIE.

This study provided new insights into the model of regulation of the mechanical properties of mature GIE and confirmed the possible use of PDE inhibitors as a molecule to block *P. falciparum* transmission.

Remerciements

« La vie vous donnera l'expérience la plus utile pour l'évolution de votre conscience » Eckart Tolle. Cette citation illustre parfaitement mon expérience durant cette thèse. Elle m'a permis de grandir mais surtout d'apprendre la persévérance. J'en ressors transformée et armée pour les futures aventures de ma vie.

Je commence par remercier tous les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à Catherine Breton-Braum, à Rachel Cerdan, à Alioune Ndour et à Stéphane Egée.

Catherine, je voudrais te remercier pour ton accueil et ta patience. La thèse est une expérience qui nous challenge et nous fait souvent douter de nos capacités. Cependant, j'ai toujours pu compter sur ton soutien et tes mots d'encouragement même quand les expériences ne marchaient pas. Merci de m'avoir appris à persévérer et d'avoir pris le temps de m'encadrer au cours de ces trois dernières années.

Frédérique, je te remercie pour tes conseils aussi bien scientifiques que personnels. Ton bureau a toujours été ouvert pour mes questions de biochimie. Merci beaucoup pour tout.

Je voudrais ensuite remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à mon travail. Tout d'abord, l'équipe de Benoit Deprez particulièrement Julie Charton, Terrence Beghyn, Lucile Brier, Valérie Landry et Florence Leroux. Ensuite, à la plateforme de production de protéines recombinantes de l'institut Curie dirigée par Ahmed El Marjou. A la plateforme 3P5 et la plateforme de microscopie électronique de l'institut Cochin. Merci à tous pour votre aide.

Merci à la présidence de la république de Côte d'Ivoire et au ministère de l'enseignement supérieur pour leur soutien financier.

Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse, Carole Peyssonnaud et Martin Picard pour leurs conseils aux cours de ces trois années. Merci particulièrement à Martin pour avoir pris de son temps pour m'introduire aux joies de l'enzymologie.

Merci au personnel du bâtiment Méchain. A Maryline, Nabila et Myriam pour leur aide au quotidien. Un merci spécial à Khemwantee pour m'avoir gentiment préparé des litres et des litres de LB quand j'en avais besoin.

Je voudrais aussi remercier mon équipe les « Gaméto X ». Quand je suis arrivée en master 2, j'ai tout de suite été accueillie par tout le monde. Aujourd'hui, vous êtes tous devenus des amis.

Tout d'abord à Florian, je voudrais te remercier pour avoir partagé mes meilleurs fous rires ces dernières années et pour avoir accepté que je te pique tes affaires sans te plaindre. Merci pour tout.

Merci à Daniela pour ta bonne humeur et ton aide, à Aurélie pour ton rire contagieux, à Maeva pour ta joie. Welcome to Ionna, i hope that you will enjoy your time in our team. A mes petites stagiaires Ludivine et Nabih, vous avez partagé avec moi les joies de travailler avec la PDEδ et surtout les nombreuses heures de comptages au microscope. Merci les filles. Aux anciens membres du labo Gaëlle, Cyrielle, Romain, Fiona, Lauriane, Killian et Lina, merci d'avoir permis que mes journées soient pleines de joie, de rires et d'entraide.

Merci aux anciens membres et aux rescapés du « cul du couloir » : Maxence, Manu, Maxime, Ivy, Andréa et Jamie. Vous faites partie des meilleurs souvenirs de ma vie à Cochin.

Merci à tous ceux que j'ai pu croiser dans le bâtiment Méchain en particulier l'équipe Piquottins avec qui j'ai partagé mes repas du midi. Merci de m'avoir prêté tant de choses pour mes manips, promis je vous les rends avant de partir.

Je voudrais enfin remercier mes amis et ma famille pour leur soutien et leur encouragement indéfectible pendant ma thèse.

Merci à toutes ses amies qui aujourd'hui sont ma famille de France : les mignonnettes Marie et Brenda ; Lindsay avec qui j'ai commencé mon aventure à l'institut Cochin et Nji avec qui j'ai partagé les joies et les peines de la vie de thésard. Merci à Celia, sa famille et Murielle qui m'ont toujours soutenues même quand ils en avaient marre que je les abandonne pour aller m'occuper de mes parasites.

Enfin, un grand merci à mon père, ma mère, mes frères : Willy, Christian, Patrick et Yannick ainsi que leur compagne pour leurs prières et encouragements. Vous avez toujours cru en moi, même dans les moments de remise en question et de doutes. Vous m'avez montré à quel point vous étiez fier de moi et pour cela, je vous en serai toujours reconnaissante.

Table des abréviations

5'ALA :	5-AminoLevulinic Acid
AC :	Adénylate Cyclase
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AFM :	Microscopie de Force Atomique
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate Cyclique
AP2-G :	ApiAP2-Gamétocyte
ARN :	Acide RiboNucléique
ASV :	Aire de la Surface sur le Volume
ATP :	Adénosine TriPhosphate
CO :	Corps osmiophiliques
CSP :	CircumSporozoite Protein
CT :	Cycle Threshold
CTA :	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
C-ter :	C-terminale
DHA :	DiHydroArtémisinine
DMSO :	DiMéthylSulfOxyde
DTT :	DiThioThréitol
EDTA :	ÉthylèneDiamineTétraAcétique
EHNA:	Erythro-9-(2-Hydroxy-3-Nonyl) Adenine
EPAC:	Exchange Protein Activated by cAMP
G6PD :	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GC :	Guanylate Cyclase
GDF :	Gain de fonction
GDV1 :	Gametocyte Development 1
GMPc :	Guanosine MonoPhosphate Cyclique
GRIG :	Globule rouge infecté par un gamétocyte
GST:	Glutathion S-Transférase
GTP:	Guanosine TriPhosphate

HA:	Hémagglutinine
HDA2:	Histone Deacetylase 2
HIS:	Histidine
HMT :	Histones méthyltransférases
HP1 :	Heterochromatin Protein 1
IC50 :	Concentration Inhibitrice médiane
ICM-1 :	Important Calcium Mobilisation-1
IMC:	Inner Membrane Complex
IPTG:	IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
KAHRP:	Knob-Associated Histidine-Rich Protein
NAG:	N-Acetyl-Glucosamine
NCC:	Next Cycle Conversion
NMII:	Non muscle Myosin II
NO:	Nitric Oxide
NPP:	New Permeability Pathway
NPPB:	5-Nitro-2-(3-PhenylPropylamino)-Benzoic acid
NP40:	Nonidet P40
NSG:	NOD/SCID/IL2ry
N-ter :	N-terminale
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PDE :	PhosphoDiEstérase
PEXEL/HT:	<i>Plasmodium</i> EXport ELe ment/ Host Targetting
PfEMP1 :	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein 1
PKA:	Protéine Kinase A
PKG:	Protéine Kinase G
PPIX :	ProtoPorphyrine IX
PSAC :	Plasmodial Surface Anion Channel
RESA :	Ring-Erythrocyte Surface Antigen
RT-qPCR:	Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction
SAM:	S-AdénosylMéthionine
SCC:	Same Cycle Conversion

STEVOR:	SubTElomeric Open Reading frames
SUMO:	Small Ubiquitin-related MOdifier
TDR :	Test de Diagnostic Rapide
VDAC :	Voltage Dependent Anion Channel

Table des matières

<i>Résumé</i>	1
<i>Abstract</i>	3
<i>Remerciements</i>	5
<i>Table des abréviations</i>	7
<i>Table des matières</i>	10
<i>Table des figures</i>	12
<i>Introduction</i>	14
A. Généralités sur le paludisme	15
1. Histoire et épidémiologie	15
2. Agent pathogène, vecteur et physiopathologie	16
3. Prévention et traitements contre le paludisme	18
B. Biologie de Plasmodium falciparum	19
1. Cycle biologique du parasite	19
a. Phase hépatocytaire	19
b. Phase érythrocytaire	20
c. Phase chez le moustique	20
2. Biologie des gamétocytes de P. falciparum	22
a. Engagement vers la voie sexuée : Facteurs épigénétiques et environnementaux	22
i. Facteurs génétiques et épigénétiques	22
ii. Facteurs environnementaux	24
b. Développement des gamétocytes	25
c. Séquestration, circulation et persistance des gamétocytes chez l'homme	28
i. Séquestration des gamétocytes dans la moelle osseuse	28
ii. Circulation et persistance des gamétocytes	29
C. Les antipaludéens dirigés contre P. falciparum	33
1. Les antipaludéens dirigés contre les formes asexuées du parasite	33
2. Les antipaludéens dirigés contre les gamétocytes	35
D. Modification des propriétés mécaniques des globules rouges infectés	37
1. Régulation de la déformabilité des globules rouges infectés	37
a. Déformabilité du globule rouge	37
i. Le globule rouge : nature et fonction	37

ii. Les techniques de mesures de la déformabilité	38
iii. Régulation de la déformabilité du globule rouge.....	40
b. Déformabilité du globule rouge infecté par <i>P. falciparum</i>	41
i. Infection par des stades asexués	42
ii. Infection par des gamétocytes	43
2. Régulation de la perméabilité des globules rouges infectés.	46
a. Perméabilité du globule rouge.....	46
b. Perméabilité des globules rouges infectés par des stades asexués	47
c. Perméabilité du globule rouge infecté par des gamétocytes	49
d. Les techniques de mesure de la perméabilité	51
E. Voie de signalisation des nucléotides cycliques.....	52
1. Voies de signalisation des nucléotides cycliques chez <i>P. falciparum</i>	53
2. Phosphodiesterases humaines	62
F. Hypothèses et objectifs de la thèse.....	68
Résultats	71
A. Résultats première partie : Le Tadalafil impacte les propriétés mécaniques des GRIGs de <i>Plasmodium falciparum</i>.....	72
1. Résumé.....	72
2. Article: Tadalafil impacts the mechanical properties of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocyte-infected erythrocytes	73
B. Résultats deuxième partie : Les analogues du Tadalafil spécifiques pour le parasite impactent les propriétés mécaniques des GRIGs de <i>Plasmodium falciparum</i>	79
1. Introduction	79
2. Matériels et méthodes	81
3. Résultats.....	83
4. Conclusions et perspectives	91
C. Résultats troisième partie : Caractérisation de <i>Pf PDEδ</i>	95
1. Introduction	95
2. Matériels et méthodes	96
3. Résultats.....	101
4. Conclusion et perspectives.....	111
Discussion.....	115
Références bibliographiques.....	126
Annexes.....	142

Table des figures

Figure 1 : Carte du taux d'incidence des cas de paludisme dans le monde en 2018.....	16
Figure 2 : Classification des espèces de Plasmodium en fonction de leur hôte vertébré	17
Figure 3 : Cycle biologique de Plasmodium falciparum.	21
Figure 4 : Régulation épigénétique de l'engagement vers la voie sexuée du cycle érythrocytaire.	23
Figure 5 : Modèles de l'induction de l'engagement vers la voie sexuée par l'expression ou non de PfAP2-G.	24
Figure 6 : Différents stades de développement des gamétocytes de P. falciparum	26
Figure 7: Développement de l'IMC et du réseau de microtubules pendant la gamétocyto-genèse. Apparition des corps osmiophiles chez les gamétocytes femelles de stade V.	28
Figure 8 : Images d'immunohistochimie réalisées sur des échantillons de moelle osseuse de patient impaludé.	29
Figure 9 : Structure de la rate et circulation sanguine ouverte ou lente des globules rouges.	32
Figure 10 : Récapitulatif des différentes stratégies mises en place par les GRIGs matures pour persister longtemps dans la circulation sanguine.	33
Figure 11 : Cibles des antipaludéens chez les formes asexuées de P. falciparum.....	34
Figure 12 : Représentation schématique de l'hémoglobine et de la structure de la membrane du globule rouge.....	38
Figure 13 : Structure de la membrane d'un globule rouge infecté par des stades asexués de P.falciparum.....	43
Figure 14 : Modèle de régulation de la déformabilité des GRIGs immatures et matures. ...	46
Figure 15 : Schéma récapitulatif des différents types de transporteurs qui régulent la perméabilité du globule rouge.....	47
Figure 16 : Modèle de régulation de la perméabilité des GRIGs immatures et matures.	50
Figure 17 : Réactions enzymatiques conduisant à la formation et à l'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc.....	52
Figure 18 : Modèle de régulation de la PKA.	53
Figure 19 : Modèle de régulation de la PKG.	54
Figure 20 : Représentation schématique de la structure de l'adénylate cyclase alpha de P. falciparum	56
Figure 21 : Représentation schématique de la structure des guanylates cyclases de P. falciparum	57
Figure 22: Représentation schématique des onze familles de PDEs humaines, leur isoforme et leur substrat.....	63
Figure 23 : Régulation de la vasodilatation des muscles lisses par la voie de signalisation NO-GMPc.	64

Figure 24 : Schéma récapitulatif des différentes PDEs humaines présentes dans le globule rouge.	67
Figure 25 : Stratégie pour bloquer la transmission des GRIGs matures en présence d'inhibiteurs de PDEs	68
Figure 26 : Hypothèses sur la cible des inhibiteurs de PDE5 humaine dans les phénotypes de déformabilité et de perméabilité des GRIGs matures.	70
Figure 27 : Structures du Tadalafil et de ses analogues et leur effet sur les formes asexuées de <i>P. falciparum</i> et sur HsPDE5.	80
Figure 28 : Essai de viabilité des gamétocytes en présence du Tadalafil et de ses analogues.	84
Figure 29 : La modification du groupement pipéronyl du Tadalafil empêche son action sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures.	86
Figure 30 : L'ajout du groupement benzylaminopyrrolidine sur le Tadalafil ne réduit pas son effet sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures.	87
Figure 31 : L'ajout du groupement benzylaminopyrrolidine sur le Tadalafil permet de retrouver l'effet sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures même en absence d'inhibition de la HsPDE5.	88
Figure 32 : L'analogue C entraîne la séquestration des GRIGs matures dans la rate d'une souris humanisée.	90
Figure 33 : Schéma récapitulatif des cibles du Tadalafil et de ses analogues dans les phénotypes de déformabilité et de perméabilité.	94
Figure 34 : Production de PfpDEδ recombinante, validation des anticorps et caractérisation de son activité enzymatique.	102
Figure 35 : Détermination du Km et de la Vmax de PfpDEδ recombinante.	103
Figure 36 : Expression des PDEs plasmodiales chez les gamétocytes de <i>P. falciparum</i>.	105
Figure 37 : Expression de PfpDEδ au cours de la gamétocytogénèse.	107
Figure 38 : Localisation de PfpDEδ au sein des GRIGs matures	109
Figure 39 : Test d'inhibition sur PfpDEδ recombinante.	110
Figure 40 : Modèle de régulation des propriétés mécaniques des GRIGs au cours de la gamétocytogénèse	114
Figure 41 : Nuage de points comparant l'intensité d'expression en log base 2 des phosphosites parasitaires des GRIGs traités avec du DMSO ou du Tadalafil.	118

Introduction

A. Généralités sur le paludisme

1. Histoire et épidémiologie

Présent depuis l'époque des Pharaons, le paludisme semble être la plus vieille parasitose qui affecte l'Homme. Cette maladie était initialement attribuée à la présence des eaux stagnantes. Cela lui a valu le nom de « *Malaria* », issu du terme l'italien « *mala aria* » qui signifie mauvais air. Ce n'est qu'en 1880 que le médecin français, Charles Louis Alphonse Laveran, découvrait à Constantine en Algérie des micro-organismes parasites mobiles dans le sang des patients impaludés. Ainsi, il établissait pour la première fois le lien entre parasite et paludisme. Cette découverte lui a valu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1907. Le parasite responsable du paludisme fut nommé *Plasmodium* par Ettore Marchiafava et Angelo Celli en 1885. Son mode de transmission via les moustiques femelles a été mis en évidence par Ronald Ross en 1889. Plusieurs de ses travaux, récompensés par un prix Nobel en 1902, lui ont permis par la suite d'apporter plus de précision sur le cycle biologique du parasite chez le moustique notamment au niveau du tube digestif. Malgré plus d'un siècle de recherches biologiques et cliniques, qui ont pourtant considérablement amélioré les connaissances sur cette maladie, de nombreuses questions restent sans réponse.

Le paludisme est une maladie généralement présente dans les zones tropicales du globe terrestre. Les régions du monde les plus touchées par cette maladie sont l'Afrique, l'Amérique latine et l'Asie du Sud-Est (**Figure 1**). Autrement dit, plus de la moitié de la population mondiale est exposée au paludisme. Cependant, l'Afrique paye la charge la plus lourde de cette épidémie. En effet, 93% des cas y sont recensés de même que 94% des décès. Les personnes à risque sont les enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées. Le contrôle de cette épidémie au cours de ces vingt dernières années est le fruit d'efforts considérables faits par les organismes de santé nationaux et internationaux, notamment l'OMS : l'utilisation massive de traitements médicamenteux et de protections contre le vecteur du parasite ont permis de réduire de façon importante l'incidence et la mortalité qui restent néanmoins élevées. En effet, on estime à 229 millions le nombre de cas de paludisme dans le monde en 2019 ainsi qu'à 409 000, le nombre de décès

au cours de cette même année (« World Malaria Report 2020 »). Aussi, l'émergence de parasites résistants aux traitements contribue au ralentissement des efforts réalisés. La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc plus qu'indispensable pour continuer la lutte contre le paludisme.

Élément retiré, diffusion non autorisée

Figure 1 : Carte du taux d'incidence des cas de paludisme dans le monde en 2018.

2. Agent pathogène, vecteur et physiopathologie

L'agent pathogène responsable du paludisme est un hématozoaire transmis à l'Homme par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Même s'il existe plus de 400 espèces de moustiques *Anopheles*, il y en a moins d'une centaine qui sont capables de transmettre le parasite du paludisme à l'Homme. Ce parasite appartient au genre *Plasmodium* de l'embranchement des *Apicomplexa*. Il est caractérisé par un complexe protéique situé au pôle apical du parasite ainsi qu'un apicoplaste, organe non-photosynthétique. Ce complexe est indispensable pour l'invasion de la cellule hôte. Le parasite partage son cycle biologique entre un hôte définitif, le moustique, et un hôte intermédiaire, l'Homme. Il peut donc infecter divers hôtes vertébrés tels que les oiseaux ou les mammifères (**Figure 2**). Les cinq espèces capables d'infecter l'Homme sont : *Plasmodium falciparum* (Pf), *Plasmodium vivax* (Pv), *Plasmodium*

ovale (Po), *Plasmodium malariae* (Pm) et *Plasmodium knowlesi* (Pk). La majorité des cas de paludisme est attribuée à *P. falciparum* et à *P. vivax* qui sont principalement retrouvés respectivement en Afrique et en Asie. Cependant, l'espèce la plus mortelle pour l'Homme reste *P. falciparum*.

Elément retiré, diffusion non autorisée

Figure 2 : Classification des espèces de *Plasmodium* en fonction de leur hôte vertébré (Ngotho et al., 2019)

De façon générale, les premiers signes de l'infection par *Plasmodium falciparum* surviennent au bout de 10 jours post-inoculation. Chez l'Homme, plusieurs symptômes sont associés au paludisme : maux de têtes, vomissements, courbatures, anémie etc. Des pics élevés et répétés de fièvres, aussi appelés accès palustres, caractérisent particulièrement cette maladie. Ces symptômes, reflets du développement intra-érythrocytaire du parasite, peuvent aussi être associés à d'autres maladies infectieuses, surtout dans les zones endémiques, ce qui peut rendre difficile le diagnostic et donc la prise en charge du patient. Néanmoins, le développement d'outils de diagnostic rapides et fiables comme les Tests de Diagnostic Rapides (TDR) ont permis d'y remédier. En absence de traitement ou en cas de résistance, le paludisme peut entraîner une défaillance multi-viscérale qui peut être fatale pour le patient. Une des formes les plus sévères de la maladie est le neuro-paludisme, dans lequel les globules rouges infectés obstruent les capillaires du cerveau. Ce manque d'irrigation du cerveau peut conduire au coma puis à la mort de la personne impaludée.

3. Prévention et traitements contre le paludisme

A l'heure actuelle, les mesures préventives contre le paludisme se situent à trois niveaux : la lutte antivectorielle (I), la chimioprophylaxie (II) et l'utilisation de vaccin (III).

La lutte anti-vectorielle repose d'une part sur l'utilisation d'insecticides afin de réduire la population de vecteurs dans les zones endémiques, et d'autre part, sur l'emploi de moustiquaires imprégnées d'insecticides qui vise à empêcher les piqûres de moustiques. Des méthodes comme l'assainissement des eaux ou la destruction des marais qui visent les stades larvaires du vecteur et même l'utilisation de moustiques génétiquement modifiés, contribuent aussi à la réduction de la population de moustiques (Wisniewski et al., 2020). Ces stratégies ont permis de réduire fortement le nombre de cas de paludisme depuis les années 2000 (Bhatt et al., 2015). Cependant, en 2014, plus de 60 pays rapportaient l'apparition de résistances aux pyréthrinoïdes (Ranson et al., 2011), principale classe d'insecticides utilisés, menaçant ainsi les avancées faites en termes de lutte contre le paludisme. Le besoin de nouvelles stratégies anti-vecteur devient donc indispensable.

La chimioprophylaxie dans le cadre du paludisme est surtout utilisée par les voyageurs qui se rendent dans les pays endémiques. Cette stratégie consiste à prendre un traitement curatif, mais à faible dose, quelques jours avant le départ. Les molécules couramment utilisées sont la doxycycline, la méfloquine, l'atovaquone, et la chloroquine en association ou non avec le proguanil. En Afrique, le paludisme est une maladie dite « saisonnière ». La mise en place de chimioprophylaxie saisonnière permet une protection d'environ 75% chez les enfants de moins de 5 ans. L'amodiaquine et l'association sulfadoxine + pyriméthamine sont les traitements donnés dans le cadre de cette stratégie (« OMS | Chimio prévention du paludisme saisonnier (CPS) » s. d.). Le développement d'un vaccin contre le paludisme est un projet qui a débuté depuis les années 1940 (Freund et al., 1945). C'est une stratégie très complexe à mettre en place du fait de la diversité génétique du parasite qui se renouvelle à chaque cycle. Malgré l'avancée des technologies et des connaissances sur *Plasmodium*, il n'existe pas de vaccin qui présente un taux de protection satisfaisant. A ce jour, le vaccin le plus prometteur en termes de développement clinique est le vaccin RTS'S vendu sous le nom de Mosquirix™. Il cible la phase pré-érythrocytaire du cycle biologique du parasite et utilise la Circumsporozoïte Surface Protein (CSP) comme antigène. Son efficacité après la quatrième

dose est d'environ 26-36 % pour les cas normaux de paludisme et de 17-32% pour les cas sévères de paludisme (Laurens, 2019). Il vient d'être autorisé par l'OMS dans un communiqué de presse officiel comme stratégie de prévention contre les cas de paludisme sévères chez les enfants.

Historiquement, les premiers traitements curatifs contre le paludisme étaient à base de quinine. Issue de la pharmacopée sud-américaine, cette molécule était utilisée par les frères Jésuites depuis le XVII^{ème} siècle pour traiter les fièvres tierces qui sévissaient à cette époque. Après avoir été introduite en Europe, plusieurs dérivés de la quinine ont été synthétisés par des industries allemandes, notamment Bayer, donnant naissance à la chloroquine. Elle fut ensuite commercialisée sous divers noms (*Nivaquine* ou *Aralen*) et fut le traitement de prédilection contre le paludisme jusqu'à la fin du XX^{ème} siècle. L'utilisation massive de ce traitement a entraîné l'apparition de parasites résistants dans les zones endémiques. A cette même période, l'artémisinine fait sa grande entrée dans les traitements médicamenteux contre le paludisme. Cette molécule provient de la pharmacopée chinoise, plus précisément de l'armoise annuelle. Elle fut mise en évidence par la biologiste chinoise Youyou Tu qui reçut le prix Nobel de médecine en 2015 pour ses travaux (Tu, 2011). Depuis, les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine et ses dérivés ou CTA sont les traitements de première ligne préconisés par l'OMS pour la lutte contre le paludisme. Cependant, après l'utilisation massive des CTA, on note l'apparition de parasites résistants en Asie du Sud-Est notamment au Cambodge (Dondorp et al., 2009) mais aussi en Afrique (Lu et al., 2017; Balikagala et al., 2021). Cette situation rend urgente la découverte de nouveaux traitements qui ciblent toutes les formes du parasite.

B. Biologie de Plasmodium falciparum

1. Cycle biologique du parasite

a. Phase hépatocytaire

Le cycle biologique de *P. falciparum* débute chez l'Homme par une piqûre de moustique qui va entraîner l'injection des sporozoïtes, première forme invasive du parasite, dans l'épiderme de l'hôte humain (**Figure 3a**). Ces formes du parasite vont migrer très rapidement vers le foie après avoir rencontré plusieurs cellules de l'immunité locale telles que les cellules de Küpffer (Yuda and Ishino, 2004). Ces cellules de Küpffer servent parfois de cheval de Troie au parasite

afin d'échapper efficacement au système immunitaire (Cha et al., 2015). Une fois dans l'hépatocyte, le parasite se développe dans une vacuole parasitophore où il subit une forte multiplication asexuée, appelée schizogonie. Cette multiplication va donner naissance à des mérosomes : ce sont des « grappes de mérozoïtes » qui contiennent plusieurs milliers de mérozoïtes, deuxième forme invasive du parasite. La rupture de la membrane des schizontes hépatiques conduit au relargage de ces mérozoïtes dans la circulation sanguine (Sturm et al, 2006). Cette phase asymptomatique du cycle dure entre une et deux semaines (**Figure 3b**).

b. Phase érythrocytaire

L'étape qui suit le relargage des mérozoïtes dans la circulation sanguine est l'invasion des globules rouges. Alors, débute un cycle d'invasion-multiplication-ré-invasion, régulé de façon très précise et qui dure entre 42 et 48 heures. Ce cycle implique les érythrocytes et différentes formes du parasite. Tout d'abord, un mérozoïte va infecter un globule rouge dans lequel il va évoluer en forme anneau puis devenir un trophozoïte. Celui-ci va se développer en schizonte, forme multi-nucléée du parasite, qui va libérer de jeunes mérozoïtes prêts à envahir de nouveaux globules rouges. Cette phase du cycle est responsable de la physiopathologie du paludisme notamment des accès palustres qui correspondent à la rupture des schizontes. Au cours de cette phase érythrocytaire, 1 à 30 % des parasites s'engagent vers une voie de différenciation sexuée (**Figure 3c**). Ces formes sexuées du parasite sont appelées gamétocytes. La gamétocytogénèse dure en moyenne 10 jours pendant lesquels le parasite passe par cinq stades morphologiquement différents (Hawking et al., 1971). Les quatre premiers stades sont dits immatures et se développent dans la moelle osseuse (Aguilar et al., 2014; Farfour et al., 2012; Joice et al., 2014) tandis que le stade V, mature, est retrouvé dans la circulation sanguine où il peut persister pendant plusieurs semaines (Cao et al., 2019).

c. Phase chez le moustique

Le cycle du parasite chez le moustique commence par l'ingestion des gamétocytes mâle et femelle matures présents dans le sang d'une personne infectée. Une fois dans l'intestin de son hôte invertébré, plusieurs facteurs tels que le changement de température, l'augmentation du pH ou encore la présence d'acide xanthurénique vont déclencher la différenciation des gamétocytes en gamètes mâle et femelle.

La première étape de la gamétogénèse consiste en l'arrondissement du gamétocyte qui va ensuite sortir du globule rouge. A la suite d'un processus appelé exflagellation, le gamétocyte mâle va donner naissance à huit gamètes flagellés et mobiles. Le gamétocyte femelle quant à lui va donner qu'un seul gamète. La fécondation des deux gamètes va donner naissance à un zygote diploïde puis à un ookinète qui, après avoir traversé la paroi de l'estomac du moustique va se fixer à la lame basale de l'épithélium où il va se développer en oocyste. La maturation de l'oocyste qui dure une dizaine de jours va donner lieu à la formation de plusieurs sporozoïtes. Après la rupture de la membrane de l'oocyste, les sporozoïtes vont migrer vers les glandes salivaires du moustique où ils seront prêts à être injectés à l'hôte vertébré lors du prochain repas sanguin (**Figure 3d**).

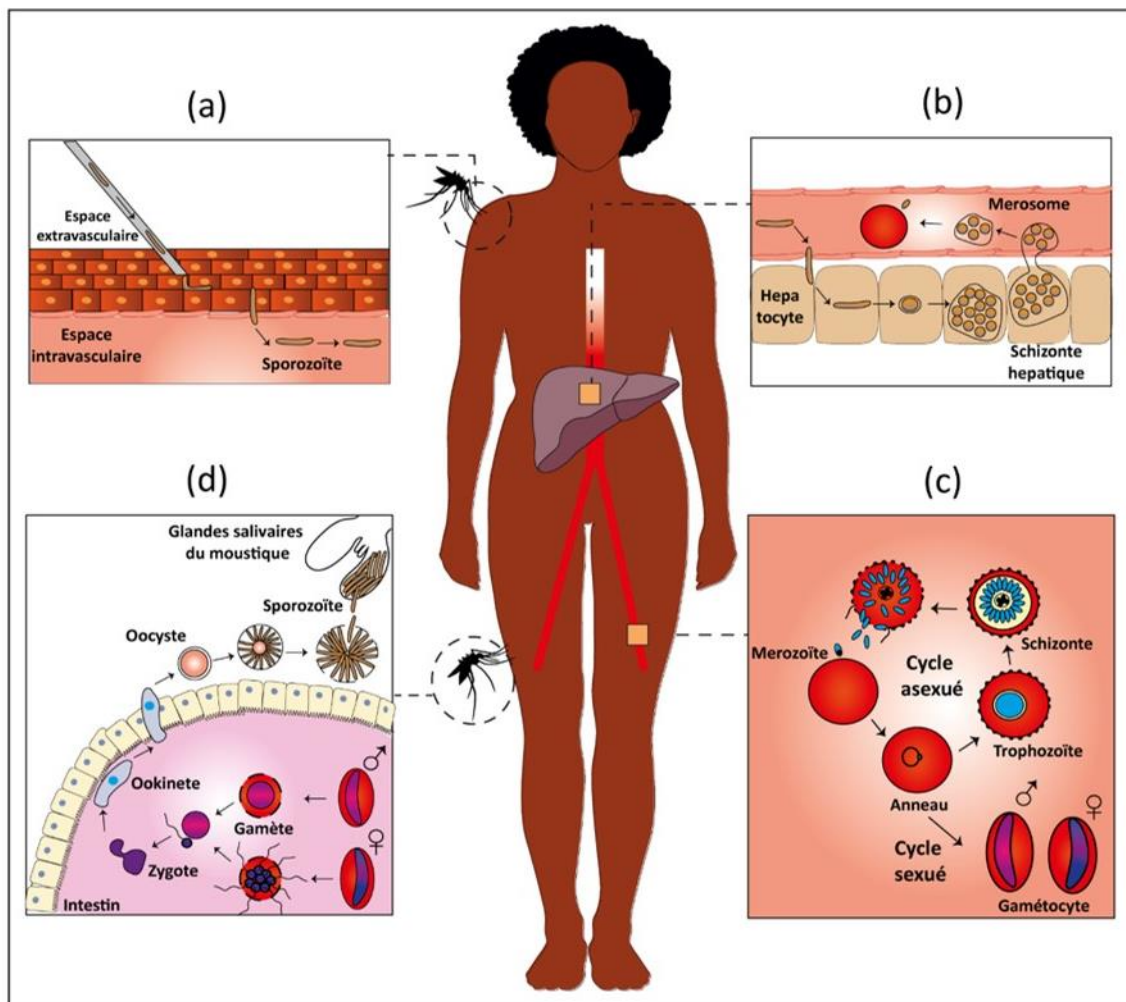


Figure 3 : Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*. Le moustique injecte des sporozoïtes dans la peau de l'hôte humain (a). Les parasites vont ensuite rejoindre le foie pour effectuer leur phase hépatique (b). Après cette phase, les mérozoïtes vont rejoindre la circulation sanguine pour infecter les globules rouges. C'est la phase érythrocytaire (c) qui conduit au cycle asexué (production de mérozoïtes) ou au cycle sexué (production de gamétocytes). Lors de son repas sanguin, le moustique va ingérer des

gamétocytes qui vont se développer, après plusieurs étapes, en sporozoïtes (d) pour recommencer le cycle.

2. Biologie des gamétocytes de *P. falciparum*

L'étude de la gamétocyto-genèse de *Plasmodium falciparum* a connu un essor ces dix dernières années. Autrefois négligés car ils ne causent aucun symptôme du paludisme, les gamétocytes font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches à travers le monde. Cet intérêt récent pour la biologie des gamétocytes s'inscrit dans un contexte d'éradication du paludisme. En effet, ce sont les seules formes du parasite transmissibles au moustique. Il est donc indispensable de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui surviennent au cours de ce processus dans le but d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques.

a. Engagement vers la voie sexuée : Facteurs épigénétiques et environnementaux

Les changements physiques et physiologiques qui se font au cours la gamétocyto-genèse dépendent de signaux internes (régulation génétique et épigénétique) et externes (composition du milieu, présence d'antipaludéens, forte parasitémie ...).

i. Facteurs génétiques et épigénétiques

Durant le cycle asexué de *Plasmodium*, de nombreux gènes impliqués dans des mécanismes cruciaux tels que la cytoadhérence ou encore l'échappement au système immunitaire, sont régulés de façon épigénétique. La conversion des stades asexués en gamétocytes est aussi soumise à ce type de régulation. En effet, plusieurs études ont mis en lumière le rôle majeur du facteur de transcription AP2-G (*Api AP2 inducing gametocytogenesis*) dans l'induction de la gamétocyto-genèse (Kafsack et al., 2014; Sinha et al., 2014). AP2-G est un facteur de transcription qui se lie à l'ADN et qui appartient à la famille Api-AP2, groupe des régulateurs majeurs de l'expression génique chez *Plasmodium*. En 2014, l'étude de souches de parasites qui ont perdu leur capacité à produire des gamétocytes a permis de mettre en lien cette incapacité avec une mutation dans le gène *ap2g* (Kafsack et al., 2014). De même, l'utilisation d'un système d'activation conditionnelle du gène *ap2g* chez des formes anneaux du parasite conduit à leur conversion en gamétocyte chez plus de 50% des parasites. De plus, l'expression du gène *ap2g* est régulée de façon épigénétique : les régulateurs épigénétiques HP1

(Heterochromatin Protein 1) et HDA2 (Histone Desacetylase 2) sont capables d'inhiber l'expression d'*ap2g* chez les stades asexués en méthylant la lysine 9 de l'histone 3 H3K9 (Brancucci et al., 2014; Coleman et al., 2014). En présence de ces protéines, la région d'ADN où se trouve le gène *ap2g* va être sous forme d'hétérochromatine, donc inaccessible pour la transcription. En leur absence, on observe l'expression du gène *ap2g* et donc l'engagement vers la voie sexuée. Par conséquent, HP1 et HDA2 peuvent être apparentés à des régulateurs épigénétiques de la production de gamétocytes. Aussi, la protéine GDV1 (*Gametocyte development 1*), identifiée après un séquençage de plusieurs souches de *Plasmodium* incapables de produire des gamétocytes, a été décrite comme un facteur épigénétique qui régule la gamétocytogénèse (Eksi et al., 2012). En effet, chez les gamétocytes, la présence de la protéine GDV1 qui se fixe à HP1, va empêcher la méthylation de l'histone H3K9, levant ainsi la répression de l'expression d'AP2-G (Filarsky et al., 2018) (**Figure 4**).

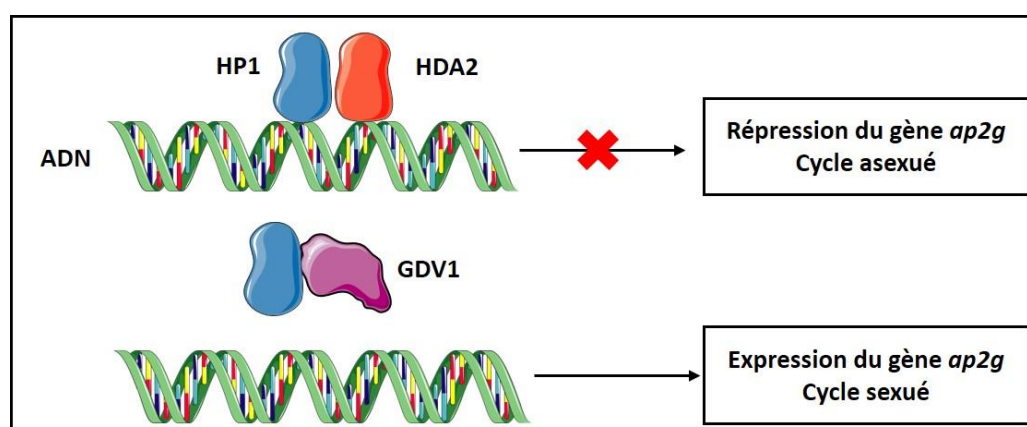


Figure 4 : Régulation épigénétique de l'engagement vers la voie sexuée du cycle érythrocytaire.

Tous ces différents facteurs vont contribuer de façon directe ou indirecte à la reprogrammation génétique des parasites afin de donner des gamétocytes. La conversion vers la voie sexuée peut avoir lieu à deux moments différents du cycle érythrocytaire : l'expression d'*ap2g* au stade schizonte va donner des mérozoïtes « induits » qui, une fois dans le globule rouge, vont évoluer en gamétocytes. Cette voie est appelée NCC (Next Cycle Conversion) car l'induction de la gamétocytogénèse par AP2-G se fait dans le cycle précédent le développement du gamétocyte. Elle a longtemps été la seule voie d'engagement vers la voie sexuée reconnue par la communauté scientifique (Bruce et al., 1990). Cependant, il a été démontré récemment que l'expression d'*ap2g* pouvait également survenir au stade anneau

et induire directement sa transformation en gamétocyte de stade I. Cette autre voie de conversion est appelée SCC (Same Cycle Conversion) (Bancells et al., 2019)(Figure 5).

Elément retiré, diffusion non autorisée

Figure 5 : Modèles de l'induction de l'engagement vers la voie sexuée par l'expression ou non de PfAP2-G. (Josling and Llinás, 2019)

ii. Facteurs environnementaux

L'engagement vers la voie sexuée des parasites *Plasmodium*, bien que régulé de façon génétique et épigénétique, intervient dans un contexte bien particulier. En effet, plusieurs éléments comme la composition du milieu (Brancucci et al., 2015; Williams, 1999), la présence d'antipaludéens (Buckling et al., 1999), la présence de réticulocytes (Hentzschel et al., 2021; Trager and Gill, 1992) ou encore une forte parasitémie pourraient contribuer à l'engagement vers la voie sexuée. Cependant, les voies moléculaires qui pourraient être impliquées dans cet engagement n'ont toujours pas été identifiées. A ce jour, le seul métabolite qui a été démontré comme ayant un impact sur la gamétocytogénèse est la lysophosphatidylcholine (LysoPC)(Nicolas M. B. Brancucci et al., 2017). Ce métabolite présent dans le sérum humain, est impliqué dans la voie de biosynthèse des phospholipides essentiels à la formation de la membrane plasmique des parasites asexués. Dans un milieu avec une concentration élevée de LysoPC, l'expression d'*ap2g* est réprimée. Au contraire, la déplétion du milieu en LysoPC

entraîne l'expression d'*ap2g* et donc la conversion des parasites asexués en gamétocytes. Cependant, les voies moléculaires par lesquelles la LysoPC influence l'expression d'*ap2g* restent encore inconnues. La LysoPC utilise la voie métabolique de Kennedy pour donner la phosphatidylcholine. C'est l'activation de cette voie qui inhiberait la gamétocytogénèse. Une hypothèse qui pourrait expliquer cette corrélation réside dans l'existence d'une autre voie métabolique qui permet la synthèse de phosphatidylcholine lorsque la disponibilité de LysoPC diminue. En effet, cette voie utilise le S-Adénosylméthionine (SAM) comme coenzyme afin de transformer la sérine ou l'éthanolamine en choline. Ce coenzyme est aussi impliqué dans le bon fonctionnement d'enzymes comme les histones méthyltransférases (HMT) du noyau. Une mobilisation importante de SAM pour la synthèse de la choline en réponse au déficit de LysoPC dans le milieu, engendrerait le mauvais fonctionnement des HMT tels que HP1. Ce mécanisme aurait pour conséquence la levée de la répression du gène *ap2g* et donc la différenciation des parasites en gamétocytes (Josling et al., 2018). Si cette hypothèse est vérifiée, la concentration en LysoPC du milieu de culture pourrait être assimilée à un senseur environnemental du parasite pour l'engagement vers la voie sexuée.

b. Développement des gamétocytes

i. Modifications morphologiques des gamétocytes

Une fois que les stades asexués de *Plasmodium falciparum* s'engagent vers la voie sexuée, ils subissent plusieurs modifications morphologiques au sein de leur cellule hôte jusqu'à atteindre la forme falciforme caractéristique des stades V (Sinden, 1982). Si les quatre derniers stades de gamétocytes sont facilement identifiables au microscope, le stade I quant à lui présente une morphologie très semblable à celle d'un érythrocyte infecté par un trophozoïte. Le développement d'outils génétiques applicables à *Plasmodium* a permis la génération de parasites transgéniques qui expriment des rapporteurs fluorescents sous le contrôle de promoteurs de gènes exprimés spécifiquement chez les gamétocytes, comme *pfs16* (Bouyer et al., 2020; Neveu et al., 2020) ou *pfg27* (Camarda et al., 2010; Silvestrini et al., 2010). Ces parasites transgéniques ont permis de faire la distinction entre ces deux stades (Tibúrcio et al., 2013). Ce n'est qu'à partir du stade II que les gamétocytes adoptent une morphologie différente des formes asexuées du parasite. Cette forme peut être assimilée à une

morphologie en demi-lune ou citron avec des extrémités légèrement accentuées. Au stade III, on assiste à l'élongation du gamétocyte qui va se positionner de façon centrale dans sa cellule hôte. Le gamétocyte va donc adopter une forme d'ellipse. Le stade IV du gamétocyte s'allonge encore plus et présente une forme légèrement courbée avec des extrémités très pointues. Enfin, au stade V, le gamétocyte perd en longueur et voit ses extrémités s'arrondir pour donner la forme de banane propre à *Plasmodium falciparum*. Tous ses changements morphologiques sont accompagnés de la digestion graduelle de l'hémoglobine du globule rouge jusqu'au stade V où elle est quasi inexistante.

Elément retiré, diffusion non autorisée

Figure 6 : Différents stades de développement des gamétocytes de *P. falciparum* (Josling and Llinás, 2015)

ii. Modifications structurales des gamétocytes

Au-delà des changements morphologiques observés au cours de la gamétocytogénèse, il se produit des modifications dans l'ultrastructure des gamétocytes comme la restructuration du *Inner Membrane Complex* (IMC) ou encore l'apparition des corps osmiophiliques (COs). **(Figure 7)**

L'IMC est une caractéristique des Alveolata, division phylogénétique à laquelle appartient les *Apicomplexa* et donc le genre *Plasmodium* (Gould et al., 2008). Chez *Plasmodium falciparum*, l'IMC est constitué de vésicules aplaties présentes sous la membrane plasmique. Il est relié à la membrane plasmique par un réseau de microtubules (Dearnley et al., 2016, 2012; Sinden, 1982). L'IMC est impliqué dans le maintien ou le changement de morphologie du parasite (arrondie ou allongée) au cours de son développement. En effet, il intervient lorsque le parasite passe du stade sporozoïte (forme allongée) au stade trophozoïte hépatique (forme arrondie) (Bergman et al. 2003 ; Poulin et al. 2013) ou encore dans le maintien de la forme trapue des ookinètes de *Plasmodium berghei* (Trempe et Dessens, 2011). Chez les

gamétocytes, le développement de l'IMC couplé à la prolifération du réseau de microtubules durant la gamétocytogénèse accompagnent les changements morphologiques observés dès les premiers stades de développement du gamétocyte. Au stade V, le réseau de microtubules se désassemble et l'IMC entoure complètement le gamétocyte.

Chez *P. falciparum*, les corps osmiophiliques (COs) sont des structures uniquement présentes chez les gamétocytes femelles. Elles apparaissent dès le stade III du développement du parasite et persistent jusqu'au stade V (Sinden, 1982). En 1995, la protéine Pfg377 a été identifiée comme étant contenue dans les COs (Alano et al., 1995). Plus tard, le caractère essentiel de cette protéine a été mis en évidence, notamment dans la formation des COs ainsi que pour son rôle dans la sortie des gamètes du globule rouge (de Koning-Ward et al., 2008; Suárez-Cortés et al., 2014). Pour mieux caractériser leur rôle physiologique, une étude comparative entre des parasites délétés pour *pfg377* et des parasites sauvages a permis d'identifier seize protéines dans les COs dont certaines sont en cours d'analyses fonctionnelles (Suárez-Cortés et al., 2016). Cette étude semble indiquer que le rôle des COs intervient plutôt au niveau de la transmission au moustique. D'autres protéines telles que la *Gamete Egress and Sporozoite Transversal protein* GEST ou *Subtilisin-like Proteases 2* SUB2 ont également été identifiées dans les COs de *P.falciparum* (Suárez-Cortés et al., 2014; Weißbach et al., 2017). Elles peuvent donc être assimilées à des vésicules sécrétoires (Bennink and Pradel, 2021). Une étude de 2020 a montré l'implication des COs dans la sortie des gamètes de leur cellule hôte. La relocalisation des COs au niveau de la membrane du parasite juste après l'activation du gamétocyte femelle contribuerait à la rupture de la membrane de la vacuole parasitophore puis de celle du globule rouge (Ishino et al., 2020).

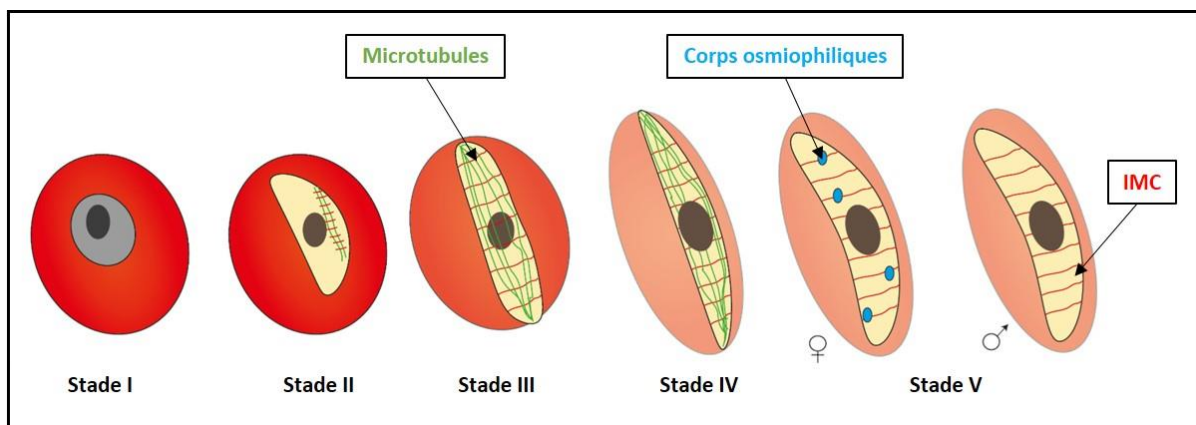


Figure 7: Développement de l'IMC et du réseau de microtubules pendant la gamétocytogénèse. Apparition des corps osmiophiliques chez les gamétocytes femelles de stade V. Schéma adapté de (Bennink and Pradel, 2021; Dixon and Tilley, 2021). Microtubules en vert ; COs en bleu ; IMC en jaune.

c. Séquestration, circulation et persistance des gamétocytes chez l'homme

i. Séquestration des gamétocytes dans la moelle osseuse

La présence de gamétocytes dans la moelle osseuse a été suggérée depuis la fin du XX^{ème} siècle (Smalley et al., 1981; Wickramasinghe et al., 1987). En effet, des échantillons de moelle osseuse issus de patients atteints de neuro-paludisme ont permis d'y détecter la présence de gamétocytes. Des études plus récentes sur des biopsies ou des échantillons de moelle, utilisant des techniques d'histologie (Farfour et al., 2012; Joice et al., 2014) ou de biologie moléculaire comme la RT-qPCR (Aguilar et al., 2014; Joice et al., 2014), ont confirmé la présence de gamétocytes immatures dans la moelle osseuse, plus précisément dans l'espace extra-vasculaire (**Figure 8**). Dans un modèle de souris humanisée qui permet le déroulement complet de la gamétocytogénèse grâce à une greffe de globules rouges humains, la présence de gamétocytes de *P. falciparum* a également été détectée dans la moelle osseuse et dans la rate grâce à des techniques d'histologie et de biologie moléculaire (Duffier et al., 2016). Plusieurs hypothèses ont été proposées quant aux mécanismes de séquestration des gamétocytes immatures dans la moelle osseuse: en 2012, des travaux ont mis en évidence le fait que les Globules Rouges Infectés par des Gamétocytes (GRIGs) immatures de *P. falciparum* étaient plus rigides que le GRIG mature (Aingaran et al., 2012; Dearnley et al., 2012; Tibúrcio et al., 2012), suggérant que les GRIGs immatures pourraient être séquestrés par rétention mécanique dans le parenchyme de la moelle osseuse. Le gain de déformabilité au stade V leur permettrait de rejoindre la circulation sanguine. Une étude de 2018 a ensuite montré que les GRIGs immatures de *P. falciparum*, et non les stades matures, adhèrent aux cellules mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse par des interactions sensibles à la trypsine (Messina et al., 2018). Enfin, une étude de 2020 a montré que les parasites de *P. falciparum* pouvaient infecter des érythroblastes humains, naturellement présents au sein des îlots érythroblastiques dans le parenchyme de la moelle osseuse (Neveu et al., 2020). L'infection par *Plasmodium* a pour effet de retarder la conversion des érythroblastes en réticulocytes, permettant ainsi aux gamétocytes de se développer jusqu'au stade IV dans des érythroblastes

qui adhèrent aux macrophages des îlots érythroblastiques. Une fois matures, les gamétocytes au sein des réticulocytes pourraient alors sortir dans la circulation sanguine. La présence de gamétocytes dans des érythroblastes a aussi été observée dans des échantillons de moelle osseuse de patients infectés (Neveu et al., 2020). Alors que tous ces éléments expliqueraient la présence des stades immatures dans la moelle osseuse, aucune des trois hypothèses n'exclue l'autre. Elles pourraient toutes les trois contribuer à la séquestration des gamétocytes immatures dans la moelle osseuse.

Elément retiré, diffusion non autorisée

Figure 8 : Images d'immunohistochimie réalisées sur des échantillons de moelle osseuse de patient impaludé. (A) Les gamétocytes sont marqués par la protéine Pfs16 (rouge) et les cellules de la moelle osseuse avec de l'hématoxyline (bleu-violet). (B) E : espace extra-vasculaire, I : espace intra-vasculaire. Les cellules endothéliales sont marquées en marron par le CD31 (Joice et al., 2014)

ii. Circulation et persistance des gamétocytes

La très longue persistance des gamétocytes dans le sang périphérique est un élément crucial pour sa transmission, car elle augmente la probabilité qu'un gamétocyte d'être ingéré par un moustique, et donc d'être transmis à un autre hôte. En effet, après environ 8 jours dans la moelle osseuse (Cao et al., 2019), les GRIGs matures rejoignent la circulation sanguine. Leur présence dans la circulation sanguine avait été estimée à environ 5-6 jours (Bousema et al., 2010). Ce temps peut être influencé par des traitements contre le paludisme. En effet, la comparaison de deux essais cliniques a permis de montrer que la durée de la circulation des gamétocytes matures dans le sang peut être réduite de 4 fois à la suite d'un traitement aux CTA et que l'addition d'une dose de primaquine réduit encore plus ce temps de circulation (Bousema et al., 2010). Cependant,

une étude de 2019 qui utilise un modèle mathématique, validé par des données biologiques de volontaires sains infectés par *Plasmodium* (Collins et al., 2018), a permis de réévaluer ce temps de circulation à environ 63 jours (Cao et al., 2019). Dans le cadre du développement d'une molécule anti-gamétocyte, ce paramètre est très important à prendre en compte car il indique qu'il est nécessaire d'utiliser une molécule qui a un temps de demi-vie assez long afin d'augmenter son efficacité.

Le parasite a développé plusieurs stratégies pour pouvoir persister longtemps dans la circulation sanguine. Une première stratégie consiste à limiter les antigènes parasitaires à la surface du globule rouge hôte, contrairement à ce qui est observé chez les stades immatures et les stades asexués, afin d'éviter la réponse immunitaire de l'hôte. Une étude de 2019 a mis en évidence la disparition d'antigènes à la surface des gamétocytes à partir du stade III (Dantzler et al., 2019). En effet, les auteurs ont détecté dans le sérum de patients des IgG capables de reconnaître les gamétocytes de stades I-II mais pas ceux de stades III à V. L'absence de ces antigènes au stade V reflète la perte des propriétés adhésives des stades matures (Messina et al. 2018) et pourrait permettre au gamétocyte mature de circuler librement dans le sang.

Une deuxième stratégie développée par le GRIG mature consiste à réguler sa perméabilité. Alors que les stades asexués de *P. falciparum* activent des canaux ioniques à la membrane du globule rouge, permettant le passage d'ions, d'acides aminés et de certains antipaludéens, une étude de 2020 a mis en évidence que les GRIGs matures étaient imperméables à ces composés (Bouyer et al., 2020). La diminution de la perméabilité se fait progressivement au cours de la gamétocytoγένèse. Cela expliquerait pourquoi, contrairement aux stades immatures, les GRIGs matures sont insensibles à la lyse isosmotique (Bouyer et al., 2020) et à une majorité d'antipaludéens (Wadi et al., 2019). Cette nouvelle propriété permettrait aux GRIGs matures de résister aux variations de concentrations ioniques, à la pression osmotique mais aussi à la présence d'antipaludéens dans le sang. Cette propriété pourrait contribuer à la longue présence des GRIGs matures dans la circulation sanguine. Elle pourrait donc représenter une cible thérapeutique très pertinente.

Enfin, la stratégie principale adoptée par les GRIGs matures est le gain de déformabilité, observé à la transition entre stades IV et V, qui leur permet d'échapper au contrôle de la

rate. Cet organe du système immunitaire a pour fonction principale de filtrer le sang, et notamment de contrôler la déformabilité des globules rouges circulants. Il est composé de deux structures principales : la pulpe blanche et la pulpe rouge (**Figure 9A**). On y distingue deux types de microcirculation : la circulation rapide ou fermée qui se fait lorsque le sang provenant de l'artère splénique arrive à grande vitesse dans la rate et poursuit son chemin dans les sinus veineux ; la circulation lente ou ouverte qui consiste en ce que le sang provenant de l'artère splénique passe soit par les cordons spléniques (ou cordons de Billroth), soit par les fentes inter-endothéliales des sinus veineux afin de rejoindre la circulation sanguine. Cette circulation lente constitue le circuit le plus contraignant que le globule rouge doit emprunter (**Figure 9B**). En effet, les fentes inter-endothéliales mesurent environ 2 μM , ce qui représente moins d'un tiers du diamètre du globule rouge (7 μM). Toute altération de la déformabilité du globule rouge (vieillesse, physiopathologie ou infection) va entraîner sa rétention au niveau de la pulpe rouge de la rate où il sera détruit par les macrophages résiduels. La rétention des globules rouges infectés par *P. falciparum* entraîne une augmentation significative de la taille de la rate ou splénomégalie qui est un symptôme commun du paludisme.

Élément retiré, diffusion non autorisée

Figure 9 : Structure de la rate et circulation sanguine ouverte ou lente des globules rouges.
(Encyclopædia Universalis France)

Plusieurs études ont mis en évidence les changements de déformabilité observés chez des globules rouges infectés par des stades asexués de *P. falciparum* (Safeukui et al. 2008; Deplaine et al. 2011; Safeukui et al. 2013) mais aussi par des gamétocytes au cours de leur développement (Aingaran et al. 2012; Dearnley et al. 2012; Tibúrcio et al. 2012). Cette nouvelle propriété GRIG est cruciale pour la pérennité du cycle du parasite. En effet, le gain de déformabilité chez les stades V leur permet de persister dans la circulation sanguine pour être ingéré par un moustique. De fait, cette propriété du GRIG mature constitue une cible thérapeutique d'un grand intérêt. Des travaux ont montré que différentes molécules pouvaient augmenter la rigidité des GRIGs matures de façon significative (Duez et al., 2018, 2015; Ramdani et al., 2015). Elles peuvent donc constituer un point de départ pour des molécules anti-transmission.

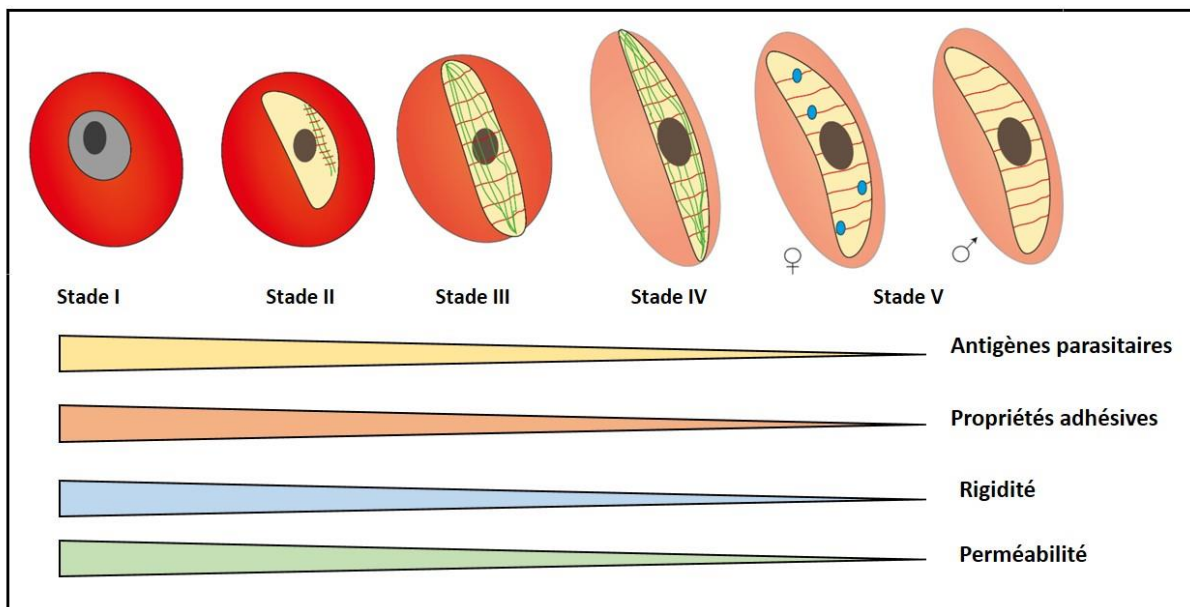


Figure 10 : Récapitulatif des différentes stratégies mises en place par les GRIGs matures pour persister longtemps dans la circulation sanguine .

C. Les antipaludéens dirigés contre *P. falciparum*

1. Les antipaludéens dirigés contre les formes asexuées du parasite

La grande majorité des antipaludéens sont sélectionnés pour leur capacité à tuer les formes asexuées du parasite. Du fait de leur forte réplication, les stades asexués sont métaboliquement très actifs. En effet, à cette étape de son développement, le parasite a

besoin de nombreux nutriments qu'il récupère du milieu extérieur. Les voies métaboliques sont donc des cibles privilégiées pour les antipaludéens.

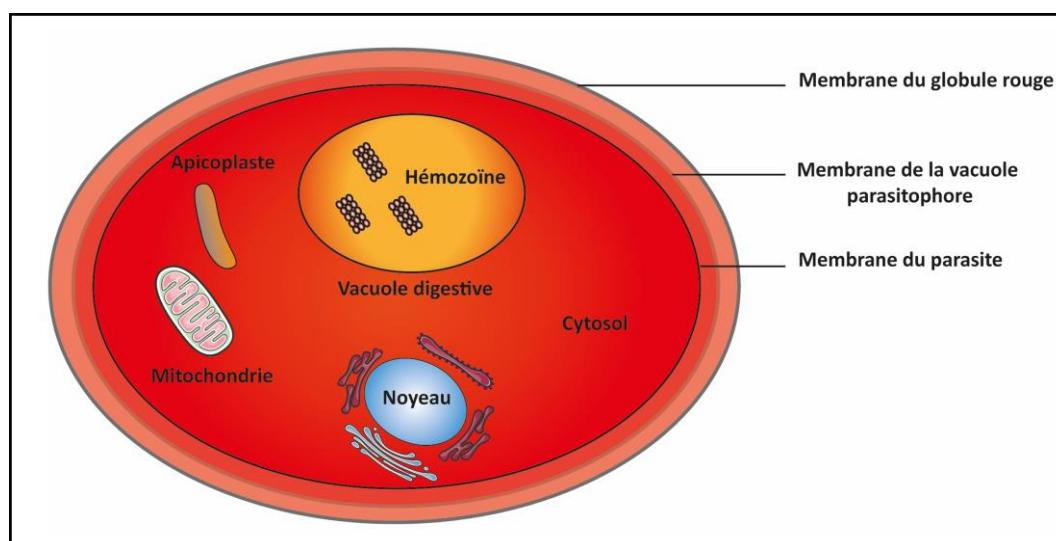


Figure 11 : Cibles des antipaludéens chez les formes asexuées de *P. falciparum*

On dénombre sept classes d'antipaludéens récapitulées dans le tableau ci-dessous :

CLASSES CHIMIQUES	NOMS COMMUNS	CIBLE CHEZ LE PARASITE
Amino alcools	- Quinine - Méfloquine - Luméfantrine - Halofantrine	- Vacuole digestive - Cytosol
4-Aminoquinolines	- Chloroquine - Amodiaquine - Piperaquine - Pyronaridine - Naphthoquine	Vacuole digestive
8-Aminoquinolines	- Primaquine - Tafenoquine	- Voie métabolique - Non déterminé
Endoperoxydes	- Artémisinine - Artésunate - Artemether - Dihydroartémisinine	- Vacuole digestive - Cytosol
Antifolates	- Pyriméthamine - Sulfadoxine - Proguanil	Cytosol

Naphthoquinone	• Atovaquone	• Mitochondrie
Antibiotique	• Clindamycine • Doxycycline • Tétracycline	• Cytosol • Ribosome 70S

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des classes d'antipaludéens et leur cible chez le parasite.

Cependant, de nombreuses résistances sont apparues dans les régions endémiques. La plus récente est la résistance à l'artémisinine (Dondorp et al. 2009; Lu, Culleton, et Cao 2017; Balikagala et al. 2021). Une mutation dans le gène *kelch 13* chez *Plasmodium* a été identifiée comme étant à l'origine de cette résistance (Ariey et al., 2014). Cette mutation sert dorénavant de marqueur de résistance identifiable chez les souches de parasites.

2. Les antipaludéens dirigés contre les gamétocytes

Contrairement aux stades asexués, les gamétocytes ont un métabolisme ralenti et la digestion de l'hémoglobine est achevée chez les stades matures (Plouffe et al., 2016). De plus, la perméabilité des GRIGs diminue au cours de la gamétocyto-genèse, conduisant à une baisse de la pénétration de certaines molécules dans la cellule infectée (Bouyer et al., 2020). Par conséquent, l'efficacité des antipaludéens classiques baisse considérablement chez les gamétocytes matures et seuls les premiers stades du gamétocyte sont sensibles à ces traitements (Plouffe et al., 2016).

A ce jour, la primaquine est le seul antipaludéen recommandé par l'OMS pour son efficacité sur les gamétocytes matures (White, 2013). Cependant, son mode d'action est encore mal connu ; certains travaux suggèrent l'implication de l'enzyme hépatique CYP2D6 (Bennett et al., 2013; Masimirembwa et al., 1995; Pybus et al., 2013). En effet, pour être active, la primaquine doit être métabolisée pour donner un métabolite actif, l'hydroxy-primaquine. Néanmoins, le traitement à la primaquine entraîne une hémolyse aiguë chez les personnes déficientes en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) (Graves et al., 2014). Or, la plupart des personnes déficientes en G6PD sont dans les zones endémiques (Afrique et Asie), ce qui rend difficile l'utilisation de cette molécule à grande échelle. La Tafenoquine, également de la famille des 8-aminoquinolines, a aussi été introduite comme potentielle molécule anti-

gamétocyte. En effet, cette molécule, en plus d'avoir un effet sur les stades asexués (Ramharter et al., 2002), présente un temps de demi-vie plus long que la primaquine. Le risque d'hémolyse chez les personnes déficientes en G6PD a été écarté dans une récente étude basée sur plusieurs travaux effectués sur la Tafenoquine au cours de ces vingt dernières années (Maier et al., 2021). L'utilisation du bleu de méthylène, efficace contre les gamétocytes et les sporozoïtes, a été suggérée comme étant un substitut potentiel à la primaquine chez les patients déficients en G6PD. En effet, plusieurs études ont montré un impact sur les gamétocytes mâles et femelles (Ruecker et al., 2014). Cependant, le manque d'études solides pour évaluer le risque d'hémolyse à la suite d'un traitement au bleu de méthylène ne permet pas de conclure quant à sa possible utilisation chez ces patients.

Plusieurs autres molécules ciblant les gamétocytes sont en phase d'essai clinique (Wadi et al., 2019). Une des molécules anti-gamétocyte les plus avancées est la Cipargamine (Van Pelt-Koops et al. 2012). Cette molécule est un inhibiteur de la *Plasmodium* ATP4ase qui est impliquée dans l'homéostasie du sodium chez le parasite (Spillman et al., 2013). Elle est en ce moment en phase clinique II. Une étude très récente regroupant cinq pays d'Afrique sub-saharienne a permis d'évaluer l'efficacité, les paramètres pharmacocinétiques et les marqueurs de résistance à la Cipargamine (Schmitt et al., 2021). Cette molécule a aussi été testée chez des volontaires sains (McCarthy et al., 2021). Même si les auteurs ont obtenu les mêmes résultats que les études précédentes concernant la clairance rapide des parasites, ils ont aussi observé une toxicité hépatique chez certains volontaires. Il est donc nécessaire de réévaluer le profil d'innocuité de la Cipargamine.

Plusieurs équipes, dont la nôtre, se sont penchées sur l'étude d'autres mécanismes biologiques des gamétocytes qui n'impliquent pas les voies métaboliques du parasite.

Une étude très récente a montré que la protéine Pfs16, marqueur précoce de la gamétocytogénèse était la cible d'une molécule anti-transmission qui cible la microgamétogénèse, processus par lequel les gamétocytes mâles se différencient en gamètes mâles chez le moustique (Yahiya et al., 2021). Dans ces travaux, les auteurs ont généré une sonde couplée à leur molécule d'intérêt qu'ils ont utilisée pour réaliser une expérience de photo-affinity labelling. Cette approche leur a permis, par spectrométrie de masse, d'identifier directement la cible de leur molécule, en l'occurrence la protéine Pfs16. Située

au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore, cette protéine serait impliquée dans les premières étapes de différenciation des gamétocytes mâles en gamète mâles.

D. Modification des propriétés mécaniques des globules rouges infectés

1. Régulation de la déformabilité des globules rouges infectés

a. Déformabilité du globule rouge

i. Le globule rouge : nature et fonction

Les globules rouges sont des cellules du sang, produites à la suite d'un processus appelé érythropoïèse. Leur durée de vie est en moyenne de 120 jours, à la suite de quoi les globules rouges vieillissants sont détruits par les macrophages de la rate lors de la filtration du sang. La principale fonction de ces cellules est de transporter l'oxygène dans les différents organes du corps. Cet oxygène est complexé à l'hémoglobine, composant majeur du cytoplasme des globules rouges. L'hémoglobine est une métalloprotéine constituée de molécules de fer fixées à un cofacteur appelé hème et d'un hétéro-tétramère de globine (**Figure 12A**). Le squelette membranaire du globule rouge forme un réseau composé d'hétérodimères de spectrines α et β liés à un complexe protéique jonctionnel constitué d'actine, de tropomyosine, d'adducine, de dématine, de la protéine 4.1R et de P55. Au niveau de la membrane du globule rouge, plus d'une cinquantaine de protéines ayant différentes fonctions (transporteurs, antigènes, récepteurs etc.) ont été caractérisées. Celles qui interagissent avec le squelette membranaire peuvent être réparties en deux complexes : Le complexe Ankyrine et le complexe 4.1R. Le premier complexe est composé d'un dimère de la Band 3 (transporteur anionique), de la protéine RhAG (transporteur de gaz), de la glycophorine A et de la protéine Ankyrine qui les relie toutes entre elles. Le second est constitué de la Band 3, de la glycophorine C, de P55 et de la protéine 4.1R. (**Figure 12B**). Grâce à sa morphologie en forme de disque biconcave, le globule rouge est capable de se déformer de façon extrême au niveau des fentes inter-endothéliales des sinus de la rate afin de rejoindre la circulation sanguine (Mohandas and Gallagher, 2008).

Elément retiré, diffusion non autorisée

Figure 12 : Représentation schématique de l'hémoglobine et de la structure de la membrane du globule rouge. (A) Les quatre chaînes de globines $\alpha 1$ et 2 et $\beta 1$ et 2 forment un hétéro-tétramère. Chaque monomère va fixer des molécules d'oxygène qui sont couplés à l'hème (B) représentation des différentes protéines qui constituent le squelette de la membrane du globule rouge (Lavazec, 2017)

ii. Les techniques de mesures de la déformabilité

La déformabilité du globule rouge peut être mesurée via différentes techniques (Depond et al., 2020) :

- *L'ektacytometrie* : cette technique permet de mesurer la capacité qu'a un globule rouge à s'étirer dans un milieu visqueux sous une contrainte de cisaillements (en Pa). On obtient un index d'élongation entre 0 et 0.65 positivement proportionnel à la déformabilité du globule rouge (Baskurt et al., 2009). Cette méthode a largement été utilisée pour évaluer les changements de déformabilité dans des pathologies comme la sphérocytose héréditaire (Da Costa et al., 2016; Guitton et al., 2008) ou le paludisme (Dondorp et al. 1999; Tibúrcio et al. 2012; Dearnley et al. 2012).
- *L'aspiration par micropipette* : elle consiste à aspirer la membrane d'un globule rouge à travers une pipette en verre à une pression de succion donnée puis à mesurer la portion de membrane capable de s'insérer dans la pipette (Havell et al., 1978). Le paramètre obtenu est le module de cisaillements en pN/ μm (Hochmuth, 2000). Cette

méthode évalue particulièrement l'élasticité de la membrane du globule rouge dans différents cas de figures notamment lors de l'infection par *Plasmodium* (Glenister et al., 2002; Nash et al., 1989; Zhang et al., 2016) .

- *Les méthodes de micro-fluidique* : ce sont des dispositifs qui reconstituent un circuit de passage des globules rouges soit dans les capillaires sanguins, soit dans les fentes spléniques. Les paramètres mesurés sont le temps de passage (Antia et al., 2008; Zhang et al., 2016) ou encore le diamètre minimal de cylindre à travers lequel le globule rouge peut passer (Antia et al., 2008; Canham and Burton, 1968; Namvar et al., 2021).
- *La microscopie à force atomique (ATM)* : cette méthode consiste à analyser les interactions entre les atomes présents à la surface d'une cellule d'intérêt et ceux d'une pointe reliée à un micro-levier. Ces interactions induisent des déviations du levier qui sont traduites en images par un laser. Grâce à ses images, on peut reconstituer la topologie de la surface de la cellule notamment le globule rouge (Aikawa et al. 1996; Barber et al. 2018). Les changements de topologie peuvent être associés à des altérations de la déformabilité des cellules.
- *La microfiltration* : c'est une technologie qui permet de mimer le passage des globules rouges à travers les fentes inter-endothéliales de la rate (Deplaine et al., 2011). Au sens strict du terme, cette technique mesure la filtrabilité du globule rouge qui est une résultante de sa déformabilité. Les fentes inter-endothéliales sont mimées par un mélange de billes d'étain dont le diamètre varie entre 5 et 25 μ m. Le mélange est ensuite déposé sur le filtre d'un cône inversé que devra traverser des globules rouges. A l'aide d'un pousse-seringue, une pression constante est appliquée aux globules rouges. Ceux capables de se déformer seront recueillis dans un tube après leur passage dans les billes alors que les globules rouges rigides seront retenus dans les billes. On obtient donc un pourcentage de rétention qui est inversement proportionnel à la filtrabilité de la cellule perfusée. La pertinence des taux de rétention obtenus a été validée sur des rates perfusées *ex vivo* (Safeukui et al. 2012).

Cette technique a notamment permis de mettre en évidence le gain de déformabilité qui survient chez les GRIGs entre le stade IV et le stade V (Tibúrcio et al., 2012), d'établir le rôle de plusieurs protéines plasmodiales dans la déformabilité des globules rouges parasités (Sanyal et al 2012, Hitz et al 2021, Warncke et al 2019) ou d'évaluer la filtrabilité de globules rouges infectés par différentes souches parasitaires (Andrade et al., 2020; Pickford et al., 2021). Dans l'étude d'Andrade et collaborateurs, les auteurs ont comparé la déformabilité de globules infectés par des parasites asexués de *P. falciparum* issus de souche de terrain (Mali), recueillies soit pendant la saison des pluies, donc la saison de transmission du parasite, soit pendant la saison sèche. Grâce à la technique de microsphiltration, les auteurs ont pu mettre en évidence un gain de déformabilité des globules infectés par des parasites pendant la saison sèche. Cela permettrait aux parasites de circuler pendant la saison sèche sans être éliminés par la rate (Andrade et al., 2020).

iii. Régulation de la déformabilité du globule rouge

Les trois paramètres qui influencent la déformabilité d'un globule rouge sont : la viscosité du cytoplasme, le ratio de l'Aire de la Surface sur le Volume (ASV) de la cellule et l'élasticité de la membrane plasmique (Mohandas and Gallagher, 2008):

- *La viscosité du cytoplasme* est due à la concentration intracellulaire d'hémoglobine. Dans un globule rouge normal, elle varie entre 30 et 35g/dL et est étroitement liée au volume de la cellule. Au-delà de 37g/dL, la viscosité du cytoplasme augmente de façon considérable (15 fois supérieure à viscosité de l'eau). Cela a pour conséquence la réduction de la vitesse à laquelle le globule rouge retrouve sa forme initiale après s'être déformé en réponse à son passage dans des capillaires étroits. Le maintien de la concentration en hémoglobine est donc indispensable pour la déformabilité du globule rouge. De plus, le volume de la cellule étant lié à la composition intracellulaire du milieu en cations, les transporteurs ioniques présents à la membrane du globule rouge régulent donc indirectement la viscosité du cytoplasme du globule rouge.

- *Le ratio ASV* d'un globule rouge est 40% supérieur à celui d'une sphère de même volume. Autrement dit, un globule rouge présente une aire de surface très élevée (140 μm^2). Cela est dû à sa morphologie biconcave. La conservation de ce ratio important est le résultat d'une part, des interactions entre la bicouche lipidique, composée de cholestérol et de phospholipides, et le squelette de la membrane plasmique. En effet, une mauvaise interaction entre ces deux parties entrainerait la vésiculation de la membrane et donc une diminution de l'aire de surface. D'autre part, la stabilité du volume de la cellule contribue à la valeur élevée du ratio ASV. Une augmentation du volume due à une défaillance des transporteurs ioniques membranaires engendrerait la baisse de ce ratio et donc un défaut de déformabilité.
- L'élasticité de la membrane du globule rouge est définie par les interactions entre les protéines du squelette membranaire et les protéines transmembranaires qui forment ensemble un réseau de maillage bidimensionnel. Tandis que la stabilité de la membrane est associée aux interactions verticales entre la bicouche lipidique et le squelette membranaire, la déformabilité de la membrane quant à elle est associée aux interactions horizontales au niveau du réseau de spectrines.

Une étude de 2018 a montré que la présence de l'isoforme A de la myosine non musculaire *Non muscle Myosin II A* (NMIIA) au niveau des filaments d'actine du squelette de la membrane contribuerait de façon active au maintien de la forme biconcave du globule rouge et donc à sa déformabilité (Smith et al., 2018). En effet, l'utilisation de la blebbistatine, inhibiteur de l'activité ATPase de la myosine, a permis d'identifier NMIIA comme étant un pont entre les filaments courts d'actine au niveau du squelette de la membrane du globule rouge. Enfin, grâce à un système de micro-fluidique dans lequel on peut distinguer l'impact du ratio ASV de celui de l'élasticité de la membrane, il a été démontré que l'ASV est le paramètre majeur qui influence la capacité du globule rouge non infecté à traverser ses micro-canaux (Namvar et al., 2021).

b. Déformabilité du globule rouge infecté par *P. falciparum*

En fonction de stade du parasite, les mécanismes qui régulent la déformabilité du globule rouge sont différents.

i. Infection par des stades asexués

L'infection du globule rouge par des stades asexués de *P. falciparum* entraîne une diminution progressive de la déformabilité de la cellule hôte jusqu'au stade schizonte (Cranston et al., 1984; Nash et al., 1989). La dégradation de l'hémoglobine proportionnelle au développement intracellulaire du parasite va permettre de maintenir constant le volume de la cellule infectée (Hanssen et al., 2012). Cette occupation progressive du cytoplasme par le parasite va conduire à une diminution de la déformabilité du globule rouge infecté. Une étude de 2021 a montré que le ration ASV des globules rouges infectés par des trophozoïtes était le même que celui des globules rouges non infectés (Namvar et al., 2021). Le ratio ASV n'influence donc pas la déformabilité des globules rouges infectés par les trophozoïtes. De plus, le remodelage extrême de la membrane du globule rouge infecté contribue à la diminution de la déformabilité de la cellule (Neveu and Lavazec, 2019). En effet, au cours de l'infection, le parasite va exporter un grand nombre de protéines au niveau de la membrane du globule rouge (**Figure 13**). Les protéines telles que Ring Exported Surface Antigen (RESA), Knob-associated Histidine Rich Protein (KAHRP) ou encore les protéines (SubTElomeric Variable Open Reading frame) STEVOR, de par leur interaction avec les protéines du squelette de la membrane, vont entraîner une diminution de l'élasticité de la membrane et donc de la déformabilité de la cellule :

- RESA diminue la déformabilité de la membrane du globule rouge infecté par des stades anneaux du parasite et cet effet est exacerbé à une température de 41° (Mills et al., 2007). Cette protéine pourrait influencer la circulation des globules rouges infectés chez des patients fébriles (Diez-Silva et al., 2012).
- KAHRP est le principal composant des protrusions appelés « *Knobs* » présentes à la surface de la membrane du globule rouge infecté par des stades asexués. Ces protrusions servent de support pour la présentation de l'antigène *Plasmodium falciparum* Export Membrane Protein 1 *PfEMP1* (Crabb et al., 1997; Langreth et al., 1978; Luse and Miller, 1971). Par leurs interactions avec le réseau de spectrines et

d'actine, les protéines KAHRP contribuent à la diminution de la déformabilité de la cellule (Glenister et al., 2002; Looker et al., 2019).

- STEVOR interagit avec les protéines du squelette qui compose le complexe Ankyrine notamment la Bande 3, l'Ankyrine et les spectrines α et β (Naissant et al., 2016). Une étude de 2012 a montré que la surexpression de STEVOR réduit l'index d'élongation et la filtrabilité du globule rouge infecté (Sanyal et al., 2012). L'augmentation de rigidité provoquée par STEVOR est dépendante de la phosphorylation du domaine cytoplasmique de STEVOR par la PKA (Naissant et al., 2016).

Elément retiré, diffusion non autorisée

Figure 13 : Structure de la membrane d'un globule rouge infecté par des stades asexués de *P.falciparum*. (Lavazec, 2017)

ii. Infection par des gamétocytes

L'infection du globule rouge par les gamétocytes modifie également ses propriétés biomécaniques notamment sa déformabilité. En effet, les GRIGs immatures sont plus rigides que les GRIGs matures. L'augmentation de leur déformabilité a été mise en évidence par les techniques de microsphiltration (Tibúrcio et al., 2012), d'Ektacytometrie (Tibúrcio et al. 2012;

Dearnley et al. 2012) et d'aspiration par micropipette (Aingaran et al. 2012). Pour essayer de comprendre comment cette propriété est régulée, plusieurs paramètres ont été étudiés.

Tout d'abord, la dégradation de l'hémoglobine qui est inversement proportionnelle à l'occupation du cytoplasme de la cellule par le gamétocyte permet de maintenir la viscosité du cytoplasme constant au cours de la gamétocytoγένèse (Hanssen et al., 2012). Une autre étude de 2012 dans laquelle le ratio ASV des différents stades de gamétocyte a été mesuré, a permis de montrer que ce paramètre ne varie pas et ne peut donc pas influencer la déformabilité du GRIG (Aingaran et al., 2012).

Ensuite, l'absence chez les gamétocytes de plusieurs protéines impliquées dans la rigidité des globules rouges infectés par des stades asexués, telles que RESA ou KARHP, suggère un autre type de régulation de la déformabilité chez le GRIG (Neveu and Lavazec, 2019). Néanmoins, la présence de la protéine STEVOR au niveau de la membrane du GRIG joue un rôle important dans le mécanisme de déformabilité (Tibúrcio et al., 2012).

De plus, le réseau de microtubules qui se met en place au cours de la gamétocytoγένèse a longtemps été suggéré comme étant impliqué dans la rigidité de stades immatures (Dearnley et al. 2012). En effet, ce réseau est responsable des changements morphologiques qui s'opèrent durant le développement des gamétocytes. Leur disparition à la transition entre les stades IV et V suggère que ce réseau pourrait impacter la déformabilité des gamétocytes. Cependant, une étude de 2016 a permis d'écarter définitivement cette hypothèse (Dearnley et al. 2016). En effet, les auteurs, après avoir traité les GRIGs immatures avec la Trifluraline, molécule qui déstabilise le réseau de microtubules, n'ont observé aucun gain de déformabilité. Cependant, l'utilisation de la cytochalasine D qui entraîne la dépolarisation des filaments d'actine, augmente de façon significative la déformabilité des stades immatures. On peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle les filaments d'actine présents chez le parasite ou au niveau du squelette de la membrane du globule jouent un rôle dans la rigidité des stades immatures.

Enfin, plusieurs études avaient suggéré le rôle des phosphorylations dans la régulation des propriétés mécaniques du globule rouge (Pantaleo et al., 2010). En partant de cette hypothèse, des travaux portant sur la compréhension du mécanisme de régulation de la déformabilité des GRIGs ont mis en évidence le rôle de la voie Adénosine MonoPhosphate

Protéine Kinase A (AMPc-PKA) dans ce phénomène (Ramdani et al., 2015). En effet, dans cette étude, l'utilisation d'inhibiteurs de PKA (H89 ou KT5720) ou d'une souche transgénique sur-exprimant la sous-unité régulatrice de la PKA de *P. falciparum* (Merckx et al., 2008a) rendent les stades immatures plus déformables. A l'inverse, la Forskoline (activateur de l'Adénylate cyclase) ou le Sildénafil (inhibiteur de phosphodiesterases) qui entraînent l'augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc rendent les stades matures plus rigides. Ensuite, la protéine STEVOR a été identifiée comme étant le substrat de la PKA dans ce mécanisme (Naissant et al., 2016). Plus précisément, c'est le domaine cytoplasmique de STEVOR, après avoir été phosphorylé par la PKA, qui permet de former un complexe multi-protéique avec le complexe Ankyrine présent à la membrane au globule rouge. Ces différents complexes vont contribuer à la rigidité du GRIG immature. Chez le stade mature, la baisse du niveau d'AMPc, probablement due à l'expression de la *P. falciparum* Phosphodiesterase delta (*PfPDEδ*), va entraîner une dislocation du complexe, le GRIG mature devient donc déformable (**Figure 14**). Le phénotype obtenu avec une souche transgénique délétée pour *pfpdeδ* soutient fortement l'hypothèse selon laquelle cette protéine sera le régulateur principal du mécanisme de déformabilité chez les gamétocytes. Des travaux plus récents ont confirmé le rôle de la voie de signalisation AMPc-PKA dans la régulation de la déformabilité des GRIGs (Hitz et al., 2021). En effet, les gamétocytes immatures d'une souche délétée de façon conditionnelle pour la sous-unité catalytique de la PKA du parasite présentent un gain de déformabilité. De façon surprenante, les GRIGs matures de cette souche sont également plus déformables que la souche sauvage. La PKA parasitaire ne présentant aucun motif d'export dans le globule rouge infecté, ce résultat suggère que la régulation de la déformabilité des GRIGs pourrait se faire à la fois au niveau de la membrane de la cellule hôte mais aussi au niveau du parasite lui-même.

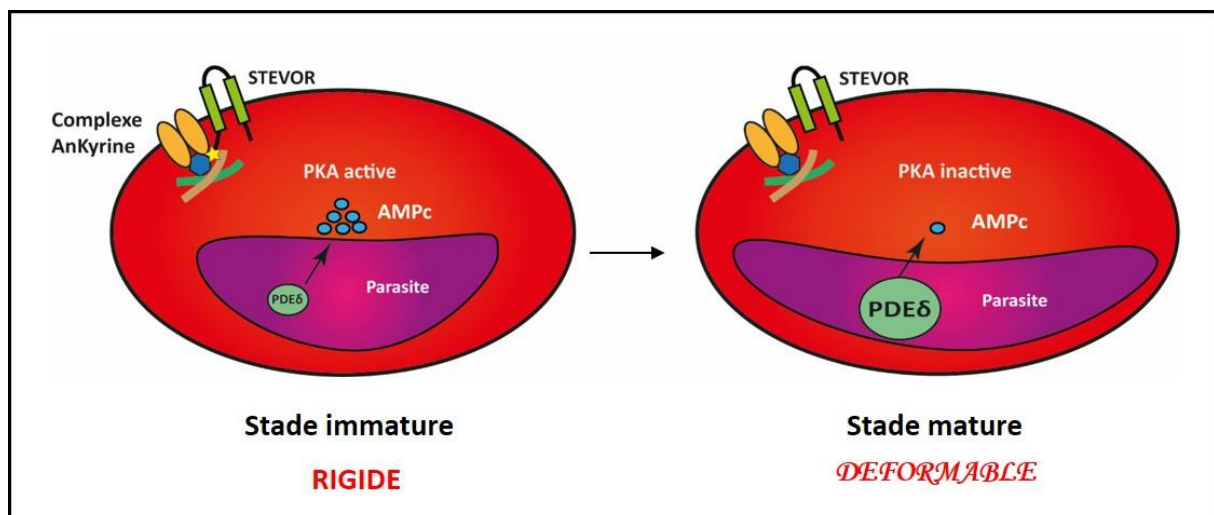


Figure 14 : Modèle de régulation de la déformabilité des GRIGs immatures et matures. (Ramdani et al., 2015)

2. Régulation de la perméabilité des globules rouges infectés.

a. Perméabilité du globule rouge.

Le globule rouge non infecté procède à très peu d'échanges avec le milieu extérieur. On distingue néanmoins deux types de transporteurs au niveau de sa membrane : Les transporteurs actifs ou pompes, et les transporteurs passifs composés de transporteurs membranaires et de canaux ioniques. Les pompes sont des transporteurs qui vont utiliser l'énergie de l'ATP pour fonctionner. Chez le globule rouge, la pompe Na^+/K^+ par exemple va permettre le maintien de la différence en concentrations d'ions Na^+ et K^+ qui existe entre le cytoplasme (milieu intracellulaire) et le plasma (milieu extracellulaire)(Tosteson and Hoffman, 1960). De plus, l'échangeur d'anions $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ou Bande 3 utilise le gradient généré par la pompe Na^+/K^+ pour faciliter le passage des ions Cl^- et HCO_3^- à travers la membrane du globule rouge. On parle alors de transport actif secondaire. Les transporteurs passifs assurent la diffusion de solutés de façon spécifique ou non et ce, en fonction d'un gradient électro-chimique. D'une part, les transporteurs membranaires permettent le passage de molécules non chargées (acides aminés, choline ou urée...) et d'autre part les canaux ioniques transportent les molécules chargées (canal Gardos, cationique et anionique...)(Balach et al., 2019) **(Figure 15)**. Tous ces différents transporteurs membranaires contribuent à l'homéostasie de globule rouge en régulant sa composition en ions et donc son volume.

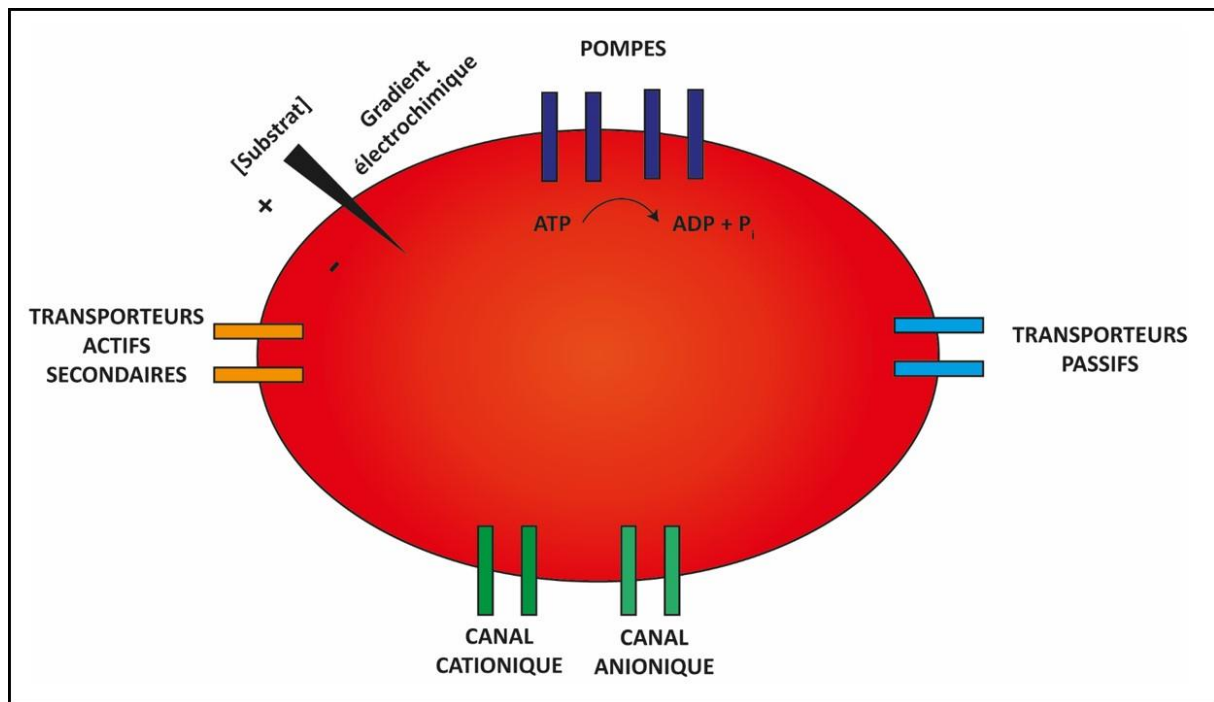


Figure 15 : Schéma récapitulatif des différents types de transporteurs qui régulent la perméabilité du globule rouge. Inspiré de (Martin, 2020)

b. Perméabilité des globules rouges infectés par des stades asexués

Le développement du parasite au sein de sa cellule hôte nécessite un changement physiologique de celle-ci. En effet, afin de pouvoir puiser les nutriments du milieu extérieur mais surtout d'évacuer les déchets métaboliques dus à la digestion de l'hémoglobine, le parasite induit l'activation de canaux anioniques à la membrane du globule rouge appelés *New Permeability Pathways* (NPPs). La nature de ces canaux a longtemps fait l'objet de controverses. Globalement, deux modèles ont été suggérés : le premier implique l'activation d'un canal endogène du globule rouge par le parasite lors de l'infection (Bouyer et al. 2011). Le second suggère que ces canaux soient uniquement d'origine parasitaire d'où l'appellation *Plasmodial Surface Anion Channel* (PSAC) (Desai, Bezrukov, et Zimmerberg 2000; Alkhalil et al. 2004). Des protéines endogènes du globule rouge comme le Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) ou encore les protéines parasitaires du complexe RhopH, présentes dans les rhoptries des mérozoïtes, ont été identifiées comme étant des éléments des NPPs :

- VDAC est un canal de type récepteur à la benzodiazépine. Dans une étude de 2011, les auteurs ont montré que ce canal, déjà présent à surface du globule rouge mais inactif, peut être activé à la suite de l'infection par *Plasmodium*. En effet, l'inhibition de ce récepteur par ajout de son ligand, entraîne un défaut de croissance des stades asexués du parasite (Bouyer et al., 2011).
- L'implication de RhopH1/CLAG3 dans l'activité de PSAC a été montrée à la suite d'un criblage ayant pour but d'identifier un inhibiteur spécifique de PSAC. Cette protéine est codée par la famille multigénique *clag*. L'expression allélique exclusive de l'un ou de l'autre allèle du gène *clag 3* (*clag 3.1* ou *clag 3.2*) confère au parasite une susceptibilité plus ou moins importante à l'inhibiteur ISPAC (Nguitrageol et al., 2011).
- RhopH2 a été identifié comme étant impliqué dans l'activité NPPs chez les globules rouges infectés par des stades asexués de *Plasmodium*. En effet, des parasites mutés pour le gène *rhoph2* présentaient un défaut de croissance et de prolifération (défaut de la rupture des schizontes, malformation des mérozoïtes...) probablement dû au manque de nutriment et à l'accumulation de déchets métaboliques dans la vacuole du parasite. Une souche mutante de *P. berghei* pour RhopH2 présentait un phénotype équivalent et cela *in vivo* (Counihan et al. 2017).
- Le rôle de RhopH3 dans les NPPs a été mis en évidence chez des souches transgéniques exprimant une forme tronquée de la protéine. En effet, les mérozoïtes de cette souche présentaient un défaut d'invasion du globule rouge mais aussi un arrêt précoce du développement intracellulaire des trophozoïtes. Ces phénotypes ont été attribués d'une part à une mauvaise relocalisation de RhopH3 lors de l'invasion, et d'autre part à une baisse de la perméabilité des globules rouges infectés réduisant leur capacité d'import de nutriment du milieu extérieur vers le milieu intérieur (Sherling et al., 2017).

Une étude très récente utilisant la technique de Cryo-microscopie électronique a permis de déterminer pour la première fois la structure tridimensionnelle du complexe RhopH (Ho et al., 2021). Dans cette structure, RhopH1 constituerait le cœur du complexe, faisant le lien en

RhopH2 et RhopH3. Ces travaux suggèrent que le complexe RhopH aurait la capacité de se disloquer pour traverser l'environnement aqueux (vacuole parasitophore) lors de l'invasion par le mérozoïte puis de former un pore au niveau de la face interne du globule rouge.

L'implication de la voie AMPc-PKA dans la régulation de la perméabilité des globules rouges infectés a été suggérée par une étude de 2008 (Merckx et al., 2008a). En effet, la surexpression du gène qui code pour la sous-unité régulatrice de la PKA plasmodiale entraîne une diminution de la conductance anionique chez des globules rouges infectés par des stades asexués. Cela a pour conséquence la diminution de la croissance du parasite, phénotype qui peut être corrigé en augmentant le niveau intracellulaire d'AMPc.

Le canal mécano sensible PIEZO1 présent dans le globule rouge a été identifié comme jouant un rôle dans la physiopathologie de *Plasmodium* (Ma et al., 2018; Nguetse et al., 2020). C'est un canal cationique non sélectif et perméable au Na⁺, K⁺ et au Ca²⁺ (Coste et al., 2010). Une mutation gain de fonction (GDF) de ce canal est liée à la xérocytose héréditaire (Albuisson et al. 2013; Andolfo et al. 2013; Zarychanski et al. 2012). Cette mutation est aussi impliquée dans la protection contre le neuro-paludisme dans un modèle de souris avec *P. berghei* (PIEZO1 R248H) mais aussi dans un tiers de la population africaine (PIEZO1 E756del) (Ma et al., 2018; Nguetse et al., 2020). Le rôle de ce canal dans la réduction de l'infection par *Plasmodium* a été suggéré à plusieurs niveaux : au niveau de la déshydratation du globule rouge (Ma et al., 2018; Tiffert et al., 2005), de la baisse d'expression de *PfEMP1* (Nguetse et al., 2020), protéine parasite impliqué dans l'adhésion, qui était significativement réduite dans des globules rouges. Aussi, le rôle de ce canal a été suggéré au niveau de l'invasion du globule rouge par le mérozoïte dans une étude récente dans laquelle les auteurs ont utilisé des activateurs chimiques de PIEZO1 tels que Yoda 1, Jedi1 et Jedi2 (Lohia et al., 2021). La mutation GDF de PIEZO1 vient donc rejoindre les autres physiopathologies du globule rouge qui confèrent un rôle protecteur contre le paludisme.

c. Perméabilité du globule rouge infecté par des gamétocytes

La présence des NPPs chez les GRIGs avait été exclue à la suite d'une étude qui montrait l'absence de lyse des gamétocytes après une courte exposition au sorbitol (Saul et al., 1990).

Une étude de 2020 a au contraire mis en évidence la présence de NPPs actifs chez les GRIGs immatures en les incubant plus longtemps dans du sorbitol, de l'alanine ou du PhTMA+. Ces résultats ont été confirmés en utilisant les techniques de *patch clamp* et de suivi de l'absorption d'une sonde fluorescente (Bouyer et al., 2020). Cependant, cette activité décline au cours de la gamétocytogénèse. En effet, les GRIGs immatures sont plus perméables aux sucres, acides aminés et ions que les GRIGs matures. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des NPPs tels que le furosémide ou le 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB), ont permis de confirmer que les différents phénotypes de lyse obtenus sont bien dus à la présence des NPPs chez les GRIGs. **(Figure 16)**

L'inhibition de l'activité PKA de façon chimique ou génétique chez les GRIGs conduit à la diminution de la perméabilité des stades immatures. A l'inverse, l'utilisation d'inhibiteurs de PDE tels que le Sildénafil augmente la perméabilité des GRIGs matures (Bouyer et al., 2020). Cependant, le substrat direct de la PKA dans le mécanisme de perméabilité n'a pas encore été identifié. Il pourrait être un élément qui compose les NPPs comme la protéine RhopH1/ CLAG qui présente un motif de phosphorylation par la PKA (Solyakov et al., 2011), ou encore une autre protéine qui interagirait avec les NPPs.

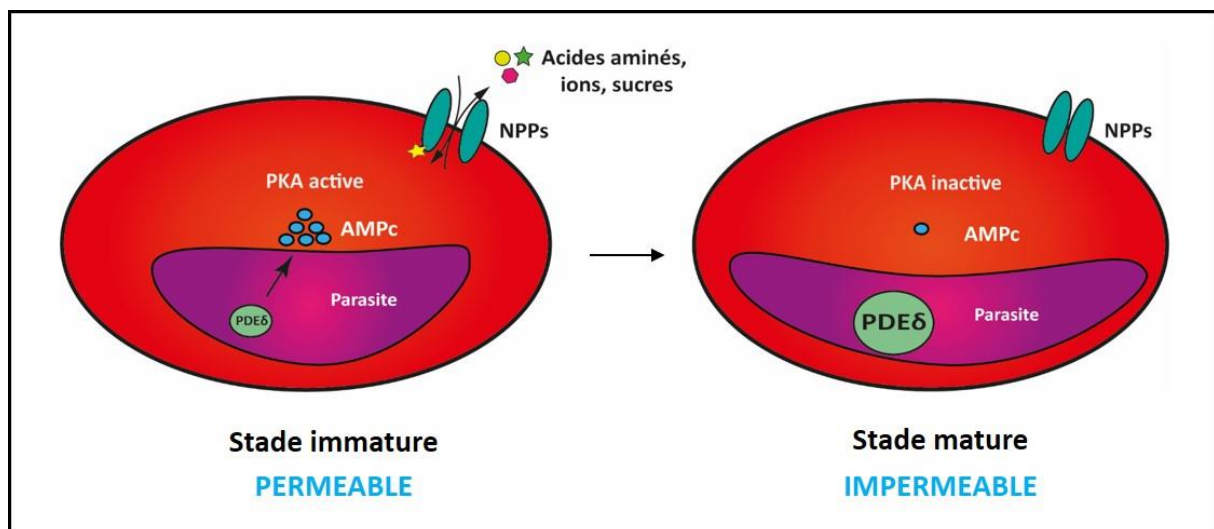


Figure 16 : Modèle de régulation de la perméabilité des GRIGs immatures et matures.

d. Les techniques de mesure de la perméabilité

Les techniques couramment utilisées pour mesurer la perméabilité des globules rouges infectés par *Plasmodium* sont la méthode de la lyse isosmotique (I), l'analyse électrophysiologique (II) ou l'absorption d'une sonde fluorescence (III):

- La méthode de la lyse isosmotique consiste à incuber le globule rouge infecté dans un milieu isosmotique contenant des molécules (sucre, acide aminé, ions ...) auxquels les canaux présents au niveau de la membrane sont perméables (Ginsburg et al., 1983). L'influx d'eau qui accompagne l'entrée de ces molécules à l'intérieur du globule rouge va entraîner la lyse de la cellule. Pour les globules rouges infectés par des stades asexués de *P. falciparum*, la lyse isosmotique est mesurée par la quantification de l'hémoglobine dans le milieu par spectrophotométrie. A cause de la faible quantité d'hémoglobine présente chez les GRIGs matures, la lyse isosmotique est mesurée par le ratio de la parasitémie avant et après l'incubation dans le milieu isosmotique (Bouyer 2020).
- Une des techniques d'électrophysiologie la plus utilisée est le *patch clamp* (Hamill et al., 1981; Neher and Sakmann, 1976): elle consiste à mesurer le courant transmembranaire d'une cellule d'intérêt à une valeur de voltage fixe. La mesure du courant peut se faire au niveau de la cellule entière ou encore sur une portion de la cellule. Le paramètre obtenu est la conductance (picoSiemens) qui reflète l'activité des canaux ioniques situés au niveau de la membrane. Cette méthode a permis de mettre en évidence l'augmentation de la perméabilité qui survient à la suite de l'infection du globule rouge par *P. falciparum* (Desai et al., 1996).
- L'état des canaux (ouvert ou fermé) peut être aussi évalué par le suivi de l'absorption d'une molécule fluorescente par les cellules d'intérêt. La méthode la plus connue est le suivi de l'absorption de la 5' aminolévulinique (5'ALA), qui est un élément de la voie de biosynthèse de l'hème (Sigala et al., 2015.; Sherling et al., 2017.). Lorsque la perméabilité est accrue en cas d'infection par *Plasmodium*, l'accumulation de la 5'ALA dans le cytoplasme du globule rouge va entraîner la synthèse d'un autre intermédiaire de la voie de l'hème, la protoporphyrine IX (PPIX). Cette molécule étant naturellement

fluorescente, on peut donc la quantifier par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules fluorescentes reflète donc le statut, ouvert ou fermé, des canaux. Dans une étude plus récente, les auteurs ont synthétisé une sonde composée d'un dérivé de l'Artémisinine, la dihydroartémisinine (DHA), couplé à une molécule fluorescente (Sissoko et al., 2020). Le suivi de l'absorption de cette sonde a permis de confirmer la présence des NPPs chez les GRIGs et de suggérer leur contribution à l'absorption de certains antipaludéens par les gamétocytes (Bouyer et al., 2020).

E. Voie de signalisation des nucléotides cycliques

Chez plusieurs organismes vivants, les cascades de signalisation ou voies de signalisation permettent de traduire des signaux externes vers l'intérieur de la cellule à la suite d'une stimulation. L'AMPc et le Guanosine Mono Phosphate cyclique (GMPc) sont des nucléotides appelées messagers secondaires dont la présence au niveau intracellulaire va entraîner l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation conduisant à divers processus biologiques. La régulation de la quantité intracellulaire de ces nucléotides est modulée par deux types d'enzymes : les cyclases et les phosphodiesterases. Les cyclases sont responsables de la synthèse de l'AMPc et du GMPc à partir de molécules d'ATP et de GTP. Les phosphodiesterases quant à elles vont les transformer en 5'AMP et 5'GMP en hydrolysant les liaisons phosphodiesters. **(Figure 17)**

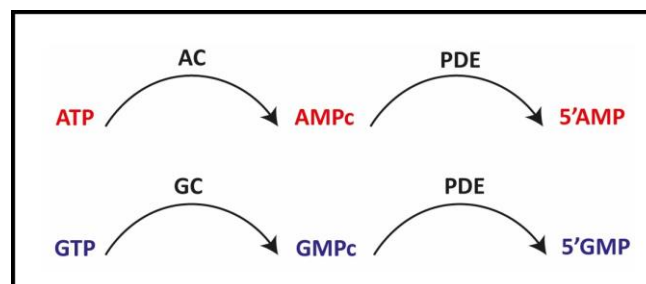


Figure 17 : Réactions enzymatiques conduisant à la formation et à l'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc.
 ATP : Adénosine Triphosphate ; AC : Adénylate cyclase ; AMPc : Adénosine Monophosphate, PDE : Phosphodiesterase ; GTP : Guanosine Triphosphate ; GC : Guanylate cyclase ; GMPc : Guanosine Monophosphate

1. Voies de signalisation des nucléotides cycliques chez *P. falciparum*

Comme chez les autres eucaryotes, plusieurs protéines impliquées dans les voies de signalisation AMPc-GMPc ont été identifiées chez *P. falciparum* et peuvent être regroupées en deux catégories : les protéines régulatrices telles que l'Adénylate cyclase (AC), la Guanylate cyclase (GC) et les PDEs ; et les protéines effectrices composés de la PKG, PKA et de la *protéine Exchange Protein directly Activated by cAMP* (EPAC).

a. Les protéines effectrices : structure et fonction

i. La Protéine Kinase A

De façon générale, les protéines kinases sont des enzymes qui vont phosphoryler un substrat sur un site spécifique de l'enzyme appelé site consensus. Pour la PKA, le site consensus de phosphorylation est R-R-X-S/T-Φ ou Φ représente un acide aminé hydrophobe (Pinna and Ruzzene, 1996). Chez *P. falciparum*, la PKA est composée d'une sous-unité régulatrice (PKAr) codée par le gène *PF3D7_1223100* et d'une sous-unité catalytique (PKAc) codée par le gène *PF3D7_0934800*. Ces deux sous-unités forment un hétérodimère qui se dissocie en présence d'AMPc. En effet, la sous-unité régulatrice contient deux sites de liaisons à l'AMPc. Une fois ces molécules fixées, la sous-unité catalytique est libérée et peut donc exercer son activité enzymatique (**Figure 18**). *PfPKA* est impliquée dans de nombreux processus biologiques du parasite, notamment l'invasion du mérozoïte dans le globule rouge (Leykauf et al., 2010; Patel et al., 2019; Wilde et al., 2019), l'invasion du sporozoïte dans l'hépatocyte (Ono et al., 2008), la régulation des canaux anioniques chez les stades sexués et asexués (Bouyer et al., 2020; Merckx et al., 2008b) ou encore la régulation des propriétés mécaniques des GRIGs (Bouyer et al., 2020; Hitz et al., 2021; Naissant et al., 2016; Ramdani et al., 2015).

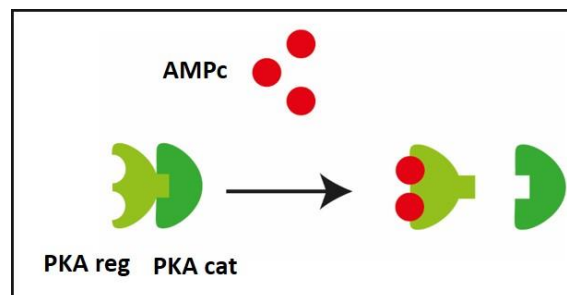


Figure 18 : Modèle de régulation de la PKA. Les sous unités régulatrice (PKA reg) et catalytique (PKA cat) de *PfPKA* sont associées à l'état inactif de l'enzyme. En présence d'AMPc, la sous unité régulatrice

se dissocie de la sous unité catalytique permettant ainsi l'activité enzymatique de PfPKA (Baker et al. 2017).

ii. La Protéine Kinase G

Le site consensus de phosphorylation de la PKG est R-R/K-X-S/T-Φ (Pinna and Ruzzene, 1996). Il est assez similaire à celui de la PKA. La différence réside dans le fait qu'en position n-2, on peut avoir soit une arginine R soit une lysine K, alors que la PKA a besoin exclusivement de l'arginine à cette position. La PKG de *P. falciparum* est codée par un seul gène : *PF3D7_1436600*, et est constituée d'une seule chaîne polypeptidique avec une région régulatrice en position N-terminale et un domaine catalytique en position C-terminale. La région régulatrice contient une séquence auto-inhibitrice et quatre sites de liaisons au GMPc dont le troisième est dit dégénéré. La fixation de molécules de GMPc sur ces sites va entraîner un changement de conformation de la protéine, libérant ainsi le domaine catalytique de l'enzyme (**Figure 19**). La PKG plasmodiale a été identifiée comme étant essentielle dans plusieurs mécanismes clés de la biologie du parasite qui sont la rupture du globule rouge permettant la sortie des mérozoïtes du schizonte mature (Collins et al., 2013; Nofal et al., 2021; Taylor et al., 2010), la sortie des gamétocytes matures de leur cellule hôte après activation en gamètes (McRobert et al., 2008; Taylor et al., 2008a), la motilité des ookinetes de *P. berghei* (Moon et al., 2009), la mobilité des sporozoïtes ainsi que leur invasion et leur sortie des hépatocytes (Falae et al., 2010; Govindasamy et al., 2016).

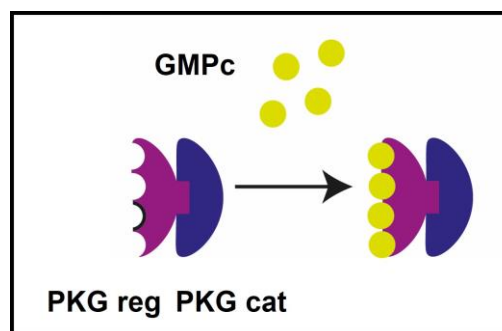


Figure 19 : Modèle de régulation de la PKG. Les sous unités régulatrices (PKG reg) et catalytique (PKG cat) de PfPKG sont associées à l'état inactif de l'enzyme. En présence de GMPc, PfPKG est activée suite à la fixation du GMPc sur la sous unité régulatrice (Baker et al. 2017).

iii. La protéine EPAC

La protéine EPAC est un facteur d'échange pour les petites protéines G et est activée par l'AMPc. Chez *P. falciparum*, elle est codée par le gène *PF3D7_1417400* présent sur le chromosome 14. Elle possède de sites de liaisons à l'AMPc et avait été suggérée comme étant responsable du relargage du calcium qui précède la décharge des micronèmes (Dawn et al., 2014). Cependant, une étude de 2019 a écarté son rôle dans la cascade de signalisation qui a lieu avant la sortie des mérozoïtes du schizonte (Patel et al., 2019). En effet, des parasites délétés pour cette protéine présentaient le même phénotype que les parasites sauvages. L'implication de cette protéine dans la régulation de la déformabilité des GRIGs a également été écartée suite à l'absence d'effet d'inhibiteurs spécifiques sur la filtrabilité des GRIGs (Ramdani et al, 2015). La fonction de cette protéine chez *Plasmodium* reste donc à déterminer.

b. Les protéines régulatrices : structure et fonction

i. Les Adénylate cyclases

Le séquençage intégral du génome de *P. falciparum* en 2002 (Gardner, M.J et al 2002) a permis l'identification de deux gènes (*PF3D7_1404600* ; *PF3D7_0802600*) qui codent pour deux formes de l'Adénylate cyclase, *PfACα* et *PfACβ*. Ces deux isoformes de l'AC présentent des caractéristiques très différentes :

PfACα possède en position N-terminale quatre domaines transmembranaires constituant un canal à potassium voltage-dépendant qui pourrait lui permettre de détecter les changements de voltage au niveau de la membrane et de répondre par la synthèse d'AMPc (**Figure 20**). Son domaine catalytique contient tous les acides aminés nécessaires à liaison du substrat et du cofacteur, le Mg^{2+} . Deux études ont montré que *PfACα* était exprimée chez les gamétocytes, avec un pic d'expression chez les stades II-III (Muhia et al., 2003), et aussi chez les sporozoïtes (Ono et al., 2008). Quant à *PfACβ*, elle présente en position N-terminale un domaine de réponse à l'ion bicarbonate. Cependant, son domaine catalytique a très peu été étudié. Elle est principalement exprimée chez les schizontes (Salazar et al., 2012). De plus, dans une étude de 2019 dans laquelle une souche transgénique exprimant *PfACβ* avec un tag HA a été générée, les auteurs ont pu montrer que cette protéine était localisée dans le schizonte au niveau des rhoptries des mérozoïtes (Patel et al., 2019). Ce mutant présentait aussi un défaut

d'invasion des globules rouges par les mérozoïtes confirmant le rôle de la voie AMPc dans ce mécanisme.

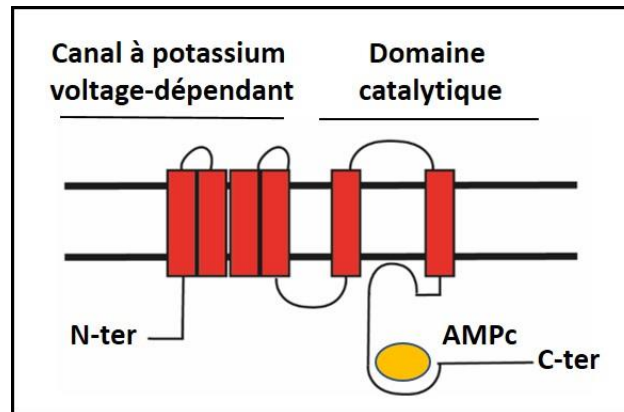


Figure 20 : Représentation schématique de la structure de l'adénylate cyclase alpha de *P. falciparum* (Baker 2004).

ii. Les Guanylate cyclases

De même que l'AC, *P. falciparum* possède, sur deux chromosomes différents, deux gènes (*PF3D7_1138400* ; *PF3D7_1360500*) qui codent pour des Guanylate cyclases, *PfGCα* et *PfGCβ*. Les deux *PfGCs* présentent une structure bifonctionnelle unique. En effet, ces enzymes possèdent 22 domaines transmembranaires avec en position N-terminale un domaine de type P4-ATPase ou flippase et en position C-terminale, une paire de domaines catalytiques (Carucci et al., 2000; Linder et al., 1999) (**Figure 21**). La différence majeure entre ces deux isoformes réside dans leur expression. En effet, *PfGCα* est exprimée chez les stades asexués et chez les gamétocytes. Le fait que cette enzyme soit réfractaire à la délétion suggère qu'elle est indispensable à ce stade du développement (Kenthirapalan et al., 2016; Moon et al., 2009; Taylor et al., 2008a). De plus, des expériences d'immunofluorescence sur une souche transgénique qui exprime *PfGCα* avec un tag HA ont permis de localiser cette protéine dans des structures vésiculaires cytoplasmiques chez les schizontes (Nofal et al., 2021). Chez les gamétocytes, cette enzyme semble être située au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore (Carucci et al., 2000). Quant à *PfGCβ*, elle est dispensable aux stades érythrocytaires et est très fortement exprimée chez les gamétocytes matures et chez les stades du parasite présents chez le moustique (Taylor et al., 2008a). Une récente étude de

2021 a mis en évidence le rôle de *PfGCα* dans la régulation de la rupture du schizonte et cela grâce à un mutant conditionnel de cette enzyme (Nofal et al., 2021).

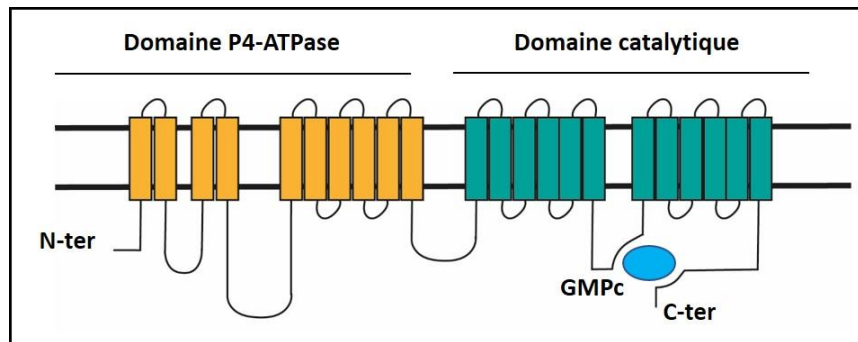


Figure 21 : Représentation schématique de la structure des guanylates cyclases de *P. falciparum* (Baker 2004).

iii. Les phosphodiesterases

Quatre gènes de *P. falciparum* prédits pour coder pour des phosphodiesterases de classe I ont été identifiés dans son génome : *pfpdeα*, *pfpdeβ*, *pfpdeγ* et *pfpdeδ*. Ces gènes codent pour quatre protéines qui contiennent toutes, la séquence signature suivante : HN-X₂-H-X₂₅₋₃₅-[DEQ]-X₁₀-HDX₂-H-X₂₅-E, caractéristique des phosphodiesterases de classes I (Beavo et al 2007). Une analyse bio-informatique de la séquence d'acides aminés des *PfPDEs* a permis d'identifier plusieurs régions hydrophobes (entre 4 et 6 régions) correspondant à des domaines transmembranaires. A part les familles des PDE3 et PDE4 humaines chez lesquelles une fraction de protéines peuvent être associées à la membrane plasmique (Houslay et al., 2007; Shakur et al., 2000; Wechsler et al., 2002), cette caractéristique est spécifique des PDEs plasmodiales car, à ce jour, ce sont les seules PDEs de classes I qui possèdent des domaines transmembranaires.

➤ *Plasmodium falciparum* phosphodiesterase alpha (*PfPDEα*)

PfPDEα fut la première PDE à être caractérisée de façon biochimique et enzymatique (Wentzinger et al., 2008; Yuasa et al., 2005). Le gène *pfpdeα* (PF3D7_1209500) codant pour cette enzyme se trouve sur le chromosome 12 et son expression au cours du cycle biologique diffère en fonction du stade du parasite. En effet, des expériences de RT-PCR réalisées à différents temps du cycle asexué ont permis de dresser un profil d'expression et ont montré que ce gène est plus fortement exprimé à partir du stade trophozoïte jusqu'aux schizontes (Yuasa et al., 2005). Une étude de 2018 portant sur l'utilisation de la technique du Assay

for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing (ATAC seq) pour caractériser la régulation des gènes chez *P. falciparum* a permis d'établir un profil d'expression plus précis de *pfpdeα* au cours du cycle asexué, montrant que le gène est exprimé chez les jeunes rings (entre 5 heures et 10 heures post-infection) et chez les schizontes (entre 35 heures et 40 heures post-infection) (Toenhake et al., 2018). Chez les gamétocytes, très peu de données sur l'expression de *pfpdeα* sont disponibles. Néanmoins, dans une étude de 2015 de notre équipe, l'expression de ce gène au stade III et V a été déterminée par RT-qPCR, indiquant une diminution de l'expression au cours de la gamétocytogénèse qui reste cependant plus faible en comparaison du stade asexué (Ramdani et al., 2015). Au niveau protéique, *PfPDEα* est retrouvée sous deux isoformes de différents poids moléculaires : *PfPDEαA* (954 acides aminés) et *PfPDEαB* (852 acides aminés), conséquence d'un épissage alternatif de l'ARN messenger qui retire un intron supplémentaire dans *PfPDEαB*. Cela entraîne la perte des domaines transmembranaires putatifs quatre et cinq. Néanmoins, les deux isoformes contiennent dans leur région N-terminale un motif de phosphorylation « K⁶⁶KKSDMEY », cible potentielle de protéines kinases telles que la PKA ; la caséine kinase II (CKII) et la tyrosine kinase (Wentzinger et al., 2008). La présence de ce motif pourrait suggérer un mécanisme de régulation de l'activité enzymatique de *PfPDEα*. En effet, la phosphorylation de ce motif permettrait d'activer la protéine via un changement conformationnel qui améliorerait l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Après le clonage du gène *pfpdeα* dans un système d'expression d'*E. Coli*, seule la région catalytique de la protéine a pu être produite sous forme soluble et fonctionnelle. L'activité enzymatique a donc été caractérisée en présence d'AMPc ou de GMPc radiomarqués, et il s'est avéré que l'enzyme ne soit capable d'hydrolyser que le GMPc avec un Km qui varie entre 0,65 et 2 μM (Yuasa et al 2005 ; Wentzinger et al 2008). *PfPDEα* est donc une PDE spécifique du GMPc. Son activité enzymatique en présence de différents inhibiteurs de PDEs humaines a montré que seul le Zaprinast, inhibiteur de la famille de la PDE5 humaine (PDE5H), affectait significativement son activité.

Enfin, la localisation précise de *PfPDEα* au sein de la cellule reste encore à déterminer. La présence de plusieurs domaines transmembranaires suggère que *PfPDEα* est une protéine membranaire. Certaines informations, notamment le profil TMHMM de la protéine (www.Plasmdb.com), qui rend compte de l'hydrophobicité d'une région protéique, semblent

indiquer que le domaine catalytique de l'enzyme a une localisation intracellulaire, c'est-à-dire exposé vers le cytoplasme du parasite. A ce jour, aucun rôle spécifique de *PfPDEα* dans la biologie de *P. falciparum* n'a été mis en évidence. Néanmoins, une étude de 2005 a montré que cette enzyme n'était pas essentielle à la survie des stades asexués (Yuasa et al., 2005).

➤ ***Plasmodium falciparum* phosphodiesterase beta (*PfPDEβ*)**

PfPDEβ a été caractérisée dans une étude parue en 2019 (Flueck et al 2019). Elle est codée par le gène *PF3D7_1321500* situé sur le chromosome 13 du parasite (Wentzinger et al 2008). Comme pour *pfpdeα*, le profil d'expression *pfpdeβ* est différent en fonction du cycle biologique du parasite et il est plus exprimé chez les formes asexuées que chez les gamétocytes (Ramdani et al 2015). Chez les formes asexuées, des expériences d'ATAC-Seq ont mis en évidence un pic d'expression chez les jeunes rings puis à partir de 32 heures post-infection, c'est-à-dire du stade trophozoïte jusqu'au stade schizonte (Toenhanke et al 2018).

Ce résultat a aussi été confirmé au niveau protéique grâce à des western blots sur un parasite transgénique exprimant *PfPDEβ* avec un tag HA (Flueck et al 2019). D'un point de vue structurel, *PfPDEβ* est constituée d'environ 1139 acides aminés et contient six domaines transmembranaires en position N-terminale. Même si aucune équipe à ce jour n'a réussi à produire la protéine recombinante soluble et fonctionnelle, l'activité enzymatique de la protéine a tout de même été caractérisée directement après immunoprécipitation de la protéine tagguée par un anticorps anti-HA chez un parasite transgénique (Flueck 2019). En utilisant l'AMPc et le GMPc comme substrats, les auteurs ont observé l'hydrolyse des deux molécules par l'enzyme. Ce résultat montre que *PfPDEβ* est capable d'hydrolyser les deux nucléotides. L'inactivation de *PfPDEβ* à l'aide d'un système de répression conditionnelle conduit à une augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc et de GMPc, ce qui confirme le résultat du test enzymatique sur la protéine immunoprécipitée. La localisation cellulaire de la protéine par immunofluorescence a montré que la protéine est exportée au pôle apical du parasite où elle est relarguée au niveau de la membrane plasmique des mérozoïtes encore présents dans les schizontes matures (Flueck et al., 2019). Le profil TMHMM de la protéine (www.Plasmdb.com) suggère que le domaine catalytique de *PfPDEβ* se situe à l'extérieur du parasite probablement dans la lumière de la vacuole parasitophore (Wentzinger 2008).

En ce qui concerne son rôle dans la biologie du parasite, une souche délétée pour *pfpdeβ* présente une hyperactivation de la PKA associée à un défaut d'invasion des mérozoïtes issus de ce mutant (Flueck et al 2019). En effet, ces mérozoïtes sont incapables d'envahir les globules rouges, et même lorsqu'ils y parviennent, ils ne se développent pas normalement. Ces résultats montrent l'implication *PfPDEβ* dans la régulation du mécanisme d'invasion des globules rouges par les mérozoïtes.

➤ ***Plasmodium falciparum* phosphodiesterase gamma (*PfPDEγ*)**

PfPDEγ est codée par le gène *PF3D7_1321600* situé sur le chromosome 13 du parasite. Comme les deux *PfPDEs* précédemment décrites, *PfPDEγ* est constituée d'environ 769 acides aminés et possède six domaines transmembranaires en position N-terminale (Wentzinger et al 2008). Une étude par RT-PCR a suggéré l'expression de *pfpdeγ* dans un mélange de stades asexués, chez des ookinetes et chez des sporozoïtes (Lakshmanan et al., 2015). Cependant, la technique de RT-PCR non quantitative utilisée dans cette étude ne permet pas de déterminer de façon précise le niveau d'expression du gène dans ces différents stades. Dans la même année, notre équipe a montré en utilisant la technique de RT-qPCR que le niveau d'expression de *pfpdeγ* était très faible chez les stades asexués et les gamétocytes (Ramdani et al 2015). *pfpdeγ* pourrait donc être préférentiellement exprimé chez les formes du parasite présentes chez le moustique. Une étude phénotypique d'un mutant délétée pour *pdeγ* chez *Plasmodium yoelii*, une espèce de *Plasmodium* murin, a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques : chez les sporozoïtes délétés pour l'enzyme, le niveau de GMPc était 18 fois supérieur au contrôle. Ces résultats suggèrent que *PfPDEγ* régule le niveau intracellulaire de GMPc chez les sporozoïtes. Il serait malgré tout important de produire la protéine recombinante *PfPDEγ* afin de déterminer plus précisément son activité enzymatique. La localisation de *PfPDEγ* a été analysée par immunofluorescence en utilisant un parasite transgénique qui exprime l'enzyme avec un tag myc, mettant en évidence sa présence dans le compartiment intracellulaire des sporozoïtes. Cette localisation intracellulaire de la protéine ainsi que son profil TMHMM semblable à celui de *PfPDEα* (Wentzinger et al 2008) suggère fortement son rôle dans la régulation intracellulaire du niveau GMPc chez le sporozoïte.

Une étude de 2015 a permis de mettre en évidence la régulation de la motilité des sporozoïtes par *PDEγ* (Lakshmanan et al 2015). En effet, chez *Plasmodium yoelii*, les sporozoïtes issus d'un parasite mutant pour la *PDEγ* ont perdu leur capacité à envahir les glandes salivaires du

moustique entraînant ainsi une baisse de leur infectivité. L'infection de souris par des sporozoïtes mutants, soit par piqûre de moustique soit par injection intra-veineuse, n'aboutissait à aucune transmission du parasite. Cela se traduit aussi par la sous-expression des gènes impliqués dans l'infectivité comme le gène *circumsporozoïte* qui code pour la protéine de surface des sporozoïtes.

➤ ***Plasmodium falciparum* phosphodiesterase delta (PfPDEδ)**

PfPDEδ est codée par le gène *PF3D7_1470500* qui se situe sur le chromosome 14 du parasite. La structure de la protéine est semblable à celles des trois autres *PfPDEs*. Elle possède 815 acides aminés et six domaines transmembranaires en position N-terminale. Plusieurs études indiquent qu'elle est plus exprimée au cours de la gamétocytogénèse mais aussi chez certaines formes du parasite présentes chez le moustique (Young et al 2005 ; Lopèz-Bàrragan et al 2011 ; Ramdani et al 2015). En effet, en utilisant des techniques de RT-qPCR et de RNA-seq, les auteurs ont pu montrer que l'expression de *pfpdeδ* augmente au cours du développement des gamétocytes jusqu'à atteindre un pic au stade V. Chez *P. berghei*, elle est aussi exprimée chez les ookinetes (Moon et al 2009). L'activité enzymatique de PDEδ a pu être caractérisée de façon phénotypique chez *P. falciparum* (Taylor et al 2008) et chez *P. berghei* (Moon et al 2009). Dans ces deux études, la délétion du gène *pdeδ* a entraîné une augmentation du niveau intracellulaire de GMPc. Cependant, une étude de notre équipe en 2015 avec le mutant délété pour le gène *pfpdeδ* a montré une augmentation du niveau d'AMPc et de GMPc. Ce résultat est aussi obtenu avec le Sildénafil, inhibiteur de la PDE5 humaine (Ramdani et al 2015). Ces résultats remettent donc en question le fait que *PfPDEδ* hydrolyse uniquement le GMPc (Taylor et al 2008). L'obtention de la protéine recombinante sous forme soluble et fonctionnelle permettra de déterminer la spécificité de substrat de *PfPDEδ*.

Son rôle dans la biologie des formes sexuées du parasite se situe à plusieurs niveaux. Une étude de 2008 a mis en évidence la régulation de la gamétogénèse par *PfPDEδ*. En effet, l'absence de l'enzyme chez le mutant délété entraîne une augmentation de la concentration de GMPc qui conduit à l'activation précoce de la PKG. Cette activation va entraîner l'arrondissement des gamètes sans qu'ils ne puissent sortir du globule rouge (Taylor et al 2008). Ce phénotype est également observé lorsqu'on utilise le Zaprinast.

En 2009, une étude portant sur un mutant délété pour le gène *pdeδ* chez *P. berghei*, a montré que les ookinètes issus de cette souche adoptaient une morphologie trapue, appelée « Stumpy », différente de la forme en « banane » caractéristique des ookinètes. De plus, les auteurs ont observé une forte diminution de la formation d’ookinète, la perte de leur IMC de façon précoce ainsi qu’un défaut de leur motilité, ce qui entraîne une baisse de leur capacité à traverser la paroi de l’estomac du moustique et donc leur infectivité (Moon et al 2009).

Une autre implication de *PfPDEδ* dans la physiologie du parasite est la régulation de la déformabilité et de la perméabilité des GRIGs. En effet, la forte expression de cette enzyme chez les GRIGs matures est corrélée avec une augmentation de leur déformabilité et une diminution de leur perméabilité (Bouyer et al., 2020; Naissant et al., 2016; Ramdani et al., 2015). Le fait que ces phénotypes soient observés chez les gamétocytes de stades V d’une souche délétée pour *pfpdeδ* et chez des souches sauvages traitées avec des inhibiteurs de PDEs tels que le Sildénafil suggère fortement le rôle central de cette enzyme. Cependant, l’implication potentielle des PDEs humaines présentes dans le globule rouge n’est pas à écarter (Adderley et al., 2011a, 2010).

2. Phosphodiesterases humaines

a. Généralités sur les PDEs humaines

Les PDEs humaines jouent un rôle très important dans la physiologie de l’organisme. On distingue onze familles de PDEs humaines ayant chacune leur spécificité : structures, localisations, substrats, etc... (**Figure 22**). De façon générale, ce sont des protéines solubles qui possèdent différents domaines de liaisons en position N-terminale et un domaine catalytique dont elles partagent plus de 40% de similitude. De plus, certaines familles de PDEs sont capables d’hydrolyser à la fois l’AMPc et le GMPc (PDE 1, 2, 3 et 10) tandis que d’autres sont spécifiques pour un seul substrat (PDE 4, 7 et 8 sont spécifiques de l’AMPc ; PDE 5, 9 et 11 sont spécifiques du GMPc). La localisation des PDEs dans des tissus particuliers comme le cœur, le cerveau, le foie ou encore les muscles squelettiques permet de compartimenter leur activité catalytique afin de réguler de façon très spatiale le niveau intracellulaire de nucléotides.

Elément retiré, diffusion non autorisée

Figure 22: Représentation schématique des onze familles de PDEs humaines, leur isoforme et leur substrat. (Baillie et al., 2019a)

b. Physiopathologie et traitements

De par leur fonction régulatrice, les PDEs humaines sont impliquées dans de nombreuses pathologies. Le rôle de la famille des PDEs de type 5 (PDE5) dans l'Hypertension Artérielle Pulmonaire et dans le Dysfonctionnement Erectile sera utilisé pour illustrer ce propos.

Tout d'abord, cette famille de PDE est l'une des plus étudiées du fait de sa présence dans de nombreux tissus tels que les poumons, le cœur, le cerveau, les reins, les muscles lisses vasculaires, les corps caverneux du pénis (Ahmed et al., 2021) et même dans les globules rouges (Adderley et al., 2011a). Son activité enzymatique est régulée de façon allostérique par la liaison de molécules de GMPc au niveau de sa région régulatrice qui contient un site de phosphorylation par la PKG et deux domaines GAF (α et β). Le premier sert à lier des molécules de GMPc (Omori and Kotera, 2007) tandis que l'autre intervient au niveau de la dimérisation de l'enzyme (Blount et al., 2006).

La voie du monoxyde d'Azote (NO) régule la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Après sa production, par les cellules endothéliales, le NO va activer la guanylate cyclase dans les muscles lisses et donc la production de GMPc. L'augmentation de la concentration intracellulaire de GMPc va entraîner la diminution du niveau de calcium, ce qui va causer la relaxation des muscles et donc l'afflux de sang. L'hydrolyse du GMPc par la PDE5 entraîne donc l'inhibition de cette voie et par conséquent la vasoconstriction des vaisseaux (**Figure 23**).

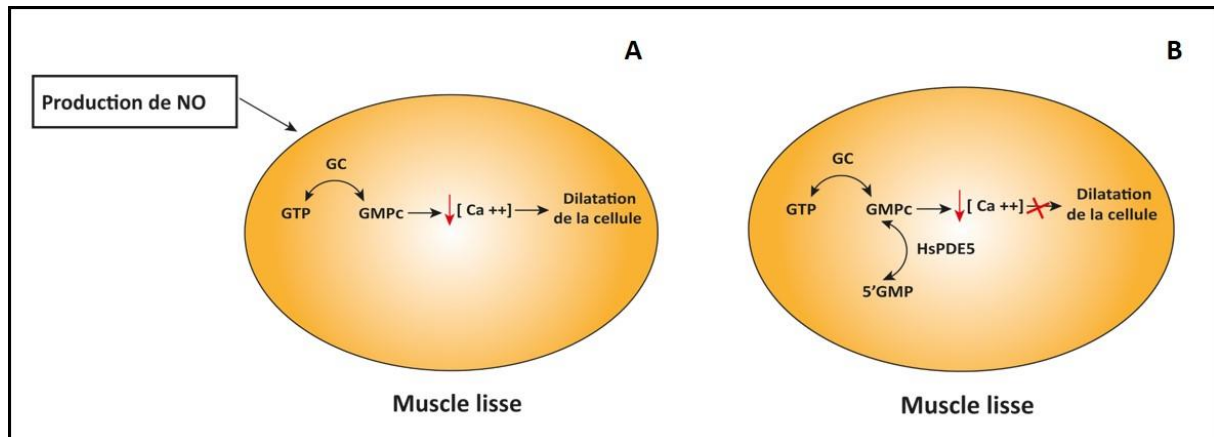


Figure 23 : Régulation de la vasodilatation des muscles lisses par la voie de signalisation NO-GMPc. Voie de signalisation NO-GMPc en absence (A) ou en présence (B) de HsPDE5 ; NO : Nitric Oxide, GC : Guanylate cyclase, GMPc : Guanosine Monophosphate cyclique, PDE5H : Phosphodiesterase 5 humaine

L'Hypertension Artérielle Pulmonaire est due à une pression sanguine élevée au niveau des artères des poumons. Elle est caractérisée par l'essoufflement, la fatigue ou encore la tachycardie. En effet, les artères pulmonaires sont rétrécies ce qui rend la circulation du sang difficile. L'HAP peut être causée par des maladies préexistantes des poumons ou du cœur ou par des traitements médicamenteux. L'activité vasoconstrictrice de PDE5 au niveau cellulaire peut être ciblée pour soulager les symptômes.

Le dysfonctionnement érectile est causé par la suractivité de PDE5 au niveau des corps caverneux du pénis. En effet, à la suite d'une stimulation sexuelle, du monoxyde d'Azote est relargué dans ces tissus, ce qui va engendrer l'activation de la GC soluble. La forte concentration intracellulaire de GMPc va entraîner la dilatation des tissus. L'influx de sang va donc entraîner l'érection. Le rôle de PDE5 dans le dysfonctionnement érectile consiste à hydrolyser le GMPc produit par la GC. Cela a pour conséquence le blocage de l'influx du sang et donc de l'érection.

Pour ces deux pathologies, plusieurs inhibiteurs de PDE5 ont été développés (Baillie et al., 2019a; Marra et al., 2016; Salvi et al., 2004). Les plus utilisés sont le Sildénafil et le Tadalafil dont les noms commerciaux sont respectivement le Viagra® et le Cialis®. Ils servent de vasodilatateurs de par leur action sur la PDE5. Leur application dans d'autres pathologies telles que l'obésité, le cancer ou plus récemment la COVID-19 a fait l'objet de plusieurs études mais reste encore non approuvée (Ahmed et al., 2021).

Plusieurs autres inhibiteurs de PDEs ont aussi été développés au cours de ces dernières années afin de cibler d'autres pathologies. Le tableau suivant récapitule les inhibiteurs de PDEs couramment utilisés, leur nom commercial, leurs cibles primaires ainsi que les pathologies qu'ils traitent.

Inhibiteurs de PDEs	Cibles	Pathologies
Vinpocétine	PDE1	Troubles vasculaires cérébraux et troubles de la mémoire
- Cilostazol - Milrinone - Amrinone - Enoximone - Oliprinone - Pimobendane - Anagrelide	PDE3	- Claudication intermittente - Insuffisance cardiaque congestive - Insuffisance cardiaque congestive - Insuffisance cardiaque congestive - Insuffisance cardiaque - Insuffisance cardiaque - Thrombocytemie
- Roflumilast - Apremilast - Crisaborole - Dortaverine	PDE4	- BPCO - Psoriasis - Dermatite atopique modérée - Troubles fonctionnels intestinaux
- Sildénafil - Vardénafil - Tadalafil - Avanafil	PDE5	- Dysfonctionnement érectile, HAP - Dysfonctionnement érectile - Dysfonctionnement érectile, HAP - Dysfonctionnement érectile

• Udénafil • Mirodénafil		• Dysfonctionnement érectile, Hypertension • Dysfonctionnement érectile
• Papavérine	PDE10A	• Spasme viscéral et vaso-spasme et dysfonctionnement érectile

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des inhibiteurs de PDEs utilisés comme traitement dans les physiopathologies.(Baillie et al., 2019b)

c. Les PDEs dans le globule rouge

La mise en évidence des PDEs et leur rôle dans la régulation des voies de signalisation dans le globule rouge s'est faite de façon générale par utilisation des inhibiteurs de PDEs spécifiques (Adderley et al., 2011b, 2010).

D'abord, la présence de PDE1 dans les globules rouges humains a été mis en évidence grâce à un inhibiteur spécifique de cette famille, le Vinpocétine (Petrov et al., 1998). Les auteurs ont observé une augmentation du niveau de GMPc dans les globules rouges traités avec ce composé. PDE1 semble donc réguler la concentration de GMPc dans ces cellules. Ensuite, des expériences de western blot ont permis d'identifier PDE2 dans les globules rouges. En effet, l'utilisation de l'inhibiteur *Erythro-9- (2-Hydroxy-3-Nonyl)unedenine*) EHNA, spécifique des PDE2, entraîne l'augmentation du niveau d'AMPc au sein des globules rouges (Adderley et al., 2009). PDE2 pourrait donc réguler le niveau d'AMPc dans ces cellules. Aussi, la présence des PDE3, PDE4 et PDE5 (Adderley et al., 2011b) dans les globules rouges a été aussi mis en évidence. Dans cette étude, les auteurs ont identifié par western blot des isoformes des PDE3 et PDE4 qui étaient déjà connues pour être dans les globules rouges (Adderley et al., 2009; Hanson et al., 2008) mais surtout PDE5 dans la fraction cytosolique. L'utilisation du Zaprinast, inhibiteur spécifique de PDE5, a mis en lumière son rôle dans la régulation du niveau de GMPc chez les globules rouges. La présence des PDEs dans le globule rouge suggère leur possible implication dans la régulation des voies de signalisation lors de l'infection par *Plasmodium*. Il est donc important de pouvoir faire la distinction entre les processus physiologiques régulés par les PDEs humaines et ceux régulés par les PDEs plasmodiales.

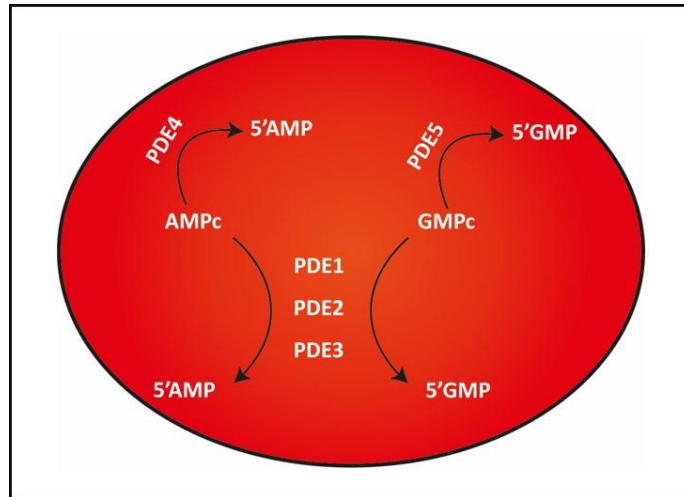


Figure 24 : Schéma récapitulatif des différentes PDEs humaines présentes dans le globule rouge.
(Adderley et al., 2011a, 2010)

F. Hypothèses et objectifs de la thèse

Le changement des propriétés mécaniques des GRIGs observé à la fin de la gamétocytogénèse représente le tendon d'Achille du cycle biologique de *P. falciparum*. En effet, les GRIGs immatures sont plus rigides et plus perméables que les GRIGs matures afin de persister dans la circulation et de pouvoir être transmis au moustique. Dans le but d'éradiquer le paludisme, cibler ces propriétés conduirait à l'interruption de la chaîne de transmission entre l'hôte humain infecté et le moustique (**Figure 25**).

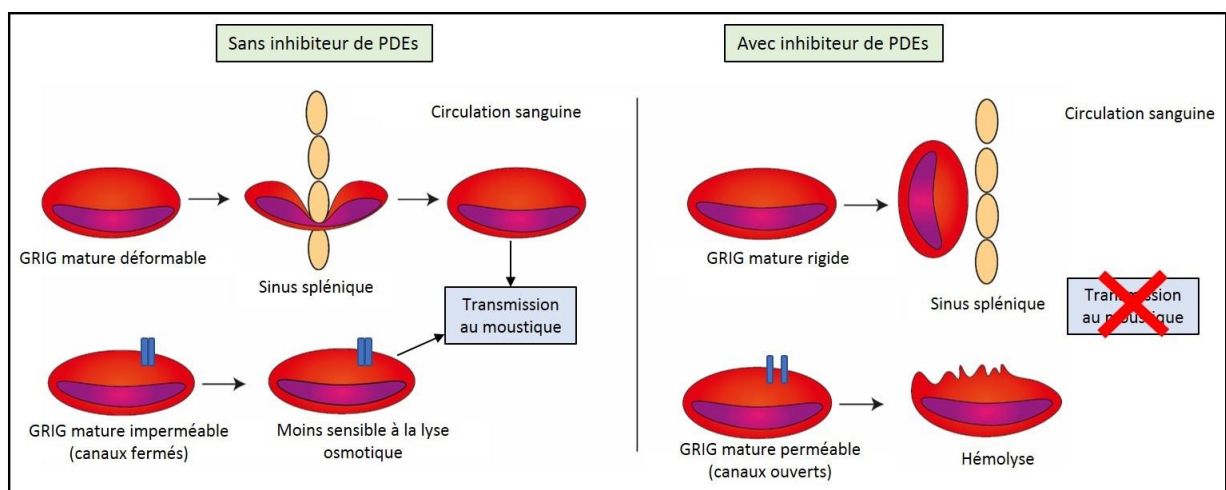


Figure 25 : Stratégie pour bloquer la transmission des GRIGs matures en présence d'inhibiteurs de PDEs

L'étude des mécanismes qui régulent les propriétés mécaniques des GRIGs a mis en lumière le rôle central de la voie de signalisation AMPc-PKA, mais surtout des protéines régulatrices de cette voie, notamment les PDEs. Cependant, la présence de PDEs humaines dans le globule rouge soulève plusieurs questions. En effet, Les phénotypes de déformabilité et de perméabilité observés chez des GRIGs matures traités avec des inhibiteurs de PDE5 humaine tels que le Zaprinast et le Sildénafil sont comparables à ceux obtenus avec une souche de parasite délété pour le gène qui code pour *PfPDEδ* (Bouyer et al., 2020; Ramdani et al., 2015). Par conséquent, nous pouvons nous poser la question suivante : Quelle est la cible réelle de ces inhibiteurs de PDEs dans les phénotypes observés, une PDE plasmodiale (1), une PDE humaine(2) ou les deux (3) ? (**Figure 26**).

Aussi, les potentiels effets secondaires dus à l'inhibition de HsPDE5 chez l'homme rend indispensable la génération d'inhibiteurs spécifiques du parasite. Deux études ont montré que le Tadalafil, inhibiteur de PDE, pouvait être modifié afin de perdre son activité inhibitrice sur HsPDE5 (Beghyn et al., 2012, 2011). Ces analogues ont également une activité anti-plasmodiale sur les formes asexuées de *P. falciparum*.

Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet du Tadalafil sur les propriétés mécaniques des GRIGs. En cas d'effet similaire à celui observé avec le Sildénafil et le Zaprinast, il s'agirait d'évaluer si les analogues du Tadalafil conservent ces effets. Si tel est le cas, l'utilisation de ces analogues pourrait non seulement nous aider à identifier la cible des inhibiteurs de PDEs, mais aussi représenter une première étape vers le développement d'inhibiteurs de PDE spécifiques pour le parasite. Enfin, il est important de mieux caractériser la PDE plasmodiale qui pourrait être ciblée par ces inhibiteurs : *PfPDEδ*.

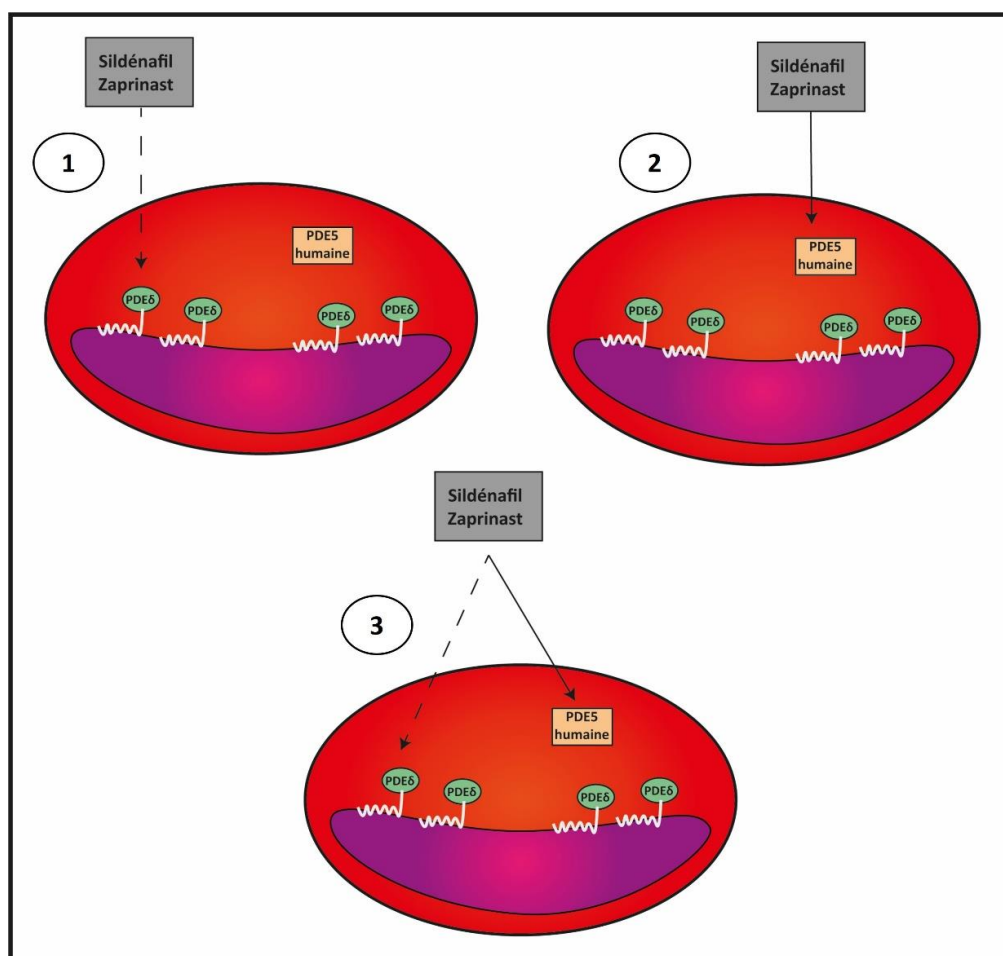


Figure 26 : Hypothèses sur la cible des inhibiteurs de PDE5 humaine dans les phénotypes de déformabilité et de perméabilité des GRIGs matures.

Dans cette thèse, nous avons tenté de:

- Evaluer l'effet du Tadalafil sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures.
- Identifier la cible des inhibiteurs de PDEs dans les phénotypes de déformabilité et de perméabilité des GRIGs matures.
- Caractériser *PfPDEδ*, c'est-à-dire son expression au niveau transcriptionnel et traductionnel, sa localisation dans le parasite ainsi que son activité enzymatique.

Résultats

A. Résultats première partie : Le Tadalafil impacte les propriétés mécaniques des GRIGs de *Plasmodium falciparum*

1. Résumé

Les gamétocytes de *P. falciparum*, responsables de la transmission du parasite, se développent tout d'abord dans la moelle osseuse (Aguilar et al., 2014; Farfour et al., 2012; Joice et al., 2014) puis sont retrouvés dans la circulation sanguine où ils persistent plusieurs dizaines de jours, disponibles pour être ingérés par un moustique (Bousema et al., 2010; Cao et al., 2019). Plusieurs travaux ont suggéré que leur présence dans le sang périphérique est probablement due à un changement des propriétés mécaniques des globules rouges qu'ils infectent. En effet, les GRIGs matures sont moins rigides (Aingaran et al., 2012; Dearnley et al., 2012; Tibúrcio et al., 2012) et moins perméables (Bouyer et al., 2020) que les GRIGs immatures. Le gain de déformabilité et la baisse de perméabilité des GRIGs matures leur permettraient respectivement d'échapper au contrôle de la rate et d'être moins sensibles à la lyse osmotique. Notre équipe a montré que les propriétés mécaniques des GRIGs étaient régulées par la voie AMPc-PKA et qu'elles pouvaient être inversées chez les GRIGs matures par des inhibiteurs de PDEs tels que le Zaprinast et le Sildénafil (Bouyer et al., 2020; Naissant et al., 2016; Ramdani et al., 2015). Ces résultats indiquent que les propriétés mécaniques des GRIGs matures sont des cibles thérapeutiques pertinentes pour bloquer la chaîne de transmission de l'homme vers le moustique. Dans cette étude, nous avons évalué l'effet d'un autre inhibiteur de PDE, le Tadalafil, sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures. C'est le premier inhibiteur de PDE5 dont la structure est non-purique. Cela lui permet d'avoir une meilleure sélectivité en comparaison au Sildénafil qui lui a une structure similaire au substrat de la PDE5. Le Tadalafil présente aussi une plus longue durée de demi-vie (17 h versus 3 h pour le Sildénafil) (Smith et al., 2013). Enfin, le fait que la structure du Tadalafil puisse être obtenue en seulement trois étapes rend plus facile sa modification, offrant ainsi la possibilité de modifier sa structure pour générer des analogues spécifiques pour le parasite. Dans cet article, nous avons utilisé les techniques de microsphiltration et de lyse isosmotique pour démontrer que le Tadalafil était capable d'augmenter la rigidité et la

perméabilité des GRIGs matures et que cet effet était bien dépendant de l'infection du globule rouge par le parasite.

2. Article: Tadalafil impacts the mechanical properties of Plasmodium falciparum gametocyte-infected erythrocytes



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molbioparaTadalafil impacts the mechanical properties of *Plasmodium falciparum* gametocyte-infected erythrocytes

Marie-Esther N'Dri, Ludivine Royer, Catherine Lavazec *

Inserm U1016, CNRS UMR8104, Université de Paris, Institut Cochin, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Plasmodium falciparum
 Gametocytes
 Transmission
 Tadalafil
 Deformability
 Permeability

ABSTRACT

Plasmodium falciparum gametocytes modify the mechanical properties of their erythrocyte host to persist for several weeks in the blood circulation and to be available for mosquitoes. These changes are tightly regulated by the plasmodial phosphodiesterase delta that decreases both the stiffness and the permeability of the infected host cell. Here, we address the effect of the phosphodiesterase inhibitor tadalafil on deformability and permeability of gametocyte-infected erythrocytes. We show that this inhibitor drastically increases isosmotic lysis of gametocyte-infected erythrocytes and impairs their ability to circulate in an in vitro model for splenic retention. These findings indicate that tadalafil represents a novel drug lead potentially capable of blocking malaria parasite transmission by impacting gametocyte circulation.

The clinical symptoms of malaria are attributed to *Plasmodium* asexual stages, whereas parasite transmission from humans to mosquitoes relies on the sexual stages, called gametocytes. For *Plasmodium falciparum*, the causative agent of the most severe form of human malaria, immature gametocytes develop in the bone marrow [1], and appear only as mature stages in the peripheral blood where they are available for uptake by mosquitoes. The persistence of mature gametocytes in the blood circulation is crucial for parasites to be ingested by mosquitoes and thereby to be transmitted to another host. The estimate for the circulating gametocyte lifespan is several weeks during which mature gametocytes are able to avoid splenic retention, immune recognition and hemolysis [2,3]. Among the different strategies evolved by *P. falciparum* parasites to persist for such a long time in the peripheral blood, gametocytes modify the mechanical properties of their erythrocyte host. As observed in mature asexual stages [4–6], immature gametocytes increase the stiffness and the permeability of their host cell by exporting proteins to the erythrocyte membrane [7,8]. The increase in stiffness is linked to both the interaction of the parasite proteins STEVOR with one or several erythrocyte membrane skeleton proteins composing the ankyrin complex [9,10] and to the remodelling of lateral and vertical interactions within the erythrocyte skeleton [11]. The increase in permeability is due to the activation of the new permeability pathways (NPPs) in which the RhopH proteins play an important role [7,12]. However, unlike in asexual stages, these changes in erythrocyte membrane mechanical properties are reversible in sexual stages. The increase

in stiffness observed in immature gametocyte-infected erythrocytes (GIE) is followed by a switch in deformability in mature stages [8,13,14]. These observations led to the hypothesis that the important stiffness of the infected erythrocyte may contribute to sequestration of immature stages in the bone marrow parenchyma by mechanical retention, and then the switch in deformability of the infected cell may trigger release of mature stages in blood circulation. In parallel, gametocytes also regulate the permeability of their host cell: NPPs are activated in stage I GIE at levels similar to that of trophozoites and then this activity declines along gametocyte maturation, leading to undetectable channel activity in stage V GIE comparable to that usually observed in uninfected erythrocytes [7]. The virtual absence of channel activity in mature stages may allow the infected erythrocyte to decrease its osmotic fragility and thus to persist longer in the blood circulation. Interestingly, both deformability and permeability of GIE appear to be tightly regulated by a cyclic AMP (cAMP) signaling pathway. GIE deformability is regulated by protein kinase A (PKA)-mediated phosphorylation of the proteins STEVOR that interact with the erythrocyte skeleton [9]. Likewise, PKA activity contributes to the activation of NPPs in immature GIE, although the phosphorylated substrate has not yet been identified [7]. In mature stages, decreased cAMP levels, due to the high expression of the plasmodial phosphodiesterase (PDE) *PfPDE8* [15], reduces the phosphorylation of STEVORs and of other proteins potentially involved in channel activity. Consequently, the stiffness and the permeability of infected erythrocytes decrease [7,9]. Therefore, *PfPDE8*, which is the

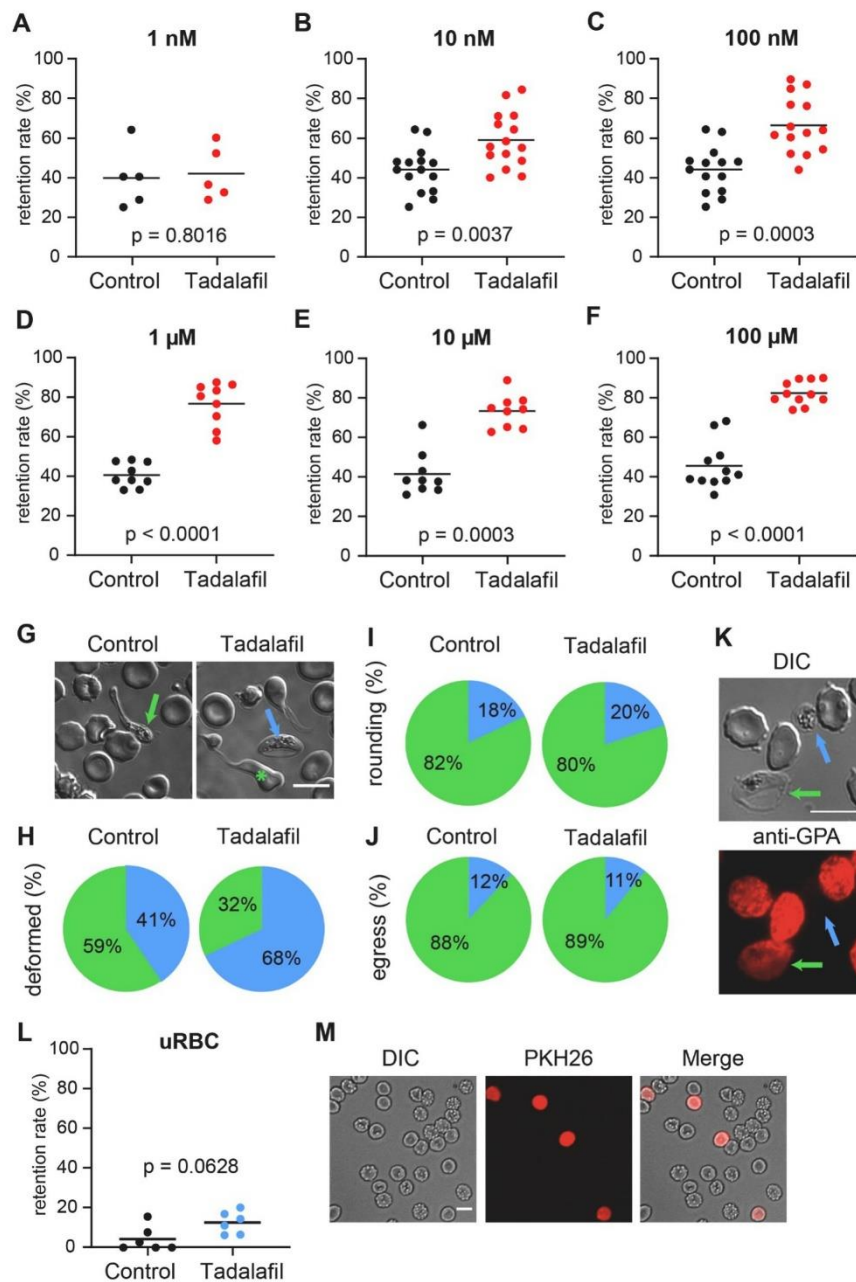
* Corresponding author.

E-mail address: catherine.lavazec@inserm.fr (C. Lavazec).<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2021.111392>

Received 10 March 2021; Received in revised form 3 June 2021; Accepted 14 June 2021

Available online 23 June 2021

0166-6851/© 2021 Published by Elsevier B.V.



(caption on next page)

Fig. 1. Tadalafil impacts stage V GIE deformability.

A–F. Retention in microspheres of stage V GIE. Synchronized cultures from the NF54 strain containing 0.5 to 5 % GIE were pre-incubated 30 min at 37 °C with 1 nM to 100 µM tadalafil (Selleckchem or Sigma) and were perfused through a microsphere matrix as described [16]. The upstream and downstream samples were smeared, stained with Giemsa reagent, and parasitaemia was assayed by counting at least 2000 erythrocytes to determine parasite retention. Circles indicate the number of independent experiments. P indicates the statistical significance determined by a Mann Whitney test using GraphPad Prism 9. **G–H.** To visualize GIE shape during their flowing through the matrix, 1 mL of PBS/4% paraformaldehyde was added after perfusion of the GIE-containing culture on the microsphere matrix. After 5 min of incubation, fixed GIE were separated from the microspheres by a 3-step decantation procedure, and GIE morphology was observed on a glass slide by light microscopy using a Leica DM 5000 B at 100X magnification. **G.** Differential interference contrast images of paraformaldehyde-fixed GIE, as they flow through the matrix. Green arrow shows untreated GIE with a deformed shape (left panel), blue arrow shows 100 µM tadalafil-treated GIE that keeps a regular shape (right panel), green star shows tadalafil-treated uninfected erythrocyte with a deformed shape (right panel). **H.** Graphical representation for the proportion of GIE showing a regular (blue) or deformed (green) shape in a population of paraformaldehyde-fixed GIE. Experiments were performed in triplicate and 100 cells were counted per experiment. **I–K.** Immunofluorescence analysis was performed on untreated and 30 µM tadalafil-treated GIE using mouse anti-glycophorin A (GPA) antibody (1/1,000, Santa Cruz Biotechnology) for staining the erythrocyte membrane. Samples were observed at 100X magnification using a Leica DMi8. Percent rounding was determined by calculating the % of round parasites and percent egress was determined by calculating the % of GPA-negative parasites in the total GIE population. **L.** Graphical representation for the proportion of GIE showing a round (blue) or elongated (green) shape. **J.** Graphical representation for the proportion of GPA-positive (green) or GPA-negative (blue) GIE. **K.** Representative images showing an elongated stage V GIE inside an erythrocyte (green arrow) and a round, egressed gamete (blue arrow). **L–M.** Retention rates of uninfected erythrocytes (uRBC) pre-incubated 30 min at 37 °C with or without 100 µM tadalafil were monitored after labelling a subpopulation of erythrocytes with PKH26 (Sigma-Aldrich) according to manufacturer's instructions. The proportion of labelled erythrocytes in upstream and downstream samples was determined by fluorescence microscopy using a Leica DM 5000 B at 40X magnification. At least 1500 erythrocytes per experiments were counted. DIC: Differential Interference Contrast. Bars represent 5 µm.

only PDE expressed by mature gametocyte stages, appears to be the key regulator of gametocyte persistence in the bloodstream by decreasing GIE osmotic fragility and by increasing GIE deformability. Thus, drugs targeting this PDE are expected to increase the stiffness and the osmotic fragility of mature GIE and, as a result, may interrupt parasite transmission by promoting GIE hemolysis and clearance by the spleen. Here, we address the effect of tadalafil, a marketed PDE inhibitor widely used to treat erectile dysfunction and pulmonary arterial hypertension, on GIE mechanical properties.

First, we assessed the effect of tadalafil on GIE deformability and filterability using a matrix of microspheres [16]. The interstices within this matrix mimic the physical constraints experienced by infected erythrocytes in the splenic microcirculation, permitting passage of deformable GIE, but impairing filtration of GIE with increased erythrocyte stiffness. Synchronized cultures containing 0.5–5% stage V GIE were pre-incubated 30 min with 1 nM to 100 µM tadalafil before filtration through the matrix (Fig. 1A–F). Approximately 40 % of untreated GIE were retained on the microspheres, confirming the retention rates previously observed [9]. Incubation with tadalafil markedly increased the retention rates that reached 82 % at 100 µM ($P < 0.0001$, Fig. 1F). The filterability of GIE was significantly impaired even at low tadalafil concentrations with 59 % retention at 10 nM ($P = 0.0037$, Fig. 1B). Importantly, retention rates were already highly increased at 1 µM tadalafil (77 % vs 41 %, $P < 0.0001$, Fig. 1D), which corresponds to peak plasma concentration in humans, measured at 378 ng/mL two hours following a 20 mg oral dose of tadalafil [17]. To validate that increased retention rates in the microsphere matrix correspond to a decrease in deformability of GIE, we visualized the shape of GIE as they flowed through the matrix by adding a paraformaldehyde-fixation step in the filtration experiment. At 100 µM tadalafil the proportion of paraformaldehyde-fixed GIE that exhibit a twisted and deformed shape decreased to 32 %, compared to 59 % of untreated cells (Fig. 1G–H). To control that increased retention rates were not the result of gametocyte rounding or egress induced by tadalafil treatment, we stained the membrane of erythrocytes with anti-glycophorin A antibodies after 30 min incubation in 30 µM tadalafil and we analyzed the shape of GIE and the presence of the erythrocyte membrane. The proportion of round parasites and of egressed parasites were similar in tadalafil-treated and untreated cells, indicating that tadalafil did not trigger gamete activation (Fig. 1I–K). Finally, to address the specificity of tadalafil on infected cells, a subpopulation of uninfected erythrocytes was labelled and subjected to filtration after incubation with tadalafil. The filterability of uninfected erythrocytes was not significantly affected at high concentrations of tadalafil, indicating that it specifically affects infected erythrocytes (Fig. 1L–M).

To further analyze the effect of tadalafil on GIE permeability, we

performed measurements of isosmotic lysis of stage V GIE in sorbitol, a sugar alcohol permeant through NPPs [4]. After 60 min in sorbitol, about 10%–15% of DMSO-treated GIE were lysed, as already described [7]. Incubation with 10 nM tadalafil significantly increased lysis (35 % vs 14 %, $P = 0.0286$, Fig. 2A), and sorbitol uptake gradually increased with tadalafil concentration (Fig. 2A–E), reaching 67 % lysis at 30 µM tadalafil ($P = 0.0286$, Fig. 2E). Lysis was totally inhibited when GIE were co-incubated with tadalafil and the anion channel inhibitor 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) that is a well-known NPP inhibitor [18], thus validating that tadalafil-induced GIE lysis corresponds to an activation of NPPs (Fig. 2G). The specificity of tadalafil was confirmed as the lysis of labelled uninfected erythrocytes was not significantly increased at high concentrations of tadalafil ($P > 0.999$, Fig. 2F).

Altogether, these results show that tadalafil impacts both the deformability and the permeability of mature GIE and therefore represents a novel drug lead potentially capable of blocking malaria parasite transmission by impacting on gametocyte circulation. We had previously observed similar effects with the PDE inhibitor sildenafil that is also used to treat erectile dysfunction [7,15]. However, the better safety profile and the longer duration of effect of tadalafil (24–36 h instead of 3–4 h for sildenafil) make it a more attractive compound [17]. Moreover, the structure of tadalafil is markedly different from that of sildenafil: tadalafil is a non-purine PDE5 inhibitor and displays a novel tetrahydro-β-carboline ring fused to a diketopiperazine scaffold. This structure makes tadalafil more easily modifiable to engineer out its effect on human targets and generate *Plasmodium*-specific analogues [19, 20].

Interfering with mechanical properties to promote GIE clearance by the spleen and hemolysis may be a novel way to target gametocytes and to block malaria parasite transmission. The majority of current first-line antimalarial treatments are curative of asexual parasite stages but they do not eliminate gametocytes and do not effectively interrupt transmission [21]. A key to malaria eradication is therefore the discovery of anti-malarial drugs that target gametocytes in addition to asexual stages. However, the development of gametocyte-targeting drugs is challenging since the metabolic activity is reduced in mature gametocytes compared to asexual stages. Low hemoglobin concentration in the erythrocyte at the end of gametocyte maturation likely also influences the susceptibility of mature gametocytes to different antimalarials whose mechanism of action depends on the degradation of hemoglobin, as is the case with artemisinin. Targeting mechanical properties of infected erythrocytes may overcome these issues. More generally, targeting the non-metabolic pathways of parasites and repositioning PDE inhibitors already used in human pharmacology is a strategy increasingly used in the context of parasitic diseases in an attempt to overcome the problem

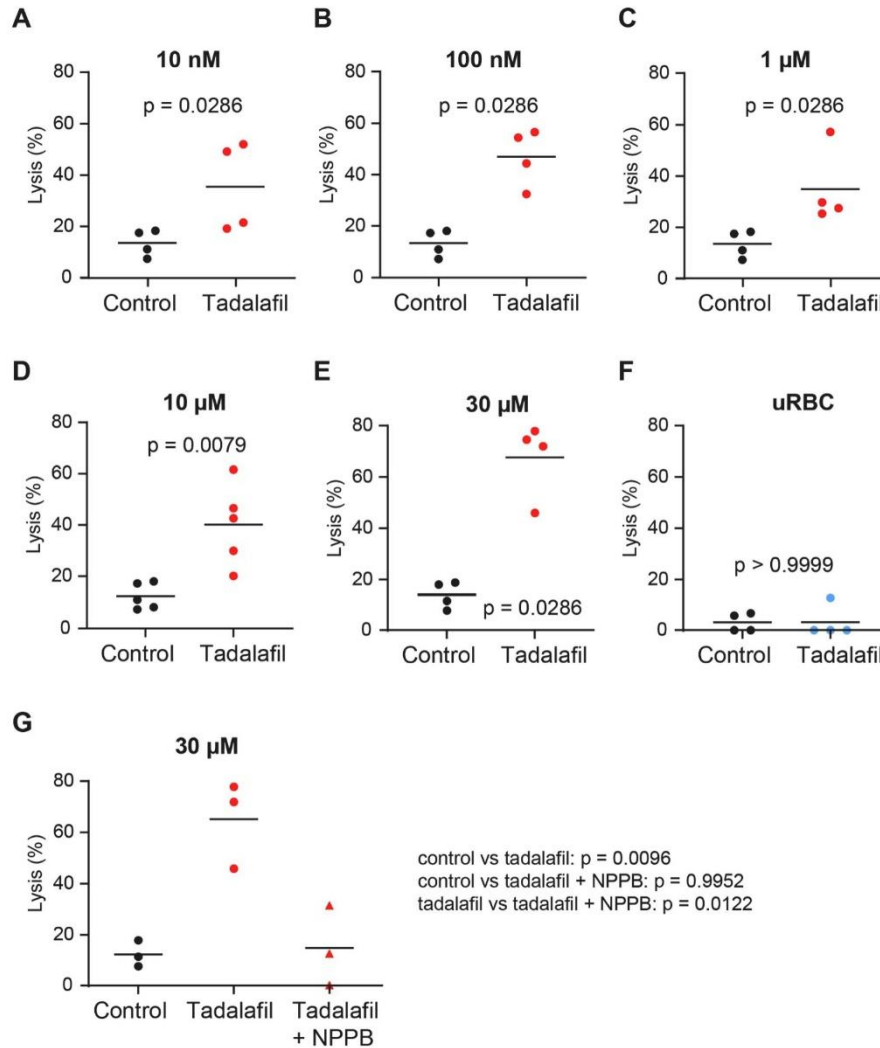


Fig. 2. Tadalafil impacts stage V GIE permeability.

A-E. Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage V GIE. Synchronized cultures from the NF54 strain containing 0.5–3 % GIE were pre-incubated 30 min at 37 °C with 10 nM (A), 100 nM (B), 1 µM (C), 10 µM (D), 30 µM (E) tadalafil or 0.5 % DMSO (Control) and were subjected to isosmotic lysis for 60 min at 37 °C in a solution containing 300 mM sorbitol supplemented with 10 mM Hepes, 5 mM glucose and with a pH adjusted to 7.4. After 60 min, cultures were smeared onto glass slides for staining with Giemsa reagent, and parasitaemia was assayed by counting at least 2000 erythrocytes to determine lysis percentage using the formula: % lysis (t60) = $[1 - (\text{parasitemia (t60)} / \text{parasitemia (t0)})] \times 100$. Only the cells present in the smears (ie the non-lysed cells) were counted. **F.** Sorbitol-induced isosmotic lysis of uninfected erythrocytes (uRBC) pre-incubated 30 min at 37 °C with 30 µM tadalafil or 0.5 % DMSO (Control) was monitored after labelling a subpopulation of erythrocytes with PKH26. The proportion of labelled erythrocytes at T = 0 min and at T = 60 min was determined by fluorescence microscopy using a Leica DM 5000 B at 100X magnification. At least 2000 erythrocytes per experiments were counted. **G.** Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage V GIE pre-incubated 30 min at 37 °C with 0.5 % DMSO (Control) or 30 µM tadalafil in presence or absence of 100 µM NPPB. In all panels, circles indicate the number of independent experiments and P indicates the statistical significance determined by a Mann Whitney test (A–F) or by one-way ANOVA with Sidak correction (G) using GraphPad Prism 9.

of resistance or reduced efficacy of current treatments [22].

Author contributions

MEN and CL conceived the project. MEN and LR performed the experiments. MEN, LR and CL designed and interpreted the experiments.

CL wrote the article.

Author statement

I certify that all authors have seen and approved the final version of the manuscript being submitted.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgements

We are grateful to François Lacoste for fruitful discussions and the Fonds Inkermann for financial support. MEN is supported by the Presidency of Côte d'Ivoire and the Ministry of Education of Côte d'Ivoire. MEN, LR and CL acknowledge the financial support from the Cnrs, Inserm and the Fondation pour la Recherche Médicale ("Equipe FRM" grant EQ20170336722).

References

- [1] R. Joice, S.K. Nilsson, J. Montgomery, S. Dankwa, E. Egan, B. Morahan, K. B. Seydel, L. Bertuccini, P. Alano, K.C. Williamson, et al., Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014) 244–245.
- [2] T. Bousema, L. Okell, S. Shekalaghe, J.T. Griffin, S. Omar, P. Sawa, C. Sutherland, R. Sauerwein, A.C. Ghani, C. Drakeley, Revisiting the circulation time of Plasmodium falciparum gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs, *Malar. J.* 9 (2010) 136.
- [3] P. Cao, K.A. Collins, S. Zaloumis, T. Wattanakul, J. Tarning, J.A. Simpson, J. McCarthy, J.M. McCaw, Modeling the dynamics of Plasmodium falciparum gametocytes in humans during malaria infection, *Elife* 8 (2019).
- [4] H. Ginsburg, M. Krugliak, O. Eidelman, Z.I. Cabantchik, New permeability pathways induced in membranes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes, *Mol. Biochem. Parasitol.* 8 (1983) 177–190.
- [5] A.G. Maier, M. Rug, M.T. O'Neill, M. Brown, S. Chakravorty, T. Szestak, J. Chesson, Y. Wu, K. Hughes, R.L. Coppel, et al., Exported proteins required for virulence and rigidity of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes, *Cell* 134 (2008) 48–61.
- [6] G.B. Nash, E. O'Brien, E.C. Gordon-Smith, J.A. Dormandy, Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by Plasmodium falciparum, *Blood* 74 (1989) 855–861.
- [7] G. Bouyer, D. Barbieri, F. Dupuy, A. Marteau, A. Sissoko, M.E. N'Dri, G. Neveu, L. Bedault, N. Khodabux, D. Roman, et al., Plasmodium falciparum sexual parasites regulate infected erythrocyte permeability, *Commun. Biol.* 3 (2020) 726.
- [8] M. Tiburcio, M. Niang, G. Deplaine, S. Perrot, E. Bischoff, P.A. Ndour, F. Silvestrini, A. Khattab, G. Milon, P.H. David, et al., A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of Plasmodium falciparum transmission stages, *Blood* 119 (2012) e172–180.
- [9] B. Naissant, F. Dupuy, Y. Duffier, A. Lorthiois, J. Duez, J. Scholz, P. Buffet, A. Merckx, A. Bachmann, C. Lavazec, Plasmodium falciparum STEVOR phosphorylation regulates host erythrocyte deformability enabling malaria parasite transmission, *Blood* 127 (2016) e42–53.
- [10] S. Sanyal, S. Egee, G. Bouyer, S. Perrot, I. Safeukui, E. Bischoff, P. Buffet, K. W. Deitsch, O. Mercereau-Pujalon, P.H. David, et al., Plasmodium falciparum STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties, *Blood* 119 (2012) 1–8.
- [11] M. Dearnley, T. Chu, Y. Zhang, O. Looker, C. Huang, N. Klonis, J. Yeoman, S. Kenny, M. Arora, J.M. Osborne, et al., Reversible host cell remodeling underpins deformability changes in malaria parasite sexual blood stages, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 4800–4805.
- [12] M.A. Schureck, J.E. Darling, A. Merk, J. Shao, G. Daggupati, S. Srinivasan, P.D. B. Olinares, M.P. Rout, B.T. Chait, K. Wollenberg, et al., Malaria parasites use a soluble RhopH complex for erythrocyte invasion and an integral form for nutrient uptake, *Elife* 10 (2021).
- [13] M. Aingaran, R. Zhang, S.K. Law, Z. Peng, A. Undisz, E. Meyer, M. Diez-Silva, T. A. Burke, T. Spielmann, C.T. Lim, et al., Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite Plasmodium falciparum, *Cell. Microbiol.* 14 (2012) 983–993.
- [14] M.K. Dearnley, J.A. Yeoman, E. Hanssen, S. Kenny, L. Turnbull, C.B. Whitchurch, L. Tilley, M.W. Dixon, Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of Plasmodium falciparum gametocytes, *J. Cell. Sci.* 125 (2012) 2053–2063.
- [15] G. Ramdani, B. Naissant, E. Thompson, F. Breil, A. Lorthiois, F. Dupuy, R. Cummings, Y. Duffier, Y. Corbett, O. Mercereau-Pujalon, et al., cAMP-signalling regulates gametocyte-infected erythrocyte deformability required for malaria parasite transmission, *PLoS Pathog.* 11 (2015) e1004815.
- [16] C. Lavazec, G. Deplaine, I. Safeukui, S. Perrot, G. Milon, O. Mercereau-Pujalon, P. H. David, P. Buffet, Microspherulite: a microsphere matrix to explore erythrocyte deformability, *Methods Mol. Biol.* 923 (2013) 291–297.
- [17] W.B. Smith 2nd, I.R. McCaslin, A. Gokce, S.H. Mandava, L. Trost, W.J. Hellstrom, PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence, *Int. J. Clin. Pract.* 67 (2013) 768–780.
- [18] K. Kirk, H.A. Horner, B.C. Elford, J.C. Ellory, C.I. Newbold, Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3339–3347.
- [19] T.B. Beghyn, J. Charton, F. Leroux, A. Henninot, I. Reboule, P. Cos, L. Maes, B. Deprez, Drug-to-genome-to-drug, step 2: reversing selectivity in a series of antiplasmodial compounds, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 1274–1286.
- [20] T.B. Beghyn, J. Charton, F. Leroux, G. Laconde, A. Bourin, P. Cos, L. Maes, B. Deprez, Drug to genome to drug: discovery of new antiplasmodial compounds, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 3222–3240.
- [21] I. Wadi, M. Nath, A.R. Anvikar, P. Singh, A. Sinha, Recent advances in transmission-blocking drugs for malaria elimination, *Future Med. Chem.* 11 (2019) 3047–3088.
- [22] T. Seebeck, G.J. Sterk, H. Ke, Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiparasitic drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite, *Future Med. Chem.* 3 (2011) 1289–1306.

B. Résultats deuxième partie : Les analogues du Tadalafil spécifiques pour le parasite impactent les propriétés mécaniques des GRIGs de Plasmodium falciparum

1. Introduction

L'apparition de résistances aux traitements contre le paludisme rend nécessaire la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques (Balikagala et al., 2021; Dondorp et al., 2009; Lu et al., 2017). Ces dix dernières années, l'accent a été mis sur l'étude de la gamétocytogénèse afin de mieux comprendre ce processus qui mène à la formation des formes du parasite qui assurent sa transmission.

Plusieurs études ont mis en lumière les propriétés mécaniques des GRIGs matures comme étant une cible thérapeutique intéressante pour bloquer la transmission du parasite (Bouyer et al., 2020; Naissant et al., 2016; N'Dri et al., 2021; Ramdani et al., 2015). En particulier, les inhibiteurs de PDEs tel que le Tadalafil ont montré leur efficacité pour rendre les GRIGs matures plus rigides et plus perméables (N'Dri et al., 2021). Cependant, les inhibiteurs utilisés dans ces études ont pour cible première des PDEs humaines, notamment HsPDE5. Elle est présente dans de nombreux tissus de l'organisme notamment le cervelet, le cœur, les muscles lisses et les globules rouges (Adderley et al., 2011a; Lugnier, 2006). Même si plusieurs éléments, notamment les phénotypes obtenus avec une souche de parasite transgénique délété pour *pfpdeδ*, suggèrent que les propriétés mécaniques des GRIGs sont régulées par une PDE plasmodiale, on ne peut pas écarter l'implication potentielle des PDE humaines présentes dans le globule rouge infecté (Adderley et al., 2011a, 2010). Autrement dit, est-ce que le Tadalafil cible la PDE humaine PDE5, la PDE plasmodiale *PfPDEδ* ou les deux enzymes à la fois dans les phénotypes de déformabilité et de perméabilité observés lors de nos expériences? Cette question est très importante si on veut utiliser les inhibiteurs de PDEs comme stratégie pour bloquer la transmission de *P. falciparum*. En effet, cette approche nécessite de générer des analogues spécifiques pour le parasite afin d'éviter les effets secondaires sur l'homme. Pour essayer d'identifier la cible du Tadalafil dans ces phénotypes, nous avons établi une collaboration avec une équipe de chimistes qui avait généré des analogues du Tadalafil dans le but de les repositionner comme traitement antipaludéen (Beghyn et al., 2012, 2011). Dans leurs études, les auteurs ont évalué deux paramètres : l'activité anti-

plasmodiale des composés sur les formes asexuées de *P. falciparum* ainsi que leurs activités inhibitrices sur HsPDE5. Tout d’abord, ils ont confirmé l’effet inhibiteur du Tadalafil sur HsPDE5 avec un IC₅₀ de 5nM, puis n’ont détecté aucune activité anti-plasmodiale de cet inhibiteur sur les parasites (IC₅₀ > 64000 nM). Ensuite, ils ont observé que le remplacement du groupement pipéronyl du Tadalafil par un groupement dimethoxyphenyl (Analogue A) entraîne une perte de l’activité inhibitrice du Tadalafil sur HsPDE5 : l’IC₅₀ passe de 5 nM à 10000 nM pour l’Analogue A. Aucune activité anti-plasmodiale n’a été détectée chez les parasites en présence de cet analogue (IC₅₀ > 64000 nM)(Beghyn et al., 2012; Maw et al., 2003). En parallèle à ces observations, ils ont montré que l’ajout du groupement benzylaminopyrrolidine (Analogue B) confère au Tadalafil une activité anti-plasmodiale avec un IC₅₀ de 500 nM (Beghyn et al., 2011). Enfin, l’analogue C, qui présente les deux modifications structurelles, perd son activité inhibitrice sur HsPDE5 (IC₅₀ = 5200 nM) mais conserve son activité anti-plasmodiale (420 nM) (Beghyn et al., 2012). Ces résultats montrent qu’il est possible de modifier le Tadalafil sur différentes parties de sa structure afin d’obtenir des molécules qui n’ont plus d’effet sur HsPDE5 mais qui ciblent potentiellement des PDEs plasmodiales. Il serait donc intéressant de déterminer leur effet sur les gamétocytes de *P. falciparum*.

Tadalafil

Analogue A

Analogue B

Analogue C

Compounds	Antiplasmodial activity (IC ₅₀ nM)	HsPDE5 (IC ₅₀ nM)
Tadalafil	<64000	5
Analogue A	<64000	10000
Analogue B	500	7
Analogue C	420	5200

Figure 27 : Structures du Tadalafil et de ses analogues et leur effet sur les formes asexuées de *P. falciparum* et sur HsPDE5. L’analogue A est obtenu par le remplacement du groupement pipéronyl du Tadalafil par un groupement dimethoxyphenyl (rectangle bleu)(Maw et al., 2003). L’analogue B est obtenu par l’ajout d’un groupement benzylaminopyrrolidine à la place d’un méthyl au Tadalafil (rectangle rouge)(Beghyn et al., 2011). L’analogue C quant à lui comporte les deux modifications (Beghyn et al., 2012). L’activité anti-plasmodiale qui indique le pourcentage d’inhibition de la croissance des parasites en présence de différents des composés a été

déterminée par la méthode de Malstat. Leur activité inhibitrice sur la HsPDE5 est mesurée par la technologie HTRF.

2. Matériels et méthodes

- **Culture des parasites et production des gamétocytes**

La souche NF54 est un isolat de terrain de *P. falciparum* adapté à la culture et généralement utilisée comme souche de référence dans les laboratoires.

La souche NF54-cg6-pfs16-CBG99 (Pfs16-Luciférase) est une souche transgénique dans laquelle le gène qui code pour la luciférase (*cbg99*) est sous le contrôle du promoteur du gène *pfs16* exprimé uniquement chez les gamétocytes. En présence de luciférine (substrat de la luciférase), on peut mesurer un signal de bioluminescence qui reflète la viabilité du parasite (Cevenini et al., 2014).

Les parasites sont cultivés en présence de sang humain O+ et de milieu RPMI (25 mM Hepes, 2 mM glutamine) supplémenté avec 10 % de sérum humain AB, 20 µg/ml gentamicine et 100 µM hypoxanthine à 37° C dans un incubateur tri-gaz à 5 % CO₂, 5 % O₂ et 93 % N. La croissance des parasites est contrôlée quotidiennement par un frottis sanguin qui permet d'évaluer la parasitémie après lecture au microscope.

Les gamétocytes sont produits à partir d'une culture de formes asexuées du parasite, qui présente une parasitémie comprise entre 10 et 25 %. En plus du stress engendré par la forte parasitémie favorisant l'engagement vers la voie sexuée, l'ajout de 50 mM N-acétylglucosamine (NAG, Sigma) dans le milieu va entraîner le blocage de l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes et par conséquent éliminer les parasites non engagés dans la gamétocytogénèse. Le milieu de culture est changé quotidiennement et les stades V apparaissent au bout de 8 à 12 jours après l'ajout du NAG.

- **Microsphiltration**

La déformabilité des globules rouges est évaluée par une technique de filtration sur billes mimant le passage des globules rouges à travers les sinus de la rate (Deplaine et al., 2011; Lavazec et al., 2013). 400 µl d'un mélange de billes d'étain de taille allant de 5 à 25 µm sont déposés sur le filtre d'un cône faisant office de support. 600 µl de globules rouges infectés à 1-2 % d'hématocrite sont injectés dans le cône à l'aide d'une seringue et poussés à travers les billes à l'aide d'un pousse-seringue injectant 5 ml de milieu RPMI supplémenté avec 10 % de

sérum humain AB à un débit de 60 ml/H. La rétention sur les billes, inversement proportionnelle à la déformabilité des cellules, est calculée en déterminant le ratio de la parasitémie après passage sur billes sur la parasitémie avant passage sur billes.

- **Lyse isosmotique**

L'état des canaux (ouverts ou fermés) à la membrane des GRIGs matures est évalué par un essai de lyse isosmotique. 500 µl d'une culture contenant 1 à 3% de gamétocytes sont incubés avec ou sans molécules d'intérêt pendant 30 min à 37°C. Après un lavage au RPMI, les gamétocytes sont re-suspendus dans une solution à pH 7.4 de 300 mM Sorbitol, 10 mM HEPES, 5 mM glucose, avec ou sans ajout de 100 µM 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) qui est un inhibiteur des NPPs (Kirk et al., 1994). Après 60 min, un frottis est réalisé et le pourcentage de lyse des gamétocytes est obtenu en calculant le ratio de la parasitémie avant et après l'incubation dans la solution de Sorbitol.

- **Essai de viabilité des gamétocytes**

L'effet gamétocide du Tadalafil et de ses analogues a été évalué par un essai de viabilité des gamétocytes (Siciliano et al., 2017). 8 jours après l'ajout du NAG, une culture de parasites de la souche Pfs16-Luciférase a été purifiée sur un séparateur magnétique (Mytenyi) puis 200000 de gamétocytes ont été incubés avec différentes concentrations des molécules d'intérêt (dilution en série). Après 72 h d'incubation à 37° C dans un incubateur tri-gaz, les gamétocytes sont mis en présence d'une solution de D-luciférine à 0.5 mM (Sigma-Aldrich) afin de permettre l'activité luciférase. Cette activité est mesurée pendant une seconde dans un lecteur de plaque Infinite 200 PRO (Tecan®). L'activité luciférase reflète directement la viabilité des gamétocytes. Toutes les expériences ont été en fait en triplicat technique et biologique.

- **Localisation des gamétocytes luminescents *in vivo***

Les gamétocytes de la souche Pfs16-luciférase sont purifiés de façon magnétique 9 jours après l'ajout du NAG puis incubés avec la molécule d'intérêt pendant 30 min à 37°C. 1.10⁷ GRIGs matures sont ensuite injectés par voie rétro-orbitale dans un modèle de souris humanisée précédemment décrit (Duffier et al., 2016). Ce sont des souris immunodéprimées génétiquement (souris NSG) et chimiquement (par injection de clodronate et d'anticorps anti-neutrophiles) auxquelles on greffe des globules rouges

humains. Sept heures après injection des gamétocytes, la luciférine est injectée dans la souris pour activer la réaction enzymatique. Des images des souris entières sont ensuite prises par l'IVIS. Les souris sont ensuite disséquées après une deuxième injection de luciférine et les différents organes sont analysés à l'aide de l'IVIS. Le signal de bioluminescence est représenté en p/s/cm²/sr. Il prend en compte le flux de photons par secondes sur l'aire de l'organe.

3. Résultats

Le Tadalafil et l'analogue A n'ont pas d'effet sur la viabilité des gamétocytes matures.

En utilisant un essai de viabilité des gamétocytes (Siciliano et al., 2017), nous avons pu évaluer l'effet du Tadalafil et de ses analogues. Après avoir incubé pendant 72 heures les gamétocytes d'une souche transgénique qui exprime la luciférase (Pfs16-luciférase) avec des concentrations croissantes des composés, nous avons mesuré l'activité luciférase qui reflète la viabilité des gamétocytes. Nous avons observé une faible diminution de la viabilité des gamétocytes en présence de Tadalafil et d'Analogue A. En effet, la viabilité passe à environ 75% à la concentration maximale des composés, 75 μ M (**Figure 28**). Ces résultats montrent que le Tadalafil et l'analogue A ont très peu d'effet sur la viabilité des formes sexuées du parasite, comme déjà démontré pour les formes asexuées.

L'ajout du groupement benzylaminopyrolidine sur le Tadalafil lui confère un effet sur la viabilité des gamétocytes. L'effet des analogues B et C sur la viabilité des gamétocytes a ensuite été évalué. Nous pouvons voir que les deux analogues entraînent une diminution du pourcentage de viabilité des gamétocytes et cela dès la concentration 1 μ M. A la plus forte concentration (75 μ M), la viabilité chute à 20 % (**Figure 28**). Ces résultats montrent que l'ajout du groupement benzylaminopyrolidine confère au Tadalafil un effet délétère non seulement sur les parasites asexués mais aussi sur les gamétocytes. Cependant, cet effet est moins prononcé chez les gamétocytes.

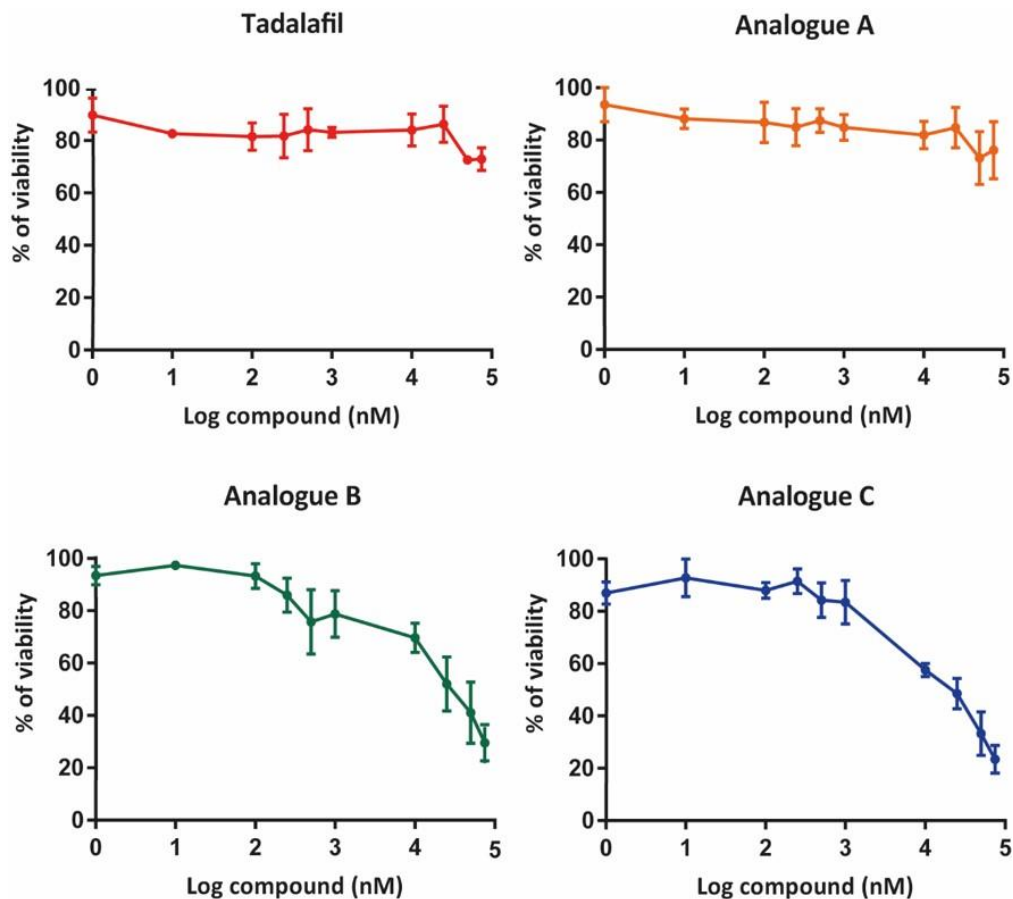


Figure 28 : Essai de viabilité des gamétocytes en présence du Tadalafil et de ses analogues. Le pourcentage de viabilité des gamétocytes est déterminé en faisant le ratio de l'activité luciférase (signal de bioluminescence) pour une concentration donnée sur l'activité la plus élevée détectée. Pour chaque concentration, la moyenne de trois réplicats techniques a été faite. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne entre trois expériences indépendantes (triplicate biologique).

L'absence d'activité inhibitrice sur HsPDE5 entraîne la perte de l'effet du Tadalafil sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures. Après avoir validé l'action des analogues du Tadalafil sur la viabilité des gamétocytes de *P. falciparum*, nous nous sommes ensuite intéressés à leur effet sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures. En effet, le fait d'avoir un analogue du Tadalafil qui a une faible activité inhibitrice sur HsPDE5 (analogue A) nous permettra d'identifier la cible du Tadalafil dans les phénotypes de déformabilité et de perméabilité des GRIGs matures. Nous avons déjà montré dans une étude précédente que le Tadalafil impactait la déformabilité et la perméabilité des GRIGs matures (N'Dri et al., 2021). En utilisant les mêmes techniques de microsphiltration et de lyse isosmotique nous avons pu déterminer le pourcentage de rétention et de lyse des

GRIGs en présence de l'analogue A. Ces deux paramètres reflètent respectivement la filtrabilité d'un GRIG, donc sa capacité à passer le filtre de la rate par les fentes inter endothéliales, et l'état des canaux, ouvert ou fermé, présents à la membrane du globule rouge infecté.

Tout d'abord, nous avons évalué la déformabilité des GRIGs matures en présence de différentes concentrations de l'analogue A. Pour rappel, cet analogue a une activité inhibitrice plus faible sur HsPDE5 que le Tadalafil (valeur d'IC₅₀ : 10 μ M vs 5nM) et a très peu d'effet sur la viabilité des gamétocytes. Comme nous pouvons le voir sur **la figure 29A**, l'analogue A entraîne une augmentation du pourcentage de rétention des GRIGs matures dans les billes de façon significative à 100 μ M ($p = 0.003$) et à 10 μ M ($p = 0.0019$). Cependant, à 1 μ M, on n'observe pas d'augmentation du pourcentage de rétention ($p = 0.8528$). Afin d'évaluer l'effet de cet analogue sur la perméabilité des GRIGs, nous avons mesuré le pourcentage de lyse des GRIGs matures avec différentes concentrations de l'analogue A. Nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de lyse à 30 μ M ($p = 0.0002$) et 10 μ M ($p = 0.0006$). Néanmoins, comme pour la déformabilité, nous n'avons pas observé d'augmentation significative du pourcentage de lyse à 1 μ M ($p = 0.1143$) (**Figure 29B**). Ces résultats contrastent avec ceux obtenus avec 1 μ M Tadalafil : à cette concentration le Tadalafil augmente de façon significative le pourcentage de rétention ($p > 0.001$) et le pourcentage de lyse ($p = 0.0286$) des GRIGs matures (N'Dri et al., 2021). Les résultats obtenus avec 1 μ M d'analogue A montrent qu'en absence d'une activité inhibitrice sur HsPDE5, on perd l'effet du Tadalafil sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures. Ils suggèrent donc que la cible du Tadalafil dans les phénotypes déformabilité et de perméabilité des GRIGs matures est la humaine HsPDE5.

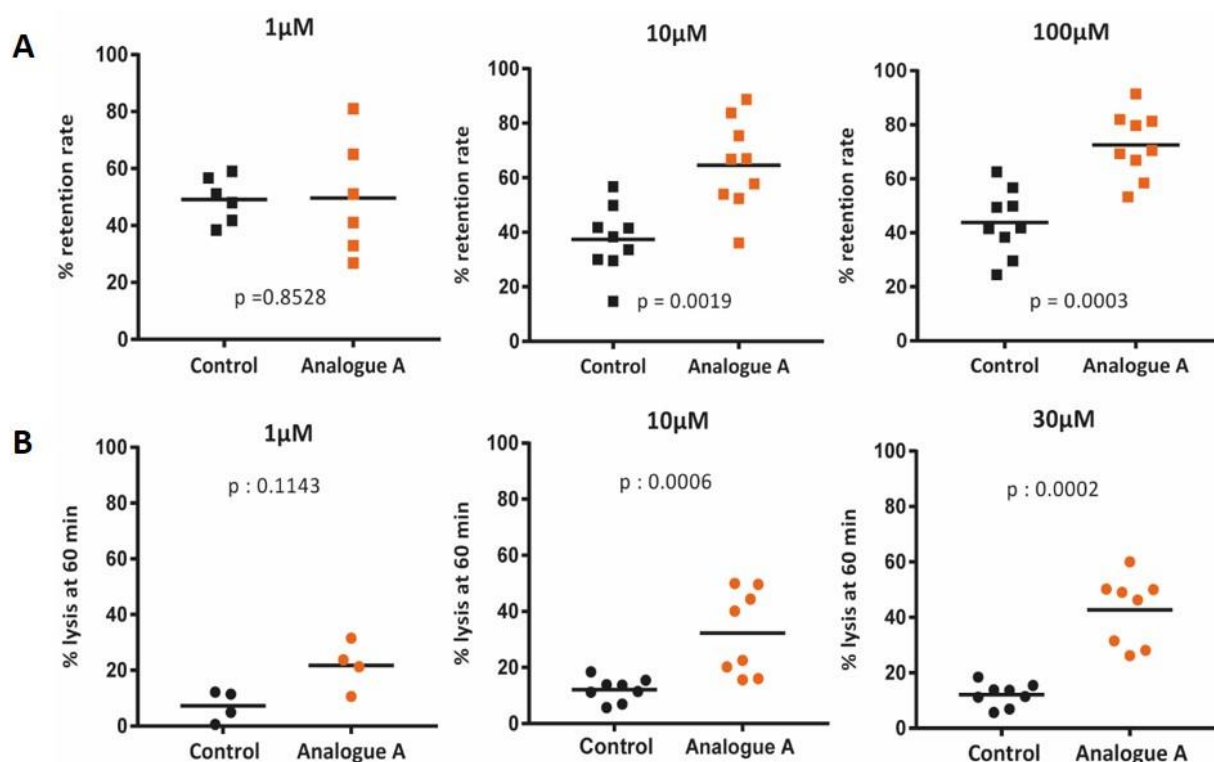


Figure 29 : La modification du groupement pipéronyl du Tadalafil empêche son action sur les propriétés mécaniques des GRIGs mature. (A) Le pourcentage de rétention des GRIGs matures à 1, 10 et 100 μM représente le ratio de la parasitémie avant et après passage sur la matrice de billes. (B) Le pourcentage de lyse des GRIGs matures à 1, 10 et 30 μM est obtenue en faisant le ratio le ratio de la parasitémie avant et après 60 min d'incubation dans le sorbitol. Pour chaque expérience au moins 2000 cellules ont été comptabilisées. Les carrés (pourcentage de rétention) et les cercles (pourcentage de lyse) représentent le nombre d'expériences indépendantes réalisées et p indique la significativité statistique des résultats (test Mann-Whitney).

L'ajout du groupement benzylaminopyrrolidine sur le Tadalafil ne réduit pas son effet sur les propriétés mécaniques des GRIGS matures. Après avoir montré que le Tadalafil ciblait probablement HsPDE5 pour provoquer les phénotypes de déformabilité et de perméabilité, notre objectif était de déterminer si une modification de sa structure pour qu'il cible des PDEs plasmodiales permettait de conserver son effet sur les propriétés mécaniques des GRIGs. Les phénotypes de viabilité observés en présence des analogues B et C suggèrent que l'ajout du groupement benzylaminopyrrolidine confère à ces composés des propriétés physico-chimiques particulières. En effet, ce groupement rend la molécule plus basique, ce qui améliore son accessibilité à des compartiments plus acides comme la vacuole parasitophore. Pour évaluer l'effet de ces nouvelles propriétés

sur la déformabilité et la perméabilité des GRIGs, nous avons déterminé les pourcentages de rétention et de lyse des GRIGs matures en présence de ces composés.

Tout d'abord, nous avons vérifié que l'ajout du groupement benzylaminopyrrolidine sur le Tadalafil n'altère pas son effet sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures. En présence de l'analogue B, qui inhibe HsPDE5 et impacte la viabilité des gamétocytes, nous pouvons observer une augmentation significative du pourcentage de rétention à 100 μM ($p < 0.0001$), 10 μM ($p = 0.0260$) et même à 1 μM ($p = 0.0152$) (**Figure 30A**). Nous avons également observé une augmentation significative du pourcentage de lyse en présence de 30 μM ($p = 0.0286$), 10 μM ($p = 0.0286$) et 1 μM ($p = 0.0286$) d'analogue B (**Figure 30B**). Ces résultats indiquent que l'ajout du groupement benzylaminopyrrolidine sur le Tadalafil ne réduit pas sa capacité à impacter les propriétés mécaniques des GRIGs matures.

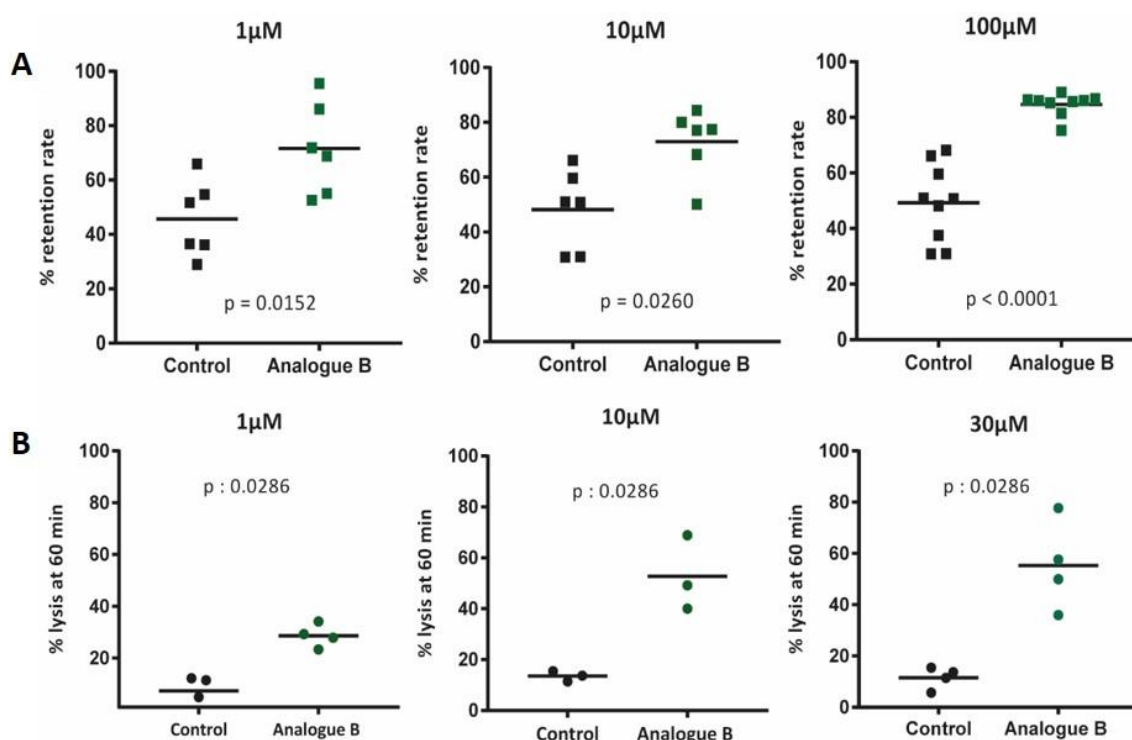


Figure 30 : L'ajout du groupement benzylaminopyrrolidine sur le Tadalafil ne réduit pas son effet sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures. (A) Le pourcentage de rétention des GRIGs matures à 1, 10 et 100 μM représente le ratio de la parasitémie avant et après passage sur la matrice de billes. (B) Le pourcentage de lyse des GRIGs matures à 1, 10 et 30 μM est obtenu en faisant le ratio de la parasitémie avant et après 60 min d'incubation dans le sorbitol. Pour chaque expérience au moins 2000 cellules ont été comptabilisées. Les carrés (pourcentage de rétention) et les cercles (pourcentage de lyse) représentent le nombre d'expériences indépendantes réalisées et p indique la significativité statistique des résultats (test Mann-Whitney).

L'ajout du groupement benzylaminopyrrolidine sur le Tadalafil permet de retrouver l'effet sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures même en absence d'inhibition de HsPDE5. Ensuite, l'effet de l'analogue C sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures a été déterminé en utilisant les mêmes méthodes que précédemment décrites. Nous pouvons observer que les pourcentages de rétention et de lyse des GRIGs matures augmentent de façon significative à 100 μ M, 10 μ M et 1 μ M d'analogue C ($p = 0.0188$ pour le pourcentage de rétention à 1 μ M (**Figure 31A**) ; $p = 0.0079$ pour le pourcentage de lyse à 1 μ M (**Figure 31B**)). Ces résultats indiquent que les nouvelles propriétés physico-chimiques de l'analogue C, dues à l'ajout du groupement benzylaminopyrrolidine, lui permettent de retrouver un effet significatif sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures, et cela même en absence du groupement pipéronyl.

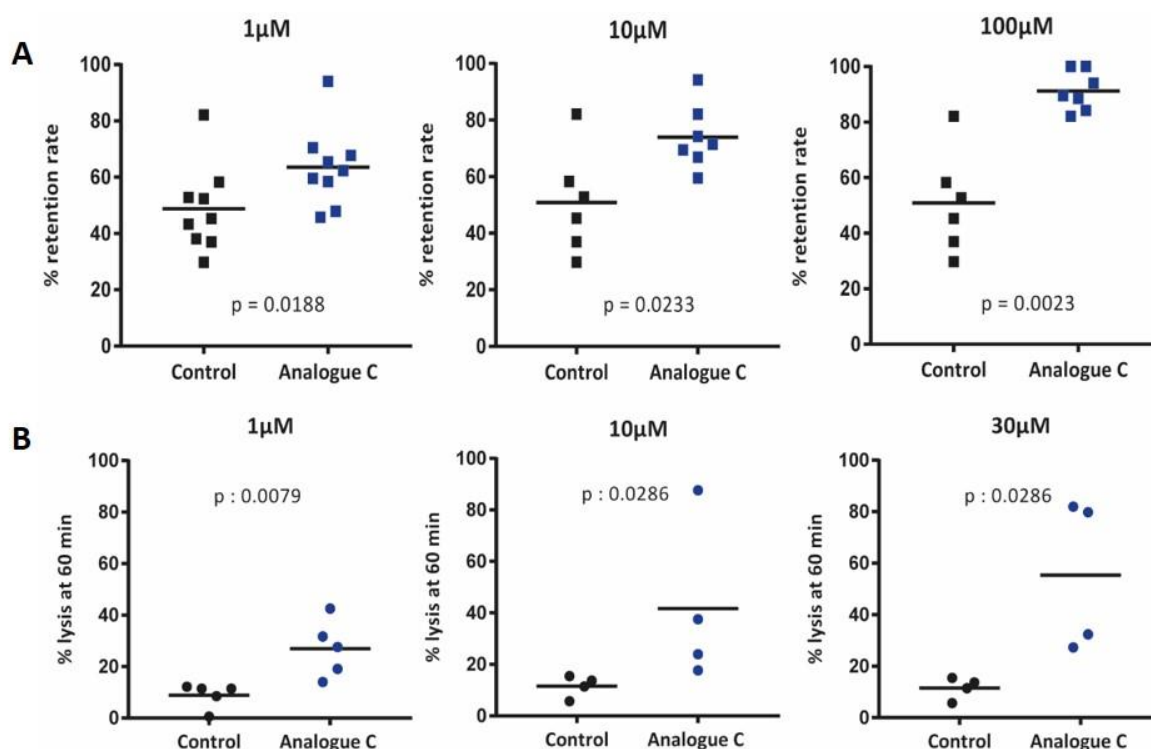


Figure 31 : L'ajout du groupement benzylaminopyrrolidine sur le Tadalafil permet de retrouver l'effet sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures même en absence d'inhibition de la HsPDE5. (A) Le pourcentage de rétention des GRIGs matures à 1, 10 et 100 μ M représente le ratio de la parasitémie avant et après passage sur la matrice de billes. (B) Le pourcentage de lyse des GRIGs matures à 1, 10 et 30 μ M est obtenu en faisant le ratio de la parasitémie avant et après 60 min d'incubation dans le sorbitol. Pour chaque expérience au moins 2000 cellules ont été comptabilisées. Les carrés (pourcentage de rétention) et les cercles (pourcentage de lyse) représentent

le nombre d'expériences indépendantes réalisées et p indique la significativité statistique des résultats (test Mann-Whitney).

L'analogue C entraîne la séquestration des GRIGs matures dans la rate d'une souris humanisée. Dans notre hypothèse de départ, les propriétés mécaniques des GRIGs matures constituent une cible pour bloquer la transmission du parasite en éliminant les GRIGs matures de la circulation. Les résultats obtenus avec l'analogue C établissent la preuve de concept que nous pouvons générer des analogues du Tadalafil qui agissent sur ces propriétés mécaniques sans cibler HsPDE5. Pour aller plus loin dans cette étude, nous avons voulu tester l'effet de cet analogue sur la circulation des GRIGs matures dans un modèle de souris humanisées développé dans notre équipe (Duffier et al., 2016). Après avoir purifié des GRIGs en stade V de la souche Pfs16-luciférase, nous les avons incubés avec soit du DMSO soit 1 μ M de Tadalafil ou d'analogue C. Cette concentration a été choisie afin de bien discriminer les effets de ces inhibiteurs sur HsPDE5. Une fois incubés, les gamétocytes sont injectés dans les souris humanisées puis le signal de bioluminescence est détecté après injection de la luciférine. Nous pouvons observer que le signal se trouve majoritairement au niveau de l'abdomen des souris, et ce signal semble plus fort chez les souris traitées avec du Tadalafil (**Figure 32A**). Les souris sont ensuite disséquées pour une quantification du signal dans la rate. Nous pouvons observer que le traitement des gamétocytes au Tadalafil entraîne leur séquestration dans la rate de la souris. Ce résultat confirme des observations déjà faites au laboratoire (Barbieri et al, manuscrit en préparation). De façon intéressante, l'analogue C entraîne également une accumulation des gamétocytes dans la rate (**Figure 32B et C**). Ces résultats préliminaires suggèrent que l'analogue C augmente non seulement la rigidité et la perméabilité des GRIGs *in vitro*, mais entraîne également leur accumulation dans la rate. La réplication de cette expérience avec un plus grand nombre de souris permettra de déterminer si cette augmentation est significative.

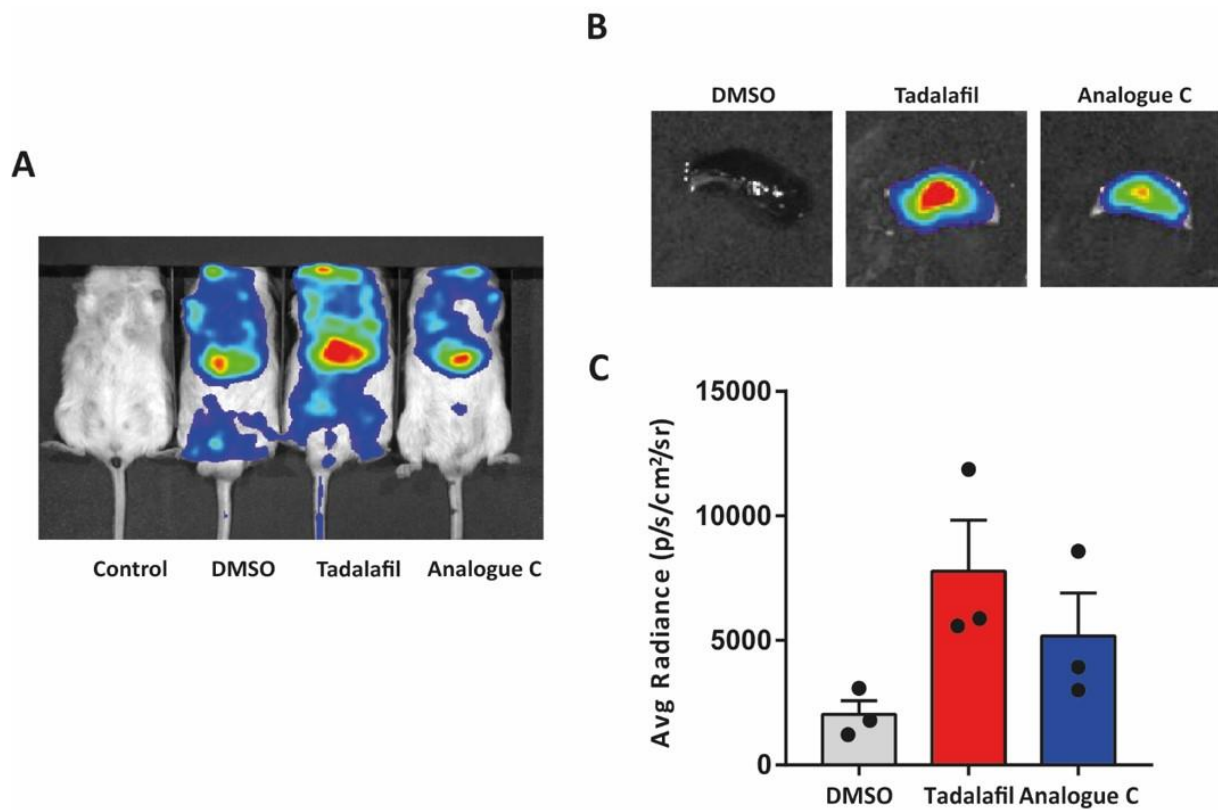


Figure 32 : L'analogue C entraîne la séquestration des GRIGs matures dans la rate d'une souris humanisée. (A) Images des souris entières prises après injection des gamétocytes matures Pfs16-luciférase traités avec du DMSO ou 1 μ M de Tadalafil ou d'analogue C. (B) Après une seconde injection de la luciférine, les souris sont disséquées puis les images des rates des différentes souris sont prises à l'aide de l'IVIS. L'intensité du signal est corrélée à la quantité de parasite. (C) Graph de la quantification du signal de bioluminescence de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne entre les trois expériences indépendantes.

4. Conclusions et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons tenté de mieux comprendre le mécanisme de régulation des propriétés mécaniques des GRIGs matures. Tout d'abord, nous avons pu montrer que les changements de déformabilité et de perméabilité observés chez les GRIGs matures en présence du Tadalafil étaient dus à l'inhibition de la PDE5 humaine présente dans le globule rouge. En effet, l'analogue A, dont la structure est quasiment identique au Tadalafil à l'exception du groupement pipéronyl qui est remplacé par un groupement dimethoxyphenyl, n'a plus d'effet sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures à 1 μ M, concentration à laquelle ce composé n'inhibe plus HsPDE5 (Beghyn et al., 2011).

Cependant, nous savons que HsPDE5 est une enzyme spécifique du GMPc. Si les phénotypes de déformabilité et de perméabilité en présence du Tadalafil, et probablement aussi du Sildénafil (Bouyer et al., 2020; Naissant et al., 2016; N'Dri et al., 2021; Ramdani et al., 2015), sont dus à l'inhibition de HsPDE5, comment se fait-il que nous observions une augmentation du niveau d'AMPc chez les GRIGs matures ? Cela pourrait s'expliquer par la présence de HsPDE3 dans le globule rouge. En effet, cette enzyme est capable d'hydrolyser à la fois l'AMPc et le GMPc. En présence d'une forte concentration de GMPc, ce nucléotide agirait comme un inhibiteur compétitif et empêcherait HsPDE3 d'hydrolyser de l'AMPc. Une étude de 2013 a montré qu'en présence de Tadalafil, on peut observer une augmentation du niveau d'AMPc dans les globules rouges humains à cause de l'effet compétiteur du GMPc sur HsPDE3 induite par l'inhibition de HsPDE5 (Knebel et al., 2013). Pour évaluer le potentiel rôle de HsPDE3 dans la régulation des propriétés mécaniques GRIGs matures, on pourrait déterminer le pourcentage de rétention et de lyse des GRIGs matures en présence d'un inhibiteur spécifique de HsPDE3 tel que le Milrinone.

D'autre part, une autre modification de la structure du Tadalafil lui confère de nouvelles propriétés physico-chimiques : l'ajout d'un groupement benzylaminopyrrolidine au Tadalafil lui confère une activité antiplasmodiale non seulement sur les formes asexuées du parasite (Beghyn 2012) mais aussi sur la viabilité des gamétocytes matures, et cela en présence (analogue B) ou en absence (analogue C) d'une activité inhibitrice du composé sur HsPDE5. L'évaluation de la déformabilité et de la perméabilité des GRIGs matures en présence de 1 μ M d'analogue C nous a permis de montrer que les nouvelles propriétés physico-chimiques de ce

composé leur permettraient de retrouver, à moindre mesure, l'effet sur les propriétés mécaniques des GRIGs précédemment observé en présence du Tadalafil. Enfin, nos résultats préliminaires suggèrent que l'analogue C est capable d'altérer la circulation des GRIGs matures en entraînant leur accumulation dans la rate d'une souris humanisée.

De façon plus générale, l'utilisation d'inhibiteurs de PDEs pour cibler des mécanismes biologiques est une stratégie assez répandue (Lugnier 2006; Seebeck, Sterk, et Ke 2011; Baillie, Tejeda, et Kelly 2019). Chez l'homme, les PDEs sont impliquées dans plusieurs physiopathologies comme les cardiomyopathies (Bedioun et al., 2016; Kim and Kass, 2017), l'hypertension pulmonaire (Barlow et al., 2021), les dysfonctionnements érectiles (Leiber, 2017) ou encore la COVID-19 (Giorgi et al., 2020). Le développement d'inhibiteurs de PDEs humaines comme traitement a permis la prise en charge de ces maladies. Les nombreuses connaissances obtenues grâce aux études scientifiques et pharmacocinétiques de ces inhibiteurs facilitent donc leur repositionnement dans d'autres pathologies, notamment des maladies infectieuses (Beghyn et al., 2012, 2011; Seebeck et al., 2011; Wang et al., 2012). En effet, la mise en évidence du rôle clé des PDEs dans la physiologie des parasites comme *Trypanosoma* ou *Plasmodium* ont fait d'elles des cibles privilégiées (Flueck et al., 2019; Luginbuehl et al., 2010; Moon et al., 2009; Oberholzer et al., 2015; Taylor et al., 2010; Zoraghi and Seebeck, 2002). Dans le cas du parasite *Trypanosoma brucei* responsable de la maladie du sommeil, une étude a montré que l'utilisation d'inhibiteur de PDEs humaines comme le Sildénafil entraînait un défaut de prolifération des formes sanguines du parasite (Zoraghi et al., 2001). Dans une autre étude dans laquelle les auteurs s'intéressaient à la PDEC de *Trypanosoma cruzi*, ils ont réalisé un criblage de molécules ayant pour cible initiale la PDE4 humaine et ont montré un effet de certains composés sur l'enzyme du parasite (King-Keller et al., 2010). De façon intéressante, les molécules qui avaient un effet sur l'enzyme parasitaire avaient un faible effet sur l'enzyme humaine. Dans notre étude, nous avons montré que le Tadalafil réduisait la déformabilité et augmentait la perméabilité des GRIGs matures en inhibant HsPDE5 présente dans le globule rouge. Plusieurs modifications de sa structure ont permis d'empêcher l'activité inhibitrice du Tadalafil sur HsPDE5 (Beghyn et al., 2011) tout en lui rajoutant de nouvelles propriétés physico-chimiques (Beghyn et al., 2012) qui lui permettent de cibler spécifiquement une PDE plasmodiale (analogue C). Ce résultat est donc

la preuve de concept que chez *Plasmodium falciparum*, il est possible de générer, à partir d'un inhibiteur de PDE humaine, un inhibiteur de PDE spécifique pour le parasite.

Ensuite, l'effet des analogues B et C sur la viabilité des gamétocytes est assez surprenante. Pour rappel, ces analogues ont un groupement benzylaminopyrrolidine qui les rend plus basiques et donc plus susceptibles d'aller dans la vacuole parasitophore qui est un compartiment acide. A ce jour, aucune PDE plasmodiale exprimée chez les gamétocytes de *P. falciparum* n'est connue pour jouer un rôle essentiel à la survie du parasite. Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'effet de ces composés sur la viabilité est une conséquence de l'altération d'une propriété mécanique du GRIG. Nous savons que l'augmentation de la perméabilité des GRIGs matures, due à l'ouverture des canaux, augmentent leur sensibilité à la lyse isosmotique (Bouyer et al., 2020). Les propriétés basiques des analogues B et C pourraient accentuer cette sensibilité à la lyse non seulement en activant les canaux à la membrane du globule rouge (NPPs) mais également en ciblant d'autres protéines présentes dans le parasite. Ce type de phénotype a déjà été observé chez d'autres parasites tel que *Trypanosoma brucei* dont l'inhibition des PDEB1 et PDEB2 entraînait un dérèglement de l'osmorégulation et donc la lyse des cellules (de Koning et al., 2012).

De plus, l'analogue C semble altérer la circulation des GRIGs matures dans un modèle de souris humanisée. En effet, nos résultats préliminaires montrent une accumulation des GRIGs matures dans la rate de la souris 7 h après leur injection. Ce résultat conforte notre stratégie initiale qui est d'altérer les propriétés mécaniques des GRIGs matures afin de bloquer la transmission du parasite (Tibúrcio et al., 2012). A la lumière de ce résultat, c'est plutôt la baisse de la déformabilité des GRIGs matures en présence de l'analogue C qui l'empêcherait de passer les fentes inter-endothéliales de la rate. Cependant, les paramètres pharmacocinétiques de l'analogue C tels que sa réversibilité et son temps de demi-vie ne sont pas connus. Il serait donc intéressant de déterminer ces paramètres afin de pouvoir les améliorer et optimiser ce composé. Nous pourrions aussi déterminer la localisation des GRIGs matures à des temps post-injection plus longs afin d'évaluer l'effet de l'analogue C sur une plus longue période. Dans l'optique d'utiliser ce composé comme base pour une molécule anti-transmission, ces différents résultats nous permettront de mieux ajuster le temps pendant lequel il faudra traiter les patients afin de réduire au maximum la gamétocythémie et donc la probabilité qu'un moustique ingère des gamétocytes au cours d'une pique.

Enfin, la cible de l'analogue C dans les phénotypes de déformabilité et de perméabilité reste à déterminer. En effet, de par sa structure, cette molécule n'inhibe plus, à une certaine concentration, ni HsPDE5 ni les autres PDEs humaines présentes dans le globule rouge (Beghyn et al., 2012). La cible la plus probable de ce composé est *PfPDEδ*. Cette protéine est exprimée chez les GRIGs matures et son rôle a déjà été mis en évidence dans la sortie du gamète du globule rouge (Taylor et al., 2008a). De plus, une souche de parasite transgénique dans laquelle le gène qui code pour *PfPDEδ* est délété, présente des phénotypes de déformabilité et de perméabilité comparable à ceux observés en présence d'inhibiteurs de PDEs (Bouyer et al., 2020; Ramdani et al., 2015). Cependant, très peu d'informations sont disponibles sur cette protéine. Nous ne savons pas exactement la nature de son substrat, son profil d'expression ou encore sa localisation au sein de la cellule. Il sera donc nécessaire de produire la protéine recombinante afin de déterminer tous ces paramètres.

Nous pouvons conclure de ces travaux que les propriétés mécaniques des GRIGs matures constituent bel et bien une cible pour bloquer la transmission de *P. falciparum* et que les inhibiteurs de PDEs peuvent être utilisés comme point de départ pour une molécule anti-transmission.

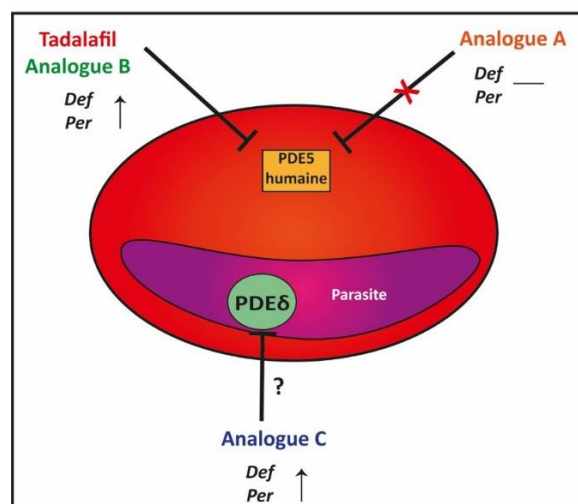


Figure 33 : Schéma récapitulatif des cibles du Tadalafil et de ses analogues dans les phénotypes de déformabilité et de perméabilité. Def : déformabilité ; Per : perméabilité ; ↑ : augmentation significative ; — : pas d'augmentation

C. Résultats troisième partie : Caractérisation de *Pf* PDE δ

1. Introduction

L'étude des propriétés mécaniques des GRIGs matures a mis en évidence le rôle des PDEs dans la régulation de ces mécanismes (Bouyer et al., 2020; Naissant et al., 2016; N'Dri et al., 2021; Ramdani et al., 2015). Dans le modèle de régulation proposé par notre équipe, la voie de signalisation AMPc-PKA est inactivée chez les GRIGs matures conduisant d'une part à la déphosphorylation de STEVOR et donc à l'augmentation de la déformabilité des GRIGs matures (Naissant et al., 2016; Ramdani et al., 2015) et d'autre part à l'inactivation des NPPs qui va entraîner la baisse de leur perméabilité (Bouyer et al., 2020). Ce changement des propriétés mécaniques est accompagné de la forte expression de *Pf*PDE δ qui est la PDE plasmodiale la plus exprimée chez les gamétocytes (Ramdani et al., 2015). Nous émettons donc l'hypothèse que *Pf*PDE δ serait le régulateur principal des propriétés mécaniques des GRIGs. Pour conforter cette hypothèse et valider notre modèle, nous allons tenter de déterminer ses caractéristiques enzymatiques, notamment sa spécificité de substrat, son profil d'expression au cours de la gamétocytogénèse et sa localisation dans le parasite.

D'autre part, les phénotypes de déformabilité et de perméabilité observés en présence d'inhibiteurs de PDEs, tel que le Tadalafil, ont mis en lumière le rôle de HsPDE5, présente dans le globule rouge, dans la régulation de ces propriétés. Un analogue du Tadalafil, initialement synthétisé pour ne plus inhiber la PDE5 humaine tout en ciblant des PDEs plasmodiales (Beghyn et al., 2012, 2011), a montré son efficacité pour augmenter la rétention des GRIGs matures dans un modèle *in vitro* de filtration splénique ainsi que pour augmenter leur fragilité osmotique. Ces résultats suggèrent donc que cet analogue inhibe une PDE plasmodiale. Dans des travaux précédents, nous avons observé les mêmes phénotypes de diminution de la déformabilité et d'augmentation de la perméabilité des GRIGs matures (Ramdani et al. 2015; Bouyer et al. 2020) chez une souche de parasite transgénique dans laquelle le gène qui code pour *Pf*PDE δ est délété (Taylor et al., 2008a). On pourrait donc émettre l'hypothèse selon laquelle l'analogue C cible *Pf*PDE δ dans les phénotypes de déformabilité et de perméabilité des GRIGs matures. Pour tester cette hypothèse, nous allons réaliser des tests d'inhibitions avec cet analogue.

2. Matériels et méthodes

- **Culture des parasites et production des gamétocytes**

La souche NF54 est un isolat de terrain de *P.falciparum* adapté à la culture et généralement utilisée comme souche de référence dans les laboratoires.

La souche PDE δ - est une souche transgénique dérivée de la souche 3D7 dans laquelle le gène codant pour *PfPDE δ* est délété (Taylor et al., 2008b).

Les gamétocytes sont produits et cultivés comme décrit dans la partie B des résultats.

- **Construction du plasmide His-Sumo-*PfPDE δ***

Un alignement de la séquence de *PfPDE α* et de *PfPDE δ* a permis de délimiter le domaine catalytique de *PfPDE δ* . La séquence du domaine catalytique qui s'étend du résidu I²³⁶ au résidu I⁶³⁴ a ensuite été synthétisée et enrichie en GC (Integrated DNA Technologies) pour faciliter son expression chez *E. coli*. Afin de rajouter des séquences d'homologies en 5' et en 3' avec le vecteur PT7-HIS-SUMO, la séquence du domaine catalytique a été amplifiée par PCR avec les amorces suivantes :

Sens : 5'-ATTGAGGCTCACCGCGAACAGATTGGTCCG-3' ;

Anti-sens : 5'-AGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGA-3'

L'insertion du produit de PCR dans le vecteur se fait grâce à une recombinaison (IN-FUSION HD cloning plus, Clontech). Le mélange (produit PCR + vecteur) est placé 15 min à 50°C. Ensuite, 2.5 μ l du mix sont mis en présence de 100 μ l de bactéries XL10 pendant 30 min sur glace puis un choc thermique est effectué pour fragiliser la membrane des bactéries et permettre l'entrée du plasmide : la suspension est placée dans un bain marie 30 sec à 42°C puis 5 min sur glace. Le tout est mis à incuber à 37°C pendant 45 min dans 900 μ l de milieu de culture LB (Luria-Bertani). Ensuite, 100 μ l de cette culture sont étalés sur une boîte de Pétri LB + kanamycine puis incubés toute la nuit à 37°C. Un criblage de plusieurs colonies est effectué le lendemain et les plasmides sont extraits en utilisant un kit d'extraction (Qiagen). Ils sont ensuite quantifiés, digérés et déposés sur gel d'agarose pour vérifier la concordance des tailles des bandes attendues puis validés par séquençage. Enfin, des bactéries BL21 (Codon plus) spécialisées dans l'expression de protéines recombinantes sont transformées avec le ou les plasmides les plus fidèles à la matrice d'ADN.

- **Expression et purification de *PfPDEδ* recombinante.**

Plusieurs conditions d'expression ont été testées afin de déterminer les conditions optimales pour obtenir la protéine *PfPDEδ* recombinante sous forme soluble et active.

Une préculture de bactéries BL21 transformées avec le vecteur His-Sumo-*PfPDEδ* (1 : 100 de la culture finale) est mise dans du milieu Luria-Bertani (LB) avec 100 µg de kanamycine (Euromedex) + 30µg de chloramphénicol toute la nuit à 37°C. Cette préculture est ensuite diluée dans du LB avec 100 µg de kanamycine puis incubée à 37°C jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance (0.6-0.8 de DO). La production de la protéine recombinante est induite par l'ajout de 0.3 mM d'Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). La culture est alors incubée à 18°C toute la nuit.

Le culot bactérien est récupéré après 15 min de centrifugation à 5000 rpm puis re-suspendu dans un tampon contenant 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 2mg/ml lysozyme, 10% d'anti-protéases et 40 mM imidazole. Après 2 h d'incubation sur glace, le culot est soniqué trois fois pendant 30 sec à une puissance de 40% (Branson). La solution bactérienne est ensuite centrifugée pendant 1h30 à 5000 rpm puis le surnageant est collecté et mis en présence de billes de sépharose couplées à du Nickel (GE-Health care) pendant 1 h. Les billes sont ensuite lavées 3 fois dans le tampon de re-suspension, puis un dernier lavage dans ce tampon auquel on rajoute 500 mM d'imidazole, permet de décrocher *PfPDEδ* recombinante des billes. La présence et la qualité de *PfPDEδ* recombinante dans l'éluat sont évaluées sur gel SDS-PAGE. La concentration en protéine est déterminée par quantification sur gel avec le logiciel Quantity One. La protéine recombinante est conservée à -80°C en aliquots dans 20% de glycérol, 1 mM de DTT et 20 µM de zinc.

- **Production et validation des anticorps**

Les anticorps anti-*PfPDEδ* ont été générés chez la souris par l'entreprise Covalab. Pour effectuer le protocole d'immunisation, nous avons tout d'abord sélectionné quatre souris parmi huit dont le sérum pré-immun ne reconnaissait aucune protéine des gamétocytes en stade V de *Plasmodium* en western blot et en expériences d'immunofluorescence. Ensuite, 50 µg de *PfPDEδ* recombinante ont été injectés dans les souris sélectionnées à J0, J14, J28 et J42, le J0 représentant le premier jour du protocole d'immunisation. Nous avons ensuite

évalué l'efficacité et la spécificité des anticorps présents dans les sérums à J39, J53 et J67 par western blot et expériences d'immunofluorescence.

- **Gel SDS-PAGE et western blot**

Pour le gel SDS-PAGE, les échantillons sont dilués avec du tampon de lyse (XT Sample Buffer, 4X; Biorad) en présence ou non d'agent réducteur (Biorad). Ils sont ensuite chauffés pendant 5 min à 90°C puis déposés sur un gel de polyacrylamide à gradient 4-12 % (Biorad), qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Une fois déposés, les échantillons migrent pendant 1 h30 à 150 V. Le gel est alors rincé à l'eau puis coloré 1h30 avec du bleu de Coomassie (Thermo Fisher Scientific). Il est finalement décoloré avec de l'eau + 20 % d'éthanol jusqu'à l'apparition des bandes d'intérêts.

Pour le western blot, le gel de polyacrylamide est déposé après migration sur une membrane PVDF afin d'y transférer les protéines. Le transfert se fait pendant 1 h à 100 V. Le blocage des sites de fixation de la membrane est ensuite réalisé pendant 2-3 h dans une solution de PBS 1X-Tween 20 0.005 % + 5 % de lait écrémé en poudre (Régilait). La membrane est incubée sur la nuit avec l'anticorps anti-*Pf*PDEδ dilué au 1 : 500 dans du PBS 1X / Tween 20 0.005 % / 5 % lait écrémé, puis après trois lavages dans du PBS 1X / Tween 20 0.005 %, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à une peroxydase (Promega) dilué au 1 : 10000 pendant 1 h. Après trois lavages, les bandes d'intérêt sont visualisées par chimioluminescence après l'ajout d'une solution de révélation (Super Signal, Pierce). L'intensité des bandes est quantifiée sur le logiciel Quantity One.

- **Extraction des ARNs, transcription inverse et PCR quantitative**

Les ARNs totaux ont été obtenus à partir d'extraits de parasites asexués synchronisés et de gamétocytes de différents stades purifiés par séparation magnétique. La synchronisation consiste à purifier des schizontes matures par séparation magnétique puis à les remettre en culture. Quatre heures après, on estime que les formes anneaux présentent dans la culture ont entre 0-4h. On peut ainsi obtenir des parasites de 12h, 22h, 32h et 42h qui correspondent aux différents stades asexués du parasite. Après deux à trois lavages dans du PBS 1X, une extraction au Trizol (Thermo Fisher) et au chloroforme, permettant d'isoler les ARNs dans la phase aqueuse de la suspension cellulaire, a été effectuée. 100 µl d'isopropanol sont ajoutés au mélange pour précipiter les ARNs qui sont ensuite re-suspendus dans une solution de Tris-

EDTA après deux lavages dans de l'éthanol 75%. La concentration et la qualité des ARN sont déterminées à l'aide d'un Nanodrop. Il s'ensuit un traitement à la DNase afin d'éliminer les probables contaminations d'ADN. Afin de réaliser la transcription inverse, le mélange réactionnel contient 500 ng d'ARN, 10 mM de dNTPs (Thermo Scientific), 50ng/μl de Random Hexamer de 6 nucléotides (Invitrogen), du tampon RT à 1X, 0.1 M de DTT, 400 unités de RNaseOUT et 200 unités de Superscript II ou de l'eau pour le contrôle négatif. Les tubes sont ensuite mis dans un Thermocycler avec le programme suivant : 5 minutes à 25°C, 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 70°C. Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus sont dilués 2,5 fois dans de l'eau. Une vérification par PCR est nécessaire en utilisant des amorces de gènes de ménage afin de voir si la transcription inverse a fonctionné.

L'expression des gènes est ensuite quantifiée par qPCR. Chaque réaction est faite en triplicat avec un volume final de 10 μL contenant du SyberGreen PCR master mix (roche), de l'ADNc et les primers du gène d'intérêt. L'amplification du gène en temps réel est quantifiée par un Light Cycler 480 (Thermo Fisher) avec le programme d'amplification de 45 cycles suivant : 15s à 95°C, 15s à 55°C et enfin 45s à 60°C. L'analyse du signal se fait par la méthode du $2\Delta CT$. Le seuil de détection a été défini comme 4 CT (Cycle Threshold) en dessous de celui des échantillons d'ARN traités sans transcriptase inverse ou de ceux contenant de l'eau. Le gène de *l'ubiquitin-conjugating enzyme Hk (PF08_0085)* a été utilisé comme gène de ménage.

Gènes	Amorce sens	Amorce anti sens
<i>pdeα</i>	5' -GTCTCCACGCAGCACAGGTA-3'	5' -TAAGCAAAATTCGTCAATAGCTGA AA-3'
<i>pdeβ</i>	5' -TATTCTTTCCCTCACGGACCAA-3'	5' -TTGGCGGAACCTACTAATATGATG-3'
<i>pdeγ</i>	5' -CGATCCACGCAGCTATGGT-3'	5' -GCACCTAGTTCGTTATCCCTAAGAA-3'
<i>pdeδ</i>	5'-ATGGTGCTACAGTATGTCACTTATCAAA-3'	5' -TGGATGTCCTACATCATGTGCTATAGAT-3'
<i>Hk</i>	5'-GGTGTTAGTGGCTACCAATAGGA-3'	5'GTACCACCTTCCCATGGAGTATCA-3'

Tableau 3 : Récapitulatif des amorces utilisées pour la qPCR. Les amorces pour amplifier les gènes *pde α, β, γ* et *δ* sont tirés de Wentzinger et al. 2008 et celles pour l'amplification du gène *Hk* de Joice et al. 2014.

- **Extraction des protéines membranaires des gamétocytes**

Les protéines membranaires sont extraites à partir de gamétocytes de stade V purifiés sur un séparateur magnétique. La première étape consiste à re-suspendre le culot de parasites dans une solution « S » qui contient 10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1X anti-protéases et 0.1 % saponine. Le mélange est ensuite incubé à 4°C pendant 10 minutes puis centrifugé pendant

15 min à 15000 *g*. La fraction soluble est recueillie tandis que le culot est à nouveau re-suspendu dans la solution S dans laquelle la saponine est remplacée par 0.5 % de Nonidet P40 (NP40). Après 30 min d'incubation à 4°C, le mélange est centrifugé pendant 10 min à 16000 *g*. La fraction soluble est recueillie alors que le culot est repris dans une solution S avec 2 % de SDS puis incubée pendant 30 min à 4°C sur une roue. Les protéines membranaires se trouvent dans le dernier culot.

- **Expériences d'immunofluorescence**

Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur des frottis de culture de gamétocytes de différents stades. Les frottis ont été fixés dans du méthanol pendant 10 min à -20°C puis les sites de fixation non spécifiques ont été saturés pendant 2 h avec une solution de PBS 1X-BSA 2%. Les frottis ont ensuite été incubés avec l'anticorps anti- *Pf*PDEδ (Covalab) au 1 : 200 et l'anti-Pfg27 (Olivieri et al., 2009) au 1 : 2000 pendant 1h30. Après trois lavages en PBS 1X-BSA 2% les frottis sont incubés avec les anticorps secondaires anti-souris Alexa488 et anti-lapin Alexa594 au 1 : 2000 ainsi qu'un marqueur d'ADN, le Hoechst, au 1 : 20000. Les différents frottis sont observés à l'objectif X100 sur un microscope à fluorescence Leica DMI8.

- **Détermination du K_m , de la V_{max} et test d'inhibition**

L'activité enzymatique de *Pf*PDEδ recombinante est déterminée grâce au Kit Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase assay kit (ENZO) en suivant les instructions du protocole. Pour résumer, *Pf*PDEδ recombinante est mise en présence de son substrat AMPc ou GMPc puis une deuxième enzyme, la 5'Nucléotidase, qui est une phosphomonoestérase, va hydrolyser le 5'AMP ou 5'GMP, obtenus après l'action de la PDE, en nucléotide et phosphate. Ce phosphate va être quantifié par un réactif coloré et l'absorbance est lue à 620 nm. Grâce à une courbe étalon, on peut déterminer la quantité de substrat hydrolysé par *Pf*PDEδ recombinante et donc son activité enzymatique. Pour déterminer le K_m et la V_{max} de *Pf*PDEδ, nous avons fait varier la concentration de substrat et déterminé la vitesse initiale (v_i) de la réaction enzymatique pour chaque concentration de substrat. Les paramètres de l'enzyme, K_m et V_{max} , sont obtenus après une régression non linéaire de la courbe $v_i = f([XMPc])$ sur Graph Prism. Nous avons également utilisé le Kit précédemment décrit pour tester l'activité inhibitrice du Tadalafil et de ses composés sur l'activité enzymatique de *Pf*PDEδ recombinante. Nous avons utilisé 500 nM comme concentration de substrat (AMPc et GMPc) et 10 μ M pour les inhibiteurs. L'EDTA a été utilisé à 20 mM comme inhibiteur non compétitif des PDEs.

3. Résultats

Production de *PfPDEδ* recombinante et caractérisation de son activité enzymatique.

Afin de mieux caractériser l'activité enzymatique de *PfPDEδ* et de générer des anticorps dirigés contre cette protéine, nous avons tenté de produire la protéine recombinante. La présence de six domaines transmembraines dans la séquence de la protéine rend difficile l'expression de la protéine entière dans un système bactérien. Nous avons donc produit uniquement son domaine catalytique. Celui-ci a été déterminé en faisant un alignement de séquence entre *PfPDEδ* et *PfPDEα*, qui est la seule PDE de *P. falciparum* ayant été produite et caractérisée biochimiquement (Wentzinger et al., 2008; Yuasa et al., 2005). Une fois le domaine catalytique délimité, nous avons optimisé les codons des différents acides aminés qui constitue sa séquence afin d'améliorer l'expression de la protéine recombinante. Nous avons tout d'abord généré un plasmide dans lequel le domaine catalytique de *PfPDEδ* était couplé à un tag GST. Après avoir fait varier la température de croissance des bactéries, la concentration d'IPTG ou encore le protocole d'extraction, nous n'avons pas pu obtenir la protéine recombinante sous forme soluble et active. Nous avons donc fait une seconde construction dans laquelle le domaine catalytique de *PfPDEδ* est couplé à un tag His-Sumo en position N-terminale afin d'améliorer sa solubilité. Avec 0.3 mM d'IPTG et une température de croissance de 18°C, nous avons réussi à produire *PfPDEδ* recombinante sous forme soluble et purifiée (**Figure 34A**). Des anticorps anti-*PfPDEδ* ont ensuite été produits chez la souris en suivant un protocole d'immunisation de 60 jours. Nous avons validé leur spécificité et leur efficacité par western blot sur les cultures bactériennes et sur la protéine recombinante purifiée (**Figure 34B**). Un des paramètres inconnus de *PfPDEδ* est la nature de son ou ses substrats. En effet, une étude phénotypique d'un parasite transgénique délété pour *PfPDEδ* a suggéré que cette enzyme était capable d'hydrolyser le GMPc, mais son affinité pour l'AMPc n'a pas été étudiée (Taylor et al., 2008a). Pour répondre à cette question, nous avons mesuré l'activité enzymatique de la protéine recombinante en utilisant un Kit commercial (Enzo life Science). Le principe de ce kit repose sur la quantification du phosphate libéré à la suite de l'action d'une 5'nuléosidase qui suit l'hydrolyse de l'AMPc ou du GMPc par la PDE. Grâce à ce kit, nous avons montré que *PfPDEδ* recombinante était active et capable

d'hydrolyser à la fois l'AMPc et le GMPc. Cette activité est inhibée en présence d'EDTA (Figure 34C).

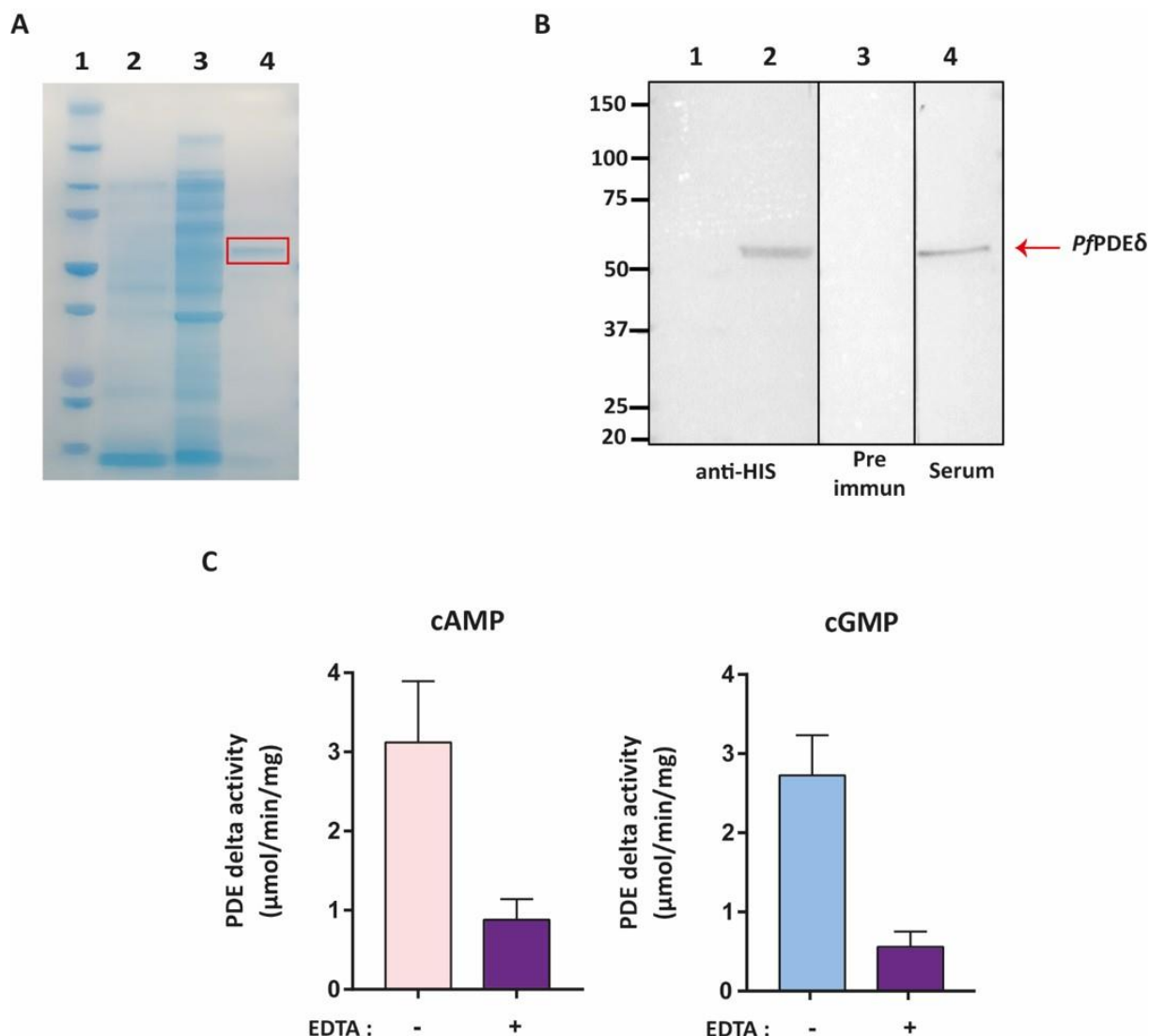


Figure 34 : Production de PfPDEδ recombinante, validation des anticorps et caractérisation de son activité enzymatique. (A) Gel SDS-PAGE montrant l'expression et la purification de PfPDEδ recombinante : Piste 1 : Poids moléculaire; Piste 2 : expression de la protéine non induite ; Piste 3 : expression de la protéine induite par l'IPTG ; Piste 4 : PfPDEδ recombinante purifiée encadrée en rouge avec une taille de 60 kDa. (B) Western blot réalisés sur PfPDEδ recombinante pour valider la spécificité des anticorps ; pistes 1 et 2 : expression de la protéine non induite (-) et induite(+) incubées avec un anti-histidine (Invitrogen) ; piste 3 : PfPDEδ recombinante incubée avec le sérum pré-immun ; piste 4 : PfPDEδ recombinante incubée avec le sérum post-immunisation (C) Activité enzymatique de PfPDEδ recombinante avec comme substrat l'AMPc ou le GMPc en absence ou en présence de l'EDTA. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne entre des expériences indépendantes.

Nous avons ensuite déterminé le K_m et la V_{max} de *PfPDE δ* en présence des deux substrats. Pour cela, nous avons fait varier la concentration du substrat de 5 μM à 0,0195 μM puis nous avons déterminé la vitesse initiale de chaque réaction enzymatique. Les valeurs des différentes vitesses initiales ont ensuite été analysées par le logiciel Graph Prism. Après une régression non linéaire de la courbe vitesse initiale = f ([substrat]), nous avons pu déterminer les valeurs de K_m et de V_{max} pour l'AMPc et le GMPc (**Figure 35A**). Le K_m de l'enzyme pour l'AMPc est de 0.28 μM tandis que celui pour le GMPc est de 4.55 μM . La V_{max} pour l'AMPc 0.811 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ est et celle du GMPc est 0.614 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (**Figure 35B**). Ce résultat montre que *PfPDE δ* a une affinité 16 fois plus grande pour l'AMPc en comparaison au GMPc.

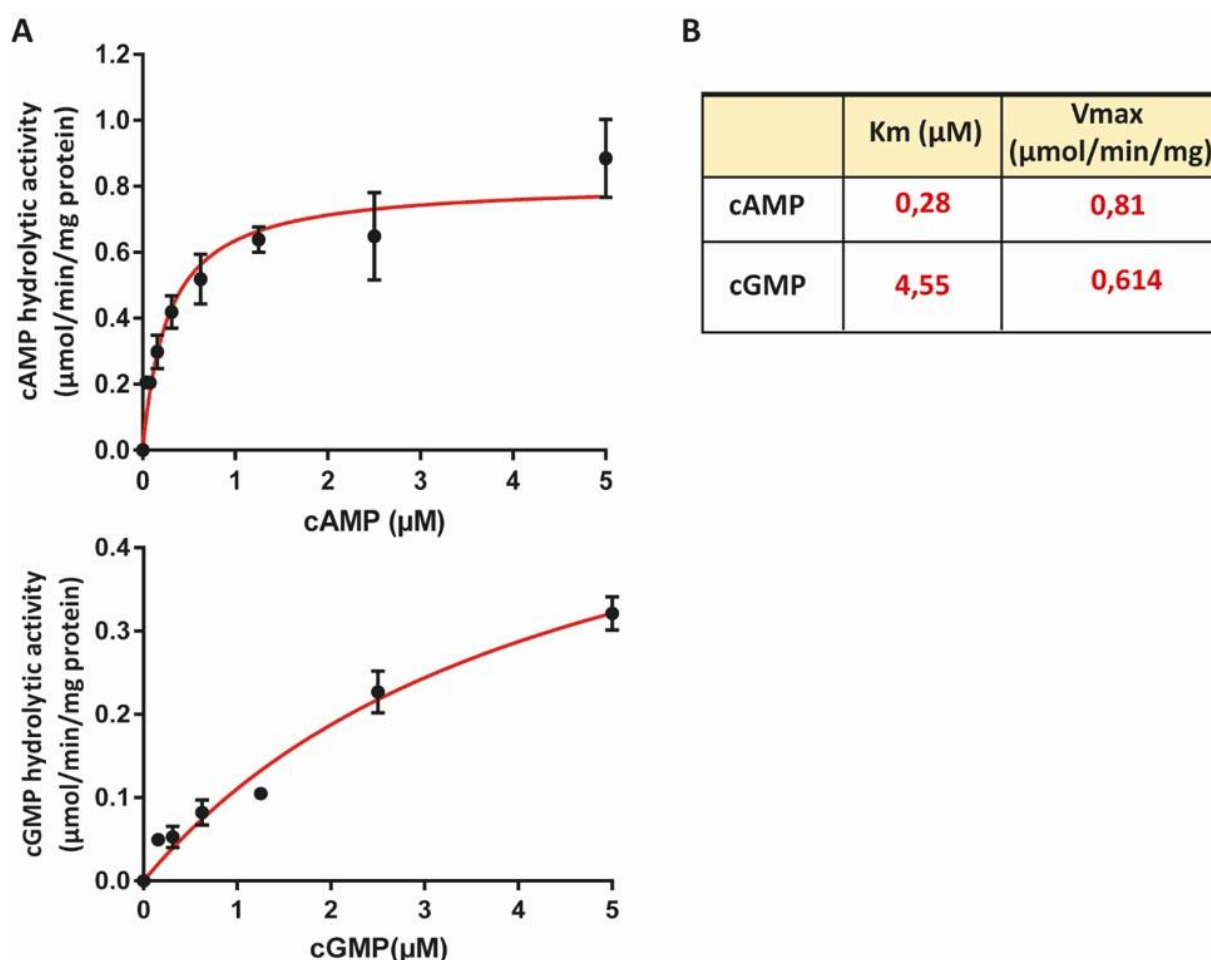


Figure 35 : Détermination du K_m et de la V_{max} de *PfPDE δ* recombinante. (A) Régression non linéaire des courbes $v_i = f$ ([substrat]) pour l'AMPc et le GMPc. (B) Tableau récapitulatif des paramètres enzymatiques de *PfPDE δ* recombinante.

Expression de *PfPDEδ* au cours de la gamétocytogénèse.

Des études précédentes ont mis en évidence que le changement des propriétés mécaniques des GRIGs à la fin de leur développement est accompagné d'une transcription plus forte du gène *pfpdeδ* par rapport aux stades III (Ramdani et al., 2015). Pour caractériser plus précisément le profil d'expression de cette protéine, plus d'expériences ont été réalisées. Tout d'abord, nous avons extrait les ARNs totaux de cultures de parasites asexués et de gamétocytes synchronisées à différents stades de leur développement. Nous avons ensuite quantifié l'expression du gène *pfpdeδ* par RT-qPCR. Le gène HK a été utilisé comme gène de ménage. Dans un premier temps, nous avons montré que le gène *pfpdeδ* n'était pas exprimé chez les stades asexués (**Figure 36A**). Ensuite, nous avons déterminé le profil d'expression du gène *pfpdeδ* au cours de la gamétocytogénèse. Nous pouvons observer que son expression débute au stade III puis atteint son maximum au stade V (**Figure 36B**). Enfin, nous avons comparé l'expression de *pfpdeδ* avec celles des trois gènes codant pour des PDEs plasmodiales. Nos observations montrent que comme décrits dans la littérature, (Yuasa et al., 2005; Wentzinger et al., 2008; Flueck et al., 2019) *pfpdeα* et *pfpdeβ* sont les PDEs plasmodiales les plus exprimées chez les parasites asexués avec une forte expression de *PfPDEβ* dès le stade trophozoïte (32h) (**Figure 36A, C, E et G**). Nous pouvons également voir que *pfpdeδ* est le gène de PDE plasmodiale le plus exprimé chez les gamétocytes en stade V (**Figure 36B, D, F et H**).

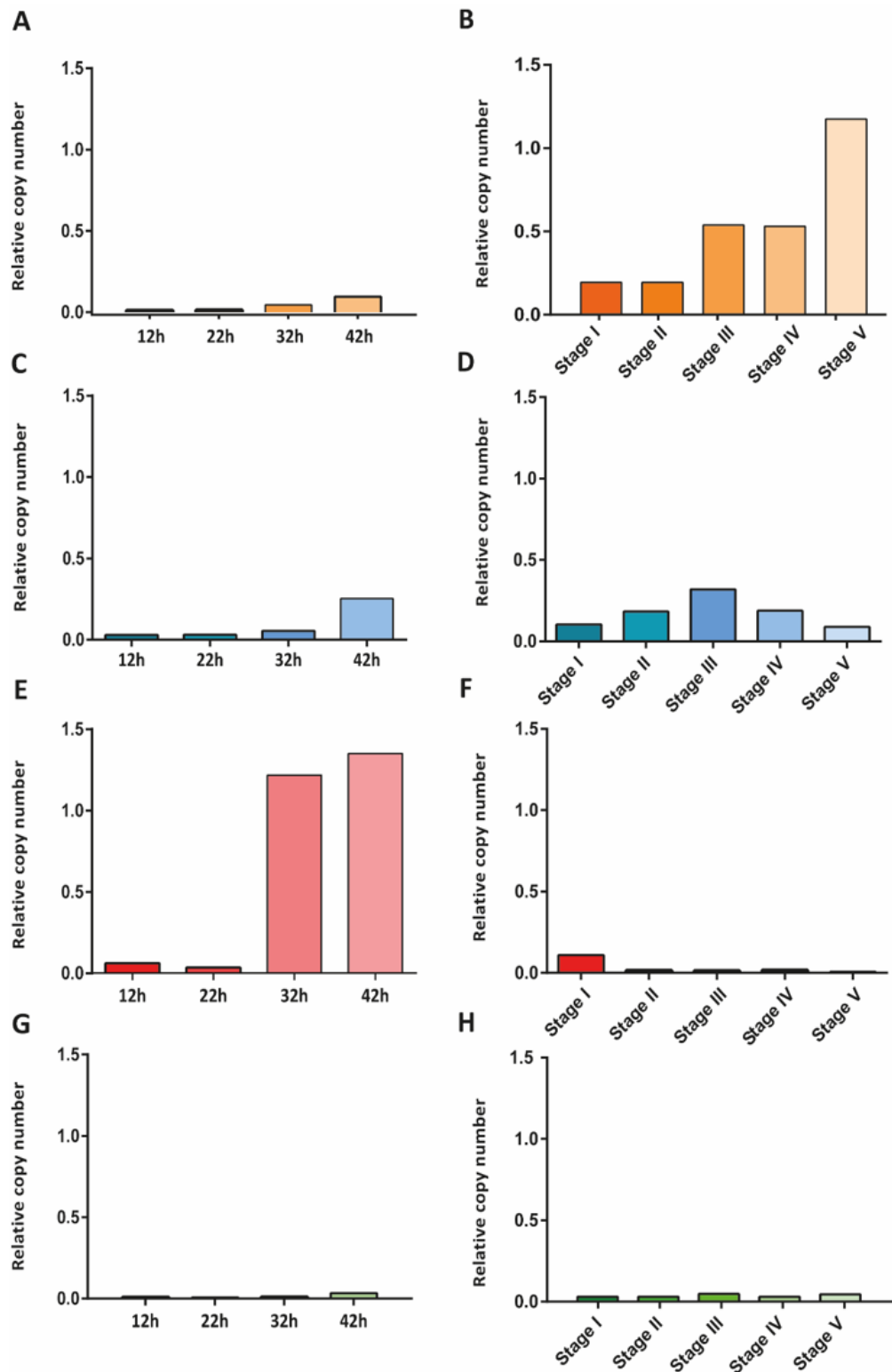


Figure 36 : Expression des PDEs plasmodiales chez les gamétocytes de *P.falciparum*. L'expression des quatre PDEs plasmodiales (PfPDE δ : orange ; PfPDE α : bleu ; PfPDE β : rouge ; PfPDE γ : vert) chez les formes asexuées (A, C, E, G) et chez les gamétocytes (B, D, F, H) est déterminée par RT-qPCR. Jeunes anneaux : 12h ; Vieux anneaux : 22h ; Trophozoïtes : 32h. Schizontes : 42h. L'expression des différents gènes est normalisée sur l'expression du gène de ménage Hk.

Ensuite, le profil d'expression au niveau protéique a été déterminé. Nous avons extrait la totalité des protéines membranaires des GRIGs à différents stades de développement puis nous les avons analysées par western blot. Nous avons pu détecter *PfPDEδ* à partir du stade II avec une forte expression dès le stade IV (**Figure 37A**). Enfin, nous avons réalisé des analyses par immunofluorescences sur des frottis de culture de gamétocytes à différents stades. Nous pouvons voir que *PfPDEδ* est présente dans le GRIG à partir du stade III jusqu'au stade V (**Figure 37B**). Ces résultats confirment l'expression progressive de *PfPDEδ* au cours du développement des gamétocytes avec un pic à partir du stade IV, et que c'est la PDE plasmodiale la plus exprimée chez les gamétocytes matures.

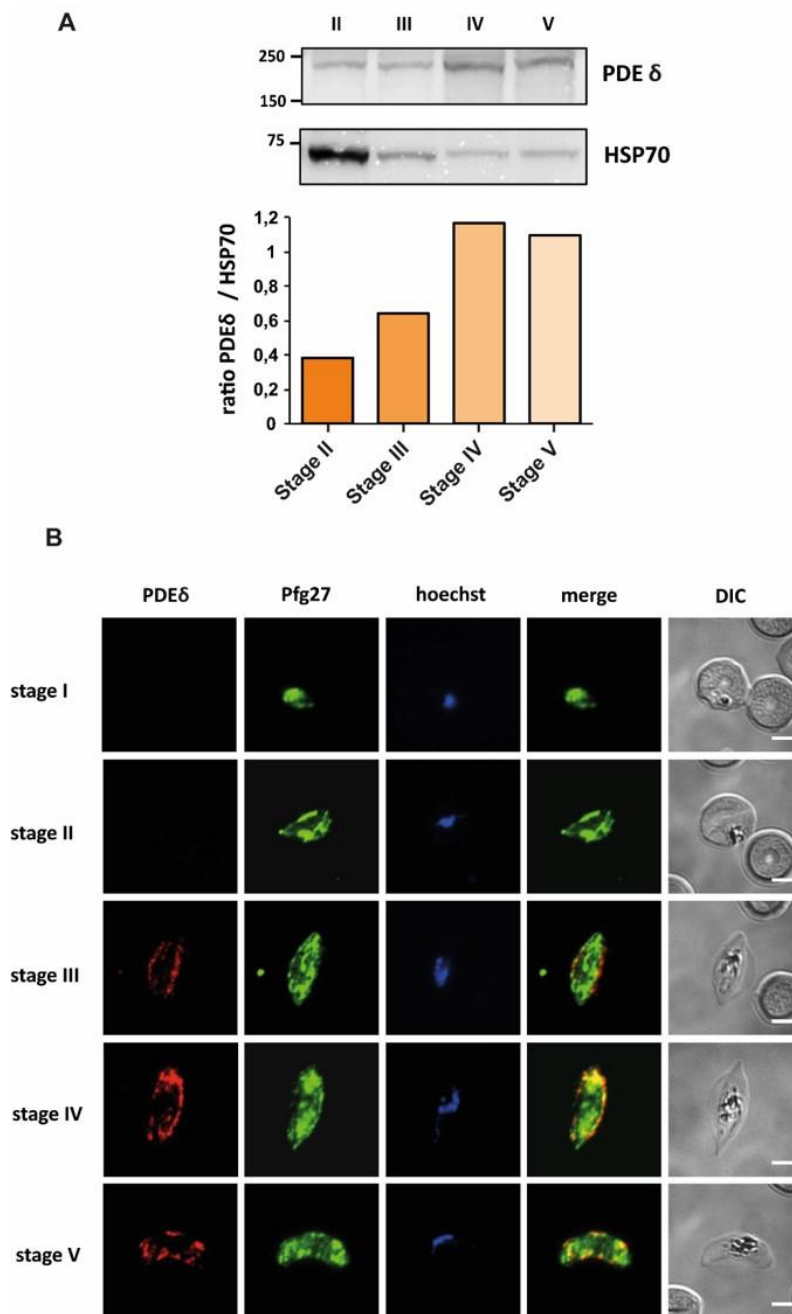


Figure 37 : Expression de PfpDEδ au cours de la gamétocytogénèse. (A) Western blot de l'expression de PfpDEδ chez les gamétocytes de *P.falciparum*. La protéine HSP70 a été utilisée comme témoin de charge (Panel haut). Ratio de la quantification du signal de correspondant à la bande de PfpDEδ et de HSP70 par le logiciel Quantity one (Panel bas). (B) Immunofluorescences réalisées sur les différents stades de gamétocytes. Les parasites sont co- marqués avec l'anticorps anti-PfpDEδ, l'anticorps anti-Pfg27 qui marque le cytoplasme des gamétocytes et du Hoechst qui marque l'ADN. Longueur de la barre d'échelle : 2μm

***PfPDEδ* est localisée à la membrane des gamétocytes.**

La présence de six domaines transmembranaires potentiels dans la séquence de *PfPDEδ* suggère que c'est une protéine membranaire (**Figure 38A**). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons établi un protocole en trois étapes qui nous permet d'extraire différents types de protéines. A partir d'extraits de gamétocytes en stade V purifiés sur colonne magnétique, nous avons obtenu trois fractions : la première fraction contient des protéines solubles dans un tampon de saponine à 0.1% ; la deuxième, des protéines solubles dans un tampon de NP40 à 0.5 % ; et la dernière, des protéines solubles dans un tampon de SDS à 2%. Nous les avons ensuite analysées par western blot. Dans la fraction avec le SDS, on détecte une bande d'environ 180 kDa, ce qui correspond à deux fois la taille attendue pour *PfPDEδ*. En revanche, en présence de DTT dans cette fraction, nous pouvons observer une bande supplémentaire d'environ 90 kDa. Ces résultats suggèrent que la bande à 180 kDa représente un dimère de *PfPDEδ* et celle à 90 kDa son monomère. D'autre part, le dimère est présent uniquement dans la fraction avec le SDS, détergent connu pour solubiliser les protéines membranaires, et seule la bande à 90 kDa est faiblement présente dans la fraction avec NP40 et DTT. Aucune bande n'est détectée dans la fraction en saponine, contenant les protéines cytoplasmiques (**Figure 38B**). Ces résultats montrent que *PfPDEδ* est une protéine membranaire qui est majoritairement sous forme de dimère.

La localisation précise de *PfPDEδ* au sein du GRIG est inconnue. Nous avons donc réalisé des expériences d'immunofluorescence afin de mieux la localiser. Les images en **figure 38C** nous montrent que *PfPDEδ* est située à la périphérie du gamétocyte mature. Le fait qu'elle soit une protéine membranaire suggère qu'elle se situe soit au niveau de la membrane du parasite, soit au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore.

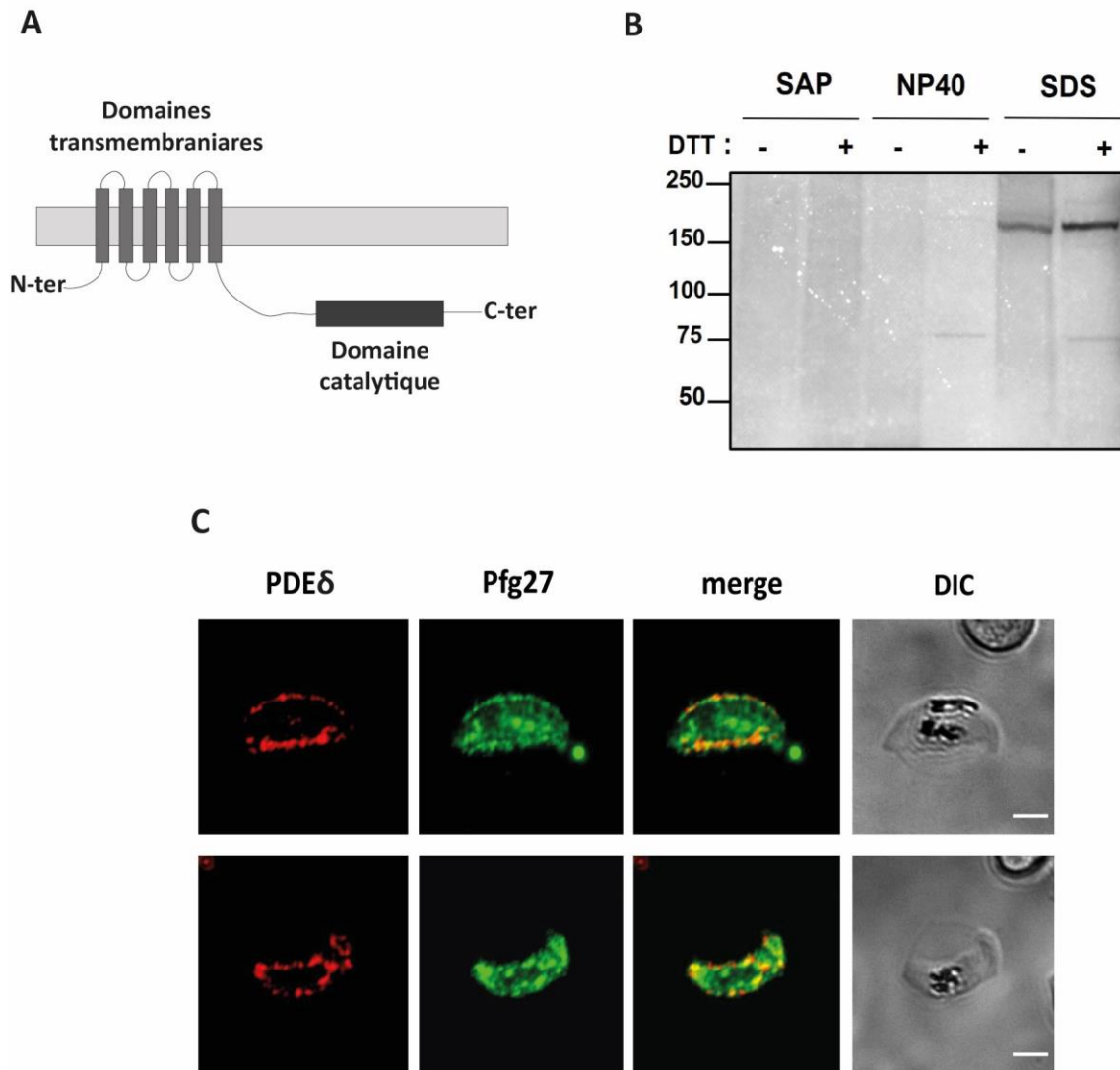


Figure 38 : Localisation de *PfPDEδ* au sein des GRIGs matures. (A) Schéma de la structure de *PfPDEδ*. (B) Western blot effectués sur différentes fractions obtenues après le traitement des gamétocytes en stade V avec la saponine (SAP), le NP40 et le SDS. L'absence (-) ou la présence (+) de 50 mM de DTT permet d'observer les formes monomériques de la protéine. (C) Immunofluorescences réalisées sur les gamétocytes en stade V. Les parasites sont co- marqués avec l'anticorps anti-*PfPDEδ* et l'anticorps anti-*Pfg27* qui marque le cytoplasme des gamétocytes. Longueur de la barre d'échelle : 2µm.

Activité enzymatique de *PfPDEδ* recombinante en présence du Tadalafil et de ses analogues

Dans la partie B de nos résultats, nous avons montré qu'un analogue du Tadalafil qui n'avait plus d'effet sur la PDE5 humaine était capable d'altérer les propriétés mécaniques de GRIGs matures et cela de façon significative. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la cible de cet analogue serait *PfPDEδ*. Pour tester notre hypothèse, nous avons mesuré l'activité

enzymatique de *PfPDEδ* en présence du Tadalafil et de ses analogues grâce à un Kit (ENZO). Nous pouvons voir qu'aucun des quatre composés n'a d'effet sur l'activité enzymatique AMPc ou GMPc de *PfPDEδ* recombinante (**Figure 39**).

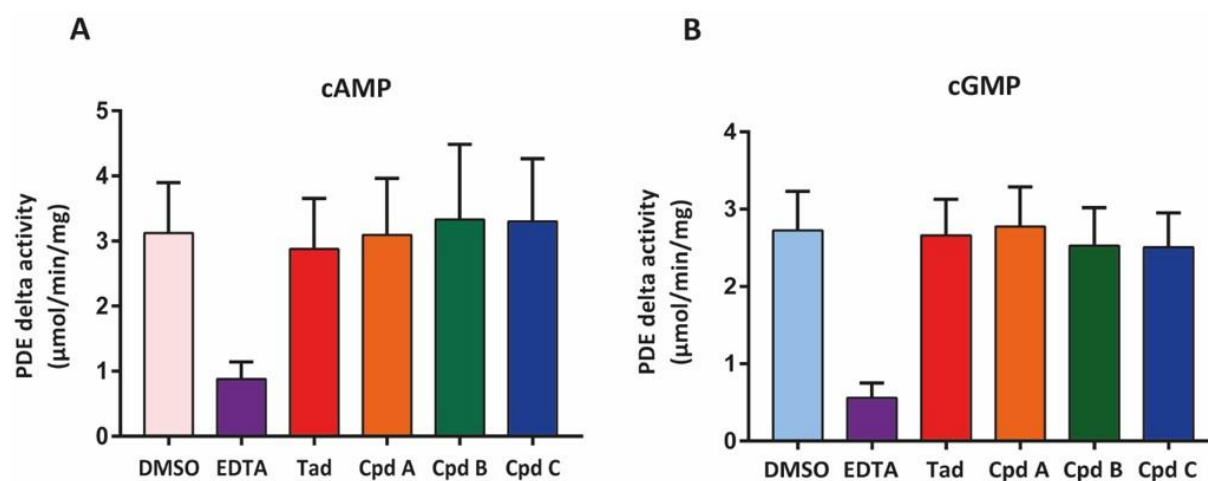


Figure 39 : Test d'inhibition sur *PfPDEδ* recombinante. Activité enzymatique de *PfPDEδ* en présence d'inhibiteurs de PDEs avec comme substrat l'AMPc (A) ou le GMPc (B). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne entre des expériences indépendantes.

4. Conclusion et perspectives

L'objectif de ces travaux était de mieux caractériser *PfPDE δ* , enzyme impliquée dans la régulation des propriétés mécaniques des GRIGs.

Tout d'abord, nous avons montré que *PfPDE δ* est capable d'hydrolyser l'AMPc et le GMPc avec une plus grande affinité pour l'AMPc. Chez *P. falciparum*, la seule PDE qui est connue pour avoir la capacité d'hydrolyser les deux substrats est *PfPDE β* (Flueck et al., 2019). Cette enzyme est impliquée dans l'invasion des mérozoïtes en régulant la voie AMPc-PKA. En effet, en absence de *PfPDE β* , on observe un défaut d'invasion des mérozoïtes. Nos résultats montrent donc que *P. falciparum* possède dans son génome au moins deux PDEs à spécificité double. Cette propriété est aussi observée chez les PDEs humaines telles que PDE1, PDE2 et PDE3 (Baillie et al., 2019a) ou chez la PDEC de *Trypanosome cruzi* (Kunz et al., 2005). Dans certains cas, le fait que ces PDEs puissent hydrolyser les deux nucléotides indiquent que l'un des deux substrats peut jouer le rôle d'inhibiteur compétitif pour l'autre substrat. La PDE3 humaine par exemple est incapable d'hydrolyser l'AMPc présence d'une forte concentration de GMPc (Knebel et al., 2013).

Ce résultat expliquerait pourquoi dans une étude de 2018, les auteurs n'ont observé qu'une augmentation du niveau intracellulaire de GMPc chez les GRIGs matures d'une souche transgénique dans laquelle *pfpde δ* est délété (Taylor et al., 2008a) alors que notre équipe a pu détecter chez ces parasites une augmentation d'AMPc en plus de l'augmentation de GMPc (Ramdani et al., 2015). Ces divergences de résultats peuvent être dues à la maturité des gamétocytes en stades V, et à leur présence dans le sang de leur hôte mammifère ou dans l'estomac du moustique. A la lumière de la double spécificité de *PfPDE δ* , on peut émettre l'hypothèse selon laquelle chez les jeunes gamétocytes en stade V, *PfPDE δ* hydrolyserait l'AMPc pour moduler le changement de propriétés mécaniques. Ensuite, la forte expression de la Guanylate Cyclase β (GC β) va entraîner l'augmentation du niveau intracellulaire de GMPc qui va agir comme un inhibiteur compétitif pour l'hydrolyse de l'AMPc. La voie GMPc-PKG régulée par *PfPDE δ* prendrait alors le relais pour l'initiation de la gamétogénèse (McRobert et al., 2008; Taylor et al., 2008a). Il serait donc intéressant de déterminer l'activité enzymatique de *PfPDE δ* en présence d'une forte concentration de GMPc.

Cette caractéristique de *PfPDEδ* pourrait lui permettre aussi de réguler des processus biologiques soumis à la voie de signalisation AMPc-PKA mais aussi ceux régulés par la voie GMPc-PKG. C'est un phénomène qui est aussi observé chez les stades asexués notamment les schizontes avec *PfPDEβ*. La forte expression de la guanylate cyclase alpha (GCα) chez les schizontes permet la production de GMPc et donc l'activation de la PKG qui, suite à une cascade de signalisation, va entraîner la rupture de la membrane de la vacuole parasitophore puis celle du globule rouge (Collins et al., 2013; Nofal et al., 2021; Taylor et al., 2010). Une fois le mérozoïte libéré, c'est la forte expression de *PfPDEβ* qui va permettre la régulation de la concentration de GMPc mais surtout de la concentration d'AMPc (Flueck et al., 2019) indispensable à l'activation de la PKA nécessaire pour l'invasion du globule rouge par le mérozoïte (Leykauf et al. 2010; Wilde et al. 2019; Patel et al. 2019).

Chez les gamétocytes, l'activité de *PfPDEδ* serait donc impliquée dans la régulation des propriétés mécaniques via la voie AMPc-PKA (Bouyer et al., 2020; Naissant et al., 2016; Ramdani et al., 2015) mais aussi dans l'initiation de la gamétocytoγένèse qui est régulée par la voie GMPc-PKG (Taylor, McRobert, et Baker 2008b). Le rôle de la *PDEδ* dans la gamétogénèse a aussi mis en évidence chez *P. berghei* (Moon et al., 2009).

D'autre part, la présence de *PfPDEδ* au niveau transcriptionnel et traductionnel dès le stade III des gamétocytes indique qu'il y a une balance entre l'activité de *PfPDEδ* et une autre enzyme qui permet de maintenir la forte concentration d'AMPc à ce stade. Il est intéressant de noter qu'une étude de 2003 a montré que l'adénylate cyclase alpha (ACα) de *P. falciparum* était exprimée chez les gamétocytes avec un pic d'expression chez les gamétocytes de stades III (Muhia et al., 2003). Ces observations suggèrent que les propriétés mécaniques des GRIGs sont régulées à la fois par *PfPDEδ* et par ACα dont les expressions sont inversement proportionnelles. Aussi, l'expression progressive *PfPDEδ* au cours de la gamétocytoγένèse est corrélée à la baisse progressive de perméabilité des GRIGs (Bouyer et al., 2020). En revanche, la déformabilité des GRIGs matures apparaît de façon plus abrupte (Tibúrcio et al., 2012). On pourrait donc imaginer que la rigidité des GRIGs immatures est dépendante non seulement de la rigidité de la membrane du globule rouge infecté, mais également de celle du gamétocyte lui-même. Le réseau de microtubules, par exemple, qui reste assemblé jusqu'au stade IV, pourrait être responsable de cette rigidité intrinsèque du gamétocyte (Dearnley et al., 2012).

Pour assurer leur rôle de régulateur de divers processus biologiques, la bonne localisation des PDEs dans la cellule est plus qu'indispensable. En effet, leur distribution à travers la cellule permet de compartimenter de la signalisation cellulaire. Chez *Trypanosoma brucei*, la présence de deux PDEs dans deux compartiments différents du parasite permet la régulation de la signalisation cellulaire de façon spatiale (Luginbuehl et al., 2010). *TbPDEB1* est localisée dans le flagelle du parasite tandis que *TbPDEB2* est située dans le corps du parasite. Dans les cardiomyocytes humains, la répartition des différents isoformes des PDE3 et PDE4 permet de réguler de façon locale et spécifique la voie de signalisation AMPc activée par différents stimuli (Bhogal et al., 2018). Dans les globules rouges humains, PDE2 et PDE4 régulent la voie de signalisation AMPc activée par la stimulation du récepteur β -adrénergique (Adderley et al., 2009) tandis que PDE3 et PDE5 régulent celles induites par la stimulation du récepteur à la prostacycline (IPR) (Hanson et al., 2008; Knebel et al., 2013).

Nos résultats ont montré que *PfPDE δ* était une protéine membranaire localisée à la membrane du gamétocyte. Elle pourrait donc réguler localement la signalisation cellulaire notamment au niveau de la vacuole parasitophore. En effet, les prédictions TMHMM indiquent que le site catalytique de *PfPDE δ* pourrait être dans un environnement hydrophobe tel que la lumière de la vacuole parasitophore (Wentzinger et al., 2008). En accord avec cette hypothèse, une étude de 1993 a mis en évidence la présence de pores au niveau de la membrane de vacuole parasitophore (Desai et al., 1993). Le diamètre de ces pores est de 23 Å et ils sont capables de laisser passer des molécules dont le poids moléculaire est inférieur ou égal à 1400 Da (Desai and Rosenberg, 1997). Etant donnée la taille de l'AMPc qui est de 328 Da, on pourrait imaginer que ces pores laissent passer l'AMPc et donc permettrait un échange de nucléotides entre le cytoplasme du globule rouge et la vacuole parasitophore. Si l'orientation du domaine catalytique de *PfPDE δ* à la membrane du gamétocyte vient à être confirmée, cela signifierait que cette enzyme pourrait réguler, de façon spatiale, la signalisation AMPc au niveau de la vacuole parasitophore et du cytoplasme de sa cellule hôte.

Enfin, les résultats obtenus avec les tests d'inhibitions ne nous ont pas permis d'identifier la cible de l'analogue du Tadalafil spécifique pour le parasite. Néanmoins, il serait intéressant dans un premier temps de refaire ces tests sur la protéine endogène. En effet, le fait de n'avoir que le domaine catalytique de *PfPDE δ* peut impacter son interaction avec des inhibiteurs. Par exemple, Flueck et ses collaborateurs ont immunoprecipités *PfPDE β* endogène puis ont réalisé

des tests d'enzymatiques sur l'enzyme (Flueck et al., 2019). Nous pourrions donc nous inspirer de leur protocole pour réaliser le même type d'expérience avec une souche transgénique qui exprimerait *PfPDEδ* endogène taguée.

En conclusion de cette étude, nous pouvons dire que les différents résultats obtenus sur *PfPDEδ* confortent notre modèle proposant qu'elle soit responsable du changement des propriétés mécaniques des GRIGs matures. Cependant, la cible de l'analogue du Tadalafil spécifique pour le parasite reste indéterminée.

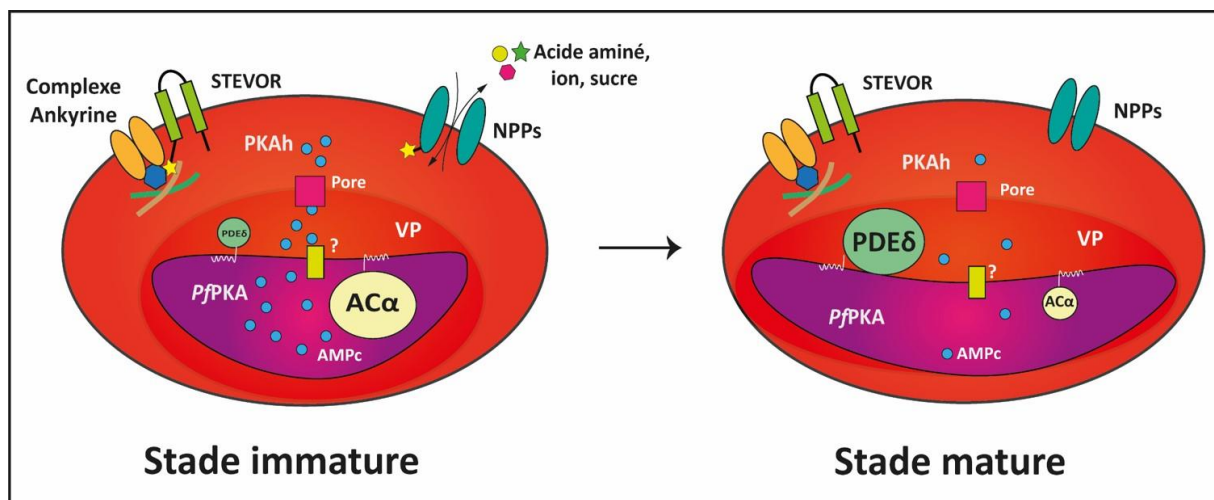


Figure 40 : Modèle de régulation des propriétés mécaniques des GRIGs au cours de la gamétocytogénèse. NPPs : New permeability Pathway ; PKAh : PKA humaine ; PfkPKA : *P.falciparum* PKA ; PDE : Phosphodiesterase ; AC : Adénylate Cyclase ; AMP : Adénosine Monophosphate ; VP : Vacuole Parasitophore

Discussion

Le cycle biologique de *P. falciparum* n'est qu'une succession de stratégies d'adaptations car il se déroule dans deux environnements complètement différents. Au cours de son cycle, le parasite subit deux reproductions asexuées : la sporogonie chez le moustique, qui conduit à la formation de sporozoïtes, puis, une fois chez l'homme, le parasite subit la schizogonie qui engendre les formes asexuées responsables des symptômes du paludisme. La reproduction sexuée du parasite, quant à elle, débute chez l'homme par la production des gamétocytes mâles et femelles qui vont achever leur maturation chez le moustique où ils vont se différencier en gamètes mâle et femelle.

Pour réussir à passer d'un environnement à un autre, le parasite va devoir procéder à des changements profonds dans sa biologie. Par exemple, au niveau morphologique, on note que le parasite peut passer d'une forme immobile à une forme mobile pour envahir un nouvel hôte (sporozoïte) ou de nouveaux tissus (ookinète pour l'épithélium de l'intestin du moustique). En fonction de la disponibilité en nutriments dans le milieu, notamment en lipides, le parasite est capable de passer d'une reproduction asexuée à un cycle sexué qui nécessite très peu d'activité métabolique (Brancucci et al., 2017). Tous ces changements sont régulés de façon spatio-temporelle par divers mécanismes qui lui permettent de reprogrammer son patrimoine génétique afin de répondre à ses besoins (Ruiz and Gómez-Díaz, 2019). Une étape critique du cycle de *Plasmodium* est la transmission du parasite de l'homme au moustique. Sans cette étape, la reproduction sexuée du parasite ne peut pas s'achever et donc le cycle biologique prend fin. Pour assurer cette phase cruciale du cycle, le parasite a mis en place de nombreuses stratégies, cette fois au niveau du globule rouge qu'il infecte au stade gamétocyte : la baisse de l'expression d'antigènes de surface pour échapper à la réponse immunitaire, la baisse de la perméabilité des GRIGs pour réduire la fragilité osmotique ainsi que l'augmentation de la déformabilité des GRIGs pour échapper à la rétention par la rate.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au changement de déformabilité et de perméabilité des GRIGs matures, stratégies mises en place pour persister dans la circulation sanguine pendant plusieurs jours, ainsi qu'au fait que ces propriétés soient des cibles pour bloquer la transmission de *P. falciparum*.

A. Effecteurs et substrats impliqués dans les mécanismes de déformabilité et perméabilité

Les précédents travaux de notre équipe sur la compréhension des propriétés mécaniques des GRIGs portaient principalement sur les régulateurs de ces mécanismes. En effet, le modèle de régulation proposé par notre équipe met au centre de ces deux mécanismes *PfPDEδ*, dont l'activité va permettre ou non l'activité de la PKA (Bouyer et al., 2020; Ramdani et al., 2015). Pour l'instant, seule la protéine STEVOR a été identifiée comme substrat de la PKA dans le phénotype de déformabilité (Naissant et al., 2016). Dans le phénotype de perméabilité, le substrat de la PKA reste indéterminé. Dans cette partie, nous allons discuter de l'implication potentielle d'autres effecteurs parasites de la voie AMPc, mais aussi de la voie GMPc, dans les propriétés mécaniques des GRIGs matures.

Pour tenter d'identifier d'autres protéines impliquées dans les propriétés mécaniques du GRIG, nous avons initié un phosphoprotéome des GRIGs matures en présence de Tadalafil grâce à la plateforme 3P5 de l'Institut Cochin. A notre connaissance, c'est le seul phosphoprotéome réalisé sur les formes sexuées de *Plasmodium*. Les résultats préliminaires ont mis en évidence l'hyperphosphorylation de plusieurs protéines parasites. L'identification de deux protéines appartenant à la famille des protéines GEXP (Gametocyte EXported Protein) (Silvestrini et al., 2010), qui sont exportées à la membrane du globule rouge infecté où elles interagissent avec les protéines du cytosquelette (Kilili et al., 2019; Warncke et al., 2020), suggère qu'elles pourraient être impliquées dans les propriétés mécaniques des GRIGs matures. Il serait intéressant d'évaluer la déformabilité et la perméabilité des GRIGs matures d'une souche mutante pour ces protéines afin de déterminer leur rôle dans ces mécanismes.

La protéine GAP45, marqueur de l'IMC, a aussi été identifiée dans notre phosphoprotéome. En tandem avec le réseau de microtubules, l'IMC accompagne les changements de morphologie au cours de la gamétocytogénèse (Dixon and Tilley, 2021). Le fait qu'elle apparait hyper-phosphorylée chez des GRIGs matures traités avec le Tadalafil indique qu'elle peut être impliquée dans la déformabilité du gamétocyte mais aussi qu'elle peut être un substrat de la PKA du parasite. En accord avec ce résultat, un autre phosphoprotéome a montré que GAP45 pouvait être un substrat de PKA chez les

schizontes de *P. falciparum* (Lasonder et al., 2012). *PfPKA* ne possédant aucun signal d'export PEXEL/HT, on peut supposer qu'elle ne phosphoryle que des protéines qui se trouvent dans le même compartiment cellulaire qu'elle, notamment les protéines dans le parasite telles que celles de l'IMC. La phosphorylation de GAP45 par *PfPKA* expliquerait le phénotype de déformabilité observé chez les GRIGs matures d'un mutant *pfpkac* dans une étude récente (Hitz et al., 2021). En effet, le pourcentage de rétention mesuré par la technique de microsphiltration des GRIGs matures de ce mutant était plus faible que celui de la souche sauvage. Ce résultat suggère que la déformabilité du GRIG mature est la résultante de l'élasticité de la membrane du globule rouge infecté et de la déformabilité intrinsèque du gamétocyte. Selon cette hypothèse, la PKA humaine présente dans le globule rouge phosphorylerait les protéines exportées à la membrane tandis que la PKA plasmodiale aurait pour substrat des protéines du parasite qui contribuent aussi à la déformabilité du gamétocyte. Pour conforter nos résultats, il serait intéressant de réaliser un phosphoprotéome de GRIG d'une souche mutée pour *pfpkac*. La confrontation des résultats des deux phosphoprotéomes permettra de discriminer les cibles de la PKA du parasite des autres protéines dont la phosphorylation dépend d'autres effecteurs des voies de signalisation AMP et GMPc.

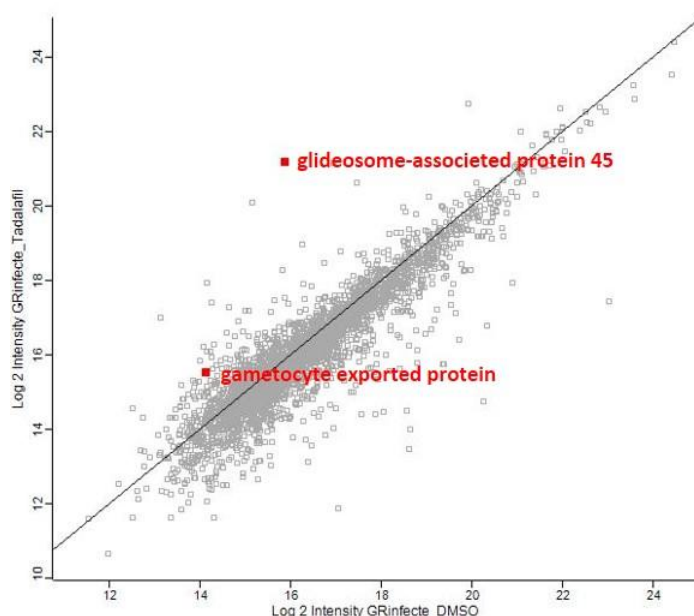


Figure 41 : Nuage de points comparant l'intensité d'expression en log base 2 des phosphoprotéomes parasitaires des GRIGs traités avec du DMSO ou du Tadalafil. Chaque carré représente un phosphosite et ceux présents au-dessus de la droite sont considérés comme hyperphosphorylés chez les GRIGs traités avec du Tadalafil par rapport à ceux traités avec du DMSO.

D'autre part, le rôle de *Pf*PKG dans les propriétés mécaniques a très peu été étudié. Son implication dans la régulation de la déformabilité des GRIGs a été écartée car les auteurs n'avaient pas observé de changement de déformabilité chez les stades immatures en présence de compound 2, qui est un inhibiteur spécifique de *Pf*PKG (Ramdani et al., 2015). Cependant, étant donné que la GC β présente chez les gamétocytes n'est exprimée que chez les stades matures (Taylor et al., 2008a), on peut supposer que le rôle de *Pf*PKG n'intervient que chez les stades matures du parasite. Cependant, son rôle dans la perméabilité des GRIGs matures n'a pas été investigué. De façon générale, la fonction principale de *Pf*PKG dans la biologie de *Plasmodium* est de phosphoryler des substrats qui vont induire la mobilisation du calcium stocké dans organelles du parasite (Lourido and Moreno, 2015; Moreno et al., 2011). Généralement, cette voie de signalisation précède la sortie du parasite de sa cellule hôte (Tan and Blackman, 2021). *Pf*PKG pourrait donc réguler la perméabilité des GRIGs matures en activant de la voie de signalisation du calcium, connue dans la littérature pour être associée à la perméabilité du globule rouge infecté (Desai et al., 1996; Tanabe et al., 1982). L'hypothèse serait donc que l'augmentation du niveau de GMPc induite par les inhibiteurs de HsPDE5 activerait la PKG du parasite qui à son tour va phosphoryler un substrat impliqué dans la perméabilité du globule rouge infecté. La récente identification d'un pseudo transporteur de calcium chez *Plasmodium*, *Important for Calcium mobilisation-1* (ICM-1), comme substrat de *Pf*PKG soutient cette hypothèse (Balestra et al., 2021). Nous pourrions donc mesurer le pourcentage d'hémolyse des GRIGs matures dans une expérience de fragilité osmotique en présence d'inhibiteur de *Pf*PKG tel que le compound 2 (Cahalan et al., 2015; Tiffert et al., 2005). L'allure de la courbe nous donnera l'état d'hydratation de la cellule. Ce résultat pourrait mettre en lumière une autre voie de régulation de la perméabilité des GRIGs matures impliquant la voie GMPc-PKG.

B. Déformabilité et perméabilité des GRIGs matures : deux mécanismes étroitement liés

Les premiers travaux sur l'étude des propriétés mécaniques des GRIGs matures de *P. falciparum* portaient sur la déformabilité du GRIG (Aingaran et al., 2012; Dearnley et al., 2012; Naissant et al., 2016; Ramdani et al., 2015; Tibúrcio et al., 2012). Ce n'est que très récemment que la perméabilité des GRIGs a été étudiée (Bouyer et al., 2020). Le fait que ces deux propriétés soient régulées par la voie de signalisation AMPc-PKA (Bouyer et al., 2020; Naissant et al., 2016; Ramdani et al., 2015) suggère que ces deux mécanismes sont intimement liés. Cependant, nous pouvons nous demander si la baisse de perméabilité entraîne l'augmentation de la déformabilité des GRIGs matures ou si au contraire, la déformabilité induit la baisse de la perméabilité des GRIGs matures.

Parmi les trois paramètres qui influencent la déformabilité du globule rouge (Mohandas and Gallagher, 2008), seule l'élasticité de la membrane a été mise en évidence comme étant un facteur qui régule l'augmentation de la déformabilité au cours de la gamétocytogénèse (Aingaran et al., 2012; Naissant et al., 2016). Un autre paramètre qui influence la déformabilité du globule rouge est le volume de la cellule. S'il augmente, le volume de la cellule peut impacter d'une part la viscosité du cytoplasme et d'autre part le ratio ASV (Mohandas and Gallagher, 2008). Dans les deux cas, plusieurs mécanismes ont été mis en place pour maintenir le volume de la cellule constant. Chez le globule rouge, les transporteurs présents à la membrane sont responsables de la composition et de la concentration en cations du cytoplasme et donc du volume de la cellule (Brugnara, 1997; Milanick and Hoffman, 1986). Les NPPs étant responsables de l'influx de Na^+ et de l'efflux du K^+ (Kirk and Lehane, 2014), ils peuvent donc réguler la déformabilité du globule rouge infecté. Une hypothèse proposée pour l'inactivité des NPPs aux stades matures serait la réduction de la fragilité osmotique de la cellule lors de sa circulation dans le sang (Bouyer et al., 2020). On pourrait proposer aussi que l'inactivité des NPPs permettrait de réguler de façon très étroite le volume de la cellule et donc sa déformabilité lors de son passage dans les fentes inter endothéliales.

Pour tester cette hypothèse, nous pourrions dans un premier temps traiter des GRIGs immatures, donc rigides, avec des inhibiteurs de NPPs tels que le NPPB ou le Furosémide

et évaluer la déformabilité des cellules. Nous pourrions aussi mesurer le taux de rétentions de GRIGs matures d'une souche transgénique mutée pour *pfpdeδ* en présence de NPPB (Taylor et al., 2008a).

De plus, il serait intéressant d'évaluer la déformabilité des GRIGs matures en présence de composés qui pourrait activer les NPPs indépendamment de la voie de signalisation AMPc-PKA, tel que le Dithioerythritol qui les activent par oxydation (Huber et al., 2002). Nous pourrions également mesurer la déformabilité des GRIGs immatures d'une souche transgénique dans laquelle un des éléments connus pour composer les NPPs a été délété. Par exemple, un mutant conditionnel pour la protéine RhopH3 a déjà été généré (Sherling et al., 2017). Cependant, cette étude porte uniquement sur les formes asexuées de *P. falciparum* et a montré un défaut d'invasion des mérozoïtes et de croissance intra-érythrocytaire du parasite dû à un manque de nutriments. Etant donné que les stades III procèdent à des échanges avec leur milieu extérieur pour l'efflux de déchets issus de la digestion de l'hémoglobine (Lang-Unnasch and Murphy, 1998; Sinden, 1982), on s'attendrait à ce que l'absence de RhopH3 affecte leur développement. Les stades immatures pourraient aussi présenter une augmentation de leur capacité à se déformer si la mutation de RhopH3 entraîne une baisse du volume de la cellule. Ce résultat supporterait l'hypothèse que la régulation du volume du GRIG, et donc de sa perméabilité, est un paramètre très important pour sa déformabilité.

A l'inverse, nous pourrions aussi évaluer la perméabilité des GRIGs matures en présence de composés qui agissent sur l'élasticité de la membrane du globule rouge tel que le glutaraldéhyde (Namvar et al., 2021). En effet, nous pourrions tester si la rigidité de la membrane influence l'état (ouvert ou fermé) des NPPs du GRIG. Il serait également intéressant d'évaluer si d'autres canaux du globule rouge, notamment des canaux mécano-sensibles tel que PIEZO1 (Coste et al., 2010) dont l'activation par mutation génétique entraîne la déshydratation du globule rouge (Albuisson et al., 2013; Andolfo et al., 2013; Zarychanski et al., 2012), jouent un rôle dans la perméabilité des GRIGs.

Le lien entre la déformabilité et la perméabilité du GRIG irait donc au-delà du fait d'être régulé par la même voie de signalisation et pourrait être un lien de cause à effet.

C. Rôle de la rate dans notre stratégie anti-transmission

Dans cette étude, nous avons apporté la preuve de concept que les inhibiteurs de PDEs peuvent constituer des molécules anti-transmission de par leur action simultanée sur la déformabilité et la perméabilité des GRIGs matures et potentiellement sur leur capacité à circuler dans un modèle de souris humanisée. Cependant, une question se pose : quel est devenir des GRIGs matures dans la rate ? Dans notre hypothèse, ils seraient phagocytés par les macrophages résiduels spléniques. Une étude de 2016 a montré que les gamétocytes matures n'étaient pas phagocytés par les macrophages spléniques à moins d'être morts ou hors de la cellule hôte après traitement à la saponine (Bansal et al., 2016). Cette propriété des GRIGs matures contribuerait à leur transmissibilité en réduisant la réponse immunitaire qui peut être engendrée par la phagocytose de ceux-ci par les macrophages.

Ce résultat questionne donc la pertinence de notre approche. Il serait donc intéressant de réaliser des coupes histologiques de rate de souris humanisées après que les GRIGs matures s'y soient accumulés pour évaluer leur morphologie. De plus, l'utilisation de parasites bioluminescents nous offre la possibilité de suivre sur un temps plus long la viabilité de ces gamétocytes. En effet, si nous observons une baisse de la bioluminescence au cours du temps, cela signifierait que soit les parasites sont tués dans la rate, soit qu'ils sont retournés dans la circulation. Nous pourrions également mettre en place un protocole dans lequel les macrophages spléniques seraient mis en contact avec des GRIGs matures traités ou non avec un inhibiteur de PDE spécifique de *P. falciparum* et mesurer le pourcentage de cellules phagocytées. Ces résultats nous permettront de savoir si cet analogue est capable de fragiliser les GRIGs matures, comme on a pu l'observer avec les essais de viabilité des gamétocytes, pour les rendre plus sensibles à la phagocytose.

Déterminer le devenir des GRIGs matures dans la rate après leur traitement avec des inhibiteurs de PDEs est d'autant plus important que deux études très récentes ont mis lumière la présence de globules rouges infectés par des parasites de *P. falciparum* et *P. vivax* dans la rate de personnes en zones endémiques (Kho et al., 2021a, 2021b). Les auteurs ont réalisé des expériences d'immunohistochimie et de coloration au GIEMSA sur des coupes de rates humaines. De façon surprenante, plus de 90% de la biomasse des

formes asexuées sont retrouvés dans la rate contre seulement 7% et 1.3% présents dans le sang périphérique pour respectivement *P. falciparum* et *P. vivax* (Kho, et al. 2021).

Ces observations remettent en question le dogme selon lequel la rate ne serait qu'un « cimetière » pour les globules rouges anormaux. Il semblerait que les parasites puissent survivent dans cet organe et même qu'ils pourraient réaliser un pseudo cycle de réplication cryptique. La présence des parasites dans le sang périphérique ne serait qu'une conséquence de leur « fuite » de la rate. Ce cycle serait d'autant plus avantageux pour *P. vivax*, étant donné que la rate est le lieu de maturation des réticulocytes, sa cellule hôte de prédilection (Chan et al., 2020). Il est donc important de redéfinir le rôle de la rate dans la physiologie et dans la physiopathologie de *Plasmodium* (Henry et al., 2020; Monteiro et al., 2020).

D. Stratégie de repositionnement de molécules anti-*Plasmodium*

Le développement de molécules anti-transmission s'inscrit dans une optique d'éradication du paludisme. En effet, si on ne cible pas cette étape du cycle de *P. falciparum*, tous les efforts faits pour endiguer le paludisme sont compromis, d'autant plus que les porteurs de gamétocytes sont asymptomatiques. Il s'agirait donc de réduire le réservoir humain infectieux, défini comme étant la proportion de la population capable d'infecter des moustiques avec succès (Drakeley et al., 2000). La transmission de *P. falciparum* peut être ciblée à deux niveaux : le vecteur (i) et les parasites sexués (ii). Les stratégies pour réduire la population de vecteurs sont diverses. Elles s'étendent de l'utilisation d'insecticides à la génération de moustiques génétiquement modifiés pour être stériles (Wang et al., 2021).

Un exemple de repositionnement de molécule pour lutter contre la transmission est l'ivermectine. Cette molécule, utilisée dans le traitement contre la filariose lymphatique (Ottesen et al., 2008) et l'onchocercose (Thylefors, 2008), a été suggérée comme pouvant réduire la population de vecteurs de *Plasmodium*. Des études ont montré que les moustiques qui se nourrissaient de sang contenant de l'ivermectine mourraient

(Iakubovich et al., 1989; Jones et al., 1992; Pampiglione et al., 1985). Cette molécule, qui cible également les stades asexués et sexués de *Plasmodium* (de Carvalho et al., 2019), a donc été proposée comme étant une potentielle molécule anti-transmission (Singh et Singh 2021). Plusieurs études ont été menées dans des pays en zones endémiques pour évaluer l'efficacité de ce traitement sur la transmission de *P. falciparum*. Une étude de 2020 dans laquelle les auteurs ont développé un modèle mathématique, validé par des données cliniques et entomologiques, avait prédit une réduction de l'incidence et de la prévalence du paludisme après utilisation de l'ivermectine (Slater et al., 2020). Une récente revue systématique de plusieurs études combinant des travaux *in vitro* et *in vivo* a permis de mettre en évidence l'impact de l'ivermectine sur le taux de survie des Anopheles, sur la survie des sporozoïtes et sur la transmission du parasite (Khaligh et al., 2021).

Dans notre étude, nous avons apporté la preuve de concept que le repositionnement d'inhibiteurs de PDEs (Beghyn et al., 2012, 2011) peut permettre de générer des molécules anti-transmission. Cependant, une molécule qui ne cible que les gamétocytes sera difficilement autorisée à la mise sur le marché. En effet, le ratio bénéfice-risque de ce type de molécule pour la personne qui la prend est très faible. En effet, on ne peut pas parler de traitement thérapeutique car les gamétocytes ne causent aucuns symptômes chez les porteurs. On pourrait plutôt qualifier une molécule anti-transmission de traitement altruiste étant donné que les véritables bénéficiaires de ce traitement non thérapeutique sont les personnes de notre environnement.

De façon intéressante, les inhibiteurs de PDEs ont déjà montré leur efficacité contre des formes graves du paludisme comme le neuropaludisme. En effet, plusieurs études ont rapporté l'effet positif de la Pentoxifylline chez des patients comateux (Das et al., 2003; Graninger et al., 1991; Lell et al., 2010; Perri et al., 1995). Aussi, dans nos travaux, nous avons montré que la modification du Tadalafil à deux endroits de sa structure (Beghyn et al., 2012, 2011) confère à cet analogue un effet sur la viabilité des formes asexuées et sexuées et sur les propriétés mécaniques des GRIGs matures. Ces résultats montrent que non seulement les inhibiteurs de PDEs ciblent les gamétocytes et donc la transmission du parasite mais peuvent aussi constituer un traitement contre les formes asexuées du parasite. Ces observations suggèrent donc que le ratio bénéfice-risque qui découle de

l'utilisation des analogues du Tadalafil pourrait être plus élevée que celui d'une molécule qui cible uniquement les gamétocytes de *P. falciparum*. Néanmoins, il ne faut pas écarter ce type de molécules car elles pourraient être couplées à des molécules qui éliminent les formes asexuées du parasite afin de constituer des doubles ou même triples thérapies contre le paludisme, comme c'est le cas pour les CTA ou pour les traitements contre le SIDA.

Pour conclure cette étude, nous pouvons dire que de nombreux efforts restent à faire pour arriver à l'éradication du paludisme dans le monde, que ce soit au niveau de la compréhension de la biologie du parasite *Plasmodium* ou encore au niveau de la découverte de nouveaux traitements. Même si l'épidémie de la COVID-19 a mobilisé une grande partie du corps scientifique et des organismes de santé, les avancées sur les vaccins comme le vaccin RTS'S qui cible les stades pré-hépatique, les vaccins anti-transmission qui ciblent les gamètes du parasite (Coelho et al., 2020; de Jong et al., 2021) et les nombreux travaux sur la biologie des gamétocytes (Chawla et al., 2021), ont permis de multiplier et diversifier les stratégies de lutte contre le paludisme.

Références bibliographiques

- Adderley, S.P., Dufaux, E.A., Sridharan, M., Bowles, E.A., Hanson, M.S., Stephenson, A.H., Ellsworth, M.L., Sprague, R.S., 2009. Iloprost- and isoproterenol-induced increases in cAMP are regulated by different phosphodiesterases in erythrocytes of both rabbits and humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H1617-1624. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01226.2008>
- Adderley, S.P., Sprague, R.S., Stephenson, A.H., Hanson, M.S., 2010. Regulation of cAMP by phosphodiesterases in erythrocytes. *Pharmacological Reports* 62, 475–482. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70303-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70303-0)
- Adderley, S.P., Thuet, K.M., Sridharan, M., Bowles, E.A., Stephenson, A.H., Ellsworth, M.L., Sprague, R.S., 2011a. Identification of cytosolic phosphodiesterases in the erythrocyte: A possible role for PDE5. *Med Sci Monit* 17, CR241–CR247. <https://doi.org/10.12659/MSM.881763>
- Adderley, S.P., Thuet, K.M., Sridharan, M., Bowles, E.A., Stephenson, A.H., Ellsworth, M.L., Sprague, R.S., 2011b. Identification of cytosolic phosphodiesterases in the erythrocyte: A possible role for PDE5. *Med Sci Monit* 17, CR241–CR247. <https://doi.org/10.12659/MSM.881763>
- Aguilar, R., Magallon-Tejada, A., Achtman, A.H., Moraleda, C., Joice, R., Cisteró, P., Li Wai Suen, C.S.N., Nhabomba, A., Macete, E., Mueller, I., Marti, M., Alonso, P.L., Menéndez, C., Schofield, L., Mayor, A., 2014. Molecular evidence for the localization of *Plasmodium falciparum* immature gametocytes in bone marrow. *Blood* 123, 959–966. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-520767>
- Ahmed, W.S., Geethakumari, A.M., Biswas, K.H., 2021. Phosphodiesterase 5 (PDE5): Structure-function regulation and therapeutic applications of inhibitors. *Biomed Pharmacother* 134, 111128. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111128>
- Aikawa, M., Kamanura, K., Shiraishi, S., Matsumoto, Y., Arwati, H., Torii, M., Ito, Y., Takeuchi, T., Tandler, B., 1996. Membrane knobs of unfixed *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes: new findings as revealed by atomic force microscopy and surface potential spectroscopy. *Exp Parasitol* 84, 339–343. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0122>
- Aingaran, M., Zhang, R., Law, S.K., Peng, Z., Undisz, A., Meyer, E., Diez-Silva, M., Burke, T.A., Spielmann, T., Lim, C.T., Suresh, S., Dao, M., Marti, M., 2012. Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol* 14, 983–993. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01786.x>
- Alano, P., Read, D., Bruce, M., Aikawa, M., Kaido, T., Tegoshi, T., Bhatti, S., Smith, D.K., Luo, C., Hansra, S., Carter, R., Elliott, J.F., 1995. COS cell expression cloning of Pfg377, a *Plasmodium falciparum* gametocyte antigen associated with osmiophilic bodies. *Mol Biochem Parasitol* 74, 143–156. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02491-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)02491-3)
- Albuisson, J., Murthy, S.E., Bandell, M., Coste, B., Louis-Dit-Picard, H., Mathur, J., Fénéant-Thibault, M., Tertian, G., de Jaureguiberry, J.-P., Syfuss, P.-Y., Cahalan, S., Garçon, L., Toutain, F., Simon Rohrlisch, P., Delaunay, J., Picard, V., Jeunemaitre, X., Patapoutian, A., 2013. Dehydrated hereditary stomatocytosis linked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels. *Nat Commun* 4, 1884. <https://doi.org/10.1038/ncomms2899>
- Alkhalil, A., Cohn, J.V., Wagner, M.A., Cabrera, J.S., Rajapandi, T., Desai, S.A., 2004. *Plasmodium falciparum* likely encodes the principal anion channel on infected human erythrocytes. *Blood* 104, 4279–4286. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-2047>
- Andolfo, I., Alper, S.L., De Franceschi, L., Auriemma, C., Russo, R., De Falco, L., Vallefucio, F., Esposito, M.R., Vandonpe, D.H., Shmukler, B.E., Narayan, R., Montanaro, D., D’Armiento, M., Vetro, A., Limongelli, I., Zuffardi, O., Glader, B.E., Schrier, S.L., Brugnara, C., Stewart, G.W., Delaunay, J., Iolascon, A., 2013. Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1. *Blood* 121, 3925–3935, S1-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-482489>
- 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., Doumtable, D., Skinner, J., Sturdevant, D., Ricklefs, S., Virtaneva, K., Asghar, M., Homann, M.V., Turner, L., Martins, J., Allman, E.L., N’Dri, M.-E., Winkler, V., Llinás, M., Lavazec, C., Martens, C., Färnert, A., Kayentao, K., Ongoiba, A., Lavstsen, T., Osório, N.S., Otto, T.D., Recker, M., Traore, B., Crompton, P.D., Portugal, S., 2020. Increased circulation time of *Plasmodium*

- falciparum underlies persistent asymptomatic infection in the dry season. *Nat Med* 26, 1929–1940. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1084-0>
- Antia, M., Herricks, T., Rathod, P.K., 2008. Microfluidic approaches to malaria pathogenesis. *Cell Microbiol* 10, 1968–1974. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01216.x>
- Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chuor, C.M., Bout, D.M., Ménard, S., Rogers, W.O., Genton, B., Fandeur, T., Miotto, O., Ringwald, P., Le Bras, J., Berry, A., Barale, J.-C., Fairhurst, R.M., Benoit-Vical, F., Mercereau-Puijalon, O., Ménard, D., 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505, 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature12876>
- Baillie, G.S., Tejada, G.S., Kelly, M.P., 2019a. Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 18, 770–796. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0033-4>
- Baillie, G.S., Tejada, G.S., Kelly, M.P., 2019b. Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: Inhibition and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 18, 770–796. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0033-4>
- Baker, D., 2004. Adenylyl and Guanylyl Cyclases from the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *IUBMB Life* 56, 535–540. <https://doi.org/10.1080/15216540400013937>
- Baker, D.A., Drought, L.G., Flueck, C., Nofal, S.D., Patel, A., Penzo, M., Walker, E.M., 2017. Cyclic nucleotide signalling in malaria parasites. *Open Biol.* 7, 170213. <https://doi.org/10.1098/rsob.170213>
- Balach, M.M., Casale, C.H., Campetelli, A.N., 2019. Erythrocyte plasma membrane potential: past and current methods for its measurement. *Biophys Rev* 11, 995–1005. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00603-5>
- Balestra, A.C., Koussis, K., Klages, N., Howell, S.A., Flynn, H.R., Bantscheff, M., Pasquarello, C., Perrin, A.J., Brusini, L., Arboit, P., Sanz, O., Castaño, L.P.-B., Withers-Martinez, C., Hainard, A., Ghidelli-Disse, S., Snijders, A.P., Baker, D.A., Blackman, M.J., Brochet, M., 2021. Ca²⁺ signals critical for egress and gametogenesis in malaria parasites depend on a multipass membrane protein that interacts with PKG. *Sci Adv* 7, eabe5396. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe5396>
- Balikagala, B., Fukuda, N., Ikeda, M., Katuro, O.T., Tachibana, S.-I., Yamauchi, M., Opio, W., Emoto, S., Anywar, D.A., Kimura, E., Palacpac, N.M.Q., Odongo-Aginya, E.I., Ogwang, M., Horii, T., Mita, T., 2021. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa. *N Engl J Med* 385, 1163–1171. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101746>
- Bancells, C., Llorà-Batlle, O., Poran, A., Nötzel, C., Rovira-Graells, N., Elemento, O., Kafsack, B.F.C., Cortés, A., 2019. Revisiting the initial steps of sexual development in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Microbiol* 4, 144–154. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0291-7>
- Bansal, G.P., Weinstein, C.S., Kumar, N., 2016. Insight into phagocytosis of mature sexual (gametocyte) stages of *Plasmodium falciparum* using a human monocyte cell line. *Acta Trop* 157, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.033>
- Barber, B.E., Russell, B., Grigg, M.J., Zhang, R., William, T., Amir, A., Lau, Y.L., Chatfield, M.D., Dondorp, A.M., Anstey, N.M., Yeo, T.W., 2018. Reduced red blood cell deformability in *Plasmodium knowlesi* malaria. *Blood Adv* 2, 433–443. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017013730>
- Barlow, A., Barlow, B., Koyfman, A., Long, B., Bissell, B., 2021. Pulmonary arterial hypertension in the emergency department: A focus on medication management. *Am J Emerg Med* 47, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2021.03.072>
- Baskurt, O.K., Hardeman, M.R., Uyklu, M., Ulker, P., Cengiz, M., Nemeth, N., Shin, S., Alexy, T., Meiselman, H.J., 2009. Parameterization of red blood cell elongation index–shear stress curves obtained by ektacytometry. *Scand J Clin Lab Invest* 69, 777–788. <https://doi.org/10.3109/00365510903266069>
- Bedioun, I., Bobin, P., Karam, S., Lindner, M., Mika, D., Lechêne, P., Leroy, J., Fischmeister, R., Vandecasteele, G., 2016. [Cyclic nucleotide phosphodiesterases: role in the heart and therapeutic perspectives]. *Biol Aujourdhui* 210, 127–138. <https://doi.org/10.1051/jbio/2016019>
- Beghyn, T.B., Charton, J., Leroux, F., Henninot, A., Reboule, I., Cos, P., Maes, L., Deprez, B., 2012. Drug-to-Genome-to-Drug, Step 2: Reversing Selectivity in a Series of Antiplasmodial Compounds. *J. Med. Chem.* 55, 1274–1286. <https://doi.org/10.1021/jm201422e>
- Beghyn, T.B., Charton, J., Leroux, F., Laconde, G., Bourin, A., Cos, P., Maes, L., Deprez, B., 2011. Drug to Genome to Drug: Discovery of New Antiplasmodial Compounds. *J. Med. Chem.* 54, 3222–3240. <https://doi.org/10.1021/jm1014617>
- Bennett, J.W., Pybus, B.S., Yadava, A., Tosh, D., Sousa, J.C., McCarthy, W.F., Deye, G., Melendez, V., Ockenhouse, C.F., 2013. Primaquine failure and cytochrome P-450 2D6 in *Plasmodium vivax* malaria. *N Engl J Med* 369, 1381–1382. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1301936>

- Bennink, S., Pradel, G., 2021. Vesicle dynamics during the egress of malaria gametocytes from the red blood cell. *Mol Biochem Parasitol* 243, 111372. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2021.111372>
- Bhatt, S., Weiss, D.J., Cameron, E., Bisanzio, D., Mappin, B., Dalrymple, U., Battle, K., Moyes, C.L., Henry, A., Eckhoff, P.A., Wenger, E.A., Briët, O., Penny, M.A., Smith, T.A., Bennett, A., Yukich, J., Eisele, T.P., Griffin, J.T., Fergus, C.A., Lynch, M., Lindgren, F., Cohen, J.M., Murray, C.L.J., Smith, D.L., Hay, S.I., Cibulskis, R.E., Gething, P.W., 2015. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* 526, 207–211. <https://doi.org/10.1038/nature15535>
- Bhogal, N.K., Hasan, A., Gorelik, J., 2018. The Development of Compartmentation of cAMP Signaling in Cardiomyocytes: The Role of T-Tubules and Caveolae Microdomains. *J Cardiovasc Dev Dis* 5, 25. <https://doi.org/10.3390/jcdd5020025>
- Blount, M.A., Zoraghi, R., Ke, H., Bessay, E.P., Corbin, J.D., Francis, S.H., 2006. A 46-Amino Acid Segment in Phosphodiesterase-5 GAF-B Domain Provides for High Vardenafil Potency over Sildenafil and Tadalafil and Is Involved in Phosphodiesterase-5 Dimerization. *Mol Pharmacol* 70, 1822–1831. <https://doi.org/10.1124/mol.106.028688>
- Bousema, T., Okell, L., Shekalaghe, S., Griffin, J.T., Omar, S., Sawa, P., Sutherland, C., Sauerwein, R., Ghani, A.C., Drakeley, C., 2010. Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs. *Malar J* 9, 136. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-136>
- Bouyer, G., Barbieri, D., Dupuy, F., Marteau, A., Sissoko, A., N'Dri, M.-E., Neveu, G., Bedault, L., Khodabux, N., Roman, D., Houzé, S., Siciliano, G., Alano, P., Martins, R.M., Lopez-Rubio, J.-J., Clain, J., Duval, R., Egée, S., Lavazec, C., 2020. *Plasmodium falciparum* sexual parasites regulate infected erythrocyte permeability. *Commun Biol* 3, 726. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01454-7>
- Bouyer, G., Cueff, A., Egée, S., Kmiecik, J., Maksimova, Y., Glogowska, E., Gallagher, P.G., Thomas, S.L.Y., 2011. Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood* 118, 2305–2312. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-329300>
- Brancucci, N.M.B., Bertschi, N.L., Zhu, L., Niederwieser, I., Chin, W.H., Wampfler, R., Freymond, C., Rottmann, M., Felger, I., Bozdech, Z., Voss, T.S., 2014. Heterochromatin Protein 1 Secures Survival and Transmission of Malaria Parasites. *Cell Host & Microbe* 16, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.004>
- Brancucci, Nicolas M. B., Gerdt, J.P., Wang, C., De Niz, M., Philip, N., Adapa, S.R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S.D., Laffitte, M.-C., Clark, M.A., Grüning, C., Ravel, D., Blancke Soares, A., Demas, A., Bopp, S., Rubio-Ruiz, B., Conejo-Garcia, A., Wirth, D.F., Gendaszewska-Darmach, E., Duraisingh, M.T., Adams, J.H., Voss, T.S., Waters, A.P., Jiang, R.H.Y., Clardy, J., Marti, M., 2017. Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell* 171, 1532–1544.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.020>
- Brancucci, Nicolas M.B., Gerdt, J.P., Wang, C., De Niz, M., Philip, N., Adapa, S.R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S.D., Laffitte, M.-C., Clark, M.A., Grüning, C., Ravel, D., Blancke Soares, A., Demas, A., Bopp, S., Rubio-Ruiz, B., Conejo-Garcia, A., Wirth, D.F., Gendaszewska-Darmach, E., Duraisingh, M.T., Adams, J.H., Voss, T.S., Waters, A.P., Jiang, R.H.Y., Clardy, J., Marti, M., 2017. Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell* 171, 1532–1544.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.020>
- Brancucci, N.M.B., Goldowitz, I., Buchholz, K., Werling, K., Marti, M., 2015. An assay to probe *Plasmodium falciparum* growth, transmission stage formation and early gametocyte development. *Nat Protoc* 10, 1131–1142. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.072>
- Bruce, M.C., Alano, P., Duthie, S., Carter, R., 1990. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* 100 Pt 2, 191–200. <https://doi.org/10.1017/s0031182000061199>
- Brugnara, C., 1997. Erythrocyte membrane transport physiology. *Curr Opin Hematol* 4, 122–127. <https://doi.org/10.1097/00062752-199704020-00008>
- Buckling, A., Crooks, L., Read, A., 1999. *Plasmodium chabaudi*: effect of antimalarial drugs on gametocytogenesis. *Exp Parasitol* 93, 45–54. <https://doi.org/10.1006/expr.1999.4429>
- 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>
- Camarda, G., Bertuccini, L., Singh, S.K., Salzano, A.M., Lanfrancotti, A., Olivieri, A., Scaloni, A., Sharma, A., Alano, P., 2010. Regulated oligomerisation and molecular interactions of the early gametocyte protein Pfg27 in *Plasmodium falciparum* sexual differentiation. *Int J Parasitol* 40, 663–673. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.11.006>

- Canham, P.B., Burton, A.C., 1968. Distribution of size and shape in populations of normal human red cells. *Circ Res* 22, 405–422. <https://doi.org/10.1161/01.res.22.3.405>
- Cao, P., Collins, K.A., Zaloumis, S., Wattanakul, T., Tarning, J., Simpson, J.A., McCarthy, J., McCaw, J.M., 2019. Modeling the dynamics of *Plasmodium falciparum* gametocytes in humans during malaria infection. *Elife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.49058>
- Carucci, D.J., Witney, A.A., Muhia, D.K., Warhurst, D.C., Schaap, P., Meima, M., Li, J.-L., Taylor, M.C., Kelly, J.M., Baker, D.A., 2000. Guanylyl Cyclase Activity Associated with Putative Bifunctional Integral Membrane Proteins in *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 22147–22156. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001021200>
- Cevenini, L., Camarda, G., Michelini, E., Siciliano, G., Calabretta, M.M., Bona, R., Kumar, T.R.S., Cara, A., Branchini, B.R., Fidock, D.A., Roda, A., Alano, P., 2014. Multicolor bioluminescence boosts malaria research: quantitative dual-color assay and single-cell imaging in *Plasmodium falciparum* parasites. *Anal Chem* 86, 8814–8821. <https://doi.org/10.1021/ac502098w>
- Cha, S.-J., Park, K., Srinivasan, P., Schindler, C.W., van Rooijen, N., Stins, M., Jacobs-Lorena, M., 2015. CD68 acts as a major gateway for malaria sporozoite liver infection. *J Exp Med* 212, 1391–1403. <https://doi.org/10.1084/jem.20110575>
- Chan, L.-J., Dietrich, M.H., Nguitragool, W., Tham, W.-H., 2020. *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes. *Cell Microbiol* 22, e13110. <https://doi.org/10.1111/cmi.13110>
- Chawla, J., Oberstaller, J., Adams, J.H., 2021. Targeting Gametocytes of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* in a Functional Genomics Era: Next Steps. *Pathogens* 10, 346. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030346>
- Coelho, C.H., Jore, M.M., Canepa, G.E., Barillas-Mury, C., Bousema, T., Duffy, P.E., 2020. Antibody Therapy Goes to Insects: Monoclonal Antibodies Can Block *Plasmodium* Transmission to Mosquitoes. *Trends Parasitol* 36, 880–883. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.009>
- Coleman, B.I., Skillman, K.M., Jiang, R.H.Y., Childs, L.M., Altenhofen, L.M., Ganter, M., Leung, Y., Goldowitz, I., Kafack, B.F.C., Marti, M., Llinás, M., Buckee, C.O., Duraisingh, M.T., 2014. A *Plasmodium falciparum* Histone Deacetylase Regulates Antigenic Variation and Gametocyte Conversion. *Cell Host & Microbe* 16, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.014>
- Collins, C.R., Hackett, F., Strath, M., Penzo, M., Withers-Martinez, C., Baker, D.A., Blackman, M.J., 2013. Malaria Parasite cGMP-dependent Protein Kinase Regulates Blood Stage Merozoite Secretory Organelle Discharge and Egress. *PLoS Pathog* 9, e1003344. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003344>
- Collins, K.A., Wang, C.Y., Adams, M., Mitchell, H., Rampton, M., Elliott, S., Reuling, I.J., Bousema, T., Sauerwein, R., Chalon, S., Möhrle, J.J., McCarthy, J.S., 2018. A controlled human malaria infection model enabling evaluation of transmission-blocking interventions. *J Clin Invest* 128, 1551–1562. <https://doi.org/10.1172/JCI98012>
- 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* 330, 55–60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270>
- Counihan, N.A., Chisholm, S.A., Bullen, H.E., Srivastava, A., Sanders, P.R., Jonsdottir, T.K., Weiss, G.E., Ghosh, S., Crabb, B.S., Creek, D.J., Gilson, P.R., de Koning-Ward, T.F., 2017. *Plasmodium falciparum* parasites deploy RhopH2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate. *eLife* 6, e23217. <https://doi.org/10.7554/eLife.23217>
- Crabb, B.S., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Waller, R.F., Caruana, S.R., Davern, K.M., Wickham, M.E., Brown, G.V., Coppel, R.L., Cowman, A.F., 1997. Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* 89, 287–296. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80207-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80207-x)
- Cranston, H.A., Boylan, C.W., Carroll, G.L., Suter, S.P., Williamson, J.R., Gluzman, I.Y., Krogstad, D.J., 1984. *Plasmodium falciparum* maturation abolishes physiologic red cell deformability. *Science* 223, 400–403. <https://doi.org/10.1126/science.6362007>
- Da Costa, L., Suner, L., Galimand, J., Bonnel, A., Pascreau, T., Couque, N., Fenneteau, O., Mohandas, N., Society of Hematology and Pediatric Immunology (SHIP) group, French Society of Hematology (SFH), 2016. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells Mol Dis* 56, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.09.001>
- Dantzler, K.W., Ma, S., Ngotho, P., Stone, W.J.R., Tao, D., Rijpma, S., De Niz, M., Nilsson Bark, S.K., Jore, M.M., Raaijmakers, T.K., Early, A.M., Ubaida-Mohien, C., Lemgruber, L., Campo, J.J., Teng, A.A., Le, T.Q., Walker, C.L., Hermand, P., Deterre, P., Davies, D.H., Felgner, P., Morlais, I., Wirth, D.F., Neafsey, D.E., Dinglasan, R.R., Laufer, M., Huttenhower, C., Seydel, K., Taylor, T., Bousema, T., Marti, M., 2019.

- Naturally acquired immunity against immature *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Sci Transl Med* 11, eaav3963. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav3963>
- Das, B.K., Mishra, S., Padhi, P.K., Manish, R., Tripathy, R., Sahoo, P.K., Ravindran, B., 2003. Pentoxifylline adjunct improves prognosis of human cerebral malaria in adults. *Trop Med Int Health* 8, 680–684. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2003.01087.x>
- Dawn, A., Singh, S., More, K.R., Siddiqui, F.A., Pachikara, N., Ramdani, G., Langsley, G., Chitnis, C.E., 2014. The Central Role of cAMP in Regulating *Plasmodium falciparum* Merozoite Invasion of Human Erythrocytes. *PLoS Pathog* 10, e1004520. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004520>
- de Carvalho, L.P., Sandri, T.L., José Tenório de Melo, E., Fendel, R., Kremsner, P.G., Mordmüller, B., Held, J., 2019. Ivermectin Impairs the Development of Sexual and Asexual Stages of *Plasmodium falciparum* In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e00085-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00085-19>
- de Jong, R.M., Meerstein-Kessel, L., Da, D.F., Nsango, S., Challenger, J.D., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G.-J., Duarte, E., Teyssier, N., Sauerwein, R.W., Churcher, T.S., Dabire, R.K., Morlais, I., Locke, E., Huynen, M.A., Bousema, T., Jore, M.M., 2021. Monoclonal antibodies block transmission of genetically diverse *Plasmodium falciparum* strains to mosquitoes. *NPJ Vaccines* 6, 101. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00366-9>
- de Koning, H.P., Gould, M.K., Sterk, G.J., Tenor, H., Kunz, S., Luginbuehl, E., Seebeck, T., 2012. Pharmacological Validation of *Trypanosoma brucei* Phosphodiesterases as Novel Drug Targets. *The Journal of Infectious Diseases* 206, 229–237. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir857>
- de Koning-Ward, T.F., Olivieri, A., Bertuccini, L., Hood, A., Silvestrini, F., Charvalias, K., Berzosa Díaz, P., Camarda, G., McElwain, T.F., Papenfuss, T., Healer, J., Baldassarri, L., Crabb, B.S., Alano, P., Ranford-Cartwright, L.C., 2008. The role of osmiophilic bodies and Pfg377 expression in female gametocyte emergence and mosquito infectivity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 67, 278–290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06039.x>
- Dearnley, M., Chu, T., Zhang, Y., Looker, O., Huang, C., Klonis, N., Yeoman, J., Kenny, S., Arora, M., Osborne, J.M., Chandramohanadas, R., Zhang, S., Dixon, M.W.A., Tilley, L., 2016. Reversible host cell remodeling underpins deformability changes in malaria parasite sexual blood stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 4800–4805. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520194113>
- Dearnley, M.K., Yeoman, J.A., Hanssen, E., Kenny, S., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Tilley, L., Dixon, M.W.A., 2012. Origin, composition, organization and function of the inner membrane complex of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *J Cell Sci* 125, 2053–2063. <https://doi.org/10.1242/jcs.099002>
- Deplaine, G., Safeukui, I., Jeddi, F., Lacoste, F., Brousse, V., Perrot, S., Biligui, S., Guillotte, M., Guitton, C., Dokmak, S., Aussilhou, B., Sauvanet, A., Cazals Hatem, D., Paye, F., Thellier, M., Mazier, D., Milon, G., Mohandas, N., Mercereau-Puijalon, O., David, P.H., Buffet, P.A., 2011. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood* 117, e88-95. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-312801>
- Depond, M., Henry, B., Buffet, P., Ndour, P.A., 2020. Methods to Investigate the Deformability of RBC During Malaria. *Front. Physiol.* 10, 1613. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01613>
- Desai, S.A., Bezrukov, S.M., Zimmerberg, J., 2000. A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* 406, 1001–1005. <https://doi.org/10.1038/35023000>
- Desai, S.A., Krogstad, D.J., McCleskey, E.W., 1993. A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature* 362, 643–646. <https://doi.org/10.1038/362643a0>
- Desai, S.A., McCleskey, E.W., Schlesinger, P.H., Krogstad, D.J., 1996. A novel pathway for Ca⁺⁺ entry into *Plasmodium falciparum*-infected blood cells. *Am J Trop Med Hyg* 54, 464–470. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.464>
- Desai, S.A., Rosenberg, R.L., 1997. Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2045–2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.2045>
- Diez-Silva, M., Park, Y., Huang, S., Bow, H., Mercereau-Puijalon, O., Deplaine, G., Lavazec, C., Perrot, S., Bonnefoy, S., Feld, M.S., Han, J., Dao, M., Suresh, S., 2012. Pf155/RESA protein influences the dynamic microcirculatory behavior of ring-stage *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Sci Rep* 2, 614. <https://doi.org/10.1038/srep00614>
- Dixon, M.W.A., Tilley, L., 2021. *Plasmodium falciparum* goes bananas for sex. *Mol Biochem Parasitol* 244, 111385. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2021.111385>
- Dondorp, A.M., Angus, B.J., Chotivanich, K., Silamut, K., Ruangveerayuth, R., Hardeman, M.R., Kager, P.A., Vreeken, J., White, N.J., 1999. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 60, 733–737. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.733>

- Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Arie, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S.S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N.P.J., Lindegardh, N., Socheat, D., White, N.J., 2009. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med* 361, 455–467. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808859>
- Drakeley, C.J., Akim, N.I., Sauerwein, R.W., Greenwood, B.M., Targett, G.A., 2000. Estimates of the infectious reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in The Gambia and in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 472–476. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90056-7](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90056-7)
- Duez, J., Carucci, M., Garcia-Barbazan, I., Corral, M., Perez, O., Presa, J.L., Henry, B., Roussel, C., Ndour, P.A., Rosa, N.B., Sanz, L., Gamo, F.-J., Buffet, P., 2018. High-throughput microfiltration to assess red blood cell deformability and screen for malaria transmission-blocking drugs. *Nat Protoc* 13, 1362–1376. <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.035>
- Duez, J., Holleran, J.P., Ndour, P.A., Loganathan, S., Amireault, P., François, O., El Nemer, W., Le Pioufle, B., Amado, I.F., Garcia, S., Chartrel, N., Le Van Kim, C., Lavazec, C., Avery, V.M., Buffet, P.A., 2015. Splenic retention of *Plasmodium falciparum* gametocytes to block the transmission of malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 4206–4214. <https://doi.org/10.1128/AAC.05030-14>
- Duffier, Y., Lorthiois, A., Cisteró, P., Dupuy, F., Jouvion, G., Fiette, L., Mazier, D., Mayor, A., Lavazec, C., Moreno Sabater, A., 2016. A humanized mouse model for sequestration of *Plasmodium falciparum* sexual stages and in vivo evaluation of gametocytidal drugs. *Sci Rep* 6, 35025. <https://doi.org/10.1038/srep35025>
- Eksi, S., Morahan, B.J., Haile, Y., Furuya, T., Jiang, H., Ali, O., Xu, H., Kiattibutr, K., Suri, A., Czesny, B., Adeyemo, A., Myers, T.G., Sattabongkot, J., Su, X., Williamson, K.C., 2012. *Plasmodium falciparum* gametocyte development 1 (Pfgdv1) and gametocytogenesis early gene identification and commitment to sexual development. *PLoS Pathog* 8, e1002964. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002964>
- Falae, A., Combe, A., Amaladoss, A., Carvalho, T., Menard, R., Bhanot, P., 2010. Role of *Plasmodium berghei* cGMP-dependent Protein Kinase in Late Liver Stage Development. *J Biol Chem* 285, 3282–3288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070367>
- Farfour, E., Charlotte, F., Settegrana, C., Miyara, M., Buffet, P., 2012. The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for *Plasmodium falciparum* gametocyte maturation? *Malar J* 11, 285. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-285>
- Filarsky, M., Frischka, S.A., Niederwieser, I., Brancucci, N.M.B., Carrington, E., Carrió, E., Moes, S., Jenoe, P., Bártfai, R., Voss, T.S., 2018. GDV1 induces sexual commitment of malaria parasites by antagonizing HP1-dependent gene silencing. *Science* 359, 1259–1263. <https://doi.org/10.1126/science.aan6042>
- Flueck, C., Drought, L.G., Jones, A., Patel, A., Perrin, A.J., Walker, E.M., Nofal, S.D., Snijders, A.P., Blackman, M.J., Baker, D.A., 2019. Phosphodiesterase beta is the master regulator of cAMP signalling during malaria parasite invasion. *PLoS Biol* 17, e3000154. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000154>
- Freund, J., Sommer, H.E., Walter, A.W., 1945. IMMUNIZATION AGAINST MALARIA: VACCINATION OF DUCKS WITH KILLED PARASITES INCORPORATED WITH ADJUVANTS. *Science* 102, 200–202. <https://doi.org/10.1126/science.102.2643.200>
- Ginsburg, H., Krugliak, M., Eidelman, O., Cabantchik, Z.I., 1983. New permeability pathways induced in membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 8, 177–190. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(83\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(83)90008-7)
- Giorgi, M., Cardarelli, S., Ragusa, F., Saliola, M., Biagioni, S., Poiana, G., Naro, F., Massimi, M., 2020. Phosphodiesterase Inhibitors: Could They Be Beneficial for the Treatment of COVID-19? *Int J Mol Sci* 21, E5338. <https://doi.org/10.3390/ijms21155338>
- Glenister, F.K., Coppel, R.L., Cowman, A.F., Mohandas, N., Cooke, B.M., 2002. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood* 99, 1060–1063. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.3.1060>
- Gould, S.B., Tham, W.-H., Cowman, A.F., McFadden, G.I., Waller, R.F., 2008. Alveolins, a new family of cortical proteins that define the protist infrakingdom Alveolata. *Mol Biol Evol* 25, 1219–1230. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn070>
- Govindasamy, K., Jebiwott, S., Jaijyan, D.K., Davidow, A., Ojo, K.K., Voorhis, W.C.V., Brochet, M., Billker, O., Bhanot, P., 2016. Invasion of hepatocytes by *Plasmodium* sporozoites requires cGMP-dependent protein kinase and calcium dependent protein kinase 4. *Molecular Microbiology* 102, 349–363. <https://doi.org/10.1111/mmi.13466>
- Graninger, W., Thalhammer, F., Locker, G., 1991. Pentoxifylline in Cerebral Malaria. *The Journal of Infectious Diseases* 164, 829.
- Graves, P.M., Gelband, H., Garner, P., 2014. Primaquine or other 8-aminoquinoline for reducing *P. falciparum* transmission. *Cochrane Database Syst Rev* 1–110. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008152.pub3>

- Guitton, C., Garçon, L., Cynober, T., Gauthier, F., Tchernia, G., Delaunay, J., Leblanc, T., Thuret, I., Bader-Meunier, B., 2008. Sphérocytose héréditaire : recommandations pour le diagnostic et la prise en charge chez l'enfant. *Archives de Pédiatrie* 15, 1464–1473. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2008.04.023>
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85–100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Hanson, M.S., Stephenson, A.H., Bowles, E.A., Sridharan, M., Adderley, S., Sprague, R.S., 2008. Phosphodiesterase 3 is present in rabbit and human erythrocytes and its inhibition potentiates iloprost-induced increases in cAMP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H786–793. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00349.2008>
- Hanssen, E., Knoechel, C., Dearnley, M., Dixon, M.W.A., Le Gros, M., Larabell, C., Tilley, L., 2012. Soft X-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum*. *J Struct Biol* 177, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.09.003>
- Havell, T.C., Hillman, D., Lessin, L.S., 1978. Deformability characteristics of sickle cells by microelastimetry. *Am J Hematol* 4, 9–16. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830040103>
- Hawking, F., Wilson, M.E., Gammage, K., 1971. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65, 549–559. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(71\)90036-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(71)90036-8)
- Henry, B., Roussel, C., Carucci, M., Brousse, V., Ndour, P.A., Buffet, P., 2020. The Human Spleen in Malaria: Filter or Shelter? *Trends Parasitol* 36, 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.03.001>
- Hentzschel, F., Gibbins, M.P., Attipa, C., Beraldi, D., Moxon, C.A., Otto, T.D., Marti, M., 2021. Host cell maturation modulates parasite invasion and sexual differentiation in *Plasmodium*. <https://doi.org/10.1101/2021.07.28.453984>
- Hitz, E., Wiedemar, N., Passecker, A., Brancucci, N.M.B., Vakonakis, I., Mäser, P., Voss, T.S., 2021. The 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 is an essential upstream activator of protein kinase A in malaria parasites (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2021.05.27.445967>
- Ho, C.-M., Jih, J., Lai, M., Li, X., Goldberg, D.E., Beck, J.R., Zhou, Z.H., 2021. Native structure of the RhopH complex, a key determinant of malaria parasite nutrient acquisition. *PNAS* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100514118>
- Hochmuth, R.M., 2000. Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech* 33, 15–22. [https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(99\)00175-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(99)00175-x)
- Houslay, M.D., Baillie, G.S., Maurice, D.H., 2007. cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res* 100, 950–966. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000261934.56938.38>
- Huber, S.M., Uhlemann, A.-C., Gamper, N.L., Duranton, C., Kremsner, P.G., Lang, F., 2002. *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J* 21, 22–30. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.1.22>
- Iakubovich, V.I., Zakharova, N.F., Alekseev, A.N., Alekseev, E.A., 1989. [Evaluation of the action of ivermectin on blood-sucking mosquitoes]. *Med Parazitol (Mosk)* 60–64.
- Ishino, T., Tachibana, M., Baba, M., Iriko, H., Tsuboi, T., Torii, M., 2020. Observation of morphological changes of female osmiophilic bodies prior to *Plasmodium* gametocyte egress from erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 236, 111261. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2020.111261>
- Joice, R., Nilsson, S.K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., Seydel, K.B., Bertuccini, L., Alano, P., Williamson, K.C., Duraisingh, M.T., Taylor, T.E., Milner, D.A., Marti, M., 2014. *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Sci Transl Med* 6, 244re5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008882>
- Jones, J.W., Meisch, M.V., Meek, C.L., Bivin, W.S., 1992. Lethal effects of ivermectin on *Anopheles quadrimaculatus*. *J Am Mosq Control Assoc* 8, 278–280.
- Josling, G.A., Llinás, M., 2019. Commitment Isn't for Everyone. *Trends Parasitol* 35, 381–383. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.03.012>
- Josling, G.A., Llinás, M., 2015. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol* 13, 573–587. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3519>
- Josling, G.A., Williamson, K.C., Llinás, M., 2018. Regulation of Sexual Commitment and Gametocytogenesis in Malaria Parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 501–519. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062712>
- Kafsack, B.F.C., Rovira-Graells, N., Clark, T.G., Bancells, C., Crowley, V.M., Campino, S.G., Williams, A.E., Drought, L.G., Kwiatkowski, D.P., Baker, D.A., Cortés, A., Llinás, M., 2014. A transcriptional switch underlies

- commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature* 507, 248–252. <https://doi.org/10.1038/nature12920>
- Kenthirapalan, S., Waters, A.P., Matuschewski, K., Kooij, T.W.A., 2016. Functional profiles of orphan membrane transporters in the life cycle of the malaria parasite. *Nat Commun* 7, 10519. <https://doi.org/10.1038/ncomms10519>
- Khaligh, F.G., Jafari, A., Silivanova, E., Levchenko, M., Rahimi, B., Gholizadeh, S., 2021. Endectocides as a complementary intervention in the malaria control program: a systematic review. *Syst Rev* 10, 30. <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01578-9>
- Kho, S., Qotrunnada, L., Leonardo, L., Andries, B., Wardani, P.A.I., Fricot, A., Henry, B., Hardy, D., Margyaningsih, N.I., Apriyanti, D., Puspitasari, A.M., Prayoga, P., Trianty, L., Kenangalem, E., Chretien, F., Brousse, V., Safeukui, I., del Portillo, H.A., Fernandez-Becerra, C., Meibalan, E., Marti, M., Price, R.N., Woodberry, T., Ndour, P.A., Russell, B.M., Yeo, T.W., Minigo, G., Noviyanti, R., Poespoprodjo, J.R., Siregar, N.C., Buffet, P.A., Anstey, N.M., 2021a. Evaluation of splenic accumulation and colocalization of immature reticulocytes and *Plasmodium vivax* in asymptomatic malaria: A prospective human splenectomy study. *PLoS Med* 18, e1003632. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003632>
- Kho, S., Qotrunnada, L., Leonardo, L., Andries, B., Wardani, P.A.I., Fricot, A., Henry, B., Hardy, D., Margyaningsih, N.I., Apriyanti, D., Puspitasari, A.M., Prayoga, P., Trianty, L., Kenangalem, E., Chretien, F., Safeukui, I., del Portillo, H.A., Fernandez-Becerra, C., Meibalan, E., Marti, M., Price, R.N., Woodberry, T., Ndour, P.A., Russell, B.M., Yeo, T.W., Minigo, G., Noviyanti, R., Poespoprodjo, J.R., Siregar, N.C., Buffet, P.A., Anstey, N.M., 2021b. Hidden Biomass of Intact Malaria Parasites in the Human Spleen. *N Engl J Med* 384, 2067–2069. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2023884>
- Kilili, G.K., Shakya, B., Dolan, P.T., Wang, L., Husby, M.L., Stahelin, R.V., Nakayasu, E.S., LaCount, D.J., 2019. The *Plasmodium falciparum* MESA erythrocyte cytoskeleton-binding (MEC) motif binds to erythrocyte ankyrin. *Mol Biochem Parasitol* 231, 111189. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111189>
- Kim, G.E., Kass, D.A., 2017. Cardiac Phosphodiesterases and Their Modulation for Treating Heart Disease. *Handb Exp Pharmacol* 243, 249–269. https://doi.org/10.1007/164_2016_82
- King-Keller, S., Li, M., Smith, A., Zheng, S., Kaur, G., Yang, X., Wang, B., Docampo, R., 2010. Chemical Validation of Phosphodiesterase C as a Chemotherapeutic Target in *Trypanosoma cruzi*, the Etiological Agent of Chagas' Disease. *AAC* 54, 3738–3745. <https://doi.org/10.1128/AAC.00313-10>
- Kirk, K., Horner, H.A., Elford, B.C., Ellory, J.C., Newbold, C.I., 1994. Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J Biol Chem* 269, 3339–3347.
- Kirk, K., Lehane, A.M., 2014. Membrane transport in the malaria parasite and its host erythrocyte. *Biochem J* 457, 1–18. <https://doi.org/10.1042/BJ20131007>
- Knebel, S.M., Elrick, M.M., Bowles, E.A., Zdanovec, A.K., Stephenson, A.H., Ellsworth, M.L., Sprague, R.S., 2013. Synergistic effects of prostacyclin analogs and phosphodiesterase inhibitors on cyclic adenosine 3',5' monophosphate accumulation and adenosine 3'5' triphosphate release from human erythrocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* 238, 1069–1074. <https://doi.org/10.1177/1535370213498981>
- Kunz, S., Oberholzer, M., Seebeck, T., 2005. A FYVE-containing unusual cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS J* 272, 6412–6422. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05039.x>
- Lakshmanan, V., Fishbaugher, M.E., Morrison, B., Baldwin, M., Macarulay, M., Vaughan, A.M., Mikolajczak, S.A., Kappe, S.H.I., 2015. Cyclic GMP Balance Is Critical for Malaria Parasite Transmission from the Mosquito to the Mammalian Host. *mBio* 6, e02330-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02330-14>
- Langreth, S.G., Jensen, J.B., Reese, R.T., Trager, W., 1978. Fine structure of human malaria in vitro. *J Protozool* 25, 443–452. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1978.tb04167.x>
- Lang-Unnasch, N., Murphy, A.D., 1998. Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host. *Annu Rev Microbiol* 52, 561–590. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.561>
- Lasonder, E., Treeck, M., Alam, M., Tobin, A.B., 2012. Insights into the *Plasmodium falciparum* schizont phosphoproteome. *Microbes Infect* 14, 811–819. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.04.008>
- Laurens, M.B., 2019. RTS,S/AS01 vaccine (MosquirixTM): an overview. *Hum Vaccin Immunother* 16, 480–489. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1669415>
- Lavazec, C., 2017. Molecular mechanisms of deformability of *Plasmodium* -infected erythrocytes. *Current Opinion in Microbiology* 40, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.011>
- Lavazec, C., Deplaine, G., Safeukui, I., Perrot, S., Milon, G., Mercereau-Puijalon, O., David, P.H., Buffet, P., 2013. Microspherulation: a microsphere matrix to explore erythrocyte deformability. *Methods Mol Biol* 923, 291–297. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-026-7_20

- Leiber, C., 2017. [Erectile dysfunction: Current diagnostics and treatment]. *Urologe A* 56, 519–529. <https://doi.org/10.1007/s00120-017-0355-y>
- Lell, B., Köhler, C., Wamola, B., Olola, C.H., Kivaya, E., Kokwaro, G., Wypij, D., Mithwani, S., Taylor, T.E., Kremsner, P.G., Newton, C.R., 2010. Pentoxifylline as an adjunct therapy in children with cerebral malaria. *Malar J* 9, 368. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-368>
- Leykauf, K., Treeck, M., Gilson, P.R., Nebl, T., Bräulke, T., Cowman, A.F., Gilberger, T.W., Crabb, B.S., 2010. Protein Kinase A Dependent Phosphorylation of Apical Membrane Antigen 1 Plays an Important Role in Erythrocyte Invasion by the Malaria Parasite. *PLoS Pathog* 6, e1000941. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000941>
- Linder, J.U., Engel, P., Reimer, A., Krüger, T., Plattner, H., Schultz, A., Schultz, J.E., 1999. Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-type ATPase-like domain in *Paramecium*, *Tetrahymena* and *Plasmodium*. *EMBO J* 18, 4222–4232. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.15.4222>
- Lohia, R., Guet, J.L., Berry, L., Guizouarn, H., Bernal, R., Cerdan, R., Abkarian, M., Douguet, D., Honoré, E., Wengelnik, K., 2021. Pharmacological activation of PIEZO1 in human red blood cells prevents *Plasmodium falciparum* invasion. <https://doi.org/10.1101/2021.05.28.446171>
- Looker, O., Blanch, A.J., Liu, B., Nunez-Iglesias, J., McMillan, P.J., Tilley, L., Dixon, M.W.A., 2019. The knob protein KAHRP assembles into a ring-shaped structure that underpins virulence complex assembly. *PLoS Pathog* 15, e1007761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007761>
- Lourido, S., Moreno, S.N.J., 2015. The calcium signaling toolkit of the Apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Cell Calcium* 57, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.12.010>
- Lu, F., Culleton, R., Cao, J., 2017. Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *N Engl J Med* 377, 306. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1705789>
- Luginbuehl, E., Ryter, D., Schranz-Zumkehr, J., Oberholzer, M., Kunz, S., Seebeck, T., 2010. The N Terminus of Phosphodiesterase TbrPDEB1 of *Trypanosoma brucei* Contains the Signal for Integration into the Flagellar Skeleton. *Eukaryot. Cell* 9, 1466–1475. <https://doi.org/10.1128/EC.00112-10>
- Lugnier, C., 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics* 109, 366–398. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.07.003>
- Luse, S.A., Miller, L.H., 1971. *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am J Trop Med Hyg* 20, 655–660.
- 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., Honore, E., Winzeler, E.A., Andersen, K.G., Patapoutian, A., 2018. Common PIEZO1 Allele in African Populations Causes RBC Dehydration and Attenuates *Plasmodium* Infection. *Cell* 173, 443–455.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.047>
- Maier, J.D., Siegfried, S., Gültekin, N., Stanga, Z., Baird, J.K., Grobusch, M.P., Schlagenhauf, P., 2021. Efficacy and safety of tafenoquine for malaria chemoprophylaxis (1998–2020): A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis* 39, 101908. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101908>
- Marra, A.M., Benjamin, N., Eichstaedt, C., Salzano, A., Arcopinto, M., Gargani, L., D'Alto, M., Argiento, P., Falsetti, L., Di Giosia, P., Isidori, A.M., Ferrara, F., Bossone, E., Cittadini, A., Grünig, E., 2016. Gender-related differences in pulmonary arterial hypertension targeted drugs administration. *Pharmacological Research* 114, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.018>
- Martin, R.E., 2020. The transportome of the malaria parasite. *Biological Reviews* 95, 305–332. <https://doi.org/10.1111/brv.12565>
- Masimirembwa, C.M., Hasler, J.A., Johansson, I., 1995. Inhibitory effects of antiparasitic drugs on cytochrome P450 2D6. *Eur J Clin Pharmacol* 48, 35–38. <https://doi.org/10.1007/BF00202169>
- Maw, G.N., Allerton, C.M.N., Gbekor, E., Million, W.A., 2003. Design, synthesis and biological activity of β -carboline-based type-5 phosphodiesterase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13, 1425–1428. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(03)00159-8)
- McCarthy, J.S., Abd-Rahman, A.N., Collins, K.A., Marquart, L., Griffin, P., Kümmel, A., Fuchs, A., Winnips, C., Mishra, V., Csermak-Renner, K., Jain, J.P., Gandhi, P., 2021. Defining the Antimalarial Activity of Cipargamin in Healthy Volunteers Experimentally Infected with Blood-Stage *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 65, e01423–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01423-20>
- McRobert, L., Taylor, C.J., Deng, W., Fivelman, Q.L., Cummings, R.M., Polley, S.D., Billker, O., Baker, D.A., 2008. Gametogenesis in Malaria Parasites Is Mediated by the cGMP-Dependent Protein Kinase. *PLoS Biol* 6, e139. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060139>

- Merckx, A., Nivez, M.-P., Bouyer, G., Alano, P., Langsley, G., Deitsch, K., Thomas, S., Doerig, C., Egée, S., 2008a. Plasmodium falciparum Regulatory Subunit of cAMP-Dependent PKA and Anion Channel Conductance. *PLoS Pathog* 4, e19. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040019>
- Merckx, A., Nivez, M.-P., Bouyer, G., Alano, P., Langsley, G., Deitsch, K., Thomas, S., Doerig, C., Egée, S., 2008b. Plasmodium falciparum Regulatory Subunit of cAMP-Dependent PKA and Anion Channel Conductance. *PLoS Pathog* 4, e19. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040019>
- Messina, V., Valtieri, M., Rubio, M., Falchi, M., Mancini, F., Mayor, A., Alano, P., Silvestrini, F., 2018. Gametocytes of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum Interact With and Stimulate Bone Marrow Mesenchymal Cells to Secrete Angiogenetic Factors. *Front Cell Infect Microbiol* 8, 50. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00050>
- Milanick, M.A., Hoffman, J.F., 1986. Ion Transport and Volume Regulation in Red Blood Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 488, 174–186. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb54402.x>
- Mills, J.P., Diez-Silva, M., Quinn, D.J., Dao, M., Lang, M.J., Tan, K.S.W., Lim, C.T., Milon, G., David, P.H., Mercereau-Puijalon, O., Bonnefoy, S., Suresh, S., 2007. Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cells harboring Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9213–9217. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703433104>
- Mohandas, N., Gallagher, P.G., 2008. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112, 3939–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Monteiro, W., Brito-Sousa, J.D., Elizalde-Torrent, A., Bôttto-Menezes, C., Melo, G.C., Fernandez-Becerra, C., Lacerda, M., del Portillo, H.A., 2020. Cryptic Plasmodium chronic infections: was Maurizio Ascoli right? *Malar J* 19, 440. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03516-x>
- Moon, R.W., Taylor, C.J., Bex, C., Schepers, R., Goulding, D., Janse, C.J., Waters, A.P., Baker, D.A., Billker, O., 2009. A Cyclic GMP Signalling Module That Regulates Gliding Motility in a Malaria Parasite. *PLoS Pathog* 5, e1000599. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000599>
- Moreno, S.N.J., Ayong, L., Pace, D.A., 2011. Calcium storage and function in apicomplexan parasites. *Essays Biochem* 51, 97–110. <https://doi.org/10.1042/bse0510097>
- Muhia, D.K., Swales, C.A., Eckstein-Ludwig, U., Saran, S., Polley, S.D., Kelly, J.M., Schaap, P., Krishna, S., Baker, D.A., 2003. Multiple splice variants encode a novel adenyl cyclase of possible plastid origin expressed in the sexual stage of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* 278, 22014–22022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301639200>
- Naissant, B., Dupuy, F., Duffier, Y., Lorthiois, A., Duez, J., Scholz, J., Buffet, P., Merckx, A., Bachmann, A., Lavazec, C., 2016. Plasmodium falciparum STEVOR phosphorylation regulates host erythrocyte deformability enabling malaria parasite transmission. *Blood* 127, e42–e53. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-690776>
- Namvar, A., Blanch, A.J., Dixon, M.W., Carmo, O.M.S., Liu, B., Tiash, S., Looker, O., Andrew, D., Chan, L., Tham, W., Lee, P.V.S., Rajagopal, V., Tilley, L., 2021. Surface area-to-volume ratio, not cellular viscoelasticity, is the major determinant of red blood cell traversal through small channels. *Cell Microbiol* 23, e13270. <https://doi.org/10.1111/cmi.13270>
- Nash, G.B., O'Brien, E., Gordon-Smith, E.C., Dormandy, J.A., 1989. Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by Plasmodium falciparum. *Blood* 74, 855–861.
- N'Dri, M.-E., Royer, L., Lavazec, C., 2021. Tadalafil impacts the mechanical properties of Plasmodium falciparum gametocyte-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 244, 111392. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2021.111392>
- Neher, E., Sakmann, B., 1976. Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J Physiol* 258, 705–729. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011442>
- Neveu, G., Lavazec, C., 2019. Erythrocyte Membrane Makeover by Plasmodium falciparum Gametocytes. *Front. Microbiol.* 10, 2652. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02652>
- Neveu, G., Richard, C., Dupuy, F., Behera, P., Volpe, F., Subramani, P.A., Marcel-Zerrougui, B., Vallin, P., Andrieu, M., Minz, A.M., Azar, N., Martins, R.M., Lorthiois, A., Gazeau, F., Lopez-Rubio, J.-J., Mazier, D., Silva, A.K.A., Satpathi, S., Wassmer, S.C., Verdier, F., Lavazec, C., 2020. Plasmodium falciparum sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis. *Blood* 136, 1381–1393. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004746>
- Ngotho, P., Soares, A.B., Hentzschel, F., Achcar, F., Bertuccini, L., Marti, M., 2019. Revisiting gametocyte biology in malaria parasites. *FEMS Microbiology Reviews* 43, 401–414. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz010>
- 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 *PIEZO1* is associated with protection from

- severe malaria in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 9074–9081. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919843117>
- Nguitragool, W., Bokhari, A.A.B., Pillai, A.D., Rayavara, K., Sharma, P., Turpin, B., Aravind, L., Desai, S.A., 2011. Malaria Parasite *clag3* Genes Determine Channel-Mediated Nutrient Uptake by Infected Red Blood Cells. *Cell* 145, 665–677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.002>
- Nofal, S.D., Patel, A., Blackman, M.J., Flueck, C., Baker, D.A., 2021. Plasmodium falciparum Guanylyl Cyclase-Alpha and the Activity of Its Appended P4-ATPase Domain Are Essential for cGMP Synthesis and Blood-Stage Egress. *mBio* 12, e02694-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02694-20>
- Oberholzer, M., Saada, E.A., Hill, K.L., 2015. Cyclic AMP Regulates Social Behavior in African Trypanosomes. *mBio* 6, e01954-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01954-14>
- Olivieri, A., Camarda, G., Bertuccini, L., van de Vegte-Bolmer, M., Luty, A.J.F., Sauerwein, R., Alano, P., 2009. The Plasmodium falciparum protein Pfg27 is dispensable for gametocyte and gamete production, but contributes to cell integrity during gametocytogenesis. *Mol Microbiol* 73, 180–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06762.x>
- Omori, K., Kotera, J., 2007. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 100, 309–327. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000256354.95791.f1>
- OMS | Chimio-prévention du paludisme saisonnier (CPS) [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/malaria/areas/preventive_therapies/children/fr/ (accessed 6.8.21).
- Ono, T., Cabrita-Santos, L., Leitao, R., Bettiol, E., Purcell, L.A., Diaz-Pulido, O., Andrews, L.B., Tadakuma, T., Bhanot, P., Mota, M.M., Rodriguez, A., 2008. Adenylyl Cyclase α and cAMP Signaling Mediate Plasmodium Sporozoite Apical Regulated Exocytosis and Hepatocyte Infection. *PLoS Pathog* 4, e1000008. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000008>
- Ottesen, E.A., Hooper, P.J., Bradley, M., Biswas, G., 2008. The global programme to eliminate lymphatic filariasis: health impact after 8 years. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e317. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000317>
- Pampiglione, S., Majori, G., Petrangeli, G., Romi, R., 1985. Avermectins, MK-933 and MK-936, for mosquito control. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79, 797–799. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(85\)90121-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(85)90121-x)
- Pantaleo, A., De Franceschi, L., Ferru, E., Vono, R., Turrini, F., 2010. Current knowledge about the functional roles of phosphorylative changes of membrane proteins in normal and diseased red cells. *J Proteomics* 73, 445–455. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.08.011>
- Patel, A., Perrin, A.J., Flynn, H.R., Bisson, C., Withers-Martinez, C., Treeck, M., Flueck, C., Nicastro, G., Martin, S.R., Ramos, A., Gilberger, T.W., Snijders, A.P., Blackman, M.J., Baker, D.A., 2019. Cyclic AMP signalling controls key components of malaria parasite host cell invasion machinery. *PLoS Biol* 17, e3000264. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000264>
- Perri, G.D., Perri, I.G.D., Monteiro, G.B., Bonora, S., Hennig, C., Cassatella, M., Micciolo, R., Vento, S., Dusi, S., Bassetti, D., Concia, E., 1995. Pentoxifylline as a Supportive Agent in the Treatment of Cerebral Malaria in Children. *The Journal of Infectious Diseases* 171, 1317–1322.
- Petrov, V., Fagard, R., Lijnen, P., 1998. Human erythrocytes contain Ca^{2+} , calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase which is involved in the hydrolysis of cGMP. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 20, 387–393. <https://doi.org/10.1358/mf.1998.20.5.485699>
- Pickford, A.K., Michel-Todó, L., Dupuy, F., Mayor, A., Alonso, P.L., Lavazec, C., Cortés, A., 2021. Expression Patterns of Plasmodium falciparum Clonally Variant Genes at the Onset of a Blood Infection in Malaria-Naive Humans. *mBio* 12, e0163621. <https://doi.org/10.1128/mBio.01636-21>
- Pinna, L.A., Ruzzene, M., 1996. How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim Biophys Acta* 1314, 191–225. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(96\)00083-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(96)00083-3)
- Plouffe, D.M., Wree, M., Du, A.Y., Meister, S., Li, F., Patra, K., Lubar, A., Okitsu, S.L., Flannery, E.L., Kato, N., Tanaseichuk, O., Comer, E., Zhou, B., Kuhen, K., Zhou, Y., Leroy, D., Schreiber, S.L., Scherer, C.A., Vinetz, J., Winzeler, E.A., 2016. High-Throughput Assay and Discovery of Small Molecules that Interrupt Malaria Transmission. *Cell Host & Microbe* 19, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.001>
- Pybus, B.S., Marcisin, S.R., Jin, X., Deye, G., Sousa, J.C., Li, Q., Caridha, D., Zeng, Q., Reichard, G.A., Ockenhouse, C., Bennett, J., Walker, L.A., Ohrt, C., Melendez, V., 2013. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar J* 12, 212. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-212>
- Ramdani, G., Naissant, B., Thompson, E., Breil, F., Lorthiois, A., Dupuy, F., Cummings, R., Duffier, Y., Corbett, Y., Mercereau-Puijalon, O., Vernick, K., Taramelli, D., Baker, D.A., Langsley, G., Lavazec, C., 2015. cAMP-Signalling Regulates Gametocyte-Infected Erythrocyte Deformability Required for Malaria Parasite Transmission. *PLoS Pathog* 11, e1004815. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004815>

- Ramharther, M., Noedl, H., Thimasarn, K., Wiedermann, G., Wernsdorfer, G., Wernsdorfer, W.H., 2002. In vitro activity of tafenoquine alone and in combination with artemisinin against *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 67, 39–43. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.39>
- Ranson, H., N'guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., Corbel, V., 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol* 27, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.08.004>
- Ruecker, A., Mathias, D.K., Straschil, U., Churcher, T.S., Dinglasan, R.R., Leroy, D., Sinden, R.E., Delves, M.J., 2014. A male and female gametocyte functional viability assay to identify biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 7292–7302. <https://doi.org/10.1128/AAC.03666-14>
- Ruiz, J.L., Gómez-Díaz, E., 2019. The second life of *Plasmodium* in the mosquito host: gene regulation on the move. *Brief Funct Genomics* 18, 313–357. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz007>
- Safeukui, I., Buffet, P.A., Deplaine, G., Perrot, S., Brousse, V., Ndour, A., Nguyen, M., Mercereau-Puijalon, O., David, P.H., Milon, G., Mohandas, N., 2012. Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen. *Blood* 120, 424–430. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-404103>
- Safeukui, I., Buffet, P.A., Deplaine, G., Perrot, S., Brousse, V., Sauvanet, A., Aussilhou, B., Dokmak, S., Couvelard, A., Cazals-Hatem, D., Mercereau-Puijalon, O., Milon, G., David, P.H., Mohandas, N., 2018. Sensing of red blood cells with decreased membrane deformability by the human spleen. *Blood Adv* 2, 2581–2587. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018024562>
- Safeukui, I., Buffet, P.A., Perrot, S., Sauvanet, A., Aussilhou, B., Dokmak, S., Couvelard, A., Hatem, D.C., Mohandas, N., David, P.H., Mercereau-Puijalon, O., Milon, G., 2013. Surface Area Loss and Increased Sphericity Account for the Splenic Entrapment of Subpopulations of *Plasmodium falciparum* Ring-Infected Erythrocytes. *PLoS One* 8, e60150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060150>
- Salazar, E., Bank, E.M., Ramsey, N., Hess, K.C., Deitsch, K.W., Levin, L.R., Buck, J., 2012. Characterization of *Plasmodium falciparum* Adenylyl Cyclase- β and Its Role in Erythrocytic Stage Parasites. *PLOS ONE* 7, e39769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039769>
- Salvi, F., Sarzani, R., Giorgi, R., Donatelli, G., Pietrucci, F., Micheli, A., Baldoni, M., Minaroli, D., Dessì-Fulgheri, P., Polito, M., Muzzonigro, G., Rappelli, A., 2004. Cardiovascular effects of sildenafil in hypertensive men with erectile dysfunction and different alleles of the type 5 cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Int J Impot Res* 16, 412–417. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901246>
- Sanyal, S., Egée, S., Bouyer, G., Perrot, S., Safeukui, I., Bischoff, E., Buffet, P., Deitsch, K.W., Mercereau-Puijalon, O., David, P.H., Templeton, T.J., Lavazec, C., 2012. *Plasmodium falciparum* STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties. *Blood* 119, e1–e8. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-370734>
- Saul, A., Graves, P., Edser, L., 1990. Refractoriness of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* gametocytes to lysis by sorbitol. *Int J Parasitol* 20, 1095–1097. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90056-s](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90056-s)
- Schmitt, E.K., Ndayisaba, G., Yeka, A., Asante, K.P., Grobusch, M.P., Karita, E., Mugerwa, H., Asimwe, S., Oduro, A., Fofana, B., Doumbia, S., Su, G., Csermak Renner, K., Venishetty, V.K., Sayyed, S., Straimer, J., Demin, I., Barsainya, S., Boulton, C., Gandhi, P., 2021. Efficacy of cipargamin (KAE609) in a randomized, Phase II dose-escalation study in adults in sub-Saharan Africa with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect Dis* ciab716. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab716>
- Seebeck, T., Sterk, G.J., Ke, H., 2011. Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiprotozoan drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite. *Future Medicinal Chemistry* 3, 1289–1306. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.77>
- Shakur, Y., Takeda, K., Kenan, Y., Yu, Z.X., Rena, G., Brandt, D., Houslay, M.D., Degerman, E., Ferrans, V.J., Manganiello, V.C., 2000. Membrane localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE3). Two N-terminal domains are required for the efficient targeting to, and association of, PDE3 with endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275, 38749–38761. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001734200>
- Sherling, E.S., Knuepfer, E., Brzostowski, J.A., Miller, L.H., Blackman, M.J., van Ooij, C., 2017. The *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RhopH3 plays essential roles in host cell invasion and nutrient uptake. *Elife* 6, e23239. <https://doi.org/10.7554/eLife.23239>
- Sherling, E.S., Knuepfer, E., Brzostowski, J.A., Miller, L.H., Blackman, M.J., van Ooij, C., n.d. The *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RhopH3 plays essential roles in host cell invasion and nutrient uptake. *eLife* 6, e23239. <https://doi.org/10.7554/eLife.23239>
- Siciliano, G., Santha Kumar, T.R., Bona, R., Camarda, G., Calabretta, M.M., Cevenini, L., Davioud-Charvet, E., Becker, K., Cara, A., Fidock, D.A., Alano, P., 2017. A high susceptibility to redox imbalance of the

- transmissible stages of *Plasmodium falciparum* revealed with a luciferase-based mature gametocyte assay. *Mol Microbiol* 104, 306–318. <https://doi.org/10.1111/mmi.13626>
- Sigala, P.A., Crowley, J.R., Henderson, J.P., Goldberg, D.E., n.d. Deconvoluting heme biosynthesis to target blood-stage malaria parasites. *eLife* 4, e09143. <https://doi.org/10.7554/eLife.09143>
- Silvestrini, F., Lasonder, E., Olivieri, A., Camarda, G., van Schaijk, B., Sanchez, M., Younis Younis, S., Sauerwein, R., Alano, P., 2010. Protein Export Marks the Early Phase of Gametocytogenesis of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics* 9, 1437–1448. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900479-MCP200>
- Sinden, R.E., 1982. Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: an electron microscopic study. *Parasitology* 84, 1–11. <https://doi.org/10.1017/s003118200005160x>
- Singh, L., Singh, K., 2021. Ivermectin: A Promising Therapeutic for Fighting Malaria. Current Status and Perspective. *J Med Chem* 64, 9711–9731. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00498>
- Sinha, A., Hughes, K.R., Modrzyńska, K.K., Otto, T.D., Pfander, C., Dickens, N.J., Religa, A.A., Bushell, E., Graham, A.L., Cameron, R., Kafsack, B.F.C., Williams, A.E., Llinas, M., Berriman, M., Billker, O., Waters, A.P., 2014. A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature* 507, 253–257. <https://doi.org/10.1038/nature12970>
- Sissoko, A., Vásquez-Ocmín, P., Maciuk, A., Barbieri, D., Neveu, G., Rondepierre, L., Grougnet, R., Leproux, P., Bland, M., Hammad, K., Michel, S., Lavazec, C., Clain, J., Houzé, S., Duval, R., 2020. A Chemically Stable Fluorescent Mimic of Dihydroartemisinin, Artemether, and Arteether with Conserved Bioactivity and Specificity Shows High Pharmacological Relevance to the Antimalarial Drugs. *ACS Infect Dis* 6, 1532–1547. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00430>
- Slater, H.C., Foy, B.D., Kobylinski, K., Chaccour, C., Watson, O.J., Hellewell, J., Aljayyousi, G., Bousema, T., Burrows, J., D'Alessandro, U., Alout, H., Ter Kuile, F.O., Walker, P.G.T., Ghani, A.C., Smit, M.R., 2020. Ivermectin as a novel complementary malaria control tool to reduce incidence and prevalence: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases* 20, 498–508. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30633-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30633-4)
- Smalley, M.E., Abdalla, S., Brown, J., 1981. The distribution of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75, 103–105. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90019-5)
- Smith, A.S., Nowak, R.B., Zhou, S., Giannetto, M., Gokhin, D.S., Papoin, J., Ghiran, I.C., Blanc, L., Wan, J., Fowler, V.M., 2018. Myosin IIA interacts with the spectrin-actin membrane skeleton to control red blood cell membrane curvature and deformability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E4377–E4385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718285115>
- Smith, W.B., McCaslin, I.R., Gokce, A., Mandava, S.H., Trost, L., Hellstrom, W.J., 2013. PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence: PDE5 inhibitors. *International Journal of Clinical Practice* 67, 768–780. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12074>
- Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M.M., Semblat, J.-P., Dorin-Semblat, D., Reininger, L., Bottrill, A.R., Mistry, S., Abdi, A., Fennell, C., Holland, Z., Demarta, C., Bouza, Y., Sicard, A., Nivez, M.-P., Eschenlauer, S., Lama, T., Thomas, D.C., Sharma, P., Agarwal, S., Kern, S., Pradel, G., Graciotti, M., Tobin, A.B., Doerig, C., 2011. Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* 2, 565. <https://doi.org/10.1038/ncomms1558>
- Spillman, N.J., Allen, R.J.W., McNamara, C.W., Yeung, B.K.S., Winzeler, E.A., Diagana, T.T., Kirk, K., 2013. Na(+) regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* involves the cation ATPase PfATP4 and is a target of the spiroindolone antimalarials. *Cell Host Microbe* 13, 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.006>
- Suárez-Cortés, P., Sharma, V., Bertuccini, L., Costa, G., Bannerman, N.-L., Sannella, A.R., Williamson, K., Klemba, M., Levashina, E.A., Lasonder, E., Alano, P., 2016. Comparative Proteomics and Functional Analysis Reveal a Role of *Plasmodium falciparum* Osmiophilic Bodies in Malaria Parasite Transmission. *Mol Cell Proteomics* 15, 3243–3255. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.060681>
- Suárez-Cortés, P., Silvestrini, F., Alano, P., 2014. A fast, non-invasive, quantitative staining protocol provides insights in *Plasmodium falciparum* gamete egress and in the role of osmiophilic bodies. *Malar J* 13, 389. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-389>
- Tan, M.S.Y., Blackman, M.J., 2021. Malaria parasite egress at a glance. *J Cell Sci* 134, jcs257345. <https://doi.org/10.1242/jcs.257345>
- Tanabe, K., Mikkelsen, R.B., Wallach, D.F., 1982. Calcium transport of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes. *J Cell Biol* 93, 680–684. <https://doi.org/10.1083/jcb.93.3.680>

- Taylor, C.J., McRobert, L., Baker, D.A., 2008a. Disruption of a *Plasmodium falciparum* cyclic nucleotide phosphodiesterase gene causes aberrant gametogenesis. *Molecular Microbiology* 69, 110–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06267.x>
- Taylor, C.J., McRobert, L., Baker, D.A., 2008b. Disruption of a *Plasmodium falciparum* cyclic nucleotide phosphodiesterase gene causes aberrant gametogenesis. *Mol. Microbiol.* 69, 110–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06267.x>
- Taylor, H.M., McRobert, L., Grainger, M., Sicard, A., Dluzewski, A.R., Hopp, C.S., Holder, A.A., Baker, D.A., 2010. The Malaria Parasite Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase Plays a Central Role in Blood-Stage Schizogony. *Eukaryot Cell* 9, 37–45. <https://doi.org/10.1128/EC.00186-09>
- Thylefors, B., 2008. The Mectizan Donation Program (MDP). *Ann Trop Med Parasitol* 102 Suppl 1, 39–44. <https://doi.org/10.1179/136485908X337481>
- Tibúrcio, M., Niang, M., Deplaine, G., Perrot, S., Bischoff, E., Ndour, P.A., Silvestrini, F., Khattab, A., Milon, G., David, P.H., Hardeman, M., Vernick, K.D., Sauerwein, R.W., Preiser, P.R., Mercereau-Puijalon, O., Buffet, P., Alano, P., Lavazec, C., 2012. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood* 119, e172–180. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-414557>
- Tibúrcio, M., Silvestrini, F., Bertuccini, L., Sander, A.F., Turner, L., Lavstsen, T., Alano, P., 2013. Early gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. *Cellular Microbiology* 15, 647–659. <https://doi.org/10.1111/cmi.12062>
- Tiffert, T., Lew, V.L., Ginsburg, H., Krugliak, M., Croisille, L., Mohandas, N., 2005. The hydration state of human red blood cells and their susceptibility to invasion by *Plasmodium falciparum*. *Blood* 105, 4853–4860. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4948>
- Toenhake, C.G., Fraschka, S.A.-K., Vijayabaskar, M.S., Westhead, D.R., van Heeringen, S.J., Bártfai, R., 2018. Chromatin Accessibility-Based Characterization of the Gene Regulatory Network Underlying *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Development. *Cell Host Microbe* 23, 557–569.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.007>
- Tosteson, D.C., Hoffman, J.F., 1960. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J Gen Physiol* 44, 169–194. <https://doi.org/10.1085/jgp.44.1.169>
- Trager, W., Gill, G.S., 1992. Enhanced gametocyte formation in young erythrocytes by *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Protozool* 39, 429–432. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1992.tb01476.x>
- Trempe, A.Z., Dessens, J.T., 2011. Malaria IMC1 membrane skeleton proteins operate autonomously and participate in motility independently of cell shape. *J Biol Chem* 286, 5383–5391. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187195>
- Tu, Y., 2011. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med* 17, 1217–1220. <https://doi.org/10.1038/nm.2471>
- van Pelt-Koops, J.C., Pett, H.E., Graumans, W., van der Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G.J., Rottmann, M., Yeung, B.K.S., Diagana, T.T., Sauerwein, R.W., 2012. The spiroindolone drug candidate NITD609 potentially inhibits gametocytogenesis and blocks *Plasmodium falciparum* transmission to anophelous mosquito vector. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 3544–3548. <https://doi.org/10.1128/AAC.06377-11>
- Wadi, I., Nath, M., Anvikar, A.R., Singh, P., Sinha, A., 2019. Recent advances in transmission-blocking drugs for malaria elimination. *Future Medicinal Chemistry* 11, 3047–3088. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0225>
- Wang, G.-H., Gamez, S., Raban, R.R., Marshall, J.M., Alpey, L., Li, M., Rasgon, J.L., Akbari, O.S., 2021. Combating mosquito-borne diseases using genetic control technologies. *Nat Commun* 12, 4388. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24654-z>
- Wang, H., Kunz, S., Chen, G., Seebeck, T., Wan, Y., Robinson, H., Martinelli, S., Ke, H., 2012. Biological and Structural Characterization of *Trypanosoma cruzi* Phosphodiesterase C and Implications for Design of Parasite Selective Inhibitors*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 11788–11797. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.326777>
- Warncke, J.D., Passecker, A., Kipfer, E., Brand, F., Pérez-Martínez, L., Proellocks, N.I., Kooij, T.W.A., Butter, F., Voss, T.S., Beck, H.-P., 2020. The PHIST protein GEXP02 targets the host cytoskeleton during sexual development of *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol* 22, e13123. <https://doi.org/10.1111/cmi.13123>
- Wechsler, J., Choi, Y.-H., Krall, J., Ahmad, F., Manganiello, V.C., Movsesian, M.A., 2002. Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 277, 38072–38078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203647200>

- Weißbach, T., Goltmann, A., Bennink, S., Pradel, G., Julius Ngwa, C., 2017. Transcript and protein expression analysis of proteases in the blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol* 180, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.03.006>
- Wentzinger, L., Bopp, S., Tenor, H., Klar, J., Brun, R., Beck, H.P., Seebeck, T., 2008. Cyclic nucleotide-specific phosphodiesterases of *Plasmodium falciparum*: PfPDE α , a non-essential cGMP-specific PDE that is an integral membrane protein. *International Journal for Parasitology* 38, 1625–1637. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.05.016>
- White, N.J., 2013. Primaquine to prevent transmission of *falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis* 13, 175–181. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70198-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70198-6)
- Wickramasinghe, S.N., Phillips, R.E., Looareesuwan, S., Warrell, D.A., Hughes, M., 1987. The bone marrow in human cerebral malaria: parasite sequestration within sinusoids. *Br J Haematol* 66, 295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1987.tb06913.x>
- Wilde, M.-L., Triglia, T., Marapana, D., Thompson, J.K., Kouzmitchev, A.A., Bullen, H.E., Gilson, P.R., Cowman, A.F., Tonkin, C.J., 2019. Protein Kinase A Is Essential for Invasion of *Plasmodium falciparum* into Human Erythrocytes. *mBio* 10, e01972-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01972-19>
- Williams, J.L., 1999. Stimulation of *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis by conditioned medium from parasite cultures. *Am J Trop Med Hyg* 60, 7–13. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.7>
- Wisniewski, J., Acosta, A., Kolaczinski, J., Koenker, H., Yukich, J., 2020. Systematic review and meta-analysis of the cost and cost-effectiveness of distributing insecticide-treated nets for the prevention of malaria. *Acta Trop* 202, 105229. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105229>
- World malaria report 2020 [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240015791> (accessed 9.16.21).
- Yahiya, S., Saunders, C.N., Straschil, U., Fischer, O.J., Rueda-Zubiaurre, A., Haase, S., Vizcay-Barrena, G., Jordan, S., Hassan, S., Delves, M.J., Tate, E.W., Barnard, A., Fuchter, M.J., Baum, J., 2021. *Plasmodium falciparum* protein Pfs16 is a target for transmission-blocking antimalarial drug development. <https://doi.org/10.1101/2021.06.14.448287>
- Yuasa, K., Mi-Ichi, F., Kobayashi, T., Yamanouchi, M., Kotera, J., Kita, K., Omori, K., 2005. PfPDE1, a novel cGMP-specific phosphodiesterase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Journal* 392, 221–229. <https://doi.org/10.1042/BJ20050425>
- Yuda, M., Ishino, T., 2004. Liver invasion by malarial parasites--how do malarial parasites break through the host barrier? *Cell Microbiol* 6, 1119–1125. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00474.x>
- Zarychanski, R., Schulz, V.P., Houston, B.L., Maksimova, Y., Houston, D.S., Smith, B., Rinehart, J., Gallagher, P.G., 2012. Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood* 120, 1908–1915. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-422253>
- Zhang, R., Suwanarusk, R., Malleret, B., Cooke, B.M., Nosten, F., Lau, Y.-L., Dao, M., Lim, C.T., Renia, L., Tan, K.S.W., Russell, B., 2016. A Basis for Rapid Clearance of Circulating Ring-Stage Malaria Parasites by the Spiroindolone KAE609. *J Infect Dis* 213, 100–104. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv358>
- Zoraghi, R., Kunz, S., Gong, K., Seebeck, T., 2001. Characterization of TbPDE2A, a novel cyclic nucleotide-specific phosphodiesterase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 276, 11559–11566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005419200>
- Zoraghi, R., Seebeck, T., 2002. The cAMP-specific phosphodiesterase TbPDE2C is an essential enzyme in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 4343–4348. <https://doi.org/10.1073/pnas.062716599>

Annexes

A. Poster : Tadalafil clears gametocytes from blood circulation in humanized mice Malaria Parasitology Meeting Wood Holes 2019

Tadalafil clears *Plasmodium falciparum* gametocytes from blood circulation in humanized mice

N'Dri Marie-Esther¹, Barbieri Daniela¹, Gomez Lina¹, Dupuy Florian¹, Franetich Jean-François², Mazier Dominique², Moreno-Sabater Alicia², Lavazec Catherine¹

¹ Inserm U1016, Institut Cochin, CNRS UMR8104, Université de Paris, Paris, France ; ² Sorbonne Université - INSERM U1135, CNRS ERL 8255, CIMI, Paris, France

SUMMARY

A switch in mechanical properties of the infected erythrocyte between the immature and mature gametocyte stages has been reported as a marker of the final step of *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis¹. This mechanism is controlled by intracellular levels of cAMP which determine the rigidity status of the infected erythrocyte². We have shown that phosphodiesterase (PDE) inhibitors increase the stiffness of mature gametocyte-infected erythrocytes (GIE) and impair their circulation in an *in vitro* model for splenic retention³. These findings suggest that PDE inhibitors may promote gametocytes elimination by the spleen, however they have never been confirmed *in vivo*.

Here, we show that the inhibition of cAMP degradation with Tadalafil, an approved drug used to treat erectile disorder, significantly increases the stiffness of mature GIE in a dose-dependent manner. We also found that retention rates of mature GIE are comparable in the *in vitro* spleen mimic and in immunodeficient mice injected with purified GIE, thus indicating that these mice are a relevant *in vivo* model to validate our previous *in vitro* results. Using flow cytometry, qRT-PCR and bioluminescence imaging, we observed that after a single GIE injection in immunodeficient mice, stiff gametocytes are retained in the spleen and the kinetics of gametocytes clearance are significantly faster when GIE are pre-incubated *in vitro* with Tadalafil. In a model of humanized mice infected with *P. falciparum*, which allows the complete development of the erythrocytic cycle till mature gametocytes stages, Tadalafil-treated mice cleared mature GIE at a higher rate than in untreated mice. Overall, these results indicate that Tadalafil treatment clear mature gametocytes from blood circulation *in vivo*.

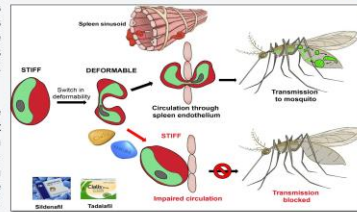
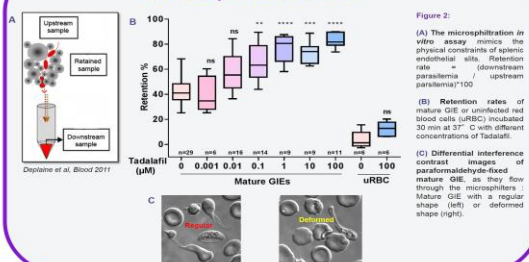
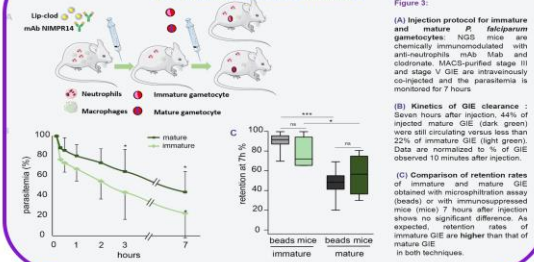


Figure 1: The deformability of mature GIE allows them to circulate across the spleen endothelium and persist in the blood circulation. We propose that increasing mature GIE stiffness with PDE inhibitors may block their circulation through the spleen.

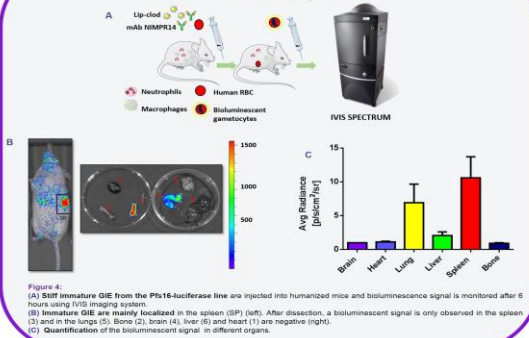
Tadalafil triggers gametocyte retention in microspiltration *in vitro*



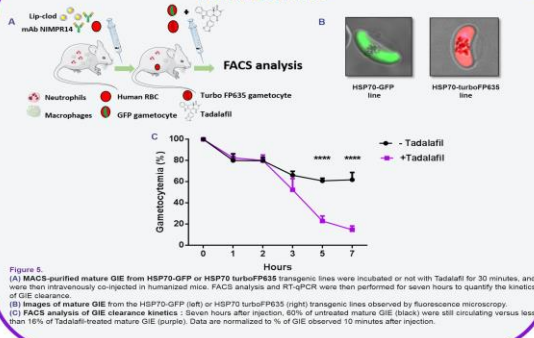
Gametocyte retention is comparable in microspilters and immunodeficient mice



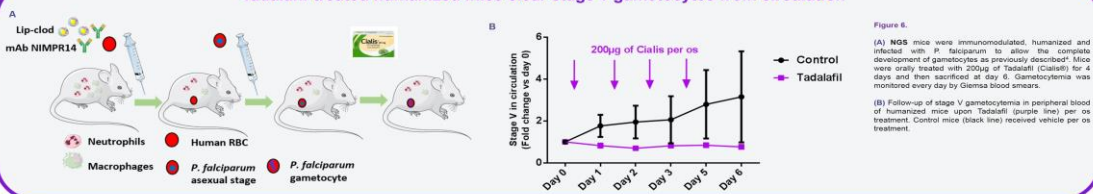
Stiff gametocytes are retained in the humanized mice spleen



Tadalafil triggers gametocyte retention in humanized mice



Tadalafil-treated humanized mice clear stage v gametocytes from circulation



References

- Tabrizi et al. 2012. « A Switch in Infected Erythrocyte Deformability at the Maturation and Blood Circulation of *Plasmodium falciparum* Transmission Stages ». *Blood*
- Remoin et al. 2015. « cAMP-Signaling Regulates Gametocyte-Induced Erythrocyte Deformability Required for Malaria Parasite Transmission ». *PLoS Pathogens*
- Deplaine et al. 2011. « The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked *in vitro* ». *Blood*
- Duflot et al. 2016. « A humanized mouse model for separation of *Plasmodium falciparum* sexual stages and *in vivo* evaluation of gametocytocidal drugs ». *Schroeder reports*

B. Communication orale congrès GR-ex 2020

Targeting erythrocyte mechanical properties to block malaria parasite transmission

N'Dri Marie-Esther^{1,3}, Marteau Anthony¹, Khodabux Nabiha¹, Ludivine Royer¹, Brier Lucile², Deprez Benoît², Charton Julie², Lavazec Catherine^{1,3}

¹ Inserm U1016, Institut Cochin, CNRS, UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France

² Unité 1177 - Inserm, Université Lille 2, Institut Pasteur de Lille

³ Laboratory of Excellence GR-Ex

The sexual stages of *Plasmodium falciparum*, called gametocytes, are responsible for parasite transmission from humans to mosquitoes. Our team has shown that the mechanical properties of gametocyte-infected erythrocytes (GIE) change during gametocyte development: a gain in deformability occurs between the immature and the mature stages, whereas the permeability of the GIE gradually decreases along gametocyte maturation. These changes allow the infected erythrocyte to circulate across the spleen and to decrease its osmotic fragility, and thereby persist in the bloodstream for several days. These mechanisms are regulated by the intracellular levels of cAMP that are controlled by the parasite Phosphodiesterase delta (PfPDE δ). Therefore, targeting mature GIE with PDE inhibitors may interrupt parasite transmission by increasing both erythrocyte membrane stiffness and permeability. Here, using microsphiltration and isosmotic lysis assays, we have shown that PDE inhibitors such as tadalafil reduce mature GIE deformability and increase their permeability. In order to generate a parasite-specific treatment, we propose to modify the tadalafil structure to engineer out its effect on human targets. Preliminary results indicate that the first tested tadalafil analogues significantly affect mature GIE deformability and permeability, suggesting that they specifically inhibit PfPDE δ activity. Further optimization of these compounds are expected to lead to a new transmission-blocking drug-candidate with a novel mechanism of action

C. Publications en collaboration

- Bouyer G, Barbieri D, Dupuy F, Marteau A, Sissoko A, **N'Dri ME**, Neveu G, Bedault L, Khodabux N, Roman D, Houzé S, Siciliano G, Alano P, Martins RM, Lopez-Rubio JJ, Clain J, Duval R, Egée S, Lavazec C. ***Plasmodium falciparum sexual parasites regulate infected erythrocyte permeability.*** **Communications Biology**
- Andrade C, Fleckenstein H, Thomson-Luque R, Doumbo S, Lima N, Anderson C, Hibbert J, Hopp C, Tran T, Li S, Niangaly M, Doumtabe D, Skinner J, Sturdevant D, Ricklefs S, Virtaneva K, Asghar M, Homann M, Turner L, Martins J, Allman E, **N'Dri ME**, Llinás M, Lavazec C, Martens C, Farnert A, Kayentao K, Ongoiba A, Lavstsen T, Osório N, Otto T, Recker M, Traore B, Crompton P, Portugal S. ***Plasmodium falciparum increased time in circulation underlies persistent asymptomatic infection in the dry season.*** **Nature Medicine**

ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01454-7>

OPEN

Plasmodium falciparum sexual parasites regulate infected erythrocyte permeability

Guillaume Bouyer^{1,2,7}, Daniela Barbieri^{2,3,7}, Florian Dupuy^{2,3}, Anthony Marteau^{2,3}, Abdoulaye Sissoko^{2,4}, Marie-Esther N'Dri^{2,3}, Gaëlle Neveu^{2,3}, Laurianne Bedault^{2,3}, Nabiha Khodabux^{2,3}, Diana Roman^{2,4}, Sandrine Houzé^{2,4}, Giulia Siciliano⁵, Pietro Alano⁵, Rafael M. Martins⁶, Jose-Juan Lopez-Rubio⁶, Jérôme Clain^{2,4}, Romain Duval^{2,4}, Stéphane Egée^{1,2,8} & Catherine Lavazec^{2,3,8}✉

To ensure the transport of nutrients necessary for their survival, *Plasmodium falciparum* parasites increase erythrocyte permeability to diverse solutes. These new permeation pathways (NPPs) have been extensively characterized in the pathogenic asexual parasite stages, however the existence of NPPs has never been investigated in gametocytes, the sexual stages responsible for transmission to mosquitoes. Here, we show that NPPs are still active in erythrocytes infected with immature gametocytes and that this activity declines along gametocyte maturation. Our results indicate that NPPs are regulated by cyclic AMP (cAMP) signaling cascade, and that the decrease in cAMP levels in mature stages results in a slowdown of NPP activity. We also show that NPPs facilitate the uptake of artemisinin derivatives and that phosphodiesterase (PDE) inhibitors can reactivate NPPs and increase drug uptake in mature gametocytes. These processes are predicted to play a key role in *P. falciparum* gametocyte biology and susceptibility to antimalarials.

¹Sorbonne Université, CNRS UMR 8227, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France. ²Laboratoire d'excellence GR-Ex, Paris, France. ³Université de Paris, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris, France. ⁴Université de Paris, IRD 261, MERIT, Paris, France. ⁵Istituto Superiore di Sanita, Roma, Italy. ⁶Université de Montpellier 1 & 2, CNRS 5290, IRD 224, MIVEGEC, Montpellier, France. ⁷These authors contributed equally: Guillaume Bouyer, Daniela Barbieri. ⁸These authors jointly supervised this work: Stéphane Egée, Catherine Lavazec. ✉email: catherine.lavazec@inserm.fr

Malaria remains a major public health problem with more than 200 million cases and almost half a million deaths annually. The clinical symptoms of malaria are attributed to *Plasmodium* asexual stages, whereas parasite transmission from humans to mosquitoes relies on the gametocytes, the specialized sexual cells formed by a fraction of parasites which cease asexual propagation. *Plasmodium falciparum* gametocyte maturation requires about ten days, and is classically divided into five developmental stages based upon morphological features¹. If eradication of malaria obviously requires compounds targeting asexual stages, transmission remains the Achilles heel of the strategies implemented today². However, most antimalarial drugs target the asexual stages, but they are less effective against gametocytes^{3,4}. As a consequence, infected individuals remain a source of transmission even after they are cured. It remains unclear why gametocytes become less sensitive to artemisinin as their maturation progresses from stage I to stage V. Thus, understanding the biology of gametocyte development within erythrocytes is crucial for successful malaria elimination.

Following *P. falciparum* invasion, the infected erythrocyte displays important alterations of its membrane properties. For instance, asexual parasites increase erythrocyte permeability to diverse solutes to ensure the transport of nutrients and waste products necessary for their replication and survival. Mature asexual parasites activate weakly selective anion channels in the erythrocyte membrane to generate new permeability pathways (NPPs) that render infected erythrocytes more permeable to a range of nutrients^{5,6} and to several antimalarials^{7–10}. Key proteins involved in NPPs have been characterized, like parasitic proteins CLAG3/RhopH1, RhopH2 and RhopH3 or endogenous constituent of the peripheral-type benzodiazepine receptor^{11–14}. However, the full identity of the NPPs has never been conclusively established¹⁵. Although their regulatory mechanisms also remain unclear, cyclic AMP (cAMP)/Protein Kinase A (PKA) pathway seems to play a key part in regulating ion channels in the membrane of erythrocytes infected with asexual stages¹⁶. Despite the vital role of NPPs in asexual stages, the level of NPP activity in gametocyte-infected erythrocytes (GIE) is unknown, nor is the role of NPPs in antimalarial uptake by GIE. Refractoriness of GIE to lysis upon short exposure to isosmotic sorbitol solution has led to the dogma that NPPs are totally absent in gametocyte stages¹⁷. However, this assumption is not supported by the fact that during their 10-day maturation, gametocytes also need to absorb nutrients from the plasma and get rid of toxic waste products they generate upon hemoglobin digestion, two major roles of NPPs at asexual stages. In addition, the absence of NPPs in GIE is not consistent with the expression profile of members of the RhopH complex that are synthesized in mature intracellular parasites and then secreted upon egress onto the erythrocyte targeted for invasion^{18,19}. Therefore, all known NPP components should be present at the surface of newly invaded GIE.

In this study, we performed isosmotic lysis, electrophysiology, fluorescence tracer uptake and viability experiments to evaluate NPP activity during *P. falciparum* gametocytogenesis. We found that NPP activity is regulated by the cycling AMP signaling cascade, and interfering with this pathway can reactivate erythrocyte permeability and facilitate uptake of artemisinin derivatives by mature gametocytes.

Results

NPPs are still active in immature gametocytes. To evaluate the NPP activity in GIE, we first performed measurements of isosmotic lysis of immature GIE in sorbitol, a sugar alcohol permeant through NPPs⁶. Sorbitol uptake was drastically reduced in

stage II GIE compared to trophozoites and schizonts; however, about 36% GIE were lysed after 60 min in sorbitol, suggesting that erythrocyte permeability is modified by immature gametocytes (Fig. 1a). Lysis kinetics in stage II GIE were similar to that of late rings 16 h post-invasion, when NPPs start to be expressed during the asexual cycle²⁰. GIE lysis was significantly inhibited by the general anion channel inhibitors 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) and furosemide, by the benzodiazepine Ro5-4864 and the isoquinoline PK11195, which have all been shown to inhibit NPPs (Fig. 1b)^{11,21}. Equivalent lysis kinetics observed in alanine or phenyltrimethylammonium (PhTMA⁺) isosmotic solutions, with a slightly greater lysis in PhTMA⁺ than in sorbitol, confirmed that uptake occurred through NPPs (Fig. 1c). Measurement of membrane currents using whole-cell patch-clamp strengthened observations obtained with isosmotic lysis. Quantification of total ion fluxes across the host membrane of individual infected erythrocytes indicated that membrane conductance at -100 mV was sixfold lower in stage II GIE than in trophozoites (Fig. 1d and Supplementary Fig. S1). However, conductance in early GIE showed anion selectivity, inward rectification and NPPB sensitivity (Fig. 1e and Supplementary Fig. S1), which are three fundamental characteristics of the correlate membrane currents of NPP activity²². These observations are consistent with detection of the NPP component RhopH2¹² in immature GIE by immunostaining (Supplementary Fig. S1). Pharmacological inhibition of NPPs is expected to lead to nutrient starvation and accumulation of toxic metabolic wastes eventually leading to parasite death. Thus, we measured viability of early gametocytes (stages I–II) upon NPPs inhibition by using a luciferase-based assay with a transgenic parasite expressing luciferase under the control of the gametocyte-specific promoter *Pfs16*²³. We observed a slight but significant decrease in early gametocytes viability 48 h after a 3-h exposure to $100 \mu\text{M}$ NPPB, consistent with a vital role of NPP activity (Fig. 1f). Fewer transition to later stages gametocytes after exposure to NPPB was also quantified by Giemsa staining (Supplementary Fig. S1). Therefore, organic solute uptake, patch-clamp and viability studies indicate that NPPs are weaker than in trophozoites but are still active and necessary in early GIE.

NPPs decline along gametocytogenesis. To further analyze the evolution of this permeability along gametocytogenesis, we performed isosmotic lysis experiments in sorbitol, alanine and PhTMA⁺ for synchronous cultures of stage I, II, III, IV, and V gametocytes (Fig. 2a–c). A transgenic parasite expressing GFP under the control of the *Pfs16* promoter was used to discriminate stage I gametocytes from asexual stages²⁴. From stage I to stage V, we observed a progressive decrease in permeability for the three different solutes, leading to undetectable NPP activity in mature GIE. Electrophysiological experiments using whole-cell configuration performed on GIE from all stages confirmed that membrane conductance drops along gametocyte maturation, leading to currents in mature GIE corresponding to levels usually recorded in uninfected erythrocytes (Fig. 2d and Supplementary Fig. S2). Altogether, these data indicate that NPP activity declines along gametocytogenesis.

NPP activity is regulated by cAMP-signaling. We then aimed to determine the mechanisms underlying the regulation of NPP activity in GIE. We have previously observed that cAMP/PKA pathway activates ion channels in the membrane of erythrocytes infected with asexual stages¹⁶, suggesting that cAMP-signaling may also modulate NPPs during gametocytogenesis. To address this hypothesis, we performed sorbitol lysis experiments on early GIE preincubated with KT5720 and H89, two independent and

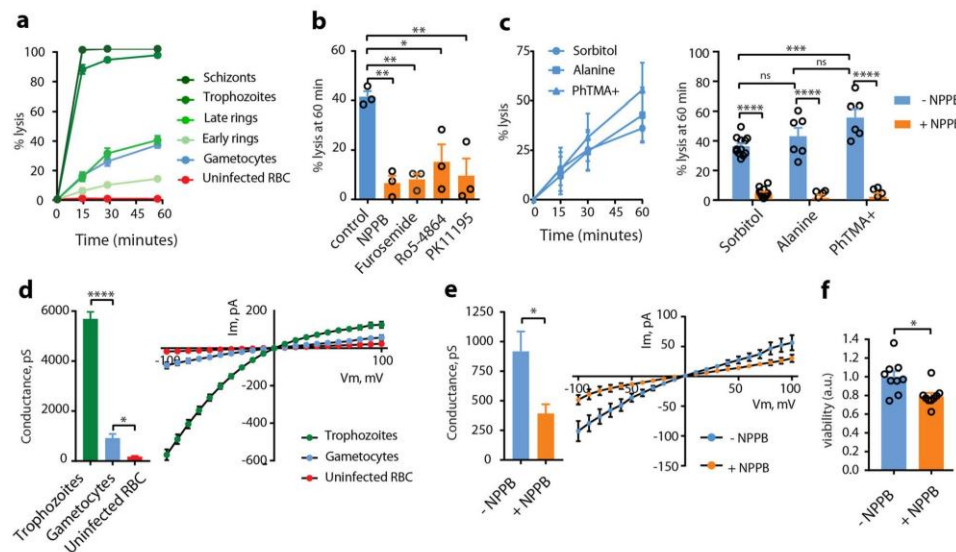


Fig. 1 NPPs are still active in immature gametocytes. **a** Kinetics of sorbitol-induced isosmotic lysis of erythrocytes infected with early rings (4 h post-invasion (hpi)), late rings (16 hpi), trophozoites (28 hpi), schizonts (40 hpi), stage II gametocytes and uninfected erythrocytes during 60 min. $n = 3$ independent experiments. **b** % lysis of stage II GIE in sorbitol at 60 min with or without 100 μ M NPPB, Furosemide, Ro5-4864, or PK11195. **c** Lysis kinetics (left) and % lysis at 60 min (right) of stage II GIE in sorbitol, alanine or PhTMA⁺. **d** Patch-clamp experiments on erythrocytes infected with trophozoites, (green bar, number of cells = 14), stage II gametocytes (blue bar, number of cells = 14) or uninfected erythrocytes (red bar, number of cells = 11). Left: whole-cell conductance calculated at -100 mV. Right: I–V plot from patch-clamp experiments. **e** Patch-clamp experiments on stage II GIE in presence or absence of NPPB (number of cells = 14 and 5, respectively). Left: whole-cell conductance calculated at -100 mV. Right: I–V plot from patch-clamp experiments. **f** Viability (luciferase activity) of early gametocytes of the NF54-cg6-pfs16-CBG99 line 48 h after a 3-h incubation with or without 100 μ M NPPB. The graph shows relative viability normalized by the average luciferase activity of control (without NPPB). a.u. arbitrary units. In (**b**, **c**, **f**), circles indicate the number of cells = 14 and 5, respectively. In (**d**, **e**), the data distribution is shown in Supplementary Fig. S1. Error bars show the standard error of the mean (SEM). Statistical significance is determined by a Mann–Whitney test (**d–f**) or by one-way ANOVA with Dunnett correction (**b**) or Sidak correction (**c**) for multiple comparisons. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: non-significant difference.

widely used PKA inhibitors that have already been shown to inhibit PKA activity in *P. falciparum*^{25,26}. We found that both compounds ablated GIE permeability (Fig. 3a), whereas the cAMP analog 8-Bromide-cyclic adenosine-monophosphate (8Br-cAMP) significantly increased the sorbitol-induced lysis (Fig. 3b). As an alternative way to investigate the effects of inhibiting PKA activity, we used a transgenic parasite that overexpresses the regulatory subunit of PKA using an episome selected by the antimalarial drug pyrimethamine (pHLpfkar)^{16,26}. The down-regulation of PKA activity in this parasite line also resulted in a significant decrease in permeability of early GIE (Fig. 3c). This phenotype was reverted to the levels of wild-type parasites upon incubation with 8Br-cAMP, or in a revertant parasite line that has shed the overexpressing episome²⁶ (Fig. 3c). We observed a similar inhibition of alanine- or PhTMA⁺-induced isosmotic lysis of stage II GIE for the pHLpfkar line (Supplementary Fig. S3). These results indicate that PKA activity contributes to NPPs in immature GIE, as described for asexual stages¹⁶.

These observations suggest that the decline in NPP activity during gametocytogenesis likely results from the previously described drop in cAMP concentration in GIE due to the rising expression of PfPDE δ in mature gametocytes²⁶. Thus, we hypothesized that interfering with cAMP pathway with molecules that raise cAMP levels may turn on NPP activity in stage V GIE. As expected, raising cAMP levels in mature GIE upon incubation

with 8Br-cAMP or with the PDE inhibitors sildenafil and tadalafil restored the sorbitol-induced lysis to the levels observed in early GIE, whereas tadalafil did not trigger any significant effect in early GIE (Fig. 3d, e and Supplementary Fig. S4). Consistently, the loss of PDE activity in a transgenic parasite in which the *PfPde δ* gene had been deleted²⁷ also resulted in a drastic increase in permeability of mature GIE (Fig. 3f and Supplementary Fig. S3). These findings show that activating the cAMP/PKA pathway can reactivate NPPs in mature stages.

NPPs contribute to the uptake of artemisinin derivatives by immature GIE. *P. falciparum* mature gametocytes are known to become less sensitive to several antimalarials, including artemisinin derivatives, as their maturation progresses from stage I to stage V^{28,29}. Although lower metabolic activity and complete hemoglobin digestion in mature stages have been suggested to contribute to this decrease in chemosensitivity^{4,30}, we hypothesized that this decrease may also be linked to the decline of host membrane permeability during gametocyte maturation. To address this hypothesis, we first evaluated whether NPP activity is required for uptake of artemisinin derivatives by immature GIE. For this purpose, we used Fluo-DHA, a fluorescent probe mimicking the clinical antimalarials dihydroartemisinin (DHA) and artemether³¹. This probe was synthesized from DHA and a 4-nitrobenzoxadiazole (NBD) fluorophore (Supplementary

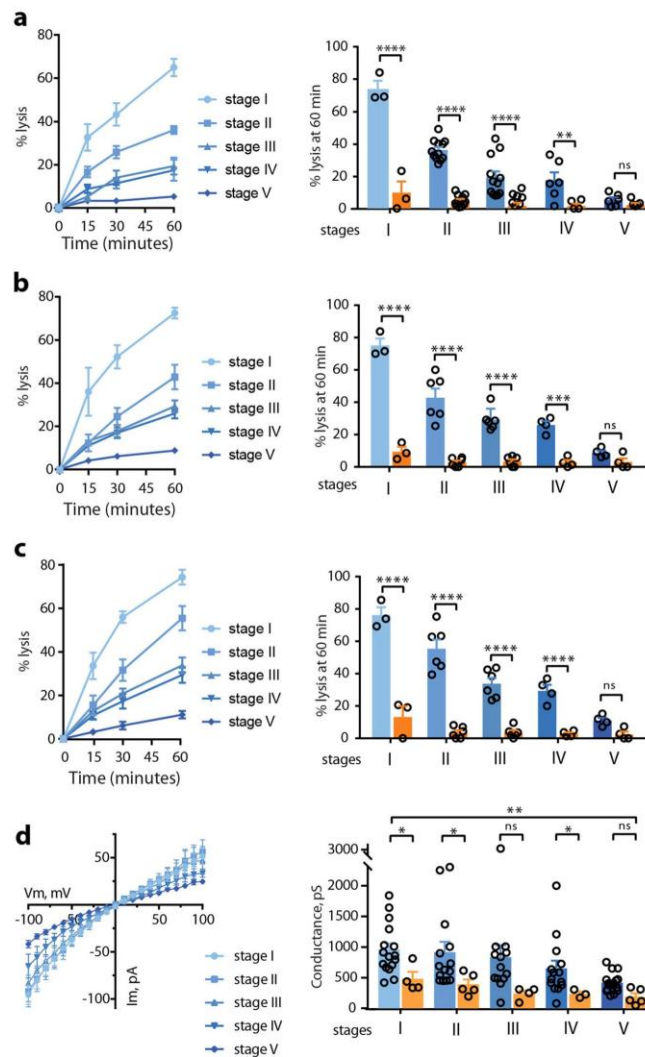


Fig. 2 NPPs decline along gametocytogenesis. **a–c** Sorbitol-induced (**a**), alanine-induced (**b**) and PhTMA⁺-induced (**c**) isosmotic lysis of GIE from stage I to stage V. Left: Kinetics of isosmotic lysis during 60 min. Right: % lysis at 60 min with (orange) or without (blue) 100 μM NPPB. Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. Statistical significance is determined by one-way ANOVA with Sidak correction for multiple comparisons. **d** Left: I–V plot from patch experiments on GIE from stage I to stage V. Right: Whole-cell conductance calculated at –100 mV on GIE from stage I to stage V with (orange) or without (blue) 100 μM NPPB. Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. Statistical significance is determined by a Mann–Whitney test at each gametocyte stage and by ANOVA test for trend between stage 1 and stage 5, $p = 0.0013$, slope -134.7 ± 40.03 pS/stage transition. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: non-significant difference.

Fig. S5). First, we validated that Fluo-DHA was detectable in the gametocyte cytoplasm after 2 h incubation and exhibited anti-plasmodial activity against early gametocytes as assessed by a luciferase-based viability assay (Supplementary Fig. S5). Flow cytometry quantification showed that Fluo-DHA was taken up by stage II GIE, whereas uninfected erythrocytes were all negative (Fig. 4a, b and Supplementary Fig. S6). The pharmacological

specificity of this probe was validated by a competition assay with an excess of DHA (Fig. 4c). Importantly, preincubation with the NPP inhibitors NPPB and furosemide induced a significant decrease in the mean fluorescence intensity, indicating that Fluo-DHA uptake is partly mediated by NPPs in early GIE (Fig. 4d). About 50% of fluorescence remained upon NPPB treatment, suggesting that Fluo-DHA uptake may also partly occur by

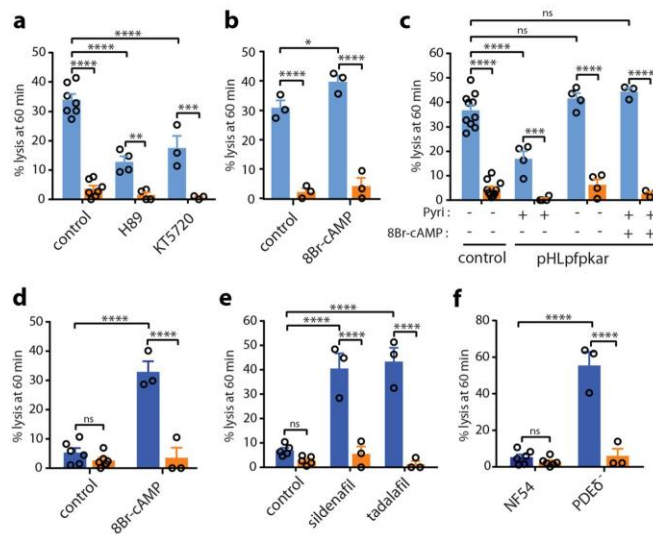


Fig. 3 NPP activity is regulated by cAMP-signaling. a, b Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage II GIE with 100 μM H89 or 10 μM KT5720 (**a**), or with 100 μM 8Br-cAMP (**b**). **c** Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage II GIE from the NF54 isolate (Control) and the transgenic pHLpfpkar line, cultivated with or without pyrimethamine (Pyri), or preincubated with 100 μM 8Br-cAMP. **d, e** Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage V GIE with 100 μM 8Br-cAMP (**d**), sildenafil (**e**) or tadalafil (**e**). **f** Sorbitol-induced isosmotic lysis of stage V gametocytes from the NF54 isolate and the transgenic line PDE6^{-/-}. All experiments were performed in the presence (orange) or absence (blue) of 100 μM NPPB. Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. Statistical significance is determined by one-way ANOVA with Sidak correction for multiple comparisons. *****p* < 0.0001, ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05, ns: non-significant difference.

diffusion through the erythrocyte membrane or by another route. Moreover, the viability at 48 h of early GIE following a 3-h pulse exposure to 150 nM Fluo-DHA or 700 nM artemisinin was slightly but significantly increased upon preincubation with NPPB, suggesting that NPP inhibition impacts the transport of these antimalarials into the infected erythrocytes (Fig. 4e). These results indicate that NPPs facilitate the uptake of artemisinin derivatives, and substantiate the idea that the slowdown of NPP activity in mature stages may account for their refractoriness to these drugs. To address this hypothesis, we evaluated Fluo-DHA uptake in synchronous cultures of stage II, III, IV, and V gametocytes. As observed for the decline in NPP activity, Fluo-DHA uptake also decreased during gametocyte maturation (Fig. 4f and Supplementary Fig. S6). The mean fluorescence intensity in GIE slowed down in stage III and reached the same level as that of NPPB-treated cells in stage V GIE. This profile is consistent with the increased IC₅₀ of Fluo-DHA in mature gametocytes (Supplementary Fig. S5) and correlates with the previously described chemosensitivity shift occurring at the transition from stage III to stage IV^{28,32}. Therefore, the decline in NPP activity and in drug uptake along gametocytogenesis parallels the decrease in gametocytes sensitivity to several antimalarials^{4,28}. Although we cannot rule out that the decrease in Fluo-DHA activity in mature stages reflects the slowdown of hemoglobin breakdown required for the activation of artemisinin³³, our results provide evidence that NPPs significantly contribute to the uptake of artemisinin derivatives in GIE.

cAMP-mediated reactivation of NPPs increases uptake of artemisinin. Next, we analyzed whether the uptake of artemisinin derivatives is also regulated by cAMP-signaling. In early GIE, we

observed that both pharmacological and genetic inhibition of PKA activity decreased the mean fluorescence intensity of Fluo-DHA in treated cells (Fig. 4g, h), suggesting that PKA activity facilitates Fluo-DHA uptake in immature GIE. Thus, we hypothesized that a reactivation of NPP activity in mature GIE may increase their susceptibility to these drugs. First, we addressed whether activating the cAMP pathway may enhance drug uptake by stage V GIE. Preincubation of mature GIE with the PDE inhibitors sildenafil and tadalafil strongly increased the mean fluorescence intensity of Fluo-DHA in treated cells, reaching the level observed in early GIE (Fig. 4i and Supplementary Fig. S7). The uptake of Fluo-DHA by mature GIE was significantly increased with 10 μM tadalafil, which approximately corresponds to tenfold the reported peak serum concentration reached in humans after 60 min following 20 mg oral dose (*C*_{max} 378 ng/ml)³⁴. As expected, preincubation of stage II GIE with tadalafil did not trigger any significant effect (Supplementary Fig. S7). To investigate the gametocytocidal effect of combining PDE inhibitors and artemisinin, we performed a gamete egress assay based on the ability of functionally viable mature gametocytes to undergo a temperature-dependent release of gametes from their host erythrocytes³⁵. We observed that the incubation of mature GIE with a combination of 5 μM artemisinin and 30 μM tadalafil drastically reduced the proportion of egressed gametes compared to tadalafil or artemisinin alone, indicating that phosphodiesterase inhibitors potentiate the effect of artemisinin in mature gametocytes (Fig. 4j). Therefore, these results show that cAMP-mediated reactivation of NPPs in mature stages enhances the uptake of artemisinin, and importantly this mechanism can increase mature gametocyte sensitivity to this antimalarial.

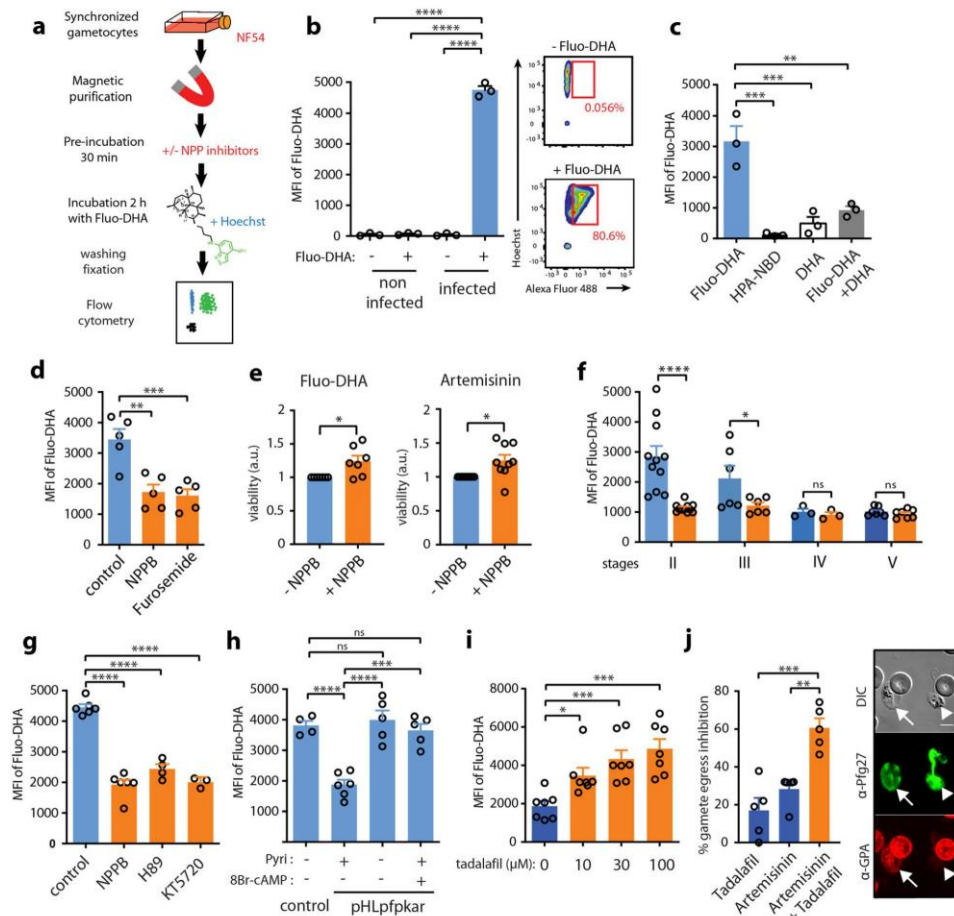


Fig. 4 NPPs contribute to the uptake of artemisinin derivatives. **a** Diagram illustrating the uptake assay. **b** Left: Quantification of Fluo-DHA uptake in uninfected erythrocytes and in early GIE by flow cytometry. Right: scatter plots showing the gating strategy for Fluo-DHA uptake. **c** Competition assay between Fluo-DHA and DHA, and control of HPA-NBD and DHA-induced fluorescence levels. **d** Inhibition of Fluo-DHA uptake in early GIE upon 100 μM NPPB or Furosemide incubation. **e** Viability (luciferase activity) of early gametocytes of the NF54-cg6-pfs16-CBG99 line 48 h after a 3-h incubation with 150 nM Fluo-DHA or 5 μM artemisinin, with or without 100 μM NPPB. The graph shows the ratio of luciferase activity (drug-treated/control) and is normalized to the condition without NPPB. a.u. arbitrary units. **f** Quantification of Fluo-DHA uptake during gametocytogenesis with (orange) or without (blue) 100 μM NPPB. **g** Fluo-DHA uptake in early GIE upon 100 μM H89 or 10 μM KT5720 incubation. **h** Fluo-DHA uptake in early GIE from NF54 (Control) and the transgenic pHLpfpkar line, cultivated with or without pyrimethamine (Pyri), or preincubated with 100 μM 8Br-cAMP. **i** Fluo-DHA uptake in stage V GIE upon 0, 10, 30 and 100 μM tadafafil incubation. **j** Left: % inhibition of gamete egress after a 24-h incubation with 5 μM artemisinin, with or without 30 μM tadafafil. Right: gamete egress observed by IFAs. Samples were co-stained with mouse anti-glycophorin A (GPA, red) and rabbit anti-Pfg27 (green) IgG. DIC differential interference contrast. Arrow: mature GIE with an intact erythrocyte membrane, arrowhead: egressed gamete. Scale bars: 5 μm. Circles indicate the number of independent experiments and error bars show the SEM. Statistical significance is determined by one-way ANOVA with Dunnett correction (**b–d, g, i**) or with Sidak correction (**f, h, j**) for multiple comparisons or by a Mann–Whitney test (**e**). **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: non-significant difference.

Discussion

It has been known for long that *P. falciparum* asexual stages modify their host erythrocyte to make them more permeable to supplementary nutrient uptake from the plasma and for removal of toxic waste by activating NPPs in the erythrocyte membrane. In this study we unravel how these NPPs are regulated during

sexual parasite development and we propose that activating these pathways may facilitate artemisinin uptake by mature gametocytes. Our results raise a new model (Fig. 5) where NPP activity in immature GIE depends on the PKA-mediated phosphorylation of one or several proteins directly or indirectly involved in channel activity. According to this model, NPPs contribute to the uptake

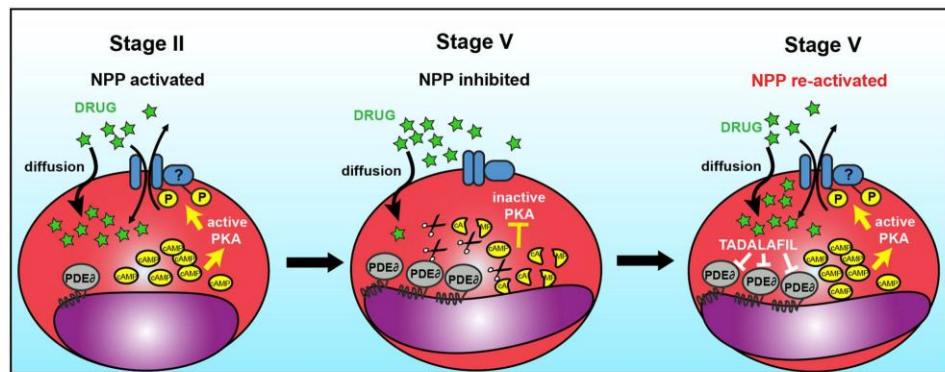


Fig. 5 Model for cAMP-mediated regulation of NPP activity. Left: In early GIE, PfPDE δ expression is low, resulting in high cAMP levels in the parasitophorous vacuole and in the host cell, thereby activating the human PKA. PKA phosphorylates one or several proteins directly or indirectly involved in NPP activity that contributes to the uptake of drugs. Middle: In mature GIE, PfPDE δ is highly expressed and degrades cAMP, leading to a decrease in PKA phosphorylation and NPP activity. Right: In mature GIE, inhibition of PfPDE δ by tadalafil results in increased levels of cAMP that reactivate PKA and NPPs, thereby restoring uptake of drugs.

of artemisinin and derivatives by immature GIE. Then in mature GIE, PfPDE δ , whose catalytic domain is predicted to be exposed outwards of the parasite³⁶, is highly expressed and degrades cAMP²⁶. The resulting drop of cAMP level in the parasitophorous vacuole and in the host cell may reduce the phosphorylation of these proteins and consequently decrease NPP activity and drug uptake. Importantly, pharmacological inhibition of PfPDE δ can reactivate NPP activity and restore uptake of artemisinin derivatives by mature gametocytes, leading to an increased susceptibility to these drugs. Altogether these results show that *P. falciparum* gametocytes regulate infected erythrocyte permeability and that this permeability may facilitate uptake of some antimalarials.

Our results showing that NPPs are still active in immature GIE contradict the paradigm that NPP activity is abolished in sexual stages. This dogma was based on a single study showing refractoriness of GIE to lysis upon short exposition to isosmotic sorbitol solution¹⁷. In contrast, our data report that GIE were lysed after longer exposition to sorbitol, indicating the presence, although slower than in trophozoites, of NPP activity in immature GIE. In support of the existence of NPPs in sexual stages, recent RNA sequencing analyzes highlighted that sexually committed parasites show higher transcription of *RhopH* and *clag* genes³⁷, whose products are involved in NPP activity^{12–14}. These observations suggest that members of the RhopH complex synthesized in sexually committed parasites may be discharged upon egress onto the membrane of the erythrocyte targeted for invasion, within which a gametocyte will develop. Accordingly, our data show the presence of at least one member of the RhopH complex in GIE. This hypothesis would be consistent with the fact that gametocytes should absorb nutrients from the extracellular medium, such as panthotenate or isoleucine, for which NPPs is the major route²¹. In addition, NPPs have been proposed to play a role in exporting amino acids liberated by the digestion of hemoglobin from the infected erythrocyte, thereby protecting the cell against the osmotic challenge posed by elevated intracellular amino acid levels²⁰. Thus, the slowdown of NPP activity in mature GIE may result from the completion of hemoglobin digestion in these stages³⁸. Absence of channel activity in mature stages may allow the infected erythrocyte to decrease its osmotic

fragility and thus to persist longer in the blood circulation. This process appears to be tightly regulated by cAMP-signaling pathway, as previously observed for asexual stages¹⁶. These results are in accordance with the detection of CLAG3/RhopH1, one of the major component of NPPs, in a global phosphoproteomic analysis of *P. falciparum* parasites³⁹. As part of the cAMP-signaling cascade, the PfPDE δ enzyme, whose expression increases in mature gametocytes²⁶, plays an instrumental role in the NPP decline. Interestingly, this enzyme has also been reported to govern the switch in GIE deformability that enables mature gametocytes to circulate several days in the bloodstream and avoid clearance by the spleen^{26,40,41}. Therefore, by decreasing GIE osmotic fragility and increasing GIE deformability, PfPDE δ appears to be the key regulator of mature gametocytes persistence in the blood circulation. Importantly, our present work suggests that targeting this enzyme with the FDA-approved drug tadalafil may enhance artemisinin uptake by mature gametocytes, thereby decreasing their refractoriness to this antimalarial.

As PDE inhibitors also render mature GIE rigid and hence may promote their clearance by the spleen²⁶, they represent novel drug leads potentially capable of blocking malaria transmission by impacting on both gametocytes circulation and susceptibility to artemisinin derivatives.

Methods

Parasite culturing and gametocyte production. The *P. falciparum* NF54 strain, the B10 clone and the transgenic lines pH1pfpkar, PfPDE δ , NF54-cg6-pfs16-CBG99 and NF54-pfs47-pfs16-GFP have been described elsewhere^{16,25,27,42}. Parasites were cultivated in vitro under standard conditions using RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated human serum and human erythrocytes at a 5% hematocrit. To obtain synchronous asexual stages, parasites were synchronized by the isolation of schizonts by magnetic isolation using a MACS depletion column (Miltenyi Biotec) in conjunction with a magnetic separator, and placed back into culture. After invasion of merozoites, a second magnetic isolation was used for the selection of ring-stage parasites to obtain a tighter window of synchronization. Synchronous production of specific gametocytes stages was achieved by treating synchronized cultures at the ring stage (10–15% parasitemia, day 0) with 50 mM N-acetylglucosamine (NAG) for 5 days to eliminate asexual parasites. Gametocyte preparations were enriched in different experiments by magnetic isolation. Stage I GIE were collected at day 1 after initiating NAG treatment, stage II GIE were collected at days 2 and 3, stage III GIE were collected

at days 4 and 5, stage IV GIE were collected at days 6 and 7, and stage V GIE were collected at day 8 onwards.

Isosmotic lysis. 500 μ l of *P. falciparum* cultures (containing gametocytes or asexual stages) with a parasitemia >0.5% were washed once with RPMI and incubated in 1.5 ml tubes for 60 min at 37 °C in 500 μ l isosmotic solution containing either 300 mM sorbitol, 300 mM Alanine or 150 mM PhTMA⁺ supplemented with 10 mM Hepes, 5 mM glucose and with a pH adjusted to 7.4. For each experiment, five tubes were prepared including one tube containing 100 μ M NPPB, Furosemide, Ro5-4864, or PK11195 (all purchased from Sigma-Aldrich). At each sampling time, one tube was centrifuged and smears were prepared and stained with Giemsa R solution (RAL diagnostics). Parasitemia was estimated for each point by counting infected cells out of at least 4000 erythrocytes, and lysis percentage was calculated using the formula: % lysis (t) = $[1 - (\text{parasitemia } (t) / \text{parasitemia } (t_0))] \times 100$.

Microscopy examination of Giemsa-stained smears allowed to morphologically confirm that only gametocytes, but not contaminating asexual parasites, were counted. The percentage of stage I GIE was determined using the NF54-pfs47-pfs16-GFP line²⁴ by fluorescence microscopy at $\times 40$ magnification on a Leica DMi8 microscope. Addressing the role of cAMP-signaling in isosmotic lysis, stage II GIE (days 2 and 3 post NAG treatment) were preincubated 30 min with 100 μ M H89, 10 μ M KT5720 or 100 μ M 8Br-cAMP, and mature GIE (days 8–11 post NAG treatment) were preincubated 30 min with tadalafil or sildenafil at different concentrations (from 10 to 100 μ M). All inhibitors were purchased from Sigma-Aldrich or Euromedex.

For standard semi-quantitative isosmotic lysis assays on uninfected erythrocytes, hemoglobin release was used to estimate lysis. Erythrocytes were washed three times in culture medium without serum and resuspended at 50% hematocrit. Time courses started with the addition of a 10 μ l packed cells suspension to 1 ml of the sorbitol isosmotic solution. Experiments were performed in triplicate. At predetermined intervals (0, 15, 30, 60 min), microcentrifuge tubes were centrifuged for 30 s and 200 μ l of the supernatant solution was transferred into 96-well plates for spectrophotometric estimation of hemoglobin concentration by absorption at a wavelength of 540 nm (A540). In all experiments, the A540 value corresponding to full hemolysis of erythrocytes was estimated from the final A540 value achieved in the supernatant solution from a suspension where 5 μ l of Triton X-100 is added. Data analyses were carried out as previously described.

Patch-clamp. Patch-clamp experiments were performed at room temperature using the whole-cell configuration. Pipettes were pulled using a DMZ Universal Puller (Zeitz Instruments, Germany) from borosilicate glass capillaries (GC150F-10, Harvard apparatus, UK) to obtain a tip resistance of 10–15 M Ω . Pipette solution was: 145 mM KCl, 1.85 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 5 mM ethylene glycol- β -aminoethyl ether-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 10 mM Hepes, 10 mM, pH 7.2. Bath solution was: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 10 mM glucose, pH 7.4. Seal resistance were 4–20 G Ω , and whole-cell configuration was obtained by a brief electrical pulse (zap) and was assessed by the development of small capacitance transient currents and reduction of access resistance. Whole-cell current were recorded using either an Axopatch 200B (Molecular Devices, USA) or a RK400 (Biologic, France) amplifier, with voltage command protocols and current analysis done with pClamp10 suite software (Molecular Devices, USA) or WinWCP4.7 software (J. Dempster, Strathclyde University, UK), respectively. Currents were elicited by generating a series of membrane potentials from +100 to –100 mV in –10-mV steps for 500 ms, from a holding potential of 0 mV. For stage I GIE, the gametocyte fluorescent NF54-pfs47-pfs16-GFP line²⁴ was used to easily distinguish by microscopy between asexual and early sexual stages.

Fluorescence microscopy. To visualize the uptake of Fluo-DHA, GIE were incubated 2 h with Fluo-DHA or dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.1% at 37 °C. Cells were stained with Hoechst 33342 (1/20,000, Thermo Fisher Scientific) for 10 min at 37 °C. After one wash with phosphate-buffered-saline (PBS) 1 $\times$, cells were fixed for 10 min at room temperature with 1% paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy Science) and 0.25% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS 1 $\times$. After three washes with PBS 1 $\times$, infected cells were observed on a glass slide at $\times 100$ magnification using a Leica DMi8 microscope.

For immunofluorescence analysis, smears were prepared with NF54 culture containing immature GIE and asexual stages. Slides were air-dried, fixed for 5 min in 75% acetone/25% methanol at –20 °C, washed three times in PBS, preincubated for 2 h in 1 $\times$ PBS/2% bovine serum albumin, incubated overnight with a mouse antibody directed against RhopH2 (1/50)⁴³ and then 1 h with a rabbit antibody raised against the Pf11-1 protein (1/5,000)⁴⁴. Then, slides were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (1/2,000), Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse antibody (1/2,000) and Hoechst 33342 (1/20,000) (Thermo Fisher) for 1 h at room temperature. All samples were observed at $\times 100$ magnification using a Leica DMi8 microscope. The RhopH2-specific mouse serum was obtained from C. Braun-Breton and the Pf11-1-specific rabbit serum was obtained from O. Mercereau-Pujalon.

Quantification of Fluo-DHA uptake assay. The synthesis of the Fluo-DHA probe was described in Sissoko et al.³¹. Quantification of Fluo-DHA uptake was performed using flow cytometry. GIE were preincubated or not with 100 μ M NPPB or with 100 μ M Furosemide for 30 min and then incubated with 1 μ M of Fluo-DHA for 2 h at 37 °C, 5% CO₂ and 5% O₂. To address the role of cAMP-signaling in Fluo-DHA uptake, early GIE (day 2 post NAG treatment) were preincubated 30 min with 100 μ M H89, 10 μ M KT5720 or 100 μ M 8Br-cAMP, and mature GIE (days 8–11 post NAG treatment) were preincubated 30 min with tadalafil or sildenafil at different concentrations (from 10 to 100 μ M). To assess the specificity of Fluo-DHA uptake, early GIE were preincubated or not with 20 μ M DHA for 2 h and then incubated with Fluo-DHA (1 μ M) for 2 h. DHA alone (20 μ M) and HPA-NBD (1 μ M) were used as control. Twenty minutes before the end of incubation, GIE were stained with Hoechst 33342 (1/10,000). Cells were then washed with PBS 1 $\times$ and fixed for 10 min at room temperature with PBS, 1% PFA and 0.25% glutaraldehyde. The percentage of Fluo-DHA-positive cells was quantified using Fortessa (BD Biosciences) cytometer.

Gametocyte survival assay. To calculate the IC₅₀ for Fluo-DHA on early or mature gametocytes, 2×10^5 MACS-purified early GIE (day 2 post NAG treatment) or mature GIE (days 8–11 post NAG treatment) from the NF54-cg6-Pfs16-CBG99 line were incubated with serial dilutions of Fluo-DHA for 3 h, then GIE were washed and incubated with complete medium without drugs for 72 h. To perform viability assays with drugs and inhibitors, early GIE were preincubated at 37 °C for 30 min with 100 μ M NPPB or 0.1% DMSO in complete medium and then incubated with the same inhibitors supplemented with 700 nM or 5 μ M artemisinin (Sigma-Aldrich), 150 nM Fluo-DHA or 0.1% DMSO for 3 h. GIE were then washed and incubated with complete medium without inhibitors and drugs for 48 h. Cell viability was evaluated by adding a non-lysing formulation of 0.5 mM D-Luciferin substrate²³ (Sigma-Aldrich) and measuring luciferase activity for 1 s on a plate Reader Infinite 200 PRO (Tecan®). All experiments were performed in triplicate on 96-well plates.

Gamete egress assay. NF54 cultures containing 2–5% stage V gametocytes were incubated for 24 h at 37 °C with 5 μ M artemisinin supplemented or not with 30 μ M tadalafil. Controls comprising gametocytes exposed to the same final concentration of DMSO (0.1%) were processed in parallel. After the incubation, 100 μ l samples from each condition were pelleted at 1000 $\times$ g for 1 min and rapidly resuspended in 50 μ l human serum at room temperature for 30 min during which gametogenesis took place. Samples were then pelleted at 1000 $\times$ g for 1 min, smeared on glass slides, methanol-fixed and co-stained with mouse anti-glycophorin A (GPA, 1/1000, Santa Cruz Biotechnology) and rabbit anti-Pf27⁴⁵ (1/2000) followed by anti-rabbit Alexa 488- and anti-mouse Alexa 594-conjugated IgG (1/2000, Life Technologies). Samples were observed at $\times 100$ magnification using a Leica DMi8. At least 100 GIE were analyzed for each sample. Percent gamete egress was determined by calculating the % of GPA-negative round gametes in the total GIE population detected by Pf27 staining.

Statistics and reproducibility. Group data are presented as mean $\pm$ s.e.m. Statistics for all datasets were performed using GraphPad Prism. Statistical significance is determined by one-way ANOVA with Dunnett correction or with Sidak correction for multiple comparisons or by a Mann–Whitney test or paired t test. Sample sizes and replicate details are described in the relevant figure descriptions.

Data availability

All experimental data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files: Supplementary Information and Source Data).

Received: 7 February 2020; Accepted: 30 October 2020;
Published online: 01 December 2020

References

- Hawking, F., Wilson, M. E. & Gammage, K. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **65**, 549–559 (1971).
- mal, E. R. A. R. C. Po. Tm. E. malERA: an updated research agenda for diagnostics, drugs, vaccines, and vector control in malaria elimination and eradication. *PLoS Med.* **14**, e1002455 (2017).
- Birkholtz, L. M., Coetzer, T. L., Mancama, D., Leroy, D. & Alano, P. Discovering new transmission-blocking antimalarial compounds: challenges and opportunities. *Trends Parasitol.* **32**, 669–681 (2016).
- Plouffe, D. M. et al. High-throughput assay and discovery of small molecules that interrupt malaria transmission. *Cell Host Microbe* **19**, 114–126 (2016).

5. Desai, S. A., Bezrukov, S. M. & Zimmerberg, J. A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature* **406**, 1001–1005 (2000).
6. Ginsburg, H., Krugliak, M., Eidelman, O. & Cabantchik, Z. I. New permeability pathways induced in membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **8**, 177–190 (1983).
7. Baumeister, S. et al. Fosmidomycin uptake into *Plasmodium* and *Babesia*-infected erythrocytes is facilitated by parasite-induced new permeability pathways. *PLoS ONE* **6**, e19334 (2011).
8. Biagini, G. A. et al. Heme binding contributes to antimalarial activity of bis-quaternary ammoniums. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2584–2589 (2003).
9. Dana, S. et al. Potent antimalarial activity of acriflavine in vitro and in vivo. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2366–2373 (2014).
10. Stead, A. M. et al. Diamidine compounds: selective uptake and targeting in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharm.* **59**, 1298–1306 (2001).
11. Bouyer, G. et al. Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood* **118**, 2305–2312 (2011).
12. Counihan, N. A. et al. *Plasmodium falciparum* parasites deploy RhopH2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate. *Elife* **6**, e23217 (2017).
13. Nguitragool, W. et al. Malaria parasite clag3 genes determine channel-mediated nutrient uptake by infected red blood cells. *Cell* **145**, 665–677 (2011).
14. Sherling, E. S. et al. The *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RhopH3 plays essential roles in host cell invasion and nutrient uptake. *Elife* **6**, e23239 (2017).
15. Gilson, P. R., Chisholm, S. A., Crabb, B. S. & de Koning-Ward, T. F. Host cell remodelling in malaria parasites: a new pool of potential drug targets. *Int. J. Parasitol.* **47**, 119–127 (2017).
16. Merckx, A. et al. *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog.* **4**, e19 (2008).
17. Saul, A., Graves, P. & Edser, L. Refractoriness of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* gametocytes to lysis by sorbitol. *Int. J. Parasitol.* **20**, 1095–1097 (1990).
18. Kaneko, O. et al. The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the clag multigene family in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **118**, 223–231 (2001).
19. Kaneko, O. et al. Apical expression of three RhopH1/Clag proteins as components of the *Plasmodium falciparum* RhopH complex. *Mol. Biochem. Parasitol.* **143**, 20–28 (2005).
20. Kirk, K., Zhang, J. & Ginsburg, H. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**, 249–256 (2002).
21. Kirk, K., Horner, H. A., Elford, B. C., Ellory, J. C. & Newbold, C. I. Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J. Biol. Chem.* **269**, 3339–3347 (1994).
22. Staines, H. M. et al. Electrophysiological studies of malaria parasite-infected erythrocytes: current status. *Int. J. Parasitol.* **37**, 475–482 (2007).
23. Cevenini, L. et al. Multicolor bioluminescence boosts malaria research: quantitative dual-color assay and single-cell imaging in *Plasmodium falciparum* parasites. *Anal. Chem.* **86**, 8814–8821 (2014).
24. Neveu, G. et al. *Plasmodium falciparum* sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis. *Blood* **136**, 1381–1393 (2020).
25. Leykauf, K. et al. Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. *PLoS Pathog.* **6**, e1000941 (2010).
26. Ramdani, G. et al. cAMP-signalling regulates gametocyte-infected erythrocyte deformability required for malaria parasite transmission. *PLoS Pathog.* **11**, e1004815 (2015).
27. Taylor, C. J., McRobert, L. & Baker, D. A. Disruption of a *Plasmodium falciparum* cyclic nucleotide phosphodiesterase gene causes aberrant gametogenesis. *Mol. Microbiol.* **69**, 110–118 (2008).
28. Lucantoni, L., Fidock, D. A. & Avery, V. M. Luciferase-based, high-throughput assay for screening and profiling transmission-blocking compounds against *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 2097–2107 (2016).
29. Delves, M. J., Angrisano, F. & Blagborough, A. M. Antimalarial transmission-blocking interventions: past, present, and future. *Trends Parasitol.* **34**, 735–746 (2018).
30. Adjalley, S. H. et al. Quantitative assessment of *Plasmodium falciparum* sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, E1214–E1223 (2011).
31. Sissoko, A. et al. A chemically stable fluorescent mimic of dihydroartemisinin, artemether, and arteether with conserved bioactivity and specificity shows high pharmacological relevance to the antimalarial drugs. *ACS. Infect. Dis.* **6**, 1532–1547 (2020).
32. Wang, Z. et al. A flow cytometry-based quantitative drug sensitivity assay for all *Plasmodium falciparum* gametocyte stages. *PLoS ONE* **9**, e93825 (2014).
33. Klonis, N. et al. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 11405–11410 (2011).
34. Smith, W. B. II et al. PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence. *Int. J. Clin. Pr.* **67**, 768–780 (2013).
35. Suarez-Cortes, P., Silvestrini, F. & Alano, P. A fast, non-invasive, quantitative staining protocol provides insights in *Plasmodium falciparum* gamete egress and in the role of osmophilic bodies. *Malar. J.* **13**, 389 (2014).
36. Wentzinger, L. et al. Cyclic nucleotide-specific phosphodiesterases of *Plasmodium falciparum*: PfPDEalpha, a non-essential cGMP-specific PDE that is an integral membrane protein. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1625–1637 (2008).
37. Brancucci, N. M. B. et al. Probing *Plasmodium falciparum* sexual commitment at the single-cell level. *Wellcome Open Res.* **3**, 70 (2018).
38. Hanssen, E. et al. Soft X-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Struct. Biol.* **177**, 224–232 (2012).
39. Solovay, L. et al. Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* **2**, 565 (2011).
40. Tiburcio, M. et al. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood* **119**, e172–e180 (2012).
41. Naissant, B. et al. *Plasmodium falciparum* STEVOR phosphorylation regulates host erythrocyte deformability enabling malaria parasite transmission. *Blood* **127**, e42–e53 (2016).
42. Lavazec, C., Sanyal, S. & Templeton, T. J. Expression switching in the stevor and Pfmc-2TM superfamilies in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **64**, 1621–1634 (2007).
43. Vincensini, L., Fall, G., Berry, L., Blisnick, T. & Braun Breton, C. The RhopH complex is transferred to the host cell cytoplasm following red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **160**, 81–89 (2008).
44. Scherf, A. et al. Gene inactivation of Pf11-1 of *Plasmodium falciparum* by chromosome breakage and healing: identification of a gametocyte-specific protein with a potential role in gametogenesis. *EMBO J.* **11**, 2293–2301 (1992).
45. Olivieri, A. et al. The *Plasmodium falciparum* protein Pfz27 is dispensable for gametocyte and gamete production, but contributes to cell integrity during gametocytogenesis. *Mol. Microbiol.* **73**, 180–193 (2009).

Acknowledgements

The authors thank D. Baker (LSHTM) for providing the *PfPDE δ* line, C. Braun-Breton for providing the anti-RhopH2 antibodies and O. Mercereau-Puijalon for providing the anti-Pf11-1 antibodies. The authors acknowledge T. Guilbert at the imaging core facility Imag'IC and the Flow Cytometry core facility CYBIO of the Institut Cochin for technical help. This study was supported by grants from Laboratory of Excellence GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051. The labex GR-Ex is funded by the IdEx program "Investissements d'avenir" of the French National Research Agency, reference ANR-18-IDEX-0001. C.L., D.B., F.D., A.M., M.-E.N., G.N., and L.B. acknowledge the financial support from the Cnrs, Inserm and the Fondation pour la Recherche Médicale ("Equipe FRM" grant EQ20170336722).

Author contributions

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

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01454-7>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

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



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

© The Author(s) 2020



Increased circulation time of *Plasmodium falciparum* underlies persistent asymptomatic infection in the dry season

Carolina M. Andrade¹, Hannah Fleckenstein¹, Richard Thomson-Luque¹,
Safiatou Doumbo², Nathalia F. Lima¹, Carrie Anderson¹, Julia Hibbert¹, Christine S. Hopp³,
Tuan M. Tran⁴, Shanping Li³, Moussa Niangaly², Hamidou Cisse², Didier Doumtabe²,
Jeff Skinner³, Dan Sturdevant⁵, Stacy Ricklefs⁵, Kimmo Virtaneva^{6,5}, Muhammad Asghar^{6,7},
Manijeh Vafa Homann^{6,7}, Louise Turner^{8,9}, Joana Martins¹⁰, Erik L. Allman¹¹, Marie-Esther N'Dri¹²,
Volker Winkler¹³, Manuel Llinás^{11,14}, Catherine Lavazec¹², Craig Martens⁵, Anna Färnert^{6,7},
Kassoum Kayentao², Aissata Ongoiba², Thomas Lavstsen^{8,9}, Nuno S. Osório¹⁰, Thomas D. Otto¹⁵,
Mario Recker¹⁶, Boubacar Traore², Peter D. Crompton³ and Silvia Portugal^{1,17,18}✉

The dry season is a major challenge for *Plasmodium falciparum* parasites in many malaria endemic regions, where water availability limits mosquito vectors to only part of the year. How *P. falciparum* bridges two transmission seasons months apart, without being cleared by the human host or compromising host survival, is poorly understood. Here we show that low levels of *P. falciparum* parasites persist in the blood of asymptomatic Malian individuals during the 5- to 6-month dry season, rarely causing symptoms and minimally affecting the host immune response. Parasites isolated during the dry season are transcriptionally distinct from those of individuals with febrile malaria in the transmission season, coinciding with longer circulation within each replicative cycle of parasitized erythrocytes without adhering to the vascular endothelium. Low parasite levels during the dry season are not due to impaired replication but rather to increased splenic clearance of longer-circulating infected erythrocytes, which likely maintain parasitemias below clinical and immunological radar. We propose that *P. falciparum* virulence in areas of seasonal malaria transmission is regulated so that the parasite decreases its endothelial binding capacity, allowing increased splenic clearance and enabling several months of subclinical parasite persistence.

The mosquito-borne *P. falciparum* parasite is responsible for over 200 million malaria cases annually, and in 2018 it killed nearly 400,000 individuals, most of whom were African children under 5 years of age¹. *P. falciparum* causes disease while multiplying asexually within red blood cells (RBCs) and exporting its variant surface antigens (VSAs) to the RBC surface. VSAs mediate adhesion to vascular endothelium, thereby helping the parasite avoid splenic clearance^{2,3}. During each ~48-h replicative cycle in RBCs, *P. falciparum* follows a regulated transcriptional pattern, starting from the invading merozoite, through the ring and trophozoite stages and to the multinucleated schizont^{4,5}, which yields

16–32 new merozoites. In parallel with a predictable transcriptional pattern, the parasite develops a network of membrane structures⁶ in the infected RBC (iRBC), and, at the trophozoite stage, the host cell membrane presents knobs⁷ exposing parasite-derived *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), encoded by the multigene family *var*⁸. *var* genes are expressed in a monoallelic fashion, coding for PfEMP1s that bind host endothelial cell receptors, with different binding phenotypes associating with varying virulence and pathological outcomes⁹. In Mali and many African regions, malaria cases are restricted to the rainy season when the mosquitoes transmitting *P. falciparum* are present¹⁰, and

¹Center for Infectious Diseases, Parasitology, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany. ²Mali International Center of Excellence in Research, University of Sciences, Techniques and Technologies of Bamako, Bamako, Mali. ³Laboratory of Immunogenetics, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, MD, USA. ⁴Division of Infectious Diseases, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA. ⁵Rocky Mountain Laboratory Research Technologies Section, Genomics Unit, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Hamilton, MT, USA. ⁶Department of Medicine Solna, Division of Infectious Diseases, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. ⁷Department of Infectious Diseases, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden. ⁸Department of Immunology and Microbiology, Centre for Medical Parasitology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, København N, Denmark. ⁹Department of Infectious Diseases, Copenhagen University Hospital (Rigshospitalet), Copenhagen, Denmark. ¹⁰Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, Portugal and ICVS/3B's -PT Government Associate Laboratory, Braga, Portugal. ¹¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Huck Center for Malaria Research, The Pennsylvania State University, State College, PA, USA. ¹²Université de Paris, Institut Cochin, Paris, France. ¹³Institute of Global Health, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany. ¹⁴Department of Chemistry, The Pennsylvania State University, State College, PA, USA. ¹⁵Institute of Infection, Immunity & Inflammation, MVLS, University of Glasgow, Glasgow, UK. ¹⁶Centre for Mathematics & the Environment, University of Exeter, Penryn Campus, Penryn, UK. ¹⁷German Center for Infection Research (DZIF), Heidelberg, Heidelberg, Germany. ¹⁸Present address: Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany. ✉e-mail: portugal@mpiib-berlin.mpg.de

subclinical *P. falciparum* infections can persist throughout the dry season, enabling the parasite to bridge transmission seasons several months apart^{11–13}. We recently showed that, although *P. falciparum*-specific humoral immunity is higher in subclinical *P. falciparum* carriers in the dry season, it decreases similarly from its beginning to its end in carriers and non-carriers¹³, suggesting that chronic low parasitemia in endemic settings might not maintain or boost malaria immunity. Although much is known about immune responses to clinical malaria, and, to some extent, to subclinical infections during the transmission season¹⁴, the effect on immunity of subclinical *P. falciparum* persistence in the dry season has not been extensively studied. Host survival during the dry months is essential for resuming *P. falciparum* transmission in the ensuing rainy season; thus, the parasite has likely evolved strategies to prevent potentially fatal host pathology and assure persistence during mosquito-free periods. In this study, we addressed the host and parasite features that associate with parasite persistence between two transmission seasons and provide insights into the complex interaction among *P. falciparum*, its human hosts and the surrounding environment. By comparing parasites from the dry season to malaria-causing parasites in the transmission season, we show that, despite inducing a minimal immune response and conserving its replication ability, *P. falciparum* dry season parasitemias can be maintained low by splenic clearance of a large proportion of iRBCs that circulate longer than observed in clinical malaria cases.

Results

***P. falciparum* persists during the dry season.** In a cohort study in Kalifabougou, Mali, we followed ~600 individuals from 3 months to 45 years of age during 2017 and 2018. As reported earlier¹³, clinical episodes of malaria (temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$, $\geq 2,500$ asexual parasites per μl and no other clinically discernible cause of fever) were largely restricted to the transmission seasons (June–December), whereas nearly all individuals remained free of symptomatic malaria during the intervening dry seasons (January–May). Specifically, 386 and 347 febrile malaria cases were diagnosed during the 2017 and 2018 rainy seasons, respectively, whereas only 12 and five febrile malaria episodes occurred during the dry seasons (Fig. 1a and Extended Data Fig. 1). Despite the very low incidence of clinical malaria in the dry season, we consistently observed 10–20% prevalence of subclinical *P. falciparum* infections during this time. Analyzing over 400 individuals with paired data at the beginning (January) and end (May) of each dry season, we found that 20% of individuals were *P. falciparum* polymerase chain reaction (PCR)⁺ both in January 2017 and January 2018, and 15% and 12% of individuals were *P. falciparum* PCR⁺ at the end of the 2017 and 2018 dry seasons, respectively (Fig. 1b). Older children and young adults carried subclinical *P. falciparum* more frequently than young children at the end of the dry season (Fig. 1c and Extended Data Fig. 1), as reported earlier for this cohort¹³. Also, as previously reported, we observed that subclinical *P. falciparum* carriers at the end of the dry season were very likely to have been infected since its beginning (January 2017 or January 2018), whereas uninfected individuals at the beginning of a dry season remained uninfected until its end (Fig. 1b). The odds ratios (ORs) of maintaining the same infection status through each entire dry season were OR = 90.9 (95% confidence interval (CI) (38.6, 213.8), $P < 0.0001$) in 2017 and OR = 43.5 (95% CI (17.5, 107.5), $P < 0.0001$) in 2018 (Supplementary Table 1). Consistent with the continued absence of clinical malaria during the dry season, parasitemias of subclinical carriers determined by RT-qPCR and flow cytometry were found to remain low, or, in some individuals, decline as the dry season progressed, whereas clinical cases of malaria in the wet season presented with high parasite burdens (Fig. 1d). Interestingly, the very few clinical malaria cases occurring during the dry seasons had significantly lower parasitemias than those presented by the same individuals in clinical cases during the ensuing rainy seasons (Extended Data Fig. 2).

***P. falciparum* induces a minimal immune response during the dry season.** To test the hypothesis that host immunity might contribute to the suppression of parasitemia during the dry season, we compared the immune responses of subclinical carriers of *P. falciparum* (May⁺) versus non-infected children (May⁻). We profiled individuals between 7 and 17 years of age, as this was the group in which most subclinical infections were detected, for serological markers of inflammation and cytokines, circulating immune cells and humoral responses to *P. falciparum* VSAs of age- and gender-matched children who did or did not carry *P. falciparum* during the dry season, detected retrospectively by PCR. Inflammation markers previously reported to be elevated in clinical cases of malaria, such as C-reactive protein (CRP)¹⁵, von Willebrand factor (vWF)¹⁶ and hepcidin¹⁷, were quantified in plasma samples obtained at the beginning (January) and end (May) of the dry season. None of the three markers was significantly different in subclinical carriers compared to uninfected children at either time point (Fig. 2a). We complemented these serological analyses with a multiplex bead array to detect 32 cytokines and chemokines and observed no differences between children with or without *P. falciparum* at the end of the dry season (May) in all but one of the quantified analytes (Supplementary Table 2). Only CXCL1, a pro-inflammatory chemokine known to recruit neutrophils, which has thus far not been associated with malaria in the clinical setting, was significantly increased in children with *P. falciparum*-persistent parasitemias at the end of the dry season (Fig. 2b). In contrast, CCL3, IL-10, IL-6 and IL-1 β , previously associated with clinical malaria^{18–20}, were similar in the plasma of infected versus uninfected children at the end of the dry season (Fig. 2b and Supplementary Table 2). We next quantified the proportions of major leucocyte populations from thawed peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected at the end of the dry season from children with or without subclinical *P. falciparum* (gating strategy in Extended Data Fig. 3). We observed that monocytes, T cells, B cells and natural killer (NK) cell sub-populations were not significantly different between children who carried (May⁺) or did not carry (May⁻) *P. falciparum* (Fig. 2c and Extended Data Fig. 4). To interrogate differences in cell function, we quantified intracellular cytokines, activation or cytotoxicity markers, transcription factors or exhaustion markers of freshly collected PBMCs from *P. falciparum* subclinically infected and non-infected children at the end of the dry season. The levels of the activation marker CD25, transcription factor T-bet or cytokine IL-2 of CD4 T cells, granzyme B of CD8 T and NK cells and exhaustion marker FCRL5 of atypical memory B cells were similar between children who carried or did not carry *P. falciparum* (Fig. 2d and Supplementary Table 3). We further questioned whether memory B cells (MBCs, defined as CD19⁺, CD10⁻ and CD21⁻ and CD27⁺ or CD21⁺ and CD27⁺; gating strategy in Extended Data Fig. 3) specific for *P. falciparum* were affected in subclinical carriers compared to non-infected individuals at the end of the dry season. Using biotinylated *P. falciparum* blood stage antigens apical membrane antigen 1 (AMA-1) and merozoite surface protein 1 (MSP1)²¹, we quantified AMA-1- or MSP1-specific MBCs in children who carried *P. falciparum* parasites and non-infected children at the end of the dry season. We found that the proportion of class-switched *P. falciparum*-specific MBCs (AMA1⁺ or MSP1⁺IgG⁺IGM⁻ MBCs) was significantly increased in subclinical carriers at the end of the dry season, whereas no such difference was found in the non-class-switched MBC population (AMA1⁺ or MSP1⁺IgG⁺IGM⁺ MBCs) (Fig. 2e). Within the IgG⁺ MBC sub-populations, we did not observe differences between *P. falciparum* carriers and uninfected individuals at the end of the dry season in *P. falciparum*-specific classical and atypical MBCs, but we detected increased *P. falciparum*-specific activated MBCs in subclinical carriers (Extended Data Fig. 4). Using another multiplex bead array, we quantified humoral responses of *P. falciparum* subclinical carriers and uninfected individuals, at the beginning

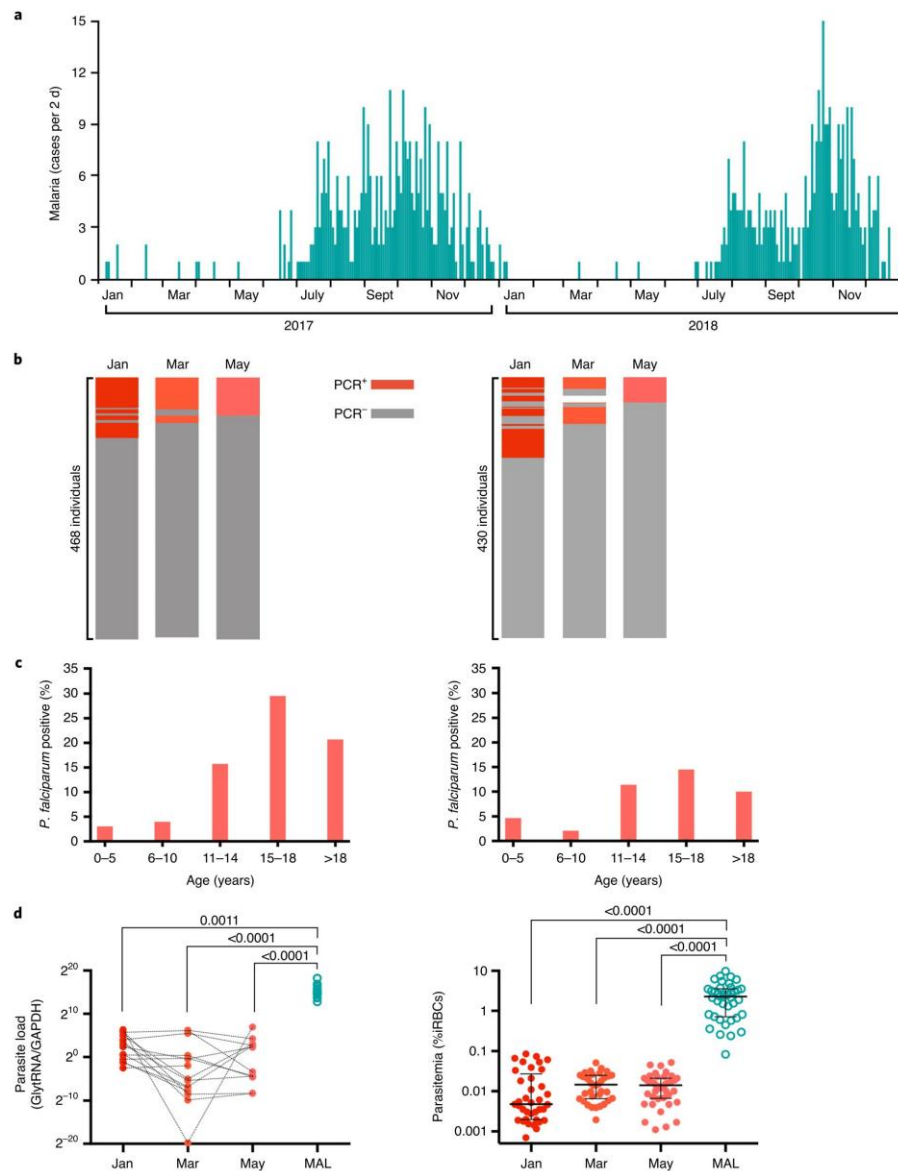


Fig. 1 | *P. falciparum* persists during the dry season. **a**, Clinical malaria frequency in a cohort of ~600 individuals aged 3 months to 45 years measured every 2 days for 2 years. Clinical malaria diagnosed by axillary temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ and $\geq 2,500$ asexual parasites per μl of blood and no other apparent cause of fever. **b**, Prevalence of subclinical *P. falciparum* determined by PCR in paired individuals (rows) at the beginning (January), middle (March) and end (May) of two consecutive dry seasons (2017, left; 2018, right). Columns are sorted to have the same individual represented in a single row at the three time points in each dry season. **c**, Point prevalence of subclinical *P. falciparum* infection determined by PCR at the end of the dry season in May 2017 (left) and May 2018 (right) stratified by age. **d**, Parasite load detected by RT-qPCR (left) and flow cytometry (right) of RDT⁺ subclinical children at the beginning (January), mid (March) and end (May) of the dry season and children with their first clinical malaria episode (MAL) in the wet season. Parasitemia data represented as median $\pm$ IQR; Kruskal-Wallis test with multiple comparisons. IQR, interquartile range.

and end of the dry season, to 35 domain types of the VSA multi-gene family *var*, which were grouped according to their endothelial receptor affinity (CD36, EPCR or unknown receptor) and PfEMP1 upstream promotor sequence (UPS) type (A, B or B/A types)²² (Supplementary Table 4). We observed that more subclinical carriers (May⁺) than non-infected individuals (May⁻) were reactive against PfEMP1 domains binding to CD36, EPCR or to unknown receptors at both time points, and also that the proportion of individuals reactive to the different PfEMP1 domains decreased over the dry season independently of individual infection status (Fig. 2f and Extended Data Fig. 4). These differences parallel our previously published data on *P. falciparum*-specific humoral responses to non-VSAs¹³, suggesting similar humoral dynamics for PfEMP1s and non-VSAs. Additionally, we observed that the magnitude of IgG reactivity to A, B or B/A types of PfEMP1 declined similarly from the beginning to the end of the dry season in children who carried subclinical infection (May⁺) or were uninfected (May⁻) during the dry season (Fig. 2g and Extended Data Fig. 4). Antibodies against PfEMP1 domains (Fig. 2f,g), against a large set of *P. falciparum* non-VSAs¹³ and also particularly against RBC invasion-related proteins²³ (Extended Data Fig. 4) were consistently higher in subclinical carriers compared to non-infected children at the end of the dry season, so we questioned whether the difference in humoral response at the end of the dry season could impose variance in inhibition of merozoite invasion *in vitro*. We tested merozoite invasion of a laboratory-adapted *P. falciparum* strain in the presence of plasma from Malian children who carried parasites or not during the dry season and evaluated the antibodies' ability to block RBC invasion. Testing complete and antibody-depleted plasma, we observed that complete Malian plasma inhibited invasion of merozoites ~fivefold more than antibody-depleted Malian plasma, whereas antibody depletion had no differential effect on the control German plasma used (Fig. 2h and Extended Data Fig. 4). Notably, however, plasma from Malian children carrying subclinical infections (May⁺) or not carrying parasites (May⁻) had similar ability to inhibit merozoite invasion, suggesting that the antibodies remaining elevated at the end of the dry season have no significant effect on inhibiting merozoite invasion of RBCs and are unlikely to contribute to the maintenance of low parasitemias through this mechanism.

***P. falciparum* genetic diversity is maintained throughout the year.** Next, we asked whether *P. falciparum* parasites persisting through the dry season are genetically distinct from those causing acute malaria during the transmission season. To that end, we measured the size of the merozoite surface protein 2 (*msp2*) gene, which is highly polymorphic and discriminates different *P. falciparum* genotypes^{24,25}. Through nested PCR followed by fragment analysis using capillary electrophoresis, we compared paired samples from 93 subclinical carriers at the beginning (January) and end (May) of the dry season, with 136 samples from clinical cases

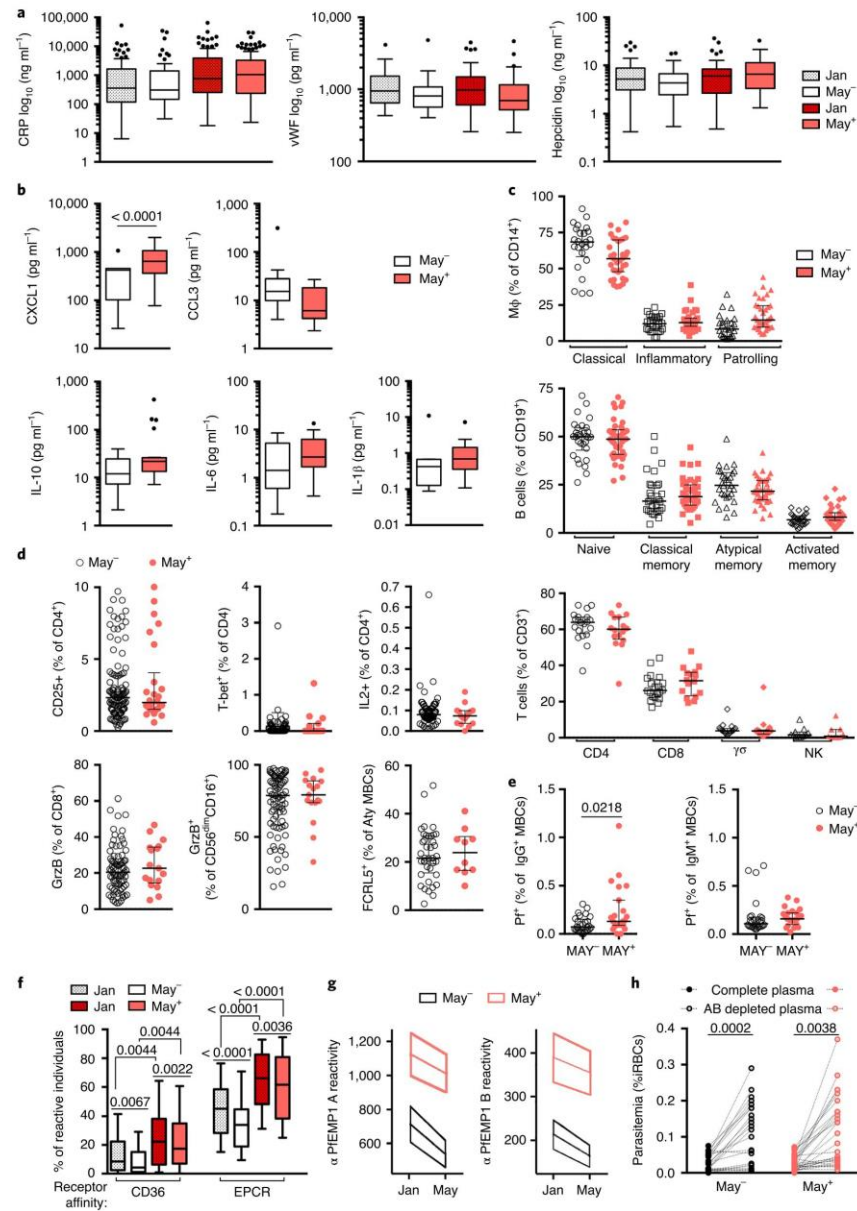
of malaria in the ensuing transmission season (MAL). The number of clones detected per individual did not significantly differ between parasites isolated during the dry season or transmission season nor did the percentage of individuals with different numbers of clones (Fig. 3a,b). Furthermore, the size and distribution of *msp2* clones identified during the dry season were similar to those isolated from clinical malaria cases during the transmission season (Fig. 3c,d), with the most frequent clone sizes being the same at any of the time points analyzed.

Transcriptome of circulating subclinical *P. falciparum* at the end of the dry season differs from that of *P. falciparum* during clinical malaria. We could not investigate the few malaria cases diagnosed in the dry season because the study protocol did not include venipuncture blood draws from clinical cases during this time. However, we performed RNA sequencing (RNA-seq) of leucocyte-depleted blood from 12 children with persistent subclinical *P. falciparum* at the end of the dry season (May) and from 12 age- and gender-matched children presenting with their first clinical malaria case in the ensuing transmission season (MAL) (Supplementary Table 5). Principal component (Fig. 4a) and unsupervised clustering (Fig. 4b) analyses showed segregation of transcription profiles based on seasonality. Differentially expressed genes (DEGs) determined at a false discovery rate threshold of 5% resulted in 1,607 DEGs, 1,131 transcripts upregulated and 476 transcripts downregulated in the dry season compared to clinical malaria samples (Fig. 4c and Supplementary Table 6). Validation of the RNA-seq data was performed by RT-qPCR of eight high-expressing and variable-in-function DEGs, and the correlation between the two methods resulted in highly significant $r^2 = 0.929$ (Fig. 4d and Supplementary Table 7). Furthermore, samples from additional children (six from the end of the dry season and 12 malaria cases during the transmission season) were used to quantify expression of three of the eight DEGs above, in parallel with the initial 24 samples, and revealed similar fold changes by RT-qPCR (Fig. 4e). We investigated similarities in the DEGs obtained in this study with those of previous reports comparing parasite physiological states and transcriptomes from a range of clinical malaria severities²⁶, or parasites causing malaria in high- versus low-transmission areas²⁷, but no enrichment was found (Extended Data Fig. 5), suggesting that singular mechanisms might be at play during the dry season. Functional and Gene Ontology analysis of the dry season DEGs revealed a significant enrichment of transcripts involved in cellular processes related with several metabolic pathways and also with phagosome, DNA replication or homologous recombination (Fig. 4f). Indeed, DEGs involved in metabolic pathways suggest that glycolysis, glycerophospholipid, purine and pyrimidine pathways were increased in parasites from the end of the dry season (May), whereas fatty acid biosynthesis appeared downregulated compared to parasites from clinical malaria (MAL) in the wet season (Fig. 4g). Interestingly, within some pathways, there are

Fig. 2 | *P. falciparum* induces a minimal immune response during the dry season. **a**, CRP ($n = 71$ May⁻, 117 May⁺), vWF ($n = 33$ May⁻, 51 May⁺) and hepcidin ($n = 41$ May⁻, 37 May⁺) of paired plasma samples at the beginning (January) and end (May) of the dry season from individuals carrying *P. falciparum* (May⁺) or not (May⁻). **b**, Plasma cytokines from children carrying or not carrying ($n = 21$ May⁺, 12 May⁻) *P. falciparum* at the end of the dry season. **c**, Surface markers of frozen PBMCs from children who carried (May⁺) or did not carry (May⁻) *P. falciparum* at the end of the dry season. **d**, Intracellular markers of fresh PBMCs from children carrying (May⁺) or not carrying (May⁻) *P. falciparum* at the end of the dry season (Supplementary Table 3). **e**, *P. falciparum*-specific AMA1⁺ or MSP1⁺ MBCs in *P. falciparum* carriers or non-carriers ($n = 23$ May⁺, 28 May⁻) at the end of the dry season for class-switched (IgG⁺IGM⁻) or non-class-switched (IgG-IGM⁺) MBCs. **f**, Proportion of children with antibodies specific to PfEMP1 domains at the beginning and end of the dry season ($n = 106$ January and May⁻, 112 January and May⁺). **g**, Magnitude of anti-PfEMP1 domains antibody response between the beginning and end of the dry season in children carrying or not carrying subclinical *P. falciparum* ($n = 112$ January and May⁺, 106 January and May⁻). **h**, Parasitemia after invasion in complete or antibody-depleted plasma from children who carried or did not carry ($n = 29$ May⁺, 24 May⁻) *P. falciparum* subclinical infections during the dry season. All data indicate median $\pm$ IQR. **(a)** One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons correction; **(b)** one-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. **(c, d, h)**, one-sided Dunn's Kruskal-Wallis multiple comparisons test; **(e)** Mann-Whitney test; **(f)** repeated-measures one-way ANOVA (with Greenhouse-Geisser correction) for each binding receptor affinity; **(g)** slopes compared with a linear non-interaction model. **(a, b, f)** Box plots indicate median $\pm$ IQR. Values $>1.5 \times$ the IQR are plotted as individual points (Tukey's method). IQR, interquartile range.

transcripts that appear to be exceptions to the trend of upregulation or downregulation (Fig. 4g); however, we observe that these particular transcripts also present exceptional patterns of expression within the 48-h intraerythrocytic developmental cycle compared to other pathway transcripts (Extended Data Fig. 6). To follow-up on possible metabolic differences between parasites persisting through

the dry season and parasites causing malaria in the transmission season, we used liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) to profile both hydrophilic and hydrophobic metabolites from the plasma of 12 subclinical children with *P. falciparum* infections at the end of the dry season (May) and of 12 children presenting with their first clinical malaria case (MAL) in the rainy season. We



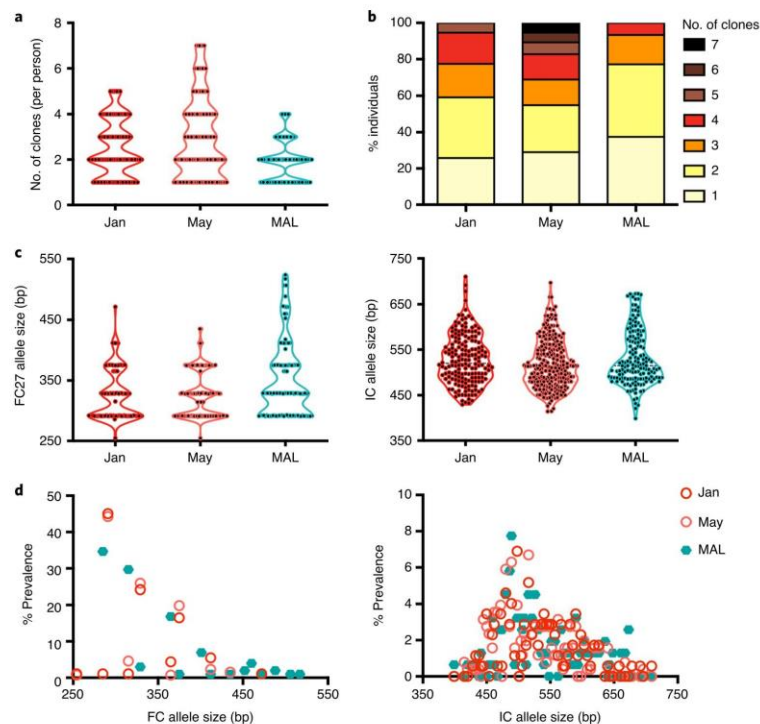


Fig. 3 | *P. falciparum* genetic diversity is maintained throughout the year. **a**, Number of *P. falciparum* clones in subclinical PCR⁺ children in beginning (Jan) and end (May) of the dry season, and first clinical malaria case (MAL) during the transmission season, determined by differences in size of a polymorphic region of *msp2*. **b**, Proportion of individuals with different numbers of *P. falciparum* clones in the beginning (January) and end (May) of the dry season and clinical malaria cases (MAL). **c**, Size of the *msp2* alleles FC27 (left) and IC/3D7 (right) in the beginning (January) and end (May) of the dry season and clinical malaria cases (MAL). **d**, Prevalence of *msp2* clone sizes of FC27 (left) and IC/3D7 (right) allelic families in January ($n=93$), May ($n=93$) and clinical malaria (MAL, $n=136$). All violin plots show all data points; Mood's median test.

found significant separation between metabolites present in the two groups of samples (Fig. 4h and Supplementary Table 8); however, the difficulty of normalization of measured metabolite levels to parasite burden, plus the strong parasitemia differences at the time of the blood draw, hinder conclusive interpretation of what might be seasonal or parasite-induced metabolic alterations (Supplementary Table 9).

***P. falciparum* replication is not impaired in the dry season.** We then tested the hypothesis that dry season parasitemias were maintained low and subclinical due to decreased parasite replication capacity during this period. We cultured *P. falciparum* for 36–48 h in vitro directly after blood draw from rapid diagnostic test positive (RDT⁺) samples of asymptomatic individuals at three time points of the dry season (January, March and May) and from samples of children presenting with their first clinical malaria episode of the ensuing transmission season (MAL). By flow cytometry, we measured the increase in parasitemia and parasite development at 0, 16, 24, 30, 36 and 48 h after in vitro culture. Parasite in vitro growth rates of samples from more than 40 subclinical donors during the dry season and ~30 malaria cases in the transmission season indicated that the highest growth determined between any two time points of the short-term culture was similar throughout the year. During

the 36- to 48-h in vitro culture, parasitemias increased between two- and fivefold at any point in the year: 2.8-fold in January, 95% CI (2.3, 3.3); 4.1-fold in March, 95% CI (3.4, 4.7); 3.6-fold in May, 95% CI (2.6, 4.6); and 2.8-fold in malaria cases, 95% CI (2.1, 3.5). However, the number of hours in culture needed to increase parasitemia was shorter in the dry season samples than in samples from malaria-causing parasites in the transmission season (Fig. 5a). In accordance with an earlier increase in parasitemia in vitro during the dry season, we could frequently identify on Giemsa smears mature schizonts after 16 and 24 h of culture and young ring stages after 30 or 36 h in the dry season samples, whereas mature schizonts of malaria-causing parasite samples were mostly observed after 36 h in culture, and young ring stages were largely found after 48 h in vitro (Fig. 5b). When we calculated the number of hours in culture at which the highest increase of parasitemia could be detected for each sample, we observed that it decreased from the beginning to the end of the dry season—January, 26.4 h, 95% CI (24.5, 28.3); March, 24.9 h, 95% CI (23.9, 25.9); May, 22.7 h, 95% CI (20.8, 24.6)—and was maximal during malaria cases in the transmission season, MAL 44.0 h, 95% CI (41.5, 46.6) (Fig. 5c). Nevertheless, when we measured the number of merozoites per multinucleated schizont before or at the time of the highest increase in parasitemia in vitro, we obtained similar values at the end of dry season and in clinical malaria cases

in the wet season (Fig. 5d). Finding later developmental parasite stages at earlier times in this short-term *in vitro* experiment during the dry season could indicate a faster than 48-h intraerythrocytic replicative cycle, or, alternatively, that dry season parasites circulate longer without adhering to the host vascular endothelium and were more developed than circulating parasites in clinical malaria cases at the time of the blood draw. To test the latter, we used the RNA-seq data described in Fig. 4 to estimate, with a likelihood-based statistical method previously described²⁸, the age in hours post-invasion (hpi) of circulating parasites from subclinical children at the end of the dry season (May) and from clinical cases during the wet season (MAL). We determined that parasites circulating in the dry season had a transcriptional signature of ~17 hpi, 95%CI (14.05, 20.8), whereas parasites circulating in malaria cases during the wet season had a transcription profile similar to parasites with ~7 hpi, 95% CI (6.5, 7.7) (Fig. 5e). Accordingly, imaging the thick blood films made in the field at the time of the blood draw, we confirmed that the more developed trophozoite stages of *P. falciparum* were present on subclinical samples collected at the end dry season, whereas clinical malaria samples in the transmission season presented much smaller ring stages of *P. falciparum* (Fig. 5f,g). All together, these data show that, at the end of the dry season, *P. falciparum* can be found circulating at later stages of the ~48-h asexual cycle than what is seen during clinical malaria cases in the wet season.

Infected erythrocytes in circulation at the end of the dry season are at higher risk of splenic clearance. To investigate if longer circulation of iRBCs in the dry season would affect host RBC deformability and potentiate splenic clearance, we used a microsphere system mimicking the narrow and short inter-endothelial slits of the human spleen with different-sized microspheres²⁹. Using freshly collected blood samples from asymptotically infected children at the end of the dry season and from children presenting with febrile malaria during the transmission season, we assessed retention in the microspheres and flow-through of circulating iRBCs at time 0 and after 6, 18 and 30 h *in vitro*. We observed that iRBCs collected from malaria (MAL) cases were not significantly retained in the spleen-like system at 0, 6 or 18 h after culture and that only after 30 h was the percentage of iRBCs in the flow-through reduced, indicating splenic retention of iRBCs (Fig. 6a). Conversely, iRBCs in RDT+ blood collected at the end of the dry season (May) had significantly reduced flow-through immediately after the blood draw (~25% retention of 0-h iRBCs in the microsphere system) and over 50% retention of iRBCs after 6 or 18 h in culture (Fig. 6a). Accordingly, we observed that trophozoites or schizonts that fail to flow through the microsphere system were circulating (at 0 h) only in the dry season samples (Fig. 6b).

We then investigated whether differences in cyto-adhesion, affecting the length of time that parasitized cells remain in circulation, could explain the observed parasite age distributions and microsphere results. For this, we used a mathematical model to describe the within-host growth and removal of iRBCs from circulation through cyto-adhesion in the vasculature and through

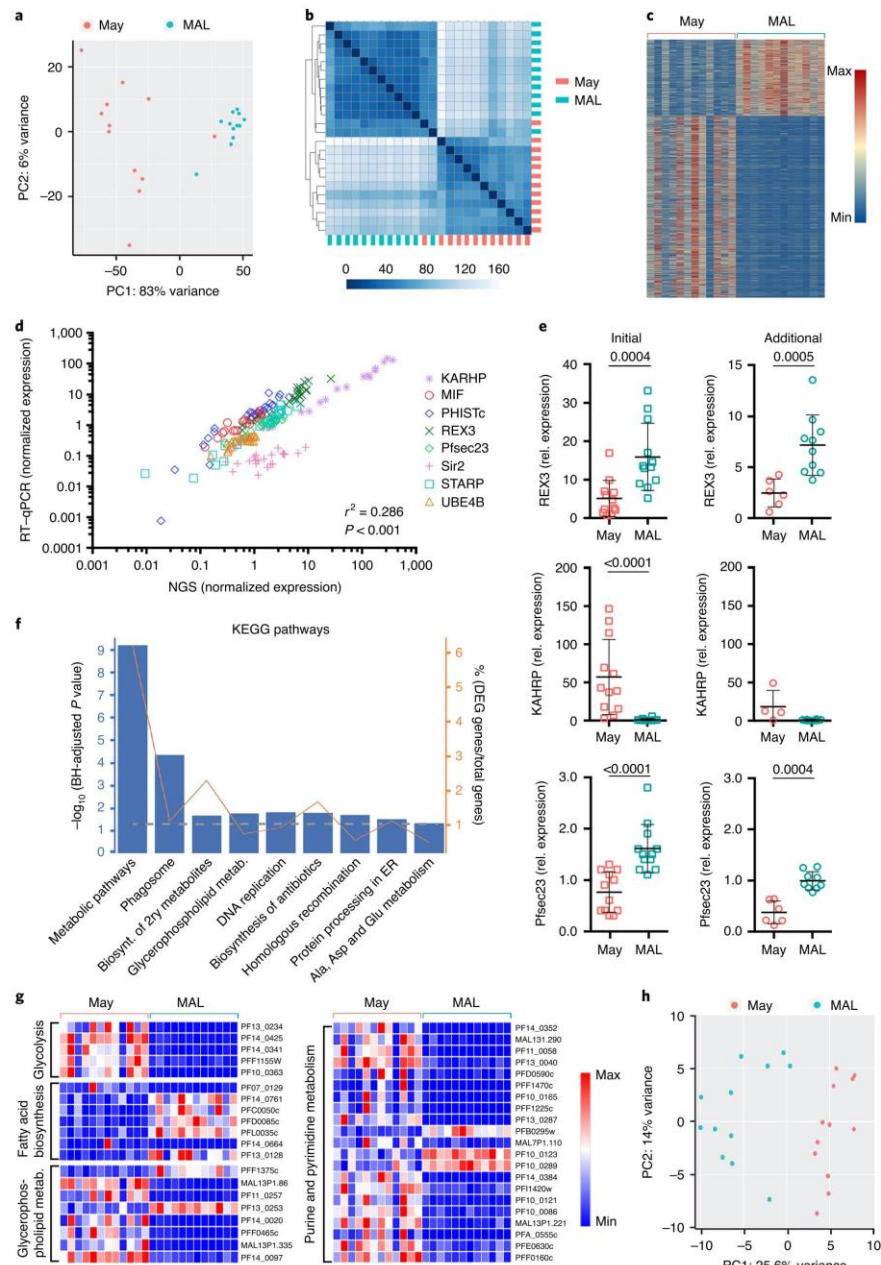
splenic retention (Methods). Both processes were assumed to be dependent on the parasite's developmental stage, increasing as the parasite starts to express adherence-mediating surface antigens, and RBC modification leads to cell rigidity. Whereas cyto-adhering parasites still replicate, those filtered out by the spleen were assumed to be removed. As shown in Fig. 6c, effective growth rates and population sizes of low-cyto-adhering parasites are significantly lower than those of high-cyto-adhering parasites, which can avoid splenic clearance before parasitized cells become too rigid to pass through the spleen. We then obtained estimated parasite age distributions for both scenarios (Fig. 6d) by sampling from the modeled parasite population at random points over the simulated infection time course, akin to blood sampling from a population. As low-adhesion parasites are predominantly removed by the spleen toward the end of their life cycle, they show a much broader age range than high-cyto-adhesion parasites, which are removed from circulation earlier through cyto-adhesion and, therefore, show a narrower and younger age range, in agreement with the observed age distribution from thick blood smears (Fig. 5e,f). Next, we simulated a microsphere filtration experiment by 'growing' our sampled model parasites older and evaluating their projected average flow-through based on our assumed, age-dependent splenic retention function (Methods and Extended Data Fig. 7). The throughput of high-cyto-adhering parasites is high for the first 6–10 h before dropping off gradually as parasites grow older (Fig. 6e). In contrast, samples from low-cyto-adhering parasites, with their more uniformly distributed age range, already have a much reduced flow-through at 0 h, which, however, remained more stable as parasites mature over the next 30 h—again, in line with the empirical observations (Fig. 6a). These mathematical results suggest that cyto-adhesion alone can explain the differences between parasites sampled during the dry season (low-adhesion) and parasites sampled from malaria cases (high-adhesion).

To investigate whether the expression of cyto-adhesion-mediating PfEMP1 proteins differed in abundance or quality in subclinical parasites from the dry season compared to parasites found in malaria cases during the wet season, we assembled the *var* genes from the RNA-seq reads of the 24 samples from the end of the dry season and the malaria cases (Methods). Expression of several *var* genes has been shown to remain fairly stable between ~10 and 20 h after invasion³⁰, which should be close to the average ages estimated for parasites in malaria cases and dry season samples, respectively. Using a recently developed analytical pipeline³¹, we could detect LARSFADIG motifs identifying PfEMP1 coding genes³² in eight of 12 samples from the dry season and in ten of 12 malaria cases (Extended Data Fig. 8). We were able to annotate full-length *var* genes, including both the start N-terminal sequence (NTS) and the acidic terminal sequence (ATS) domains, and also many isolated fragments, and we observed more contigs with LARSFADIG motifs and *var* gene fragments in the wet season samples (Supplementary Table 10). We used different methods to access enrichment of higher expressed *var* genes in the wet versus the dry season samples. Although we did not see statistically significant enrichment,

Fig. 4 | Transcriptome of circulating *P. falciparum* at the end of the dry season differs from malaria-causing *P. falciparum* during the transmission season. **a,b** Principal component (**a**) and unsupervised clustering (**b**) analyses of RNA-seq data of *P. falciparum* parasites collected at the end of the dry season and from clinical malaria cases ($n=12$ May, 12 MAL). **c**, Heat map showing normalized reads of DEGs (rows) for each individual (columns) from *P. falciparum* collected at the end of the dry season (May) and at the first clinical malaria case (MAL) in the ensuing transmission season. **d**, RT-qPCR validation of RNA-seq data for eight labeled DEGs ($n=24$). P and r^2 determined by Pearson's correlation. **e**, RT-qPCR validation of initial 24 RNA-seq samples (left) and 18 additional samples (right) for three DEGs. Data indicate mean $\pm$ s.d.; two-tailed Mann-Whitney test. **f**, Summary of KEGG pathways significantly enriched with DEGs. Blue bars indicate P_{adj} for enrichment of each pathway. The gray dashed line indicates the threshold $P=0.05$; the orange line indicates the percentage of genes in each pathway present in the DEG list. **g**, Heat map showing normalized reads of DEGs involved in different metabolic pathways (rows) for each individual (columns) from *P. falciparum* at the end of the dry season and at the first clinical malaria case ($n=12$ May, 12 MAL). **h**, Principal component analysis of target metabolite data of plasmas from subclinical *P. falciparum* carriers at the end of the dry season and from clinical malaria cases ($n=12$ May, 12 MAL).

we observed a trend that the top expressed *var* genes in each individual in the wet season are more highly expressed (Fig. 6f), and we plan further studies with larger samples size to verify this

trend. Furthermore, we identified known *var* gene domains such as Duffy binding-like (DBL) and cysteine-rich interdomain region (CIDR), as well as the NTS and ATS, and searched for typical 5'



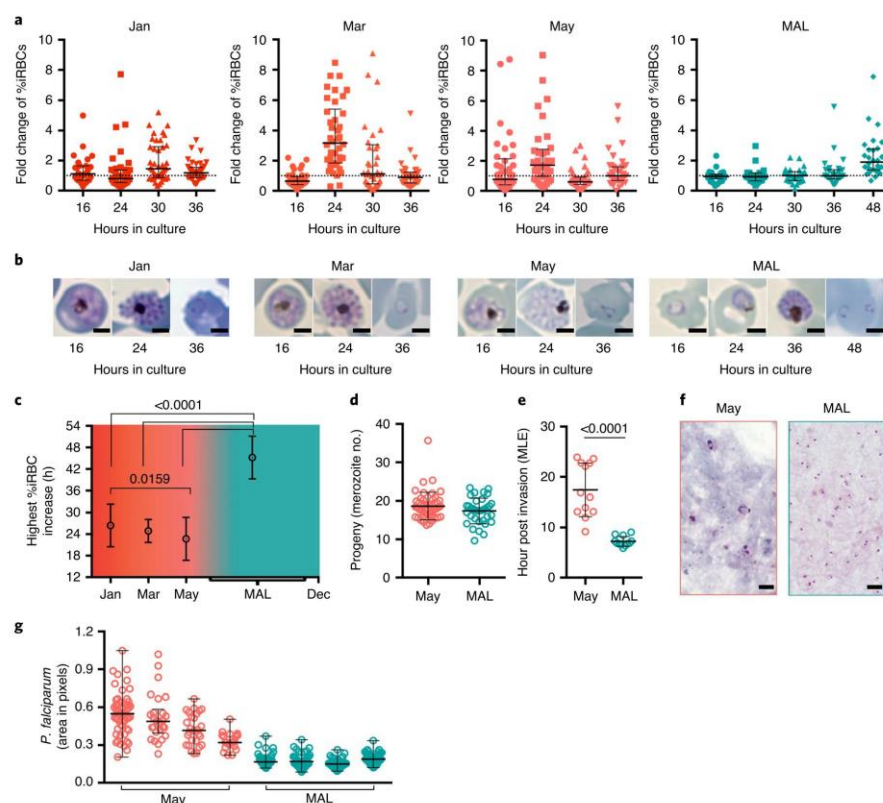


Fig. 5 | Replication of persistent dry season *P. falciparum* is not impaired. **a**, Parasitemia fold change at 16, 24, 30, 36 and 48 h after culture of parasites collected from children at different times during the dry season (January, March and May) and clinical malaria cases (MAL). Fold change is defined as %iRBC t(n)/%iRBC t(n-1). Data indicate median $\pm$ IQR. Dashed line at fold change of 1. One-sided Dunn's Kruskal-Wallis multiple comparisons test. **b**, Giemsa-stained thin blood smears 16, 24, 36 or 48 h after culture of *P. falciparum* parasites collected from children during the dry season (January, March and May) and clinical malaria cases (MAL). Scale bar, 2 μ m. **c**, Time of highest increase in parasitemia detected during in vitro culture of *P. falciparum* parasites from children in January ($n=39$), March ($n=42$) and May ($n=40$) during the dry season, and clinical malaria cases (MAL, $n=27$). Data indicate mean $\pm$ s.d.; one-sided Dunn's Kruskal-Wallis multiple comparisons test. **d**, Number of merozoites inside multinucleated schizonts determined by flow cytometry at the end of the dry season (May, $n=50$) and clinical malaria (MAL, $n=35$) samples. Data indicate mean $\pm$ s.d.; two-tailed Mann-Whitney test. **e**, Maximum likelihood estimation (MLE) of the hpi of dry season (May, $n=12$) and clinical malaria (MAL, $n=12$) parasites. Data indicate mean $\pm$ s.d.; two-tailed Mann-Whitney test. **f**, Giemsa-stained thick blood films of *P. falciparum* parasites collected straight from the arms of children at the end of the dry season (May) and at their first clinical malaria (MAL). Scale bar, 5 μ m. **g**, *P. falciparum* area measured from Giemsa-stained thick smears in subclinical infections at the end of the dry season (May) and in malaria cases (MAL) in the wet season. Data indicate median $\pm$ IQR; two-tailed Mann-Whitney test, $P<0.0001$. IQR, interquartile range.

UPS sequences associating with different pathological outcomes²² in the dry season and malaria case assembled *vars*. Although we were unable to determine the UPS type of expressed *vars* owing to the short assembly of the 5' UTR region, we did find more *var* genes with a DBLz domain in the malaria samples (13 of 61 in *var* fragments longer than 3.5 kb) compared to the dry season (one of 11 in *var* fragments longer than 3.5 kb) (Supplementary Table 10).

Discussion

Asymptomatic individuals carrying *P. falciparum* at the end of the dry season in areas of seasonal malaria have been broadly described^{13,33–37}, but how the parasite bridges two rainy seasons

without promoting malaria symptoms or being cleared remained elusive. In this study, with samples from Malians exposed to alternating 6-month dry and transmission seasons, we show that, within each 48-h replicative cycle, *P. falciparum* iRBCs circulate longer in the bloodstream during the dry season, allowing increased clearance in the spleen and thus preventing high parasitemias, which could lead to immune activation or malaria symptoms^{38,39}.

Although asymptomatic parasitemia at the end of the dry season associates with a lower risk of clinical malaria in the ensuing wet season^{13,33–35}, clearance of parasitemia with anti-malarials before the transmission season does not increase subsequent malaria risk, and the persistence of infection during the dry season does not prevent

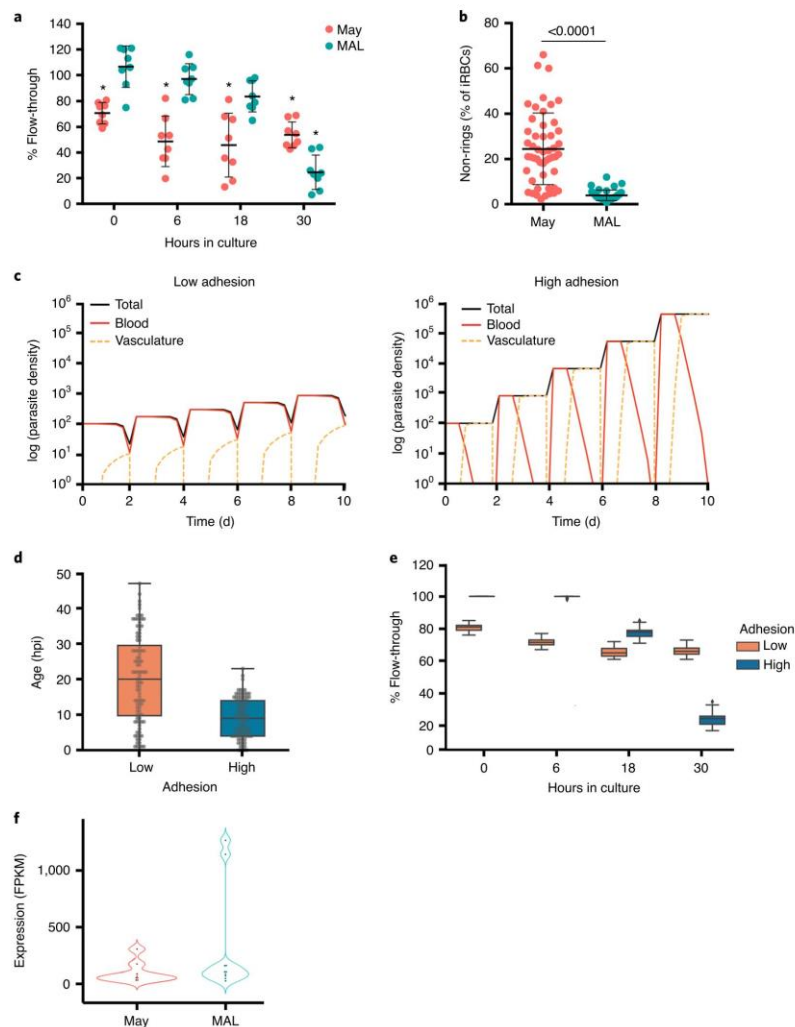


Fig. 6 | Infected erythrocytes in circulation at the end of the dry season are at higher risk of splenic clearance. **a**, *P. falciparum* iRBC filtration through beads mimicking the human spleen at 0, 6, 18 and 30 h after culture at the end of the dry season and during clinical malaria ($n=8$ May, 8 MAL) relative to the non-filtered same-time control. Flow-through percentage is defined as (downstream %iRBCs/upstream %iRBCs) $\times 100$. Data indicate mean $\pm$ s.d.; one-sided Dunn's Kruskal-Wallis multiple comparisons test of the mean rank of each condition to 0-h MAL; * shows $P < 0.001$. **b**, Percentage of circulating non-ring stage iRBCs at the end of the dry season and during malaria cases ($n=50$ May, 39 MAL) determined by flow cytometry. Mean $\pm$ s.d.; two-tailed Mann-Whitney test. **c**, Within-host dynamics simulation of growth rates and population sizes over five replication cycles of low-cyto-adhering (left) and high-cyto-adhering (right) parasites, stratified as circulating (red lines), cyto-adhering (orange dashed lines) and total biomass (black lines). **d**, Simulation of circulating parasite age distribution over two replication cycles after repeated sampling of low-cyto-adhering parasites (Low, $n=100$) and high-cyto-adhering parasites (High, $n=100$). **e**, Simulation of circulation and passage through the spleen of independently sampled parasites aging over time, with low-cyto-adhering (Low, $n=50$) and high-cyto-adhering (High, $n=50$) parasites. **f**, Expression level of the highest expressed *var* gene at the end of the dry season and during a clinical malaria case ($n=8$ May, 10 MAL). Box plots (**d**, **e**) indicate the median $\pm$ IQR and the minimum ($Q1 - 1.5 \times IQR$) and maximum ($Q3 + 1.5 \times IQR$) of the data range (whiskers). IQR, interquartile range.

or slow the decline of *P. falciparum*-specific antibodies¹³ (Fig. 2f,g). Consistent with these observations, low parasitemia during the dry season did not elicit detectable inflammation or affect immune cell

function (Fig. 2), indicating that chronic low parasitemia in seasonal endemic settings might differ from controlled human malaria infections (CHMIs) in naive individuals, where low parasitemias

appear to induce immunity⁴⁰, and also suggesting that slow and continuous stimulation of the immune system is less effective than sudden changes in antigenic stimulation⁴¹. Nevertheless, cumulative immunity might be required to sustain the dry season reservoir of *P. falciparum*. Dry season subclinical carriers have higher anti-*P. falciparum* humoral immunity (ref. 13 and Fig. 2f,g) and higher *P. falciparum*-specific MBCs (Fig. 2e) than non-infected individuals, suggesting that a certain level of cumulative exposure is necessary to carry dry season subclinical infections. Additionally, we and others have shown that end-of-dry-season parasitemias are more frequent in older than younger children^{13,42}, which is consistent with an age-dependent decrease in parasitemia and increase in anti-parasitic immunity^{43,44}. It is possible that, within each *P. falciparum* infection, sequential presentation of different VSAs on the surface of iRBCs and its corresponding ordered acquisition of antibodies^{45,46} favor progressively less virulent parasites. Accordingly, a recent study of CHMI, including naive and semi-immune individuals, observed clinical cases in naive individuals, whereas chronic infections appeared in semi-immune individuals with intermediate antibody levels⁴⁷.

Reports from the transmission season show that increasing malaria severity associates with different parasite transcriptional profiles^{26,48–50}, but the persisting dry season reservoir had not been investigated. Our data show that, whereas *P. falciparum*-causing malaria in the transmission season has a ring stage transcriptional signature, parasites persisting at the end of the dry season resemble more developed intraerythrocytic stages, which we confirmed both visually and through differential growth kinetics in vitro (Fig. 5). Future single-cell transcript analysis of iRBCs⁵ will allow comparing stage-matched pools of parasites to better understand how *P. falciparum* achieves low cyto-adhesion in the dry season. Also of interest will be to revisit earlier reports of transcriptional differences between parasites, inducing varying degrees of malaria severity^{26,48,49}, and to question whether these could be partially imposed by the hpi of circulating parasites. In fact, Tonkin-Hill and colleagues found a bias toward early trophozoite transcription in non-severe malaria samples compared to the ring stage transcriptional profile of severe malaria cases⁴⁸, which could be due to differing adhesion efficiencies in vivo. Interestingly, in vitro replication rates of severe and uncomplicated malaria-causing parasites^{51,52} have not consistently explained the higher parasitemias observed in severe malaria cases, suggesting that adhesion efficiency differences might also contribute. Continued asexual replication (independently or coupled with immunity) might lead to progressively less adhesive iRBCs, as observed in parasites collected during the dry season. In a rodent-malaria model, uninterrupted asexual-stage growth led to bias in gene expression of VSA and parasite virulence⁵³, and the transition between acute and chronic phases is suggested to be independent of adaptive immunity⁵⁴. Also, in humans, it has been suggested that continued asexual replication can skew the PfEMP1 expression profile^{47,55}, which is consistent with our *var* genes RNA-seq data (Fig. 6f and Extended Data Fig. 8). The mechanisms by which the parasite adapts to the dry season, and how transmission is assured as the rainy season ensues, remain to be investigated. In a varying or unpredictable environment, organisms can overcome unfavorable conditions by sensing environmental changes and adapting their individual developmental program to increase survival. Alternatively, stochastic population heterogeneity can increase the probability of survival under changing conditions⁵⁶. *P. falciparum* might sense and respond to environmental cues of transmissibility opportunity, as has been described for detection of nutrient availability⁵⁷, sexual commitment⁵⁸ or appropriate environment for gametogenesis⁵⁹. Such a mechanism could act through epigenetic modulation of VSAs, or be seasonally imposed by different metabolic states of the host, driving a shift of the parasite from a fast- to a slow-growing program as the transmission season ends

and persistence is required, and returning to fast growth as transmission resumes. In an avian-malaria model, chronic *Plasmodium relictum* was shown to respond to bites from uninfected mosquitoes and increase its replication, promoting transmission⁶⁰. Parasite survival during the dry season is imperative but will be efficient in resuming transmission only if these retain the ability to produce gametocytes that mosquitoes can uptake. Thus, investigating potential adaptive changes in the sexual stages of *P. falciparum* during the dry season will likely also reveal seasonal adjustments. Investigating the transcriptional profile of the few malaria cases diagnosed in the dry season (Fig. 1a and Extended Data Fig. 2) should be the focus of future studies.

In conclusion, the survival of *P. falciparum*-infected individuals during the dry season is advantageous for the parasite, and low adhesion of infected erythrocytes is likely a central feature to the subclinical carriage of *P. falciparum*, demonstrating the adaptability of *P. falciparum* parasites to the vector-free period.

Online content

Any methods, additional references, Nature Research reporting summaries, source data, extended data, supplementary information, acknowledgements, peer review information; details of author contributions and competing interests; and statements of data and code availability are available at <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1084-0>.

Received: 2 April 2020; Accepted: 27 August 2020;

Published online: 26 October 2020

References

- World Health Organization. *World malaria report 2019* <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2019/en/> (2019).
- Hommel, M., David, P. H. & Oligino, L. D. Surface alterations of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. Antigenic variation, antigenic diversity, and the role of the spleen. *J. Exp. Med.* **157**, 1137–1148 (1983).
- Roberts, D. J. et al. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* **357**, 689–692 (1992).
- Bozdech, Z. et al. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* **1**, E5 (2003).
- Howick, V. M. et al. The Malaria Cell Atlas: single parasite transcriptomes across the complete *Plasmodium* life cycle. *Science* **365**, eaaw2619 (2019).
- Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E. & Cowman, A. F. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* **306**, 1930–1933 (2004).
- Crabb, B. S. et al. Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell* **89**, 287–296 (1997).
- Oh, S. S. et al. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **108**, 237–247 (2000).
- Lavstsen, T. et al. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, E1791–E1800 (2012).
- Lehmann, T. et al. Aestivation of the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* in the Sahel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 601–606 (2010).
- Babiker, H. A., Abdel-Muhsin, A. M., Ranford-Cartwright, L. C., Satti, G. & Walliker, D. Characteristics of *Plasmodium falciparum* parasites that survive the lengthy dry season in eastern Sudan where malaria transmission is markedly seasonal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**, 582–590 (1998).
- Ouedraogo, A. L. et al. Dynamics of the human infectious reservoir for malaria determined by mosquito feeding assays and ultrasensitive malaria diagnosis in Burkina Faso. *J. Infect. Dis.* **213**, 90–99 (2016).
- Portugal, S. et al. Treatment of chronic asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection does not increase the risk of clinical malaria upon reinfection. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 645–653 (2017).
- Kimenyi, K. M., Wamae, K. & Ochola-Oyler, L. I. Understanding *P. falciparum* asymptomatic infections: a proposition for a transcriptomic approach. *Front. Immunol.* **10**, 2398 (2019).
- O'Donnell, A. et al. The acute phase response in children with mild and severe malaria in Papua New Guinea. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**, 679–686 (2009).

16. Park, G. S., Ireland, K. F., Opoka, R. O. & John, C. C. Evidence of endothelial activation in asymptomatic *Plasmodium falciparum* parasitemia and effect of blood group on levels of von Willebrand factor in malaria. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* **1**, 16–25 (2012).
17. Burte, F. et al. Circulatory hepcidin is associated with the anti-inflammatory response but not with iron or anemic status in childhood malaria. *Blood* **121**, 3016–3022 (2013).
18. Weinberg, J. B. et al. Monocyte polarization in children with *falciparum* malaria: relationship to nitric oxide insufficiency and disease severity. *Sci. Rep.* **6**, 29151 (2016).
19. Oyegbe-Liabagui, S. L. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in children with malaria in Franceville, Gabon. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* **6**, 9–20 (2017).
20. Lyke, K. E. et al. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor α , and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect. Immun.* **72**, 5630–5637 (2004).
21. Hopp, C. S. et al. *Plasmodium falciparum*-specific IgM B cells dominate in children, expand with malaria and produce parasite inhibitory IgM. Preprint at <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.12.030049v2> (2020).
22. Lavstsen, T., Salanti, A., Jensen, A. T., Arnot, D. E. & Theander, T. G. Sub-grouping of *Plasmodium falciparum* 3D7 var genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. *Malar. J.* **2**, 27 (2003).
23. Cowman, A. E., Berry, D. & Baum, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J. Cell Biol.* **198**, 961–971 (2012).
24. Snounou, G. et al. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **93**, 369–374 (1999).
25. Liljander, A. et al. Optimization and validation of multi-coloured capillary electrophoresis for genotyping of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins (msp1 and 2). *Malar. J.* **8**, 78 (2009).
26. Daily, J. P. et al. Distinct physiological states of *Plasmodium falciparum* in malaria-infected patients. *Nature* **450**, 1091–1095 (2007).
27. Rono, M. K. et al. Adaptation of *Plasmodium falciparum* to its transmission environment. *Nat. Ecol. Evol.* **2**, 377–387 (2018).
28. Lemieux, J. E. et al. Statistical estimation of cell-cycle progression and lineage commitment in *Plasmodium falciparum* reveals a homogeneous pattern of transcription in ex vivo culture. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 7559–7564 (2009).
29. Deplaine, G. et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood* **117**, e88–e95 (2011).
30. Dahlback, M. et al. Changes in var gene mRNA levels during erythrocytic development in two phenotypically distinct *Plasmodium falciparum* parasites. *Malar. J.* **6**, 78 (2007).
31. Otto, T. D. et al. Evolutionary analysis of the most polymorphic gene family in *falciparum* malaria. *Wellcome Open Res.* **4**, 193 (2019).
32. Otto, T. D. et al. Genome sequencing of chimpanzee malaria parasites reveals possible pathways of adaptation to human hosts. *Nat. Commun.* **5**, 4754 (2014).
33. Sonden, K. et al. Asymptomatic multiclonal *Plasmodium falciparum* infections carried through the dry season predict protection against subsequent clinical malaria. *J. Infect. Dis.* **212**, 608–616 (2015).
34. Males, S., Gaye, O. & Garcia, A. Long-term asymptomatic carriage of *Plasmodium falciparum* protects from malaria attacks: a prospective study among Senegalese children. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 516–522 (2008).
35. Crompton, P. D. et al. Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria. *J. Infect. Dis.* **198**, 1265–1275 (2008).
36. Drakeley, C., Sutherland, C., Bousema, J. T., Sauerwein, R. W. & Targett, G. A. The epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytes: weapons of mass dispersion. *Trends Parasitol.* **22**, 424–430 (2006).
37. Bousema, T. et al. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS ONE* **7**, e42821 (2012).
38. Dicko, A. et al. Season, fever prevalence and pyrogenic threshold for malaria disease definition in an endemic area of Mali. *Trop. Med. Int. Health* **10**, 550–556 (2005).
39. Smith, T., Schellenberg, J. A. & Hayes, R. Attributable fraction estimates and case definitions for malaria in endemic areas. *Stat. Med.* **13**, 2345–2358 (1994).
40. Stanisic, D. I., McCarthy, J. S. & Good, M. F. Controlled human malaria infection: applications, advances, and challenges. *Infect. Immun.* **86**, e00479–17 (2018).
41. Pradeu, T. & Vivier, E. The discontinuity theory of immunity. *Sci. Immunol.* **1**, AAG0479 (2016).
42. Goncalves, B. P. et al. Examining the human infectious reservoir for *Plasmodium falciparum* malaria in areas of differing transmission intensity. *Nat. Commun.* **8**, 1133 (2017).
43. Tran, T. M. et al. An intensive longitudinal cohort study of Malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to *Plasmodium falciparum* infection. *Clin. Infect. Dis.* **57**, 40–47 (2013).
44. Crompton, P. D. et al. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 6958–6963 (2010).
45. Cham, G. K. et al. Hierarchical, domain type-specific acquisition of antibodies to *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 in Tanzanian children. *Infect. Immun.* **78**, 4653–4659 (2010).
46. Obeng-Adjei, N. et al. Longitudinal analysis of naturally acquired PfEMP1 CIDR domain variant antibodies identifies associations with malaria protection. *JCI Insight* **5**, e167232 (2020).
47. Bachmann, A. et al. Controlled human malaria infection with *Plasmodium falciparum* demonstrates impact of naturally acquired immunity on virulence gene expression. *PLoS Pathog.* **15**, e1007906 (2019).
48. Tonkin-Hill, G. Q. et al. The *Plasmodium falciparum* transcriptome in severe malaria reveals altered expression of genes involved in important processes including surface antigen-encoding var genes. *PLoS Biol.* **16**, e2004328 (2018).
49. Almelli, T. et al. Differences in gene transcriptomic pattern of *Plasmodium falciparum* in children with cerebral malaria and asymptomatic carriers. *PLoS ONE* **9**, e114401 (2014).
50. Lee, H. J. et al. Integrated pathogen load and dual transcriptome analysis of systemic host–pathogen interactions in severe malaria. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaar3619 (2018).
51. Deans, A. M. et al. Low multiplication rates of African *Plasmodium falciparum* isolates and lack of association of multiplication rate and red blood cell selectivity with malaria virulence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 554–563 (2006).
52. Chotivanich, K. et al. Parasite multiplication potential and the severity of *falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* **181**, 1206–1209 (2000).
53. Spence, P. J. et al. Vector transmission regulates immune control of *Plasmodium* virulence. *Nature* **498**, 228–231 (2013).
54. Brugat, T. et al. Antibody-independent mechanisms regulate the establishment of chronic *Plasmodium* infection. *Nat. Microbiol.* **2**, 16276 (2017).
55. Abdi, A. I. et al. Global selection of *Plasmodium falciparum* virulence antigen expression by host antibodies. *Sci. Rep.* **6**, 19882 (2016).
56. Weinberger, L. S. A minimal fate-selection switch. *Curr. Opin. Cell Biol.* **37**, 111–118 (2015).
57. Mancio-Silva, L. et al. Nutrient sensing modulates malaria parasite virulence. *Nature* **547**, 213–216 (2017).
58. Brancucci, N. M. B. et al. Lysophosphatidylcholine regulates sexual stage differentiation in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell* **171**, 1532–1544 (2017).
59. Billker, O. et al. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**, 289–292 (1998).
60. Cornet, S., Nicot, A., Rivero, A. & Gandon, S. Evolution of plastic transmission strategies in avian malaria. *PLoS Pathog.* **10**, e1004308 (2014).

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

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature America, Inc. 2020

Methods

Study individuals and ethical approval. This study, registered at ClinicalTrials.gov (identifier NCT01322581), was approved by the Ethics Committee of Heidelberg University Hospital; the Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology at the University of Bamako; and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health Institutional Review Board. Samples and clinical data were obtained between 2011 and 2019 in a cohort study previously described⁴¹ and conducted in Kalifabougou, Mali, where malaria transmission occurs from June through December. Access to antimalarial drugs was provided by a single clinic and pharmacy. A random sample of the village population was drawn in an age-stratified manner to enroll the study, including individuals aged 3 months to 45 years. Written informed consent was obtained from all participants and the parents/guardians of included children. Exclusion criteria at enrollment included hemoglobin <7 g dl⁻¹, axillary temperature ≥37.5°C, acute systemic illness or use of antimalarial or immunosuppressive medications in the 30 d preceding enrollment. Clinical malaria cases were determined prospectively by passive surveillance and defined by axillary temperature ≥37.5°C, ≥2,500 asexual parasites per µl of blood and no other apparent cause of fever. Malaria episodes were treated according to Malian national guidelines with a 3-d standard course of artemether and lumefantrine. Cross-sectional clinical visits and blood draws were performed at the beginning (January), mid (March) and end (May) of each dry season.

Sample collection. Dried blood spots on filter paper (Protein Saver 903, Whatman), thick blood smear and venous blood (4 or 8 ml depending on whether donor age was below or above 4 years) were collected on dry season cross-sectional visits and at their first malaria episode of the transmission season. Blood samples drawn by venipuncture were collected in sodium citrate-containing cell preparation tubes (Vacutainer CPT Tubes, BD) and transported to the laboratory where PBMCs, plasma and RBC pellets were separated by centrifugation and used freshly or stored at -80°C within 3 h. An additional 2 ml of venous blood from RDT+ individuals who tested at the end of the dry season (May 2012) cross-sectional⁴¹, and from individuals at their first malaria episode of the ensuing transmission season, was collected into EDTA tubes (Vacutainer K3EDTA Tubes, BD) and processed directly at the field site. Plasma (used for metabolomic analysis) was separated by centrifugation and immediately frozen in liquid N₂. The buffy coat was discarded, and leucocytes were removed from the RBC pellet in a two-step procedure: first by density gradient on Lymphoprep solution (Fresenius Kabi), followed by Plasmodipur (EuroProxima) filtration, all according to the manufacturer instructions and as previously described⁴¹. RBC pellets were then frozen in liquid N₂ and were later used for the RNA-seq and RT-qPCR validation.

Detection of clinical malaria and subclinical *P. falciparum* infection.

Plasmodium parasites per microliter of whole blood were counted in Giemsa-stained thick blood smears against 300 leukocytes of all symptomatic participants presenting to the study clinic, based on a mean leukocyte count of 7,500 cells per µl. Each smear was evaluated separately by two expert microscopists, and a third resolved discrepancies. Subclinical infections during the dry season were detected at cross-sectional time points by RDT (SD BIOLINE Malaria Ag Pf test of histidine-rich protein II) with a sensitivity of ~100 parasites per µl⁴² once the blood was in the laboratory and by Giemsa-stained smear and nested PCR amplification of *P. falciparum* DNA retrospectively as previously described⁴¹ from filter papers (2017) and frozen RBC pellets (2018). The sensitivity of the nested PCR is ~0.5–1 parasites per µl⁴¹.

***P. falciparum* quantification.** By flow cytometry, RBC pellets removed from CPT tubes after leucocyte isolation were washed and stained with 5× SYBR Green I (Invitrogen) and 7.5 µM MitoTracker (Applied Biosystems) for 30 min at 37°C. Cells were acquired using a LSR II and analyzed using FlowJo software 10.2 or higher versions. By RT-qPCR, RNA was extracted immediately after thawing RBC pellets using TRIzol LS (Ambion) according to manufacturer instructions, and complementary DNA (cDNA) was synthesized using SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase (Invitrogen). RT-qPCR was run on a qTower (Analytik Jena) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with primers for the *P. falciparum* reference gene glycine-tRNA ligase (PF14_0198) (forward, 5'-TGAGTGATATGGATAATA TAAAGGAACAAA-3'; reverse, 5'-GGATGATATTTACAAA ACGTATCTTTCT-3') and for human GAPDH (forward, 5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG-3'; reverse, 5'-GCCATCACGCCA CAGTTTC-3').

Serologic analyses. CRP, vWF and hepcidin in human plasmas were detected through the CRP Human ELISA Kit (Invitrogen), Human vWF A2 Domain Sandwich ELISA (R&D Systems) and Hepcidin 25 ELISA Kit (DRG Diagnostics), respectively, all according to manufacturer instructions. Results were measured using the Cytation3 plate reader (BioTek). Milliplex Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 41-Plex Kit (Merck) was used to measure circulating analytes in human plasma according to manufacturer instructions and read on a Bio-Plex 200 System (Bio-Rad). PfEMP1 domain antibody reactivity was measured using PfEMP1 domains covalently coupled beads following the method described by

Cham et al.⁴³. PfEMP1 coupled beads were incubated with diluted plasma samples for 30 min, followed by incubation with 1:3,000 human secondary F(ab')₂ Goat Anti-Human IgG (Jackson ImmunoResearch) detection antibody for 30 min. The results were read on a Bio-Plex 200 System. The threshold for reactivity of each PfEMP1 domain was calculated with the average value of 21 German controls plus three standard deviations. Reactivity to PfEMP1 A, B and B/A subtypes was determined by the fluorescence intensity of reactive individuals in the beginning (January) and end (May) of the dry season of subclinical carriers and non-infected individuals. Slopes of subclinical carriers and non-infected individuals were compared using a linear non-interaction model.

Processing of PBMCs. PBMCs were isolated from the Vacutainer CPT Tubes according to manufacturer instructions and were either stained and analyzed immediately or frozen within 3 h of the blood draw in FBS containing 7.5% DMSO (FBS: Gibco; DMSO: Sigma-Aldrich). The cells were first frozen at -80°C for 24 h and then subsequently transferred to liquid N₂ for long-term storage. For experiments where PBMCs were used from frozen vials, PBMCs were rapidly thawed in a 37°C water bath, washed with 10% heat-inactivated FBS in PBS, followed by complete RPMI (RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% penicillin-streptomycin and 0.5% β-mercaptoethanol). For each experiment, PBMCs from all individuals were thawed and assayed at the same time. The trypan blue dye exclusion assay consistently demonstrated greater than 80% viability of PBMCs after thawing. Immediately after thawing or after washing if used fresh, 1–2 × 10⁶ PBMCs were incubated for 30 min at 4°C with different combinations of the following fluorescently labeled surface antibodies diluted 1:25 and stained in 50 µl of 4% FBS in PBS: CD14-PE/BV71, CD16-BV421/BV605/BV711, CD19-PETexasRed/ BV421/PerCPcy5.5, CD21-FITC/PE Texas Red/BV421/APC, CD27-FITC/PEcy7/AlexaFluor 700/BV421/BV650/APCcy7, CD3-BV510/BV711/PerCPcy5.5, CD4-FITC/PEcy5/APC, CD8-PEcy7/APCcy7, TCRγδ-PE and CD56-BV510/BV605. After fixing and permeabilizing the cells with FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience) according to manufacturer instructions, PBMCs were stained for 30 min with 1:25 diluted fluorescently labeled intracellular antibodies: CD25-PEcy7, T-bet-PE Texas Red, IL-2-FITC, Granzyme B-PE Texas Red, FCRL5-PE and Granzyme A-AF647. Cells were acquired using BD LSR II or LSR Fortessa flow cytometers (BD) and analyzed using FlowJo 10.2 or higher versions.

Flow cytometry with *P. falciparum*-specific B cell probes. Recently thawed PBMCs were stained with biotinylated recombinant PfMSP1 and PfAMA1 and then coupled to fluorescently labeled streptavidin⁴¹, together with the following labeled monoclonal antibodies: CD3-BV510 (clone UCHT1), CD4-BV510 (clone SK3), CD8-BV510 (RPA-T8), CD14-BV510 (clone M5E2), CD16-BV510 (clone 3G8), CD56-BV510 (clone HCD56), CD10-BUV737 (clone Hi10a), IgD-BUV737 (clone IA-2), CD19-ECD (clone J3-119), CD21-PE-Cy7 (clone B-ly4), CD27-BV605 (clone M-T271), IgM-PerCP-Cy5.5 (clone G20-127) and IgG-AlexaFluor700 (clone G18-145). Aqua Dead Cell Stain was added for live/dead discrimination (Thermo Fisher Scientific). Stained samples were run on a LSR Fortessa X20 (BD), and data were analyzed using FlowJo 10.2 or higher versions. PfMSP1- or PfAMA1-specific MBcs were identified after exclusion of CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD14⁺CD16⁺CD56⁺ non-B cells and CD10⁺ immature and IgD⁺ B cells. To increase the frequency of specific B cells detected in any given sample, PBMCs were stained simultaneously with PfAMA1 and PfMSP1 probes. Therefore, PfAMA1 and PfMSP1 probe-binding cells are indistinguishable by flow cytometry analysis and are referred to together as 'Pf-specific' cells. Influenza hemagglutinin (HA) antigen was used as a non-Pf-specific cells control.

***P. falciparum* culture.** 3D7 *P. falciparum* parasites were maintained in fresh human O⁺ erythrocytes at 5% hematocrit in RPMI 1640 complete medium (with L-glutamine and HEPES 7.4% sodium bicarbonate, 100 µM hypoxanthine (C.C.Pro) and 25 mg ml⁻¹ gentamycin (all Gibco)) added with 0.25% Albumax II (Gibco), at 37°C either in the presence of a gas mixture containing 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ or using the candle jar system method described by Trager and Jensen⁴⁴.

***P. falciparum* invasion assay.** 3D7 *P. falciparum* parasites were cultured and regularly synchronized by the use of 5% sorbitol⁴⁵ and heparin to prevent re-invasion. At the early schizont stage, E64 compound (Sigma-Aldrich) was used to prevent merozoite egress, and, later, merozoites were purified through filtration as previously described⁴⁶. Merozoites were cultured with non-infected RBCs and RPMI medium supplemented with 25% human plasma from different donors for 30 min to allow invasion, and then RPMI medium supplemented with Albumax II was provided to all parasites for 30 h. iRBCs were fixed as previously described⁴⁶ and stained with 5% SYBR Green, and successful invasion by merozoites was measured 30 h after invasion using FACS Canto II (BD) and analyzed using FlowJo software 10.2 or higher versions. Antibody depletion from human plasma was achieved using Protein G and Protein L Plus Agarose beads (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Successful depletion was obtained after three incubations of plasma with the beads and was verified with a Ready-SET-Go! ELISA Kit (eBioscience) measuring total IgG and IgM quantities in the plasma before and after depletion read. Results were read on a Cytation3 plate reader.

Msp2 fragment analysis by capillary electrophoresis. DNA was extracted from two 3-mm circular punches of blood spots on filter papers (Whatman 3MM), using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Genotyping of *msp2* was performed using a previously described nested PCR reaction²⁵. The first PCR amplified the outer *msp2* domain (forward, 5'-ATGAAGTAATTAACATTGTCTATTATA-3'; reverse, 5'-CTTGATACACGGTACATTCTT-3'), and the second PCR used fluorescently labeled primers to identify two *msp2* allelic families: IC/3D7 (forward, 5'-AGAAGATGCAGAAAGAACCCTCTACT-3' and reverse, 5'-GATGTAATCGGGGATCAGTTGTTC G-3' VIC) and FC27 (FC27 forward, 5'-AATACAAGAGGTGGGCRATGCTCCA-3'; reverse, 5'-TTTATTGGTGCATTGCCAGAACTTGAAC-3' 6-FAM). Fragment analysis was performed by capillary electrophoresis using a DNA sequencer (3730, Applied Biosystems) and analyzed using GeneMapper 5 software (Thermo Fisher Scientific), where a cutoff of 300 relative fluorescent units was set. Fragments were considered to be the same allele within each allelic type if the size difference between them was less than 3 base pairs.

Transcriptome analysis. RNA was extracted from frozen RBC pellets using TRIzol as previously described⁴ and was performed from RBC pellets that were frozen in liquid N₂ immediately after blood draw. RNA quality was tested using a Bioanalyzer (Agilent). The average RNA integrity number value was 5.4 for the dry season samples and 5.3 for the clinical malaria cases. The average Bioanalyzer yield was 27.4 ng on the dry season samples, whereas the average Bioanalyzer yield on the clinical malaria cases was 25.0 ng. Twenty-four samples were selected based on parasitemia, the highest 12 titers for the wet and dry seasons. The RNA input going into next-generation sequencing (NGS) sample preparation ranged from 100 pg up to 100 ng. The samples were prepared for transcriptome analysis following a previously described protocol²⁶ with minor modifications. Initially, samples were treated with TURBO DNase as described. After DNase treatment, Agencourt RNAClean SPRI beads (Beckman Coulter) were resuspended in 19 μ l to modify the protocol for a low-input ribosomal RNA depletion step. Ribosomal RNA was depleted following the Clontech Modified Protocol for Removal of rRNA from Small Amounts of Total RNA (100 ng) using Human/Mouse/Rat Ribo-Zero Magnetic Kit (Epicentre). The purification beads were resuspended in 21 μ l to proceed with the fragmentation step as described²⁶. The first- and second-strand cDNA synthesis steps were followed without modification, except that the final bead purification was eluted in 55 μ l. Aliquots from the DNase, Ribo-Zero treatment and fragmentation were analyzed on Agilent Bioanalyzer Pico RNA chips, along with the final cDNA constructs. The purified cDNA was below detectable levels of the Bioanalyzer Pico chips. Next, 50 μ l of purified cDNA was prepared for NGS using the KAPA Hyper Prep Kit (KAPA Biosystems). The adaptor stock concentration was 300 nM for the ligation with 4-h incubation at 20 °C. The USER digestion step was omitted as the Hi-Fi polymerase does not amplify uracil-containing products. The number of amplification cycles for PCR was determined to be 14 based on quantification of the amount of post-ligation product with a KAPA Quant Kit for Illumina Sequencing (KAPA Biosystems). The purified amplified libraries were visualized on Agilent DNA 1000 chips. Libraries were quantified using the KAPA Quant Kit for Illumina Sequencing and normalized to 2 nM. The samples were pooled based on parasitemias, denatured and diluted to 11 pM for cluster generation and paired-end 100-cycle sequencing on a HiSeq 2500 Rapid flow cell (Illumina) producing ~13 million reads per sample. Raw reads were trimmed of adapter sequence and low-quality bases and filtered for low-quality reads using the FASTX-Toolkit v0.0.14. Remaining reads were mapped to the *P. falciparum* genome, build ASM276v1, using HISAT2 v2.0.4 (ref. ⁶⁸). Reads mapping to genes were counted using htseq-count: v0.6.1 (ref. ⁶⁹). For each sample, parasite age (hpi) was estimated based on gene expression using a previously described maximum likelihood method²⁵, applying a script that was kindly provided by Chris Newbold (lemieux_et_al_pipeline_functions.r and lemieux_et_al_pipeline.r). Differential expression analysis was performed using the Bioconductor package DESeq2 v1.26.0 (ref. ⁷⁰), with adjusted *P* values (*P*_{adj}) < 0.05 considered significant. DEGs were analyzed for enrichment in Gene Ontology categories using DAVID⁷¹. RNA-seq data (normalized counts data and raw sequencing reads) are available at the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (project ID no. GSE148125). Validating RT-qPCR was performed on the 24 above-mentioned samples and on an extra set of 18 samples: six dry season and 12 clinical cases during the wet season. VILO cDNAs were synthesized using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) and purified according to QIAquick 96-well protocol (Qiagen) with a modified centrifugation protocol⁷². Expression levels of eight transcripts (sir2, rex3, Pfsc23, PFB0100c/KARHP, PF07_0006/STARP antigen, PFB0900c/PHISTc, GEX20, PF08_0020/UBE4B and MIF) were determined by RT-qPCR using Invitrogen Express qPCR SuperMix with premixed ROX reference dye (Invitrogen) in 20- μ l reactions. All gene-specific oligo sequences were designed using Beacon Designer software (Premier Biosoft) and purchased from LGC, Biosearch Technologies, with double quencher BHQnova fluorescent probes owing to AT-rich *P. falciparum* sequences (Supplementary Table 7). In a multiplex format, we used reference gene glycine-tRNA ligase%2C putative (PF14_0198) and a standard made from pooled SPIA cDNA. RT-qPCR reactions were mixed at 95 °C for 2 min, 55 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Data were

analyzed using the 7900HT version 2.4 sequence detection system software per the manufacturer's recommendations.

Metabolite profiling. Plasma metabolomics was performed using both targeted and untargeted approaches, across several LC-MS platforms, for small molecules and lipids, to obtain full metabolite coverage. Each plasma sample was split into two independent samples for metabolite extraction. For hydrophilic metabolites, 50 μ l of plasma was extracted by the addition of 9 $\times$ volumes of ice-cold methanol. Samples were briefly vortexed before centrifuging for 10 min to remove precipitated protein. The clarified supernatants were dried under N₂ gas and resuspended in 100 μ l (1:2 dilution). Sample groups were pooled to create a group quality assurance (QA), and all samples were pooled to create a batch quality control (QC), which were injected periodically throughout each run. The hydrophilic extracts were randomized and analyzed using reverse-phase high-performance LC-MS by injecting 10 μ l onto an AB SCIEX 5600 (QTOF) TripleTOF in positive ESI mode before injection on a Thermo Exactive Plus Orbitrap in negative ESI mode. Samples were separated on the AB SCIEX 5600 by reverse-phase HPLC using a Prominence 20 UFLCXR System (Shimadzu) with a Waters (Milford) BEH C18 column (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7- μ m particle size) maintained at 55 °C and a 20-min aqueous acetonitrile gradient at a flow rate of 250 μ l min⁻¹. Solvent A was HPLC-grade water with 0.1% formic acid; solvent B was HPLC-grade acetonitrile with 0.1% formic acid. The initial conditions were 97% A and 3% B, increasing to 45% B at 10 min and 75% B at 12 min where it was held at 75% B until 17.5 min before returning to the initial conditions. The eluate was delivered into a 5600 TripleTOF using a Duospray ion source (all AB SCIEX). The capillary voltage was set at 4.5 kV in negative ion mode, with a declustering potential of 80 V. The mass spectrometer was operated in information-dependent acquisition mode with a 100-ms survey scan from 100 to 1,200 *m/z* and up to 20 MS/MS product ion scans (100 ms) per duty cycle using a collision energy of 50 V with a 20-V spread. Metabolite separation was performed on the Thermo Exactive Plus Orbitrap as previously described³¹ using a Waters XSelect HSS T3 column (2.1 $\times$ 100 mm, 2.5 μ m). For hydrophobic metabolites, 25 μ l of plasma was extracted by the addition of 3 $\times$ volumes of isopropanol. Samples were briefly vortexed and allowed to sit at room temperature for 10 min. Samples were then placed at -20 °C to precipitate overnight. Precipitated samples were centrifuged for 20 min, and the clarified supernatant was diluted to 50% water in a glass LC-MS sample vial (1:6 dilution). Sample groups were pooled to create a group QA, and all samples were pooled to create a batch QC, which were injected periodically throughout each run. The hydrophobic extracts were randomized and analyzed using reverse-phase high-performance LC-MS by injecting 10 μ l of sample onto an AB SCIEX 5600 TripleTOF in positive and negative ESI modes. Metabolite separation was performed as previously described³¹ using a Waters Acquity UPLC CSH C18 column (100 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m). Ammonium formate and formic acid were added to the positive ESI solvents, and ammonium acetate was used for negative ESI. Targeted analysis of the Orbitrap data was performed as previously described³¹. Untargeted analysis from the 5600 TripleTOF was performed using the default settings in MS-DIAL⁷³. The built-in databases were used for putative identification of metabolites at the MS/MS level. QA/QC samples were evaluated to minimize systematic and technical issues. All data were normalized to the total ion chromatogram and blank subtracted, to remove background noise, before statistical analysis.

***P. falciparum* field isolates short-term culture.** RBC pellets isolated from CPT tubes of RDT⁺ samples in the dry season and of malaria case samples in the transmission season were cultured in fresh human O^{B+} erythrocytes at 7% hematocrit in complete RPMI supplemented with 0.25% Albumax II at 37 °C in a candle jar for 36 or 48 h. Malaria case samples were cultured undiluted and diluted 1:10, 1:25 and 1:50 with non-infected blood to assure that initial parasitemia was low (0.5–1%) and that all cultured parasites could grow to their maximum potential. Parasitemia and parasite development were assessed at 0, 16, 24, 30, 36 and 48 h in culture by thin blood smears and flow cytometry. Parasitemia fold change was determined for each sample (ratio of %iRBCs at each time point over its preceding one). The time of highest increase of parasitemia was the time point at which the ratio of %iRBCs at a given time point over its preceding one was the highest for each sample. Progeny number was determined by dividing SYBR Green fluorescence of multi-nucleated schizonts before or at the time of the highest increase in parasitemia in vitro by the fluorescence of the smallest ring stage population that sample presented. Fiji software was used to measure *P. falciparum* area.

Microfiltration of *P. falciparum* iRBCs. RBC pellets isolated from CPT tubes of RDT⁺ samples in the dry season and of malaria case samples in the transmission season were leucocyte depleted using EasySep CD45 Depletion Kit (STEMCELL Technologies), according to manufacturer instructions. iRBCs were cultured in complete RPMI medium supplemented with Albumax, and microfiltration was performed in triplicates at 0, 6, 18 and 30 h in culture as previously described³⁰. Briefly, calibrated microspheres of 5–15 μ m and 15–25 μ m in diameter (Sn96.5% tin, 3% silver, 0.5% copper; Industrie des Poudres Sphériques) were mixed at 4 g each in 12 ml of complete medium. Filter tips (732–0534, VWR) were cut

diagonally on the tip and wet by pushing 200 μ l of complete medium through the filter. The bead suspension was vortexed, and 400 μ l was loaded onto the filter tips, yielding a 1.5-mm layer of microsphere beads. The tips were then filled up with medium and connected to a three-way stopcock. Microsiphonation tips were used within 12 h of preparation. At each time point, 600 μ l of the 2% hematocrit culture was loaded onto the microbead layer and perfused with 5 ml of complete medium at 1 ml min⁻¹ using a syringe pump (AL-4000, World Precision Instruments). The upstream and downstream samples were collected at the different time points and stained for *P. falciparum* quantification by flow cytometry. Samples in which parasitemia increased (fold change > 1) between 0 and 30 h (May) or 0 and 48 h (MAL) were included in the analysis.

Simulation of *P. falciparum* cyto-adhesion and splenic clearance. We developed a discrete-time within-host infection model to monitor parasite replication, cyto-adhesion and splenic clearance in the absence of host immune responses. The parasite's 48-h life cycle was divided into eight 6-h time steps, and we assumed that the parasite population was fully synchronized. The dynamics of circulating, B_i , and cyto-adhering, V_i , parasites are described through the following iterative scheme

$$\begin{aligned} B_i^{t+1} &= \gamma(B_i^t + V_i^t) \\ B_i^{t+1} &= (1 - \sigma_i)(1 - \eta_i)B_i^{t+1} \\ V_i^{t+1} &= \eta_i B_i^{t+1} \\ V_i^{t+1} &= (1 - \sigma_i)(1 - \eta_i)V_i^{t+1}, \quad \forall i \in [2, 3, \dots, 8] \\ V_i^{t+1} &= \eta_i B_i^{t+1} + V_i^{t+1}, \quad \forall i \in [2, 3, \dots, 8] \end{aligned}$$

where B_i^t and V_i^t are the numbers of circulating and cyto-adhering parasites of age i and at time t , respectively. γ is the intrinsic parasite growth rate—that is, the average number of newly infected RBCs arising from a single infected cell. As seen from the above equations, only cyto-adhering and freely circulating iRBCs replicate and contribute to parasite population growth, whereas the spleen is assumed to remove retained parasites. Removal of infected RBCs from circulation by means of cytoadhesion, η_i , and splenic clearance, σ_i , is assumed to be dependent on the age of the parasite, i , where the rate of removal increases as the parasite starts to express cyto-adhering VSAs, PfEMP1, shortly after invasion, and where RBC modification by the parasite gradually increases the cell's rigidity and, hence, splenic retention. Both removal functions are given by the following sigmoidal forms

$$\begin{aligned} \sigma_i &= \sigma(i) = \frac{\sigma_{\max}}{1 + e^{a \cdot (i - T)}} \\ \eta_i &= \eta(i) = \frac{\eta_{\max}}{1 + e^{b \cdot (i - T)}} \end{aligned}$$

and are visualized in Extended Data Fig. 7. $\sigma_{\max}$ and $\eta_{\max}$ are the maximum removal rates by the spleen and cyto-adhesion, respectively. p_{σ} and T_{σ} are the shape and location parameters of the sigmoidal functions, where T determines the age at which 50% of the parasites are removed. The factor $k \in [0, 1]$ is included to investigate the effect of cyto-adhesion on the within-host growth dynamics. All parameters and values used are listed in Supplementary Table 12.

PfEMP1 genes expression. To exclude human reads, all reads were mapped against the human genome (hg19) using bwa mem⁷ (-k 32). Reads and their pair that did not map the human genome were used further. Reads were correct with quorum²⁰, parameter -k 35. Adapters were trimmed with cutadapt²¹, using the TruSeq LT adapter sequences. To assemble the *var* genes, the RNA-seq reads (fastq files) were first assembled with the pipeline recently published in Otto et al.³¹. Owing to the variable coverage of the sequence reads, the results were not satisfactory. Therefore, an older approach was used to assemble all the non-human sequencing reads with velvet²², following parameters Kmer 41, exp_cov 999999999, ins_length 420, cov_cutoff 5, ins_length_sd 30 and min_pair_count 5. Different k-mer were tested, and k-mer of 41 returned the best results. The obtained contigs were annotated, and the domains were called as previously described³¹. For each *var* gene, domains and subdomains were annotated as defined by Rask et al. (vardom³¹). The expression per *var* gene was calculated with two methods. In both methods, the reads back with bwa mem were mapped against the assemblies. In the first method, the number of mapped reads was counted on *var* genes larger than 3,500 and normalized by the length of the *var* genes and the number of reads mapped against all contigs, similar to RPKM. In the second method, the coverage over the middle of the LARSFADIG motifs (samtools depth) was addressed. These values were divided by the number of reads mapped on each assembly and multiplied by 10 million. As a complementary validation, a mapping approach was used: the sequencing reads were mapped using bwa mem, parameter -k 31 -a (to allow multiple hits), against a combined database of *var* genes from Otto et al.³¹ (varDB, fulldataset.1 kb.nt.fasta.gz) and the *var* genes from Otto et al.³², limited to *var* genes of the length of at least 3 kb. Next, the number of reads mapped with an AS score of at least 95 against the *var* genes from this combined database were counted.

Statistical analysis. Mann–Whitney or Kruskal–Wallis was used to test for differences between two or more groups, respectively. Differences between the number of clones and clone sizes were tested by Mood's median test. PfEMP1 slopes between the beginning and the end of the dry season of subclinical carriers

and non-infected individuals were compared using a linear non-interaction model. Spearman's rank correlation between linear RT-qPCR normalized data and linear RNA-seq normalized data of each gene was obtained along with P values using GraphPad Prism 8.0 software. Metabolite significant differences were determined by a two-way analysis of variance (ANOVA) corrected for multiple comparisons controlling for a false discovery rate of 0.05%. Statistical significance was defined as a two-tailed P value of ≤ 0.05 . All analyses were performed with GraphPad Prism versions 6.0 or 8.0, JMP 14.0.1 or R.

Reporting Summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

RNA-seq data (normalized counts data and raw sequencing reads) have been deposited in the National Center of Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO Series accession number GSE148125. Metabolomics data are available at the National Institutes of Health (NIH) Common Fund's National Metabolomics Data Repository website, the Metabolomics Workbench, <https://www.metabolomicsworkbench.org>, where it has been assigned project ID PR000948. The data can be accessed directly via <https://doi.org/10.21228/M8540T>. This work is supported by NIH grant U2C-DK119886. The data file of assembled *var* gene fragments of all isolates is available at https://github.com/ThomasDOtto/varDB/tree/master/Otherdatasets/Andrade_DryWet2020

References

- Auburn, S. et al. An effective method to purify *Plasmodium falciparum* DNA directly from clinical blood samples for whole genome high-throughput sequencing. *PLoS ONE* **6**, e22213 (2011).
- Ratsimbasa, A. et al. Evaluation of two new immunochromatographic assays for diagnosis of malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **79**, 670–672 (2008).
- Trager, W. & Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673–675 (1976).
- Radfar, A. et al. Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. *Nat. Protoc.* **4**, 1899–1915 (2009).
- Boyle, M. J. et al. Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 14378–14383 (2010).
- Tonkin, C. J. et al. Localization of organellar proteins in *Plasmodium falciparum* using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Mol. Biochem. Parasitol.* **137**, 13–21 (2004).
- Broadbent, K. M. et al. Strand-specific RNA sequencing in *Plasmodium falciparum* malaria identifies developmentally regulated long non-coding RNA and circular RNA. *BMC Genomics* **16**, 454 (2015).
- Kim, D., Langmead, B. & Salzberg, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* **12**, 357–360 (2015).
- Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
- Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
- Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
- Virtaneva, K. et al. Longitudinal analysis of the group A *Streptococcus* transcriptome in experimental pharyngitis in cynomolgus macaques. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 9014–9019 (2005).
- Schalkwijk, J. et al. Antimalarial pantothenamide metabolites target acetyl-coenzyme A biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaas9917 (2019).
- Cajka, T. & Fiehn, O. Increasing lipidomic coverage by selecting optimal mobile-phase modifiers in LC–MS of blood plasma. *Metabolomics* **12**, 34 (2016).
- Allman, E. L., Painter, H. J., Samra, J., Carrasquilla, M. & Llinas, M. Metabolomic profiling of the malaria box reveals antimalarial target pathways. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 6635–6649 (2016).
- Tsugawa, H. et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat. Methods* **12**, 523–526 (2015).
- Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Preprint at <https://arxiv.org/abs/1303.3997> (2013).
- Marcas, G., Yorke, J. A. & Zimin, A. Quorum: an error corrector for Illumina reads. *PLoS ONE* **10**, e0130821 (2015).
- Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* **17**, 10–12 (2011).

80. Zerbino, D. R. in *Current Protocols in Bioinformatics* (ed Baxeavanis, A. D.) (John Wiley and Sons, 2010).
81. Rask, T. S., Hansen, D. A., Theander, T. G., Gorm Pedersen, A. & Lavstsen, T. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes—divide and conquer. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1000933 (2010).
82. Otto, T. D. et al. Long read assemblies of geographically dispersed *Plasmodium falciparum* isolates reveal highly structured subtelomeres. *Wellcome Open Res.* **3**, 52 (2018).

Acknowledgements

We thank the residents of Kalifabougou, Mali, for participating in this study. We acknowledge the support of the Flow Cytometry Core Facility of DKFZ in Heidelberg, Germany, and the Immunology Core Lab of the UCRC in Bamako, Mali. We thank the Metabolomics Core Facility at Penn State University and A. Patterson and P. Smith from the Penn State Metabolomics Core. We thank Z. Bozdech and the lab at Nanyang Technological University, Singapore, for help and expertise with RNA extraction. This work was supported by the German Center for Infection Research (DZIF), the European Research Council under the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme (grant agreement 759534), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) projektnummer240245660 SFB 1129 of the German Research Foundation and the Division of Intramural Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, of the National Institutes of Health. R.T.L. was funded by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Marie Skłodowska-Curie grant agreement DLV-839998.

Author contributions

C.M.A., H.F., R.T.-L., N.F.L., C.A., J.H., C.S.H., S.L., M.N., H.C., D.S., C.M., S.R., K.V., M.V.H., E.L.A. and S.P. performed experiments and analyzed data. S.D., D.D., K.K., A.O., B.T. and P.D.C. designed, conducted and supervised field work generating the clinical data and samples. J.M., N.O.S. and T.D.O. performed bioinformatic analysis. M.-E.N., C.L., T.L., M.A., A.F. and M.L. provided technical expertise, and T.L. and I.T. provided essential reagents. M.R. performed mathematical models. T.M.T., J.S. and V.W. provided statistics expertise. C.M.A. prepared figures, and C.M.A., H.F., R.T.-L., T.M.T., N.S.O. and T.D.O. helped prepare the manuscript. T.M.T., A.F., M.L., T.L., T.D.O., M.R. and P.D.C. provided insightful comments to the manuscript. P.D.C. discussed initial field and study designs. S.P. designed the study and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1084-0>.

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1084-0>.

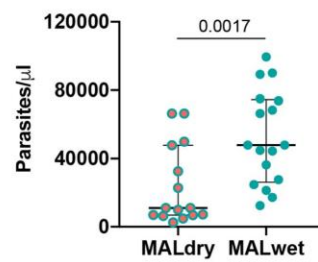
Correspondence and requests for materials should be addressed to S.P.

Peer review information Alison Farrell is the primary editor on this article and managed its editorial process and peer review in collaboration with the rest of the editorial team.

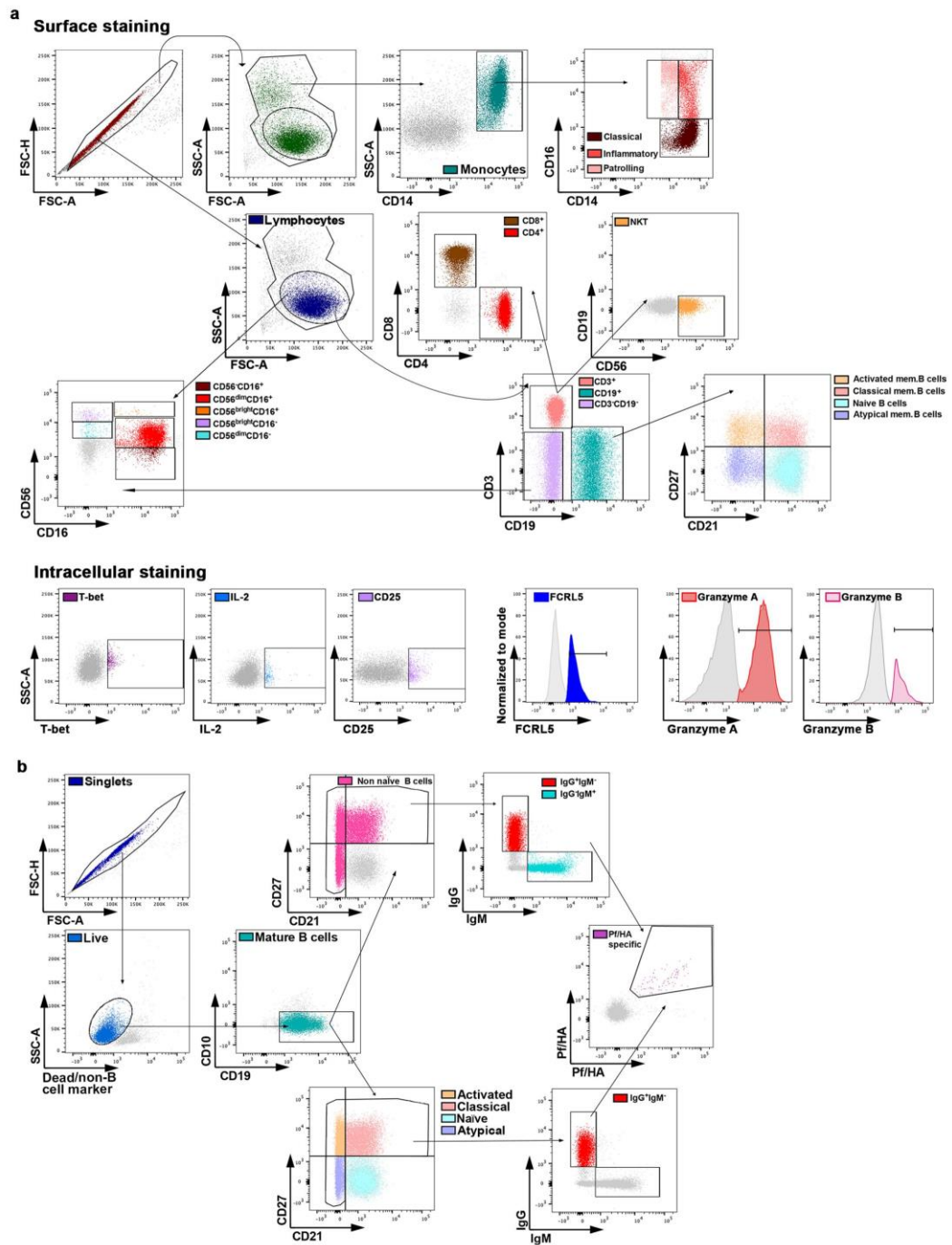
Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

	all			MAL		May	
	n	female %	Age, y, mean (95% CI)	Malaria cases n	Age malaria case (y, 95% CI)	% Pf+ in May n	Age %Pf+ in May (y, 95% CI)
2017	604	46,7	11.2 (10.5 - 11.8)	398	9.4 (8.8 - 10.1)	13,4	13.3 (11.8 - 14.9)
2018	603	46,3	10.8 (10.1 - 11.5)	352	9.2 (8.5 - 10.0)	10,9	11.8 (10.0 - 13.6)

Extended Data Fig. 1 | Characteristics of study participants stratified by year.

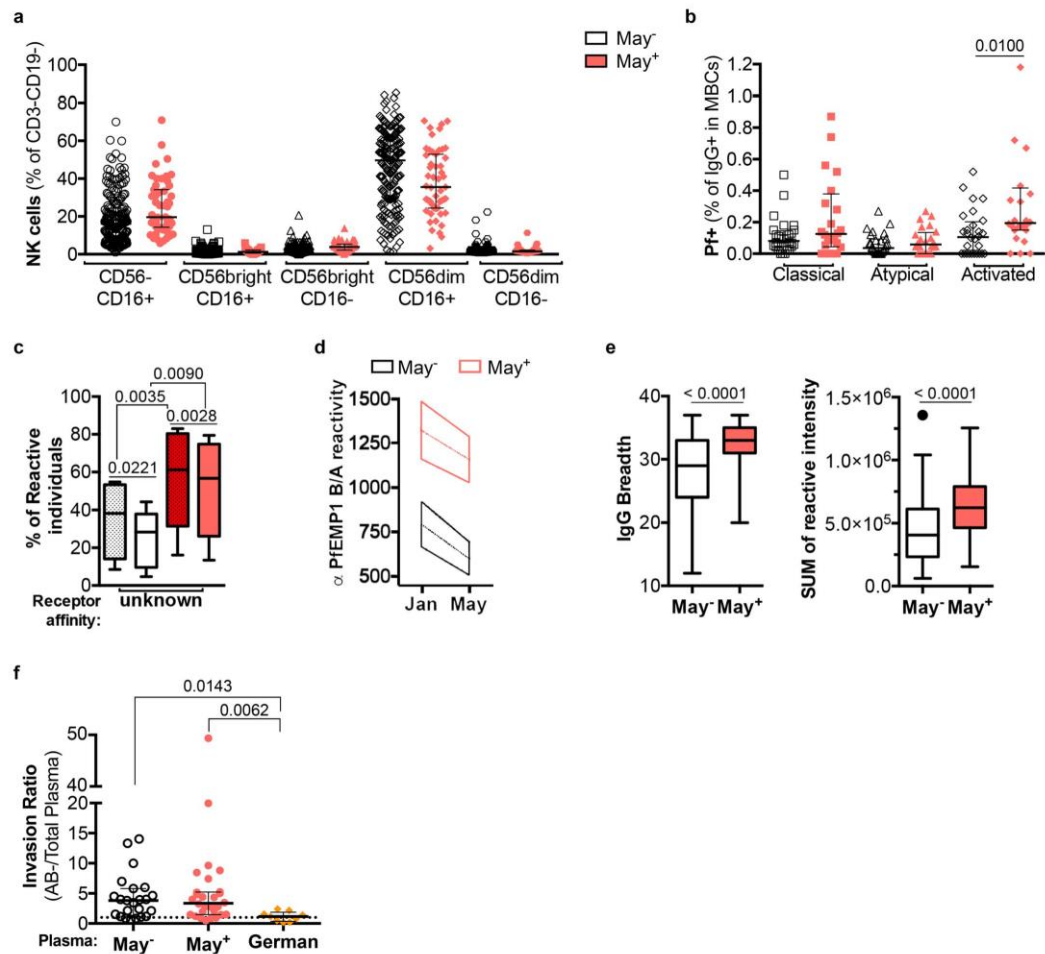


Extended Data Fig. 2 | Parasite density of malaria cases during dry and transmission seasons. Parasite density detected by microscopy on thick blood smear of 17 individuals that presented malaria cases both in the dry season (January to May, MALdry) and in the ensuing wet season (June to December, MALwet) in the years on 2017 and 2018. Parasitaemia data shows median $\pm$ IQR, two-tailed Mann-Whitney test.

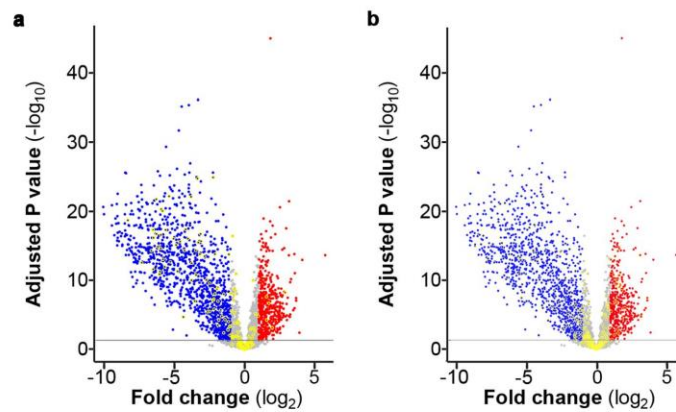


Extended Data Fig. 3 | See next page for caption.

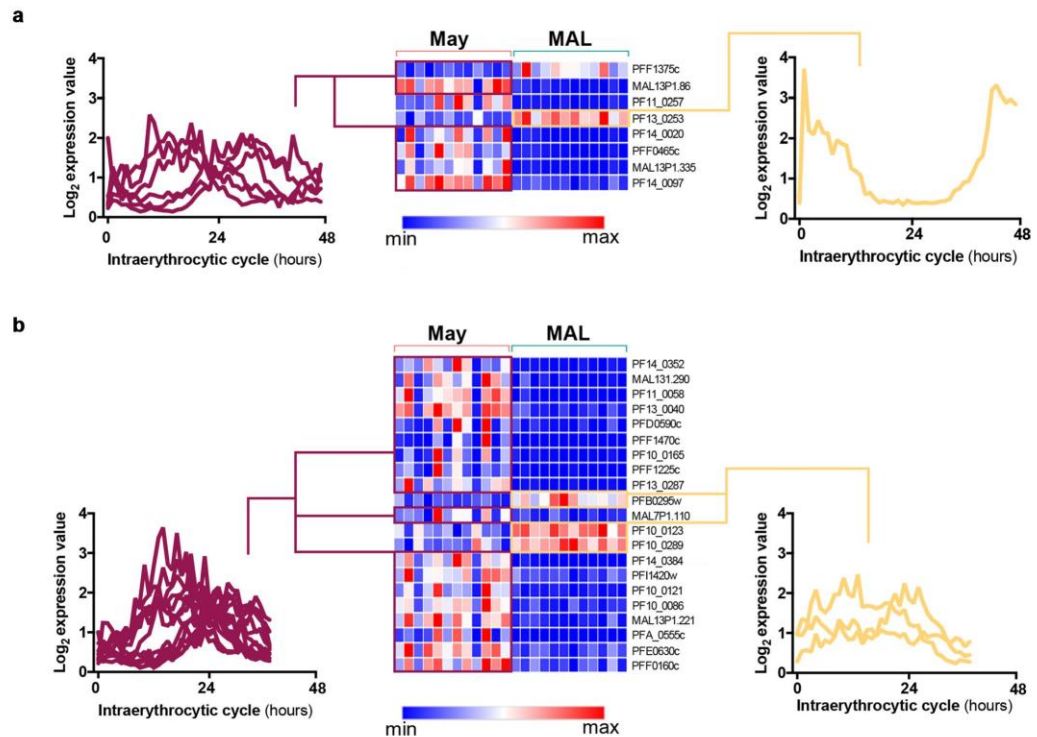
Extended Data Fig. 3 | Flow cytometry gating strategies. **a**, Major leucocyte populations from frozen and fresh PBMCs (Surface staining) and fresh PBMCs intracellular content (Intracellular staining). **b**, *P. falciparum*-specific memory B cells in frozen PBMCs at the end of the dry season of children with or without subclinical *P. falciparum* infection.



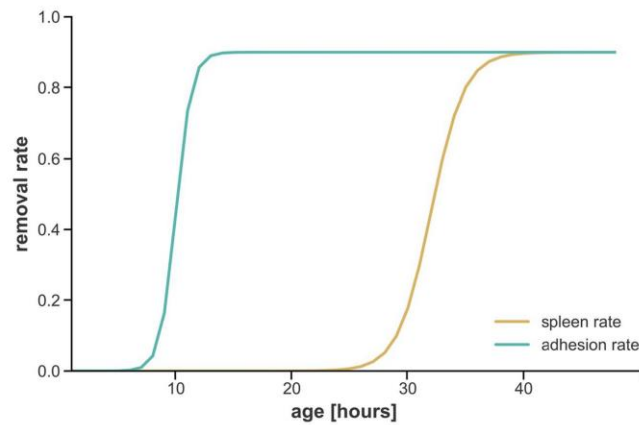
Extended Data Fig. 4 | Immune responses to *P. falciparum* during the dry season. **a**, Proportions of NK subpopulations defined by CD56 and CD16 in children carrying (May⁺) or not (May⁻) *P. falciparum* at the end of the dry season. Median $\pm$ IQR; One sided Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons test. **b**, Proportion of *P. falciparum*-specific IgG⁺ MBCs in classical, activated or atypical MBCs of *P. falciparum* carriers (May⁺) or uninfected individuals (May⁻) at the end of the dry season. Median $\pm$ IQR; One sided Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons test. **c**, Proportion of children with antibodies specific to PfEMP1 domains binding to unknown receptors at the beginning (Jan) and end (May) of the dry season (n=106 Jan and May⁻, 112 Jan and May⁺). Boxplots indicate median $\pm$ IQR. Values >1.5 times the IQR are plotted as individual points (Tukey method), RM one-way ANOVA (with Greenhouse-Geisser correction). **d**, Magnitude of IgG antibodies against PfEMP1 domains of B/A subtype between the beginning and end of the dry season in children carrying (May⁺) or not (May⁻) subclinical *P. falciparum* infection at the end of the dry season (n=106 Jan and May⁻, 112 Jan and May⁺). Boxplots indicate median $\pm$ IQR, Tukey method, two-tailed Mann-Whitney test. **e**, Breadth (left) and magnitude (right) of IgG reactivity to invasion-related antigens (Supplementary Table 11) at the end of the dry season in non-infected and subclinical children carrying *P. falciparum* (n=143 May⁻, 139 May⁺). Individual antigen reactivity (detailed in Portugal et al.¹³) of invasion-related antigens based on Cowman et al.²³. Breadth is the number of antigens to which the level of IgG reactivity exceeds 2 SDs above the no DNA control. Magnitude is the sum of log2 -lgG intensity values for all antigens per sample. Boxplots indicate median $\pm$ IQR, Tukey method, two-tailed Mann-Whitney test. **f**, *P. falciparum* invasion ratio between merozoite invasion in antibody depleted plasma and merozoite invasion in paired complete plasma from subclinical carriers and non-infected children (n=28 May⁺, 23 May⁻), and malaria-naïve control (German adults' plasma, n=9). One sided Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons test.



Extended Data Fig. 5 | Volcano plots comparing the DEGs found in this study with the DEGs reported in two other studies^{26,27}. **a**, 141 DEGs previously reported in the comparison of transcriptomes of severe vs moderate malaria parasite physiological states were matched to the present study. 69 were not DEG in the dry season, 67 were upregulated and 5 were downregulated. **b**, 306 DEGs previously reported in the comparison of high vs low transmission clinical malaria causing parasites were matched to the present study. 182 were not DEGs in the dry season, 103 were upregulated and 21 were downregulated. DEGs found in this study are highlighted in yellow. Dots in blue represent the transcripts up-regulated (1131) and in red the transcripts down-regulated (476) in the dry season compared to clinical malaria samples.



Extended Data Fig. 6 | Expression patterns in 3D7 parasites along the ~48 h intraerythrocytic developmental cycle (defined by Bozdech et al. *PLoS Biology*, 2003) of DEGs between *P. falciparum* of asymptomatic carriers at the end of the dry season (May) and at the first clinical malaria case (MAL) in the ensuing transmission season. **a**, Glycerophospholipid metabolism **b**, Purine and Pyrimidine metabolism pathways by KEGG enrichment analysis using the DAVID tool.



Extended Data Fig. 7 | Modelled removal of infected RBCs from circulation by means of cytoadhesion and splenic clearance over the 48 h replicative cycle, assuming the rate of removal increases with increasing expression of cytoadhering variant surface antigens, and where RBC modification by the parasite gradually increases the cell's rigidity and hence splenic retention.

SampleID	de novo assembly					Mapped base approach		
	total length in bp	# contigs	#LARSFADIG	Max expression	longest contig in bp	# varDB hits	Id of var gene with highest hit	Domain structure of highest hit
May 9307	18.920	10	1	50	6.763	2.693	PF0159-C.g637	NTS-DBLa-CIDRa-DBLb-DBLg-DBLd-CIDRb-DBLb-DBLg-
May 9308	9.624	5	1	37	5.348	14	PF0145-C.g513	NTS-DBLa-CIDRa-DBLd-CIDRb-
May 9309	1.296	2	0	NA	670	13	PF0084-C.g173	NTS-DBLa-CIDRa-DBLd-CIDRb-
May 9310	18.769	10	3	87	6.227	216	PF0043-C.g402	DBLd-CIDRb-
May 9311	2.292	1	0	NA	2.292	14	PT0294-C.g1327	DBLa-CIDRa-DBLb-DBLg-DBLd-CIDRb-DBLb-DBLg-
May 9312	20.556	18	1	30	3.170	64	PF0051-C.g887	DBLa-CIDRa-DBLd-CIDRb-
May 9313	4.721	8	0	NA	2.292	6	PT0122-C.g1412	NTS-DBLa-CIDRa-DBLb-DBLz-DBLe-
May 9314	39.049	28	2	66	9.011	248	PF0262-C.g611	DBLb-DBLb-DBLd-CIDRg-
May 9315	5.824	3	1	307	4.176	193	PF0062-C.g430	NTS-DBLa-CIDRa-DBLd-CIDRb-
May 9316	9.185	13	0	NA	3.400	121	PA0182-C.g826	NTS-DBLa-CIDRa-
May 9317	19.689	20	2	176	5.234	915	PM0098-C.g1086	NTS-DBLa-CIDRa-DBLd-CIDRg-
May 9318	10.131	10	1	55	6.004	51	PF0417-C.g422	NTS-DBLa-CIDRa-DBLd-CIDRb-
MAL 9319	173.674	133	24	159	10.423	1.299	PA0146-C.g1029	DBLd-CIDRb-
MAL 9320	8.666	20	0	NA	2.208	66	PA0224-C.g312	DBLa-CIDRa-DBLd-CIDRb-
MAL 9321	23.668	12	2	1.263	9.564	1.149	PF0097-C.g294	NTS-DBLa-CIDRa-DBLb-DBLg-DBLd-CIDRb-
MAL 9322	138.491	170	16	104	10.046	846	PA0092-C.g461	DBLd-CIDRg-DBLg-DBLz-
MAL 9323	35.909	43	5	48	3.571	103	PA0253-C.g804	NTS-DBLa-CIDRa-DBLd-CIDRb-
MAL 9324	43.517	56	5	27	4.626	136	PF0189-C.g397	DBLd-CIDRb-
MAL 9325	3.849	1	0	NA	3.849	391	PF0801-C.g1202	DBLg-DBLz-DBLe-DBLe-
MAL 9326	113.437	87	17	71	8.812	785	QG0212-C.g1592	NTS-DBLa-CIDRa-DBLd-CIDRb-
MAL 9327	11.330	14	2	109	4.225	82	PA0237-C.g706	NTS-DBLa-CIDRa-DBLd-CIDRb-
MAL 9328	12.501	16	1	163	2.688	63	PF0228-C.g1045	CIDRa-DBLd-CIDRb-
MAL 9329	122.076	120	17	1.140	9.161	1.288	PA0167-C.g886	NTS-DBLa-CIDRa-DBLb-DBLd-CIDRg-
MAL 9330	106.347	87	13	85	11.752	420	PT0211-C.g738	NTS-DBLa-CIDRa-DBLb-DBLd-CIDRb-

Extended Data Fig. 8 | LARSFADIG motifs that identify PfEMP1 coding genes of 12 subclinical individuals at the end of the dry season (May) and 12 first clinical malaria episodes in the ensuing wet season (MAL).

