

ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ART : Artésunate

CBC : Centre de Biologie Clinique

CENHOSOA : CENTreHOspitalier de SOAvinandriana

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

FITC : Fluoresceine IsoThioCyanate

GR : Globule rouge

GR AA : Globule rouge sain

GR AS : Globule rouge drépanocytaire hétérozygote

GR SS: Globule rouge drépanocytaire homozygote

GRP : Globule rouge parasite

Hb: Hémoglobine

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HE: Hydroéthidine

HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique.

HJRA : Hôpital Joseph Ravoahangy Andrianavalona.

IPM: Institut Pasteur de Madagascar.

MACS: Magnetic Separation (Séparation magnétique).

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P. falciparum: *Plasmodium falciparum*

RPMI: Roswell Park Memorial Institute.

SIDA: Syndrome Immuno-Déficience Acquise.

LITTE DES FIGURES

| | Page |
|---|------|
| Figure 1 : Cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i> | 5 |
| Figure 2 : Différences entre les globules rouges normaux et les globules rouges drépanocytaires..... | 6 |
| Figure 3 : Distribution géographique de la drépanocytose et du paludisme sur le continent africain..... | 7 |
| Figure 4 : Interprétations des études épidémiologiques sur la relation entre HbS et le paludisme..... | 8 |
| Figure 5: Mécanismes de l'éryptose..... | 11 |
| Figure 6 : Séparation des stades matures de <i>P. falciparum</i> des autres stades (par rétention magnétique sur colonne)..... | 17 |
| Figure 7 : Culture <i>in vitro</i> de <i>P falciparum</i> avant (A) et après purification (B)..... | 18 |
| Figure 8 : Diffusions lumineuses sur une cellule..... | 21 |
| Figure 9: Appareillage d'un cytomètre en flux..... | 22 |
| Figure 10: Epics XL ,Beckman Coulter. Cytomètre à 4fluorescences équipé d'un laser 488 nm équipé de plusieurs photomultiplicateurs capables de détecter quatre longueurs d'ondes d'émission différentes..... | 23 |
| Figure 11 : Chevauchement des fluorescences relatives de plusieurs fluorochromes. | 26 |
| Figure 12 : Moyenne de l'évolution de la parasitémie chez l'ensemble des sujets AA et SS.... | 31 |
| Figure 13 : Exemple de retard de croissance parasitaire chez GRSS..... | 32 |
| Figure 14: Cytogramme A : la fluorescence en Annexin V-FITC en fonction de la taille (FS) chez les GRP..... | 33 |
| Figure 15: Cytogramme B: la fluorescence en HE en fonction de la taille (FS) des cellules.... | 33 |
| Figure 16 et 17: Augmentation des populations marquées par l'Annexin V-FITC et l'Hydroéthidine dans la région Q2 du cytogramme de la fenêtre électronique HE+..... | 34 |
| Figure 18: Moyenne (%) de l'exposition en PS (GR marqués par Annexin-V FITC et HE) chez GRP AA et SS à 24h de la cocultureavec une dose croissante d'artésunate..... | 36 |
| Figure 19 : Cytogramme A : la fluorescence en Fluo-4 AM en fonction de la taille (FS) des cellules..... | 38 |
| Figure 20 : Cytogramme B: la fluorescence en HE en fonction de la taille (FS) des cellules..... | 38 |
| Figure 21 et 22: Accroissement des populations marquées par Fluo-4 AM et Hydroéthidine dans la région Q2 du cytogramme de la fenêtre électronique HE+..... | 38 |
| Figure 23 : Moyenne des taux de GR AA et SS marqués par Fluo-4 AM à 24h de coculture (%). | 41 |
| Figure 24 : Comparaison des moyennes des taux (%) de GR marqués par Fluo-4 AM avec et sans artésunate à T24h chez GR AA et GRP AA..... | 42 |
| Figure 25: Comparaison des moyennes des taux (%) de GR marqués par Fluo-4 AM avec et sans artésunate à T24h chez GR SS et GRP SS..... | 42 |
| Figure 26 : Accroissement de fluorescence en Fluo-4 AM avec 10nM d'artésunate chez GRP AA..... | 43 |

LISTE DES TABLEAUX

| | Page |
|---|------|
| Tableau I : Evolution de la parasitémie à différentes doses d'artésunate. La décroissance est plus marquée à 10nM ART chez certains sujets (AA2, AA6, SS1, SS7, SS11, SS12)..... | 30 |
| Tableau II : Pourcentages des cellules dans les régions ANN+, HE+ et Q2 chez les échantillons de GRS..... | 34 |
| Tableau III : Pourcentages des cellules dans les régions ANN+, HE+ et Q2 chez les échantillons de GRP (parasitémie sur lame : 3.85%)..... | 35 |
| Tableau IV : Moyenne (%) des GR marqués par Annexin-V FITC et HE selon le type d'hématie AA et SS à 24h de la coculture avec une dose croissante d'artésunate..... | 37 |
| Tableau V : Pourcentages des cellules dans les régions Fluo4+, HE+ et Q2 chez les échantillons de GRS..... | 39 |
| Tableau VI : Pourcentages des cellules dans les régions Fluo4+, HE+ et Q2 chez les échantillons de GRP..... | 39 |
| Tableau VII : Hétérogénéité du calcium dans les GRSS..... | 40 |

SOMMAIRE

| | Page |
|--|-------------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| PREMIERE PARTIE : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES | |
| I. Corrélation entre paludisme et drépanocytose..... | 3 |
| I.1. Paludisme..... | 3 |
| I.1.1. Cycle évolutif chez l'anophèle : phase sexuée = sporogonie..... | 4 |
| I.1.2. Cycle évolutif chez l'homme : phase asexuée = schizogonie..... | 4 |
| I.2. Drépanocytose..... | 6 |
| II. Apoptose et éryptose..... | 9 |
| II.1. Apoptose..... | 9 |
| II.2. Éryptose..... | 10 |
| II.3. Rôles des ions calcium et de l'exposition de la phosphatidylsérine durant l'éryptose..... | 10 |
| II.4. Rôles physiologiques de l'éryptose durant le paludisme..... | 11 |
| III. Artésunate..... | 12 |
| DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES | |
| I. Culture <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>..... | 14 |
| I.1. Matériels..... | 14 |
| I.1.1. Souche parasitaire..... | 14 |
| I.1.2. Hôte des parasites..... | 14 |
| I.1.3. Milieu de culture..... | 14 |
| I.2. Mode opératoire..... | 15 |
| II. Technique de purification et de concentration sur colonne magnétique des globules rouges infectés par les stades matures..... | 16 |
| II.1. Matériels..... | 17 |
| II.2. Mode opératoire..... | 17 |
| III. Coculture des hématies normales et drépanocytaires parasitées avec différentes doses d'artésunate..... | 18 |
| III.1. Matériels..... | 18 |
| III.2. Mode opératoire..... | 18 |
| III.2.1. Prélèvements de sang des drépanocytaires..... | 18 |
| III.2.2. Dilution de l'artésunate..... | 19 |
| III.2.3. Coculture sur des plaques à 6 puits..... | 19 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| IV. | Cytométrie en flux..... | 20 |
| IV.1. | Principe..... | 20 |
| | IV.2.Description du cytomètre en flux..... | 20 |
| | IV.3. Les fluorochromes..... | 23 |
| | IV.3.1. Annexin V- FITC (BD Pharmingen TM)..... | 24 |
| | IV. 3.2. Hydroéthidine (Invitrogen)..... | 24 |
| | IV.3.3. Fluo-4 AM (Invitrogen)..... | 24 |
| | IV.4. Présentation des données et compensation..... | 25 |
| V. | Etude de l'effet de l'artésunate sur les cocultures de globules rouges normaux et drépanocytaires parasités et traités avec de l'artésunate..... | 26 |
| V.1. | Matériels..... | 26 |
| | V.2. Mode opératoire..... | 26 |
| VI. | Evaluation du retard de croissance des parasites dans les globules rouges drépanocytaires..... | 27 |
| VI.1. | Matériels..... | 27 |
| | VI.2. Mode opératoire..... | 27 |
| VII. | Etude de l'éryptose sur des cocultures avec de l'artésunate..... | 27 |
| VII.1. | Matériels..... | 27 |
| | VII.2. Mode opératoire..... | 28 |
| VIII. | Evaluation de l'hétérogénéité du calcium chez les globules rouges drépanocytaires | 28 |
| VIII.1. | Matériels..... | 28 |
| | VIII.2. Mode opératoire..... | 28 |
| IX. | Etude de la modulation calcique sur les cocultures avec de l'artésunate..... | 29 |
| IX.1. | Matériels..... | 29 |
| | IX.2. Mode opératoire..... | 29 |

TROISIEME PARTIE : RESULTATS, DISCUSSIONS, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

RESULTATS

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | Effet de l'artésunate sur le cycle de <i>Plasmodium falciparum</i>..... | 30 |
| II. | Evaluation du retard de croissance dans les globules rouges drépanocytaires..... | 31 |
| III. | Etude de l'éryptose sur des cultures traitées avec de l'artésunate..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| III.1. Mise au point des marquages avec l'Annexin V-FITC et l'Hydroéthidine..... | 33 |
| III.2. Etude de l'éryptose sur des cocultures d'hématies drépanocytaires parasitées avec différentes doses d'artésunate..... | 36 |
| IV. Evaluation de l'hétérogénéité du calcium chez les globules rouges drépanocytaires..... | 37 |
| IV.1. Mise au point des marquages avec Fluo-4 AM et l'Hydroéthidine.... | 37 |
| IV.2. Evaluation de l'hétérogénéité du calcium chez les globules rouges drépanocytaires..... | 39 |
| V. Modulation calcique sur les cocultures avec de l'artésunate..... | 40 |
| DISCUSSION..... | 44 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 47 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 48 |

ANNEXES

Annexe I : Préparation des réactifs et milieu de culture

Annexe II : Protocoles de marquages

Annexe III : Effets de l'artésunate sur le cours du paludisme

Annexe IV : Etude de l'éryptose sur les cocultures avec artésunate

Annexe V : Evaluation de l'hétérogénéité du calcium chez SS

Annexe VI : Modulation calcique sur les cocultures de GRP AA et SS avec artésunate

ABSTRACT

RESUME

Rapport d'introduction

INTRODUCTION

rapportdintroduction.com

Le paludisme est une maladie parasitaire faisant 1.5 à 2.7 millions de morts chaque année. Des cinq espèces de parasites qui causent le paludisme humain, *Plasmodium falciparum* entraîne le plus sévère des symptômes et le plus grand nombre de décès (Eda et Sherman, 2002). Quant à la drépanocytose, c'est une maladie génétique de l'hémoglobine, de transmission autosomique récessive. Elle est due à une mutation* unique, ponctuelle, du gène* β -globine situé sur le chromosome 11. La mutation du sixième codon entraîne le remplacement de l'acide glutamique 6 par de la valine. Les hématies sont normalement discoïdes ; celles qui contiennent l'hémoglobine S s'incurvent, se déforment en forme de faucille ébréchée, lorsqu'elles sont désoxygénées.

Les efforts déployés pour traiter le paludisme ont été largement focalisés sur l'approvisionnement en antipaludiques des centres de santé, le contrôle des systèmes sanitaires et l'emploi d'insecticides. Mais l'augmentation de la résistance* des parasites vis à vis des médicaments rend l'impossibilité de combattre le paludisme par ces méthodes traditionnelles. Plusieurs organisations ont commencé à faire des recherches sur des médicaments qui auront plus de probabilité de guérir les malades du paludisme.

Les mécanismes de l'éryptose semblent être un bon moyen de combattre le paludisme. En effet, les hématies défectueuses sont éliminées de l'organisme par éryptose, une forme de suicide cellulaire induit par le stress et caractérisé par une déformation de la membrane et un rétrécissement de la cellule (Lang *et al.*, 2008). Contrairement à l'éryptose due à la sénescence de l'hématie, qui se produit approximativement après 120 jours, l'éryptose des globules rouges infectés se manifeste après 1h jusqu'à 48h (Lang *et al.*, 2003) déclenchée par l'entrée de l'ion calcium par les canaux perméables aux cations*(Lang *et al.*, 2003; Foller *et al.*, 2008). Puisque, l'éryptose affecte principalement les hématies infectées, elle devrait diminuer la parasitémie* et ainsi influencer sur le cours de la maladie (Foller *et al.*, 2009).

Par conséquent, toute intervention thérapeutique visant à accélérer l'éryptose a le potentiel d'éliminer les hématies parasitées, retarder le développement parasitaire et influencer sur le paludisme. Ce présent travail a pour principaux objectifs de répondre à ces questions :

1. L'exposition de la phosphatidylsérine et la modulation calcique jouent elles un rôle dans la clairance des parasites et agissent elles sur le cycle de *Plasmodium* ?
2. Existe-t-il une différence entre l'éryptose chez les globules rouges

- drépanocytaires parasités et normaux parasités ?
3. L'artésunate engendre-t-il l'éryptose chez des hématies normales et drépanocytaires infectées et influence-t-il la croissance parasitaire sur des cocultures *in vitro* avec *Plasmodium falciparum* ?

La première partie de cet ouvrage concerne les études bibliographiques sur la corrélation entre paludisme et drépanocytose, l'éryptose et l'artésunate.

Ensuite, la deuxième partie décrit les matériels et méthodes employés durant la coculture des hématies saines et drépanocytaires parasitées avec des doses croissantes d'artésunate, ainsi que les manipulations majeures effectuées sur microscope optique et cytomètre en flux.

Les résultats de ces manipulations, la discussion et conclusions ainsi que les perspectives seront détaillés dans la partie finale.

PREMIERE PARTIE:

ETUDES

BIBLIOGRAPHIQUES

I. CORRÉLATION ENTRE PALUDISME ET DRÉPANOCYTOSE

I.1. Paludisme

Le paludisme est dû à un parasite de genre *Plasmodium* dont quatre espèces sont responsables de maladies chez l'Homme : *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P.falciparum*. *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* appartiennent au genre *Plasmodium* tandis que *P. falciparum* appartient au genre *Laverania* (Esposito *et al.*, 1991). Cette espèce est la plus pathogène et responsable de complications sévères, souvent fatales. Elle est présente dans les zones tropicales d'Afrique, d'Amérique Latine et d'Asie, et dominante en Afrique (Hay *et al.*, 2010). Occasionnellement, l'Homme peut être infecté par des parasites simiennes telles que *P. cynomolgi* et *P. knowlesi* (Kissinger *et al.*, 1998)

Le paludisme est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle, du genre *Anopheles*, elle-même infectée après avoir piqué un homme impaludé. La femelle, en prenant le repas sanguin nécessaire à sa ponte, injecte le parasite à son hôte. La durée de vie de *A. gambiae* vecteur du *P.falciparum* est de 30 jours minimum. Par conséquent, après avoir piqué un sujet paludéen, la femelle de *A. gambiae*, peut transmettre le paludisme à des centaines de personnes saines (Pierce *et al.*, 2009).

Le cycle de vie du *Plasmodium* est complexe (Figure 1) et comprend deux étapes majeures: la première est une phase sexuée ou sporogonie chez le moustique femelle. La deuxième étape qui est une phase asexuée chez l'Homme, se divise en deux cycles, l'un à l'intérieur et l'autre à l'extérieur des globules rouges nommés respectivement intra et exo-érythrocytaire.

I.1.1.Cycle évolutif chez l'anophèle : phase sexuée = sporogonie:

La femelle du moustique appartenant au genre *Anopheles* est le vecteur prédominant qui peut transmettre les parasites aux mammifères ainsi qu'à lui-même lors d'un repas sanguin. Sur les deux hôtes, les humains sont l'hôte intermédiaire et le Moustique anophèle l'hôte définitif, car en lui se déroule la phase sexuée (Fujioka *et al.*, 2002).

Lors du repas sanguin sur un paludéen, l'anophèle femelle absorbe des trophozoïtes, des schizontes, et potentiellement des gamétocytes. Les éléments asexués sont digérés tandis que les gamétocytes restent dans l'estomac pour initier la fécondation. Après la fécondation, on obtient un oeuf mobile appelé «ookinète». Ce dernier subit une méiose et des séries de

mitoses donnant l'oocyste à l'intérieur duquel s'individualise les sporozoïtes. Libérés par éclatement de l'oocyste, les sporozoïtes migrent dans les glandes salivaires de l'anophèle. Ce sont les formes infectantes prêtes à être injectées à l'homme lors d'un prochain repas sanguin. La durée du cycle sporogonique est de 12 jours pour *P. falciparum* en Afrique tropicale et le cycle s'arrête lorsque la température moyenne est inférieure à 18° C.

I.1.2.Cycle évolutif chez l'homme : phase asexuée (schizogonie)

Plasmodium subit une évolution en deux phases chez l'homme:

Stade hépatique ou exoerythrocytaire:

Les parasites sont transmis à l'homme via la piqûre de l'anophèle femelle infesté qui prend son repas sanguin. Le moustique injecte de la salive contenant des centaines de sporozoïtes dans le torrent circulatoire. Ces sporozoïtes gagnent rapidement le foie (30 minutes après inoculation) pour effectuer le cycle pré-érythrocytaire.

Pour *Plasmodium falciparum*, en une semaine environ, les parasites sont au stade de schizontes matures dont l'intérieur contient quelques milliers de noyaux qui déforment l'hépatocyte de l'hôte et repoussent son noyau en périphérie. L'éclatement des schizontes libère de nombreux mérozoïtes, qui vont continuer leur développement dans le milieu sanguin.

Stade sanguin ou intraérythrocytaire:

Le mérozoïte entre par endocytose dans une hématie et s'y transforme en stade annulaire ou ring. Dans le globule rouge s'effectue dès lors la phase symptomatique de schizogonie érythrocytaire qui consiste en :

- Une évolution progressive du stade annulaire en trophozoïte (possède une volumineuse vacuole nutritive) ;
- Un grossissement du trophozoïte, le noyau se divise ensuite pour donner un schizonte contenant des pigments malariques ou hemozoïne;
- Une individualisation de chaque noyau contenu dans le schizonte. Ainsi se forme un schizonte mature ou un corps en rosace.
- L'éclatement des schizontes matures libèrent des mérozoïtes qui vont parasiter d'autres hématies pour effectuer un nouveau cycle érythrocytaire. Au cours de cette phase survient la crise de paludisme ou accès palustre dû à

la libération de l'hemozoïne ou pigment malarique.

- Après plusieurs cycles érythrocytaires schizogoniques, s'amorce le cycle sexué ou sporogonique. Dans les hématies apparaissent des éléments à potentiel sexuel: les gamétocytes mâles (microgamétocytes) et femelles (macrogamétocytes).
- Après avoir piqué une personne infectée par le paludisme, l'anophèle femelle récupère les gamétocytes du sang périphérique. Le cycle parasitaire recommence au sein d'un autre hôte lors du prochain repas du moustique.

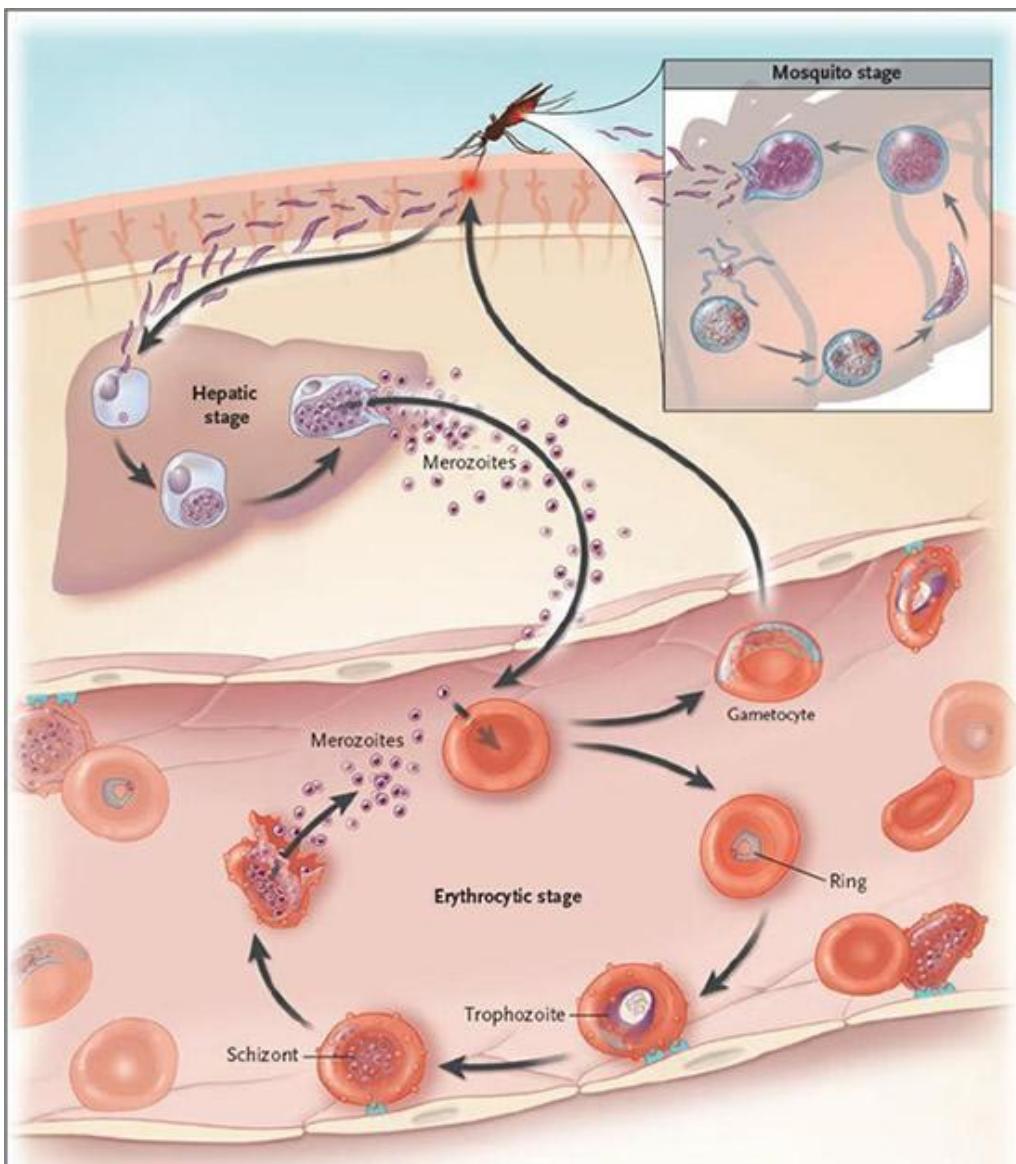


Figure 1 : Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*.

(Source :McW Healthcare, 2008)

I.2. Drépanocytose

La drépanocytose ou anémie falciforme est une maladie génétique, héréditaire récessive autosomique du sang. Elle est dite récessive car la présence de deux gènes anormaux est requise pour que la maladie s'exprime. Elle est caractérisée par la falcification des érythrocytes. Cette falcification est due à une mutation au niveau du gène de l'hémoglobine. En effet, l'hémoglobine S anormale diffère de l'hémoglobine A par le sixième acide aminé de sa chaîne β : une valine qui est un résidu hydrophobe remplace un acide aminé hydrophile, l'acide glutamique. Cette substitution est sous la dépendance d'une mutation portant sur le gène de structure de la chaîne β située sur le chromosome 11.

A la différence des hématies normales, les hématies falciformes sont moins élastiques. Elles obstruent les petits vaisseaux sanguins et bloquent la circulation sanguine (Figure 2).

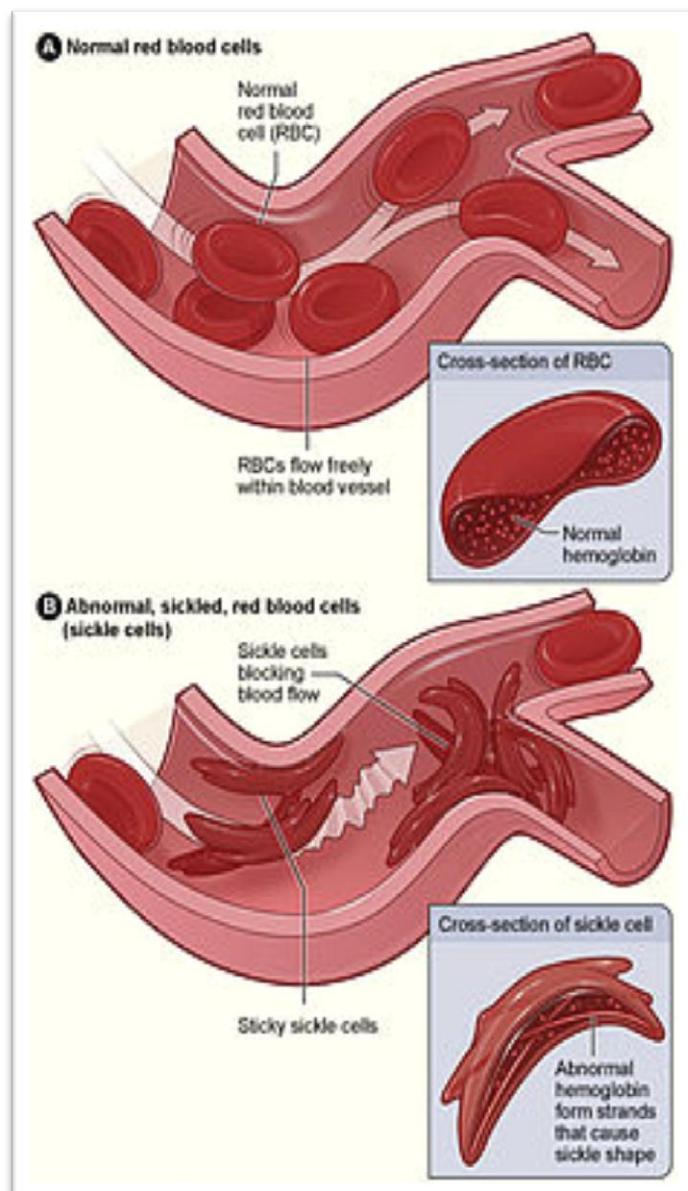


Figure 2 : Différences entre les globules rouges normaux et les globules rouges drépanocytaires.

En A, les globules rouges normaux circulent librement dans les veines. L'encart représente une coupe transversale d'un globule rouge normal de l'hémoglobine normale.

En B, les globules rouges anormaux, falciformes, se collent et s'accumulent au point de branchements d'une veine. L'encart montre une coupe transversale d'une hématie falciforme dont l'HbS est polymérisé en un long brin qui cause l'étirement et la déformation de la cellule.

(Source :

http://en.wikipedia.org/wiki/Sickle-cell_disease)

Les hématies falciformes vivent moins longtemps, ce qui entraîne une anémie dite anémie falciforme. La drépanocytose homozygote se présente comme une anémie hémolytique chronique entrecoupée de crises hématologiques et de crises vaso-occlusives, souvent compliquées par des infections bactériennes sévères.

La maladie est majoritairement rencontrée en Afrique Noire mais aussi en Amérique du Nord et du Sud, aux Antilles, dans les pays du Maghreb, en Sicile, en Grèce, dans tout le Moyen Orient et aux Indes (Driss, 2008). Les plus hautes fréquences de l'HbS se trouvent dans une zone géographique comprise entre le 10ème parallèle Nord et le 15ème parallèle Sud, une zone baptisée "ceinture sicklémique" par Lehmann s'étendant du sud du Sahara à la rivière Zambèze (Allison, 1964). La prévalence de cette hémoglobinopathie est de 8.6% chez les enfants Malagasy (Razakandrainibe *et al.*, 2009). Cette aire géographique à haute fréquence drépanocytaire correspond à la zone d'endémie palustre en Afrique. La superposition des cartes de distribution de l'HbS et du paludisme (Figure 3 et 4) est à l'origine de plusieurs théories sur les relations entre drépanocytose et paludisme.

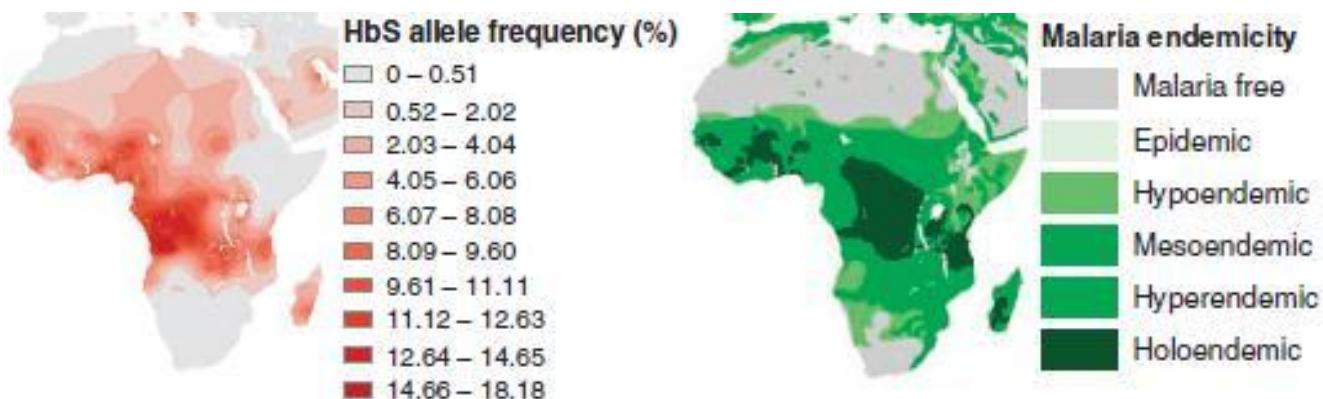


Figure 3 : Distribution géographique de la drépanocytose et du paludisme sur le continent africain.
(Source : Piel *et al.*, 2010)

La coïncidence géographique entre la prévalence élevée de certaines anomalies génétiques et l'endémie du paludisme a suggéré un rôle protecteur de ces traits contre le paludisme sévère. Cette hypothèse a été confirmée pour la drépanocytose (Hill *et al.*, 1991). Les propriétés biochimiques et physiques des globules rouges hétérozygotes (HbAS) ne favorisent pas la croissance intraglobulaire des plasmodes, diminuent les invasions des autres

hématies et augmentent la falcification des érythrocytes infectées (Williams *et al.*, 2005). Néanmoins, le paludisme à *Plasmodium falciparum* est une des causes majeures de décès chez les enfants nés atteints de la drépanocytose en Afrique sub-saharienne (McAuley *et al.*, 2010).

Des études épidémiologiques démontrent que des mutations sur l'hémoglobine humaine, tel le cas de la drépanocytose (Jallow *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2005) lui confèrent un effet protecteur contre les infections dues à *Plasmodium* (Williams, 2006).

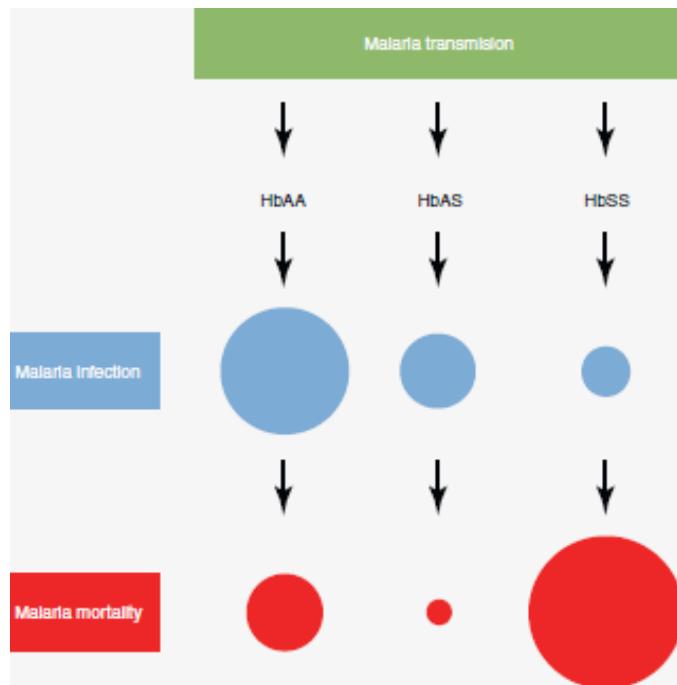


Figure 4 : Cette image illustre l'une des interprétations des études épidémiologiques sur la relation entre HbS et le paludisme. Les tailles des cercles représentent le risque que courent les différents génotypes d'Hb lors d'une exposition similaire au paludisme. Les sujets ayant des HbAS ont peu de risque d'être infectés par le paludisme que les sujets à Hb AA et même lorsqu'ils sont infectés, la maladie n'arrive pas à progresser un état critique ou la mort. Le risque pour que le pathogène du paludisme infecte les sujets ayant des HbSS est réduit par rapport au Hb AA, mais dès qu'ils sont atteints, ces drépanocytaires homozygotes risquent la mort. Bien que des données ont suggéré que la mortalité due au paludisme est à moins de 90% chez HbAS que chez les individus normaux (Williams, 2006), les résultats sont insuffisants pour estimer les potentiels risques de l'infection et de la mortalité chez les drépanocytaires homozygotes. (Source : Williams et Obaro, 2011).

II. APOTOSE ET ÉRYPTOSE

II.1. Apoptose

L'apoptose est une mort programmée des cellules. Elle représente une forme de mort cellulaire résultant de l'activation d'une machinerie interne à la cellule et a pour but de désassembler les composants cellulaires afin d'éliminer les cellules malades ou inutiles durant l'embryogenèse (Lancellotti *et al.*, 2009). Elle s'oppose à la mort nécrotique qui suppose une destruction d'origine exogène produisant une rupture membranaire et la dispersion du contenu cellulaire dans l'environnement causant une inflammation (Gulbins *et al.*, 2000)

Lors de l'apoptose, la membrane cellulaire reste intacte. De nombreuses protubérances apparaissent à sa surface. La polarité phospholipidique de la membrane cellulaire est perdue, avec passage de la phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe (Bortner et Cidlowski, 2004 ; Javadov *et al.*, 2007). A un stade ultérieur, irréversible, le noyau va être également atteint. Il se condense et devient pycnotique. L'ADN est attaqué et fragmenté (Green *et al.*, 1998 ; Gulbins *et al.*, 2000) par diverses endonucléases, générant, selon les cellules, de grands fragments d'ADN ou des multiples des unités nucléosomiques. Le phénomène se signale, par l'exposition de lipides et de sucres normalement situés à la face interne, à l'attention des macrophages (Fadok *et al.*, 2000) qui engloutissent et dégradent soit la cellule entière soit des fragments de celle-ci (Boas *et al.*, 1998) mais restant toujours limités par une membrane. L'intégrité membranaire, la rapidité de l'élimination cellulaire font que l'apoptose, même massive, n'induit aucune inflammation contrairement à ce qui peut se produire dans un phénomène nécrotique, où les différents compartiments cellulaires se rompent, déversent leur contenu enzymatique au sein même des tissus.

D'une part, l'apoptose survient au cours du développement normal des cellules et agit tel un mécanisme d'homéostasie* pour maintenir le nombre de population cellulaire. Chez un humain adulte, environ 10 millions de cellules sont générées tous les jours afin de compenser les pertes durant l'apoptose (Renehan *et al.*, 2001). D'autre part, l'apoptose constitue une défense contre des maladies ou des agents nocifs (Norbury *et al.*, 2001).

II.2. Éryptose

Le terme : « éryptose » a été inventé (Lang *et al.*, 2006) pour désigner l'apoptose des globules rouges. L'éryptose, est un mécanisme de suicide coordonné au sein même de l'érythrocyte sans rupture de la membrane ni libération des organites cellulaires dans

l'environnement externe (Lang *et al.*, 2010). Il est aussi caractérisé par la déformation cellulaire, la protubérance de la membrane et l'exposition de la phosphatidylsérine qui sont tous des caractéristiques de l'apoptose chez les cellules nucléées (Berg *et al.*, 2001 ; Bratosin *et al.*, 2001 ; Daugas *et al.*, 2001).

II.3. Rôles des ions calcium et de l'exposition de la phosphatidylsérine durant l'éryptose

Les ions Ca^{2+} entrent à l'intérieur des cellules par des canaux non sélectifs de cations (Kaestner *et al.*, 2002; Kaestner *et al.*, 2004; Bernhardt *et al.*, 2007; Ivanova *et al.*, 2008). Ces canaux peuvent être activés par des chocs osmotiques (Huber *et al.*, 2001), de stress oxydatif (Duranton *et al.*, 2002) et d'une sortie de l'ion Cl^- (Duranton *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2005).

L'augmentation de l'activité cytosolique de Ca^{2+} stimule l'éryptose (Berg *et al.*, 2001; Bratosin *et al.*, 2001; Daugas *et al.*, 2001), ce qui mène à la vésiculation de la membrane (Allan *et al.*, 1977), stimule le rétrécissement de la membrane cellulaire (Akel *et al.*, 2006; Nicolay *et al.*, 2006; Niemoeller *et al.*, 2006b) et active la cystéine endopeptidase. La cystéine endopeptidase est un enzyme qui dégrade la cytosquelette et qui cause la protubérance membranaire (Pant *et al.*, 1983).

L'ion Ca^{2+} stimule la scramblase (Zhou *et al.*, 2002), un enzyme qui mène à l'exposition de la phosphatidylserine à l'extérieur de la membrane (Lang *et al.*, 2003). En outre, l'ion Ca^{2+} stimule les canaux K^+ sensibles aux ions calcium (Bookchin *et al.*, 1987; Franco *et al.*, 1996) accompagné d'une perte de K^+ et de Cl^- et une hyperpolarisation de la membrane cellulaire. La sortie de KCl entraîne par phénomène d'osmose une déshydratation et ainsi une diminution du volume de la cellule (Lang *et al.*, 2003).

D'autres facteurs peuvent stimuler l'éryptose tels que la céramide (acylsphingosine) la prostaglandine E₂ (Lang *et al.*, 2005b), facteurs d'activation des plaquettes (Lang *et al.*, 2005c)

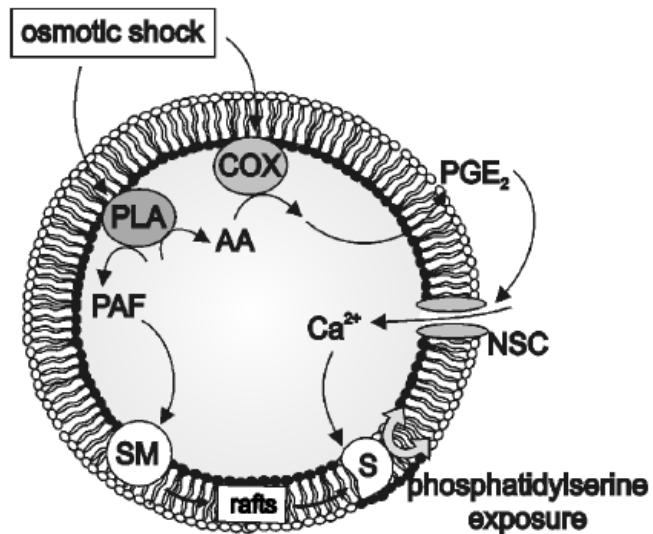


Figure 5: Mécanismes de l'éryptose. AA : arachidonic acid; COX: cyclooxygenase; NSC: nonselective cation channel; PAF, platelet activating factor; PGE2: prostaglandin E2; PLA, phospholipase A2; S, scramblase; SM, sphingomyelinase. (Source : Lang *et al.*, 2005a)

II.4. Rôles physiologiques de l'éryptose durant le paludisme

Se développer à l'intérieur des cellules permet aux agents pathogènes d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Ainsi, ils peuvent répliquer tranquillement avant d'infecter d'autres cellules. La cellule hôte doit supporter les parasites et ainsi augmenter le transport de nutriments et l'élimination des déchets à travers la membrane cellulaire (Gulbins *et al.*, 2001).

Les cellules infectées par *Plasmodium* ont besoin de plus de nutriments que les cellules non infectées. En effet, un globule rouge parasité consomme 40 à 100 fois plus de glucose que les cellules saines. Afin de se nourrir et éliminer les déchets, *Plasmodium falciparum* mettent à leur disposition les canaux ioniques présents sur la membrane des globules rouges (Kirk, 2001). Ils activent les canaux ioniques en induisant un stress oxydatif (Duranton *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2002; Tanneur *et al.*, 2006a). L'ouverture des canaux ioniques est suivie par l'entrée de Ca²⁺ et entraîne l'éryptose (Bilmen *et al.*, 2001). Les macrophages, en phagocytant les cellules en éryptose, limitent la durée de vie des parasites (Lang *et al.*, 2004). D'une part, les pathogènes ont besoin des canaux pour faire entrer du calcium pour sa survie ; d'autre part, l'entrée de calcium déclenche l'éryptose de globules rouges parasités (Brand *et al.*, 2003). L'ouverture de ces canaux limite ainsi la survie des parasites à l'intérieur des cellules. Pour faire face à ce dilemme, *Plasmodium* tarde l'éryptose. Les parasites

séquestrent le calcium, maintenant ainsi une faible concentration en Ca^{2+} à l'intérieur des erythrocytes et celle de la pompe à calcium (Huber *et al.*, 2005).

L'éryptose est caractérisée par l'exposition de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane globulaire (Lang *et al.*, 2003) qui normalement devrait s'exprimer dans le milieu intracellulaire. Les macrophages reconnaissent ce changement de conformation et engloutissent les cellules présentant les phosphatidylsérines à l'extérieur de la membrane (Boas *et al.*, 1998b; Yamanaka *et al.*, 2005a). Ainsi, les globules rouges peuvent être rapidement éliminés de la circulation sanguine (Kempe *et al.*, 2006).

III. ARTESUNATE

La chloroquine a été utilisée à Madagascar depuis 1945, à des fins curatives et préventives, mais des échecs de traitement par cette molécule, notamment chez les enfants, ont été rapportés au cours des vingt dernières années (Lepers *et al.*, 1988 ; Randrianarivelojosia *et al.*, 2006). En Décembre 2005, le Ministère de la Santé, du Planning Familial et de la Protection Sociale a publié la nouvelle Politique Nationale de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Celle-ci préconise l'utilisation d'une combinaison à base d'artémisinine (artésunate et amodiaquine), en première ligne pour le traitement de l'accès palustre simple conformément aux recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS 2005).

L'artémisinine (ou qinghaosu), le principe actif d'une plante chinoise appelée *Artemisia annua* (qinghao), a été isolé en 1972 (Christen et Veuthey, 2001) et sa structure antipaludique a été déterminée en 1979 (van Agtmael *et al.*, 1999). L'artésunate est un des dérivés de l'artémisinine. C'est un hemisuccinate d'artémisinine hydrosoluble. Il dispose d'une liaison peroxyde actif, qui réagit avec les cellules infectées par le paludisme et produit des espèces réactives de l'oxygène qui empoisonnent les organismes à l'intérieur des globules rouges. Après administration parentérale, l'artésunate est rapidement hydrolysé en son métabolite actif, la dihydroartémisinine.

Plusieurs revues attestent l'efficacité de l'artésunate en comparaison avec le traitement standard à la quinine et le préconise étant le médicament de choix pour les adultes et les enfants atteints de paludisme grave dans le monde entier (Barnes *et al.*, 2004 ; SEAQUAMAT group, 2005 ; Sinclair *et al.*, 2012). Il a été rapporté que l'artésunate élimine la fièvre en 16 à 25 heures après administration parentérale chez les malades atteints de paludisme à *falciparum* grave (OMS 1997). Par contre, l'artésunate a une demi-vie très courte

inférieure à 10 min (Krishna *et al.*, 2004). Il cause une clairance rapide des parasites de la circulation sanguine et diminue ainsi les premiers symptômes mais il est rapidement éliminé d'où son utilisation avec des molécules (comme la méfloquine) qui pourraient tuer les parasites durant trois jours de traitements (Wells *et al.*, 2013).

DEUXIEME PARTIE:

MATERIELS ET

METHODES

I. CULTURE *in vitro* DE *Plasmodium falciparum*

Le principe de la culture consiste à reproduire les conditions de développement *in vivo* de *Plasmodium falciparum*. Pour éviter d'éventuelles contaminations, il est nécessaire de toujours travailler dans un endroit aseptisé : manipulation sous hotte à flux laminaire.

I.1. Matériels

I.1.1. Souche parasitaire

La souche de *Plasmodium falciparum* utilisée est la souche FCM 29. C'est une souche d'origine camerounaise, quinino-résistante conservée dans des cryotubes allant à l'azote liquide (-196° C).

I.1.2. Hôte des parasites

Pour un bon développement des parasites, la culture nécessite des globules rouges sains. Ceux-ci proviennent du sang périphérique d'un donneur du groupe O+, prélevés stérilement sur tube EDTA qui est un anticoagulant. Ces hématies seront les cibles des merozoïtes, et utilisées aussi comme source de nutriments pour les formes intra-érythrocytaire (ring, trophozoïte et schizonte). Le sang doit être lavé et déleucocyté avant utilisation. Ceci permet l'élimination des anticorps et des leucocytes présents dans le sang qui peuvent interférer dans le développement des parasites.

I.1.3. Milieu de culture

Le milieu de base de la culture est constitué du RPMI 1640 additionné de quelques éléments de base tels que le glucose, un système tampon HEPES-NaHCO₃, de l'hypoxanthine et supplémenté de l'Albumax II® comme substitut de sérum humain (Annexe I).

- Le **RPMI 1640** (Rosewell Park Memorial Institute) est un milieu nutritionnel complexe , utilisé comme milieu de base pour la culture de *Plasmodium falciparum*.
- La présence de **glucose** est indispensable à la croissance et à la multiplication plasmodiale. Par ailleurs, la consommation en glucose de l'hématie parasitée augmente 75 fois par rapport à celle de l'hématie normale. L'ajout de glucose constitue donc une réserve énergétique dont ni *Plasmodium* ni les hématies ne

possèdent. Le glucose est dégradé par la voie d'Embden Meyerhoff–Parnas ou la glycolyse. Son utilisation s'arrête cependant à l'acide lactique (métabolite terminal de la glycolyse chez *Plasmodium*) qui sera rejeté hors de la cellule. Ceci entraînera l'acidification du milieu qui pourrait altérer les parasites (Sherman, 1998).

- L'acidose produite lors de la multiplication des parasites est diminuée et stabilisée grâce à l'ajout d'un système tampon composé de l'**HEPES** (acide Hydroxy- Ethyl-Pipérazine-Ethane- Sulfonique) et du **NaHCO₃** (bicarbonate de sodium). Ces derniers entrent en interaction avec le CO₂ du mélange gazeux et permet de maintenir le pH du milieu dans une fourchette physiologique comprise entre 7, 1 et 7, 6. C'est le pH optimum pour le développement de *Plasmodium falciparum* (Druilhe et Gentilini, 1982).
- **L'hypoxanthine** est une purine exogène nécessaire à la synthèse de l'ADN parasitaire. Durant la phase asexuée érythrocytaire, *Plasmodium falciparum* est capable de synthétiser les pyrimidines et non les purines qui sont essentielles à la synthèse d'ADN parasitaire (Sherman, 1998).
- **L'Albumax II®** (Gibco BLR, Grand Island, New York, USA), substitut de sérum humain, est un sérum albumine bovine riche en lipides et complémenté par des éléments essentiels à la croissance cellulaire et permettant l'invasion, le développement et la multiplication des hématies (Schuster, 2002). Ce substitut de sérum humain est efficace (Taverne, 2000) et présente de nombreux avantages. A l'inverse du sérum humain, il est stable et permet d'éviter les risques d'utilisation liés aux manques de contrôles par rapport aux règles d'hygiène et de sécurité durant l'utilisation de produits biologiques.

Le milieu de culture est stérilisé par filtration avant usage.

I.2. Mode opératoire

La souche de *Plasmodium* conservée dans l'azote liquide (-196°C) est décongelée rapidement dans une solution saline 3% puis lavée par une solution de lavage (RPMI seul). Seuls les stades ring ou annulaires supportent les étapes de congélation et de décongélation.

Le culot obtenu est cultivé *in vitro* suivant la méthode établie par Trager et Jensen (Trager et Jensen, 1976) avec quelques modifications.

Le changement du milieu de culture et le contrôle de la parasitémie, par observation microscopique d'un frottis mince fixé au méthanol par immersion et coloré durant 10 minutes au GIEMSA, s'effectuent quotidiennement (microscope optique objectif X100 et observation sous huile à immersion).

Si la parasitémie est élevée, une dilution avec des hématies saines permet de préserver le développement des parasites. Mais il faut noter que même si la parasitémie est faible, il faut ajouter des hématies fraîches (O+) tous les 4 à 5 jours afin de renouveler les hématies âgées.

Une étape à effectuer après le changement journalier du milieu consiste à gazer la culture avec un mélange 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂. Cette réduction du taux d'oxygène dans le milieu est indispensable dans les conditions de culture de *Plasmodium falciparum*. En effet, *in vivo*, les parasites transitent bien dans les vaisseaux oxygénés mais prolifèrent au niveau des capillaires profonds où le taux d'oxygène est faible. L'augmentation de celui-ci nuit aux parasites (Scheibel *et al.*, 1979; Druilhe et Gentilini, 1982 ; Sherman, 1998).

Pour simuler la condition normale de développement et de prolifération du parasite chez l'Homme, la température d'incubation est à 37°C en atmosphère humide (Rojas et Wasserman, 1993).

II. TECHNIQUE DE PURIFICATION ET DE CONCENTRATION SUR COLONNE MAGNETIQUE DES GLOBULES ROUGES INFECTÉS PAR LES STADES MATURES

La coculture avec les sanguins de drépanocytaires nécessite des parasites aux stades matures ou schizontes. Afin de les sélectionner, une méthode efficace (Ahn *et al.*, 2008; Ribaut *et al.*, 2008) de purification et de concentration par séparation magnétique en utilisant la colonne et le système MACS (Miltenyi Biotec Inc, Bergisch Gladbach, Allemagne) a été exécutée. Cette technique repose sur la charge en fer des parasites. Les globules rouges parasités par les stades matures (trophozoïtes âgés; schizontes; gamétocytes) ont une quantité d'ion Fe³⁺ très élevée dans leur vacuole alimentaire qui est sensible au champ magnétique (Paul *et al.*, 1981; Trang *et al.*, 2004). Ils peuvent ainsi être séparés de ces hématies saines par colonne magnétique (Ribaut *et al.*, 2008).

II.1. Matériels

- Support et colonne magnétiques pour la purification.
- Microscope optique pour l'observation des stades après purification.

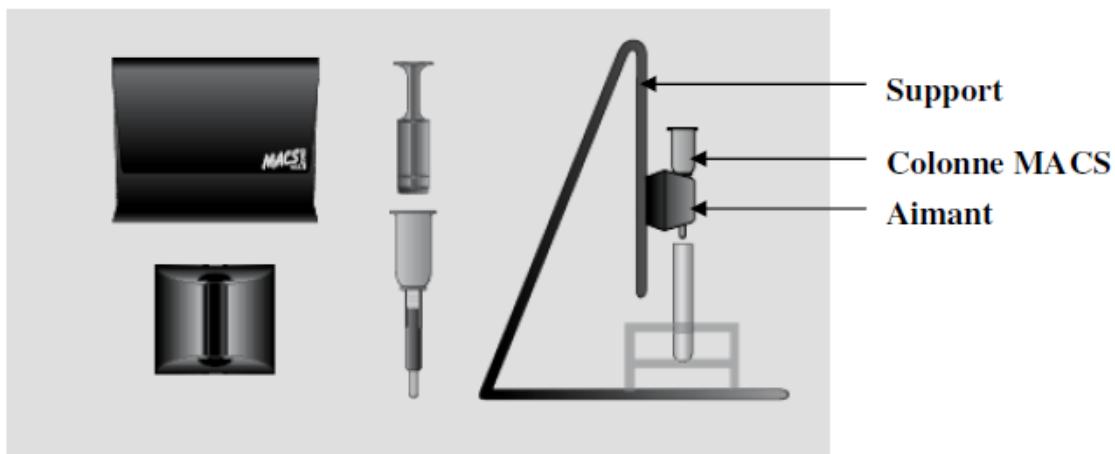


Figure 6 : Appareil de séparation des stades matures de *P. falciparum* des autres stades par rétention magnétique sur colonne. (Source : Miltenyi Biotec Inc. ,2014).

II.2. Mode opératoire

Support et colonne magnétique sont toujours nettoyés avec de l'alcool 70° avant d'être introduits sous la hotte à flux laminaire. Avant la purification, la colonne MACS est lavée avec 7ml de RPMI seul préchauffé au bain-marie à 37°C. La suspension cellulaire est ensuite introduite dans la colonne de séparation à un hématocrite de 10%.

Lorsque la colonne est vide, elle est enlevée du support magnétique et 7 ml de milieu de culture complet sont ajoutés à nouveau dans la colonne. L'éluat est récupéré puis centrifugé à 1000 tr/min pendant 10min à 20°C. Le culot contenant les schizontes est recueilli dans 1ml de RPMI complet. Le niveau de concentration et de purification est vérifié par observation au microscope d'un frottis mince fixé au méthanol et coloré au GIEMSA (Figure 7).

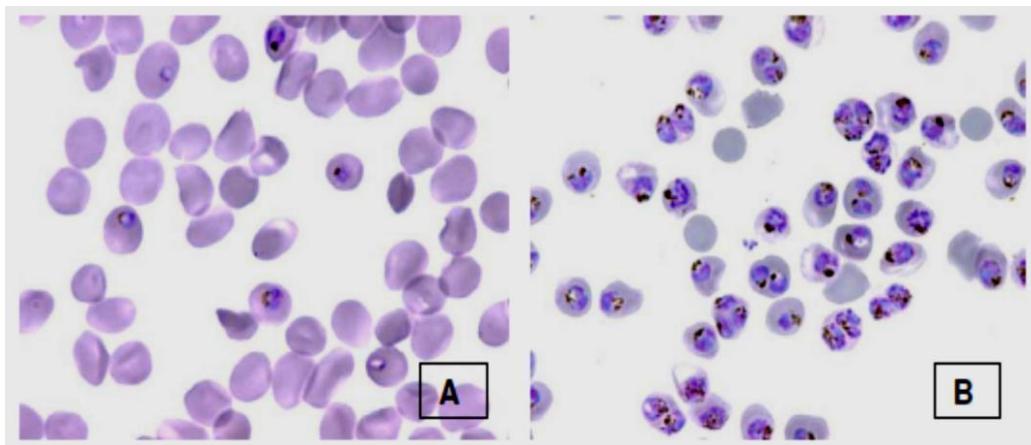


Figure 7 : Culture *in vitro* de *P. falciparum* avant (A) et après purification (B). (Source: Ribaut *et al.*, 2008)

III. COCULTURE DES HEMATIES NORMALES ET DREPANOCYTAIRES PARASITEES AVEC DIFFERENTES DOSES D'ARTESUNATE

III.1. Matériels

- Globules rouges normaux (GR AA), globules rouges drépanocytaires hétérozygotes (GR AS), globules rouges drépanocytaires homozygotes (GR SS).
- Souche de *Plasmodium falciparum* FCM 29.
- Artésunate (ART) 1nM et 10nM

III.2. Mode opératoire

III.2.1. Prélèvements de sang des drépanocytaires

Des prélèvements de sang total sur tube EDTA de sujets drépanocytaires de moins de 24 heures issus de l'Unité de Centre de Biologie Clinique (CBC) de l'Institut Pasteur ainsi que de deux hôpitaux sis à Antananarivo à savoir le laboratoire d'hématologie de l'HJRA et l'unité de pédiatrie de CENHOSOA sont acheminés à l'unité d'Immunologie de l'Institut Pasteur.

A leur arrivée, les tubes sont centrifugés puis lavés deux fois avec du RPMI afin d'éliminer le sérum. Cinq µl du culot sont prélevés des tubes, mis entre lame et lamelle, puis observés sur objectif X 40 au microscope optique. Cette étape est nécessaire afin de s'assurer de l'intégrité des globules rouges avant la coculture. Seuls les culots dont les globules rouges ne

présentent pas encore d'anomalie sont retenus. En effet, la présence d'hématie falciforme au début de la coculture ne permet pas l'entrée des parasites. En outre, ceci engendre des valeurs erronées pour les marquages visant à connaître le taux de l'éryptose et peut causer une fausse interprétation des résultats lors des passages au cytomètre.

III.2.2. Dilution de l'artésunate

L'artésunate se présente sous forme d'une solution à 10mM. Cette solution se conserve durant des mois à - 20°C à l'abri de la lumière.

Dix μ l de cette solution mère est suspendue dans 990 μ l de RPMI 1640 pour avoir une solution à 100 μ M. Cette solution B peut être stockée pendant une semaine à +4°C.

A chaque manipulation, 1 μ M de la solution d'artésunate est préparé en prenant 10 μ l de la solution A et en la diluant avec 990 μ l de RPMI complet. Cette solution B peut se conserver pendant une semaine à +4°C.

Les solutions finales à mettre dans les puits sont de 1nM et 10nM. Les volumes de la solution B requis sont respectivement de 2 μ l et 20 μ l pour 2ml de milieu complet pour les parasites.

III.2.3. Coculture sur des plaques à 6 puits

La coculture s'effectue dans des plaques à 6 puits dont les composants sont :

- Milieu de culture pour les parasites : 2ml
- GR AA, GR AS, GR SS :100 μ l
- Globules rouges parasités (GRP) par des stades schizontes : 100 μ l
- Artésunate 1nM, 10nM

Configuration des plaques à 6puits :

| | | |
|-------------|--------------------|---------------------|
| GR AA + GRP | GR AA + 1ART + GRP | GR AA + 10ART + GRP |
| GR SS + GRP | GR SS + 1ART + GRP | GR SS + 10ART + GRP |

Les plaques sont ouvertes et mises dans un incubateur. Du gaz composé de 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ est introduit pour satisfaire le besoin atmosphérique des parasites.

IV. CYTOMÉTRIE EN FLUX

IV.1. Principe

La cytométrie en flux a été mise au point dans les années 60 par les chercheurs de Los Alamos et de Stanford aux États-Unis. Elle ne s'est cependant réellement développée que depuis les années 80 avec l'apparition des anticorps monoclonaux et certaines applications comme le phénotypage des hémopathies malignes et le suivi des populations lymphocytaires dans les pathologies associées au VIH (Troussard *et al.*, 2010). En analyse médicale, la cytométrie en flux est de plus en plus utilisée, pour le typage des leucémies, la numération des très nombreux sous-types cellulaires par exemple pour le suivi du SIDA* ou des traitements immunosuppresseurs et greffes. (El Hentati *et al.*, 2009).

La cytométrie consiste en l'analyse objective, quantitative et multiparamétrique des cellules. Elle utilise la fluorescence, des moyens fluidiques, optiques et le soutien informatique pour le traitement des signaux ou des images.

IV.2. Description du cytomètre en flux

Le cytomètre est composé de 3 systèmes : fluidique, optique et électronique :

Les cellules sont entraînées dans le système fluidique qui est un flux laminaire qui permet aux cellules en suspension de passer une à une devant le laser. Les cellules sont propulsées une par une et à grande vitesse, dans un flux hydraulique de très faible diamètre (entre 50 et 150 microns) autocentré par un second flux liquide qui sert de gaine (liquide de gaine) (Ronot *et al.*, 2007). Les cellules, en file indienne, sont analysées une par une en défilant à plus de 30Km/h devant un laser qui fait office de source lumineuse (système optique). Le faisceau laser irradie une à une les cellules durant quelques secondes à la cadence moyenne de 1.000 cellules/s.

Après intersection du rayon incident, la cellule diffracte la lumière et les signaux émis dans toutes les directions de l'espace sont captés dans deux directions privilégiées:

- Diffusion aux petits angles dans l'axe de la propagation laser qui correspond à la taille de la cellule (FSC : forward scatter).
- Diffusion orthogonale et fluorescences à 90° de cet axe qui correspondent à la granularité de la cellule (SSC : side scatter).

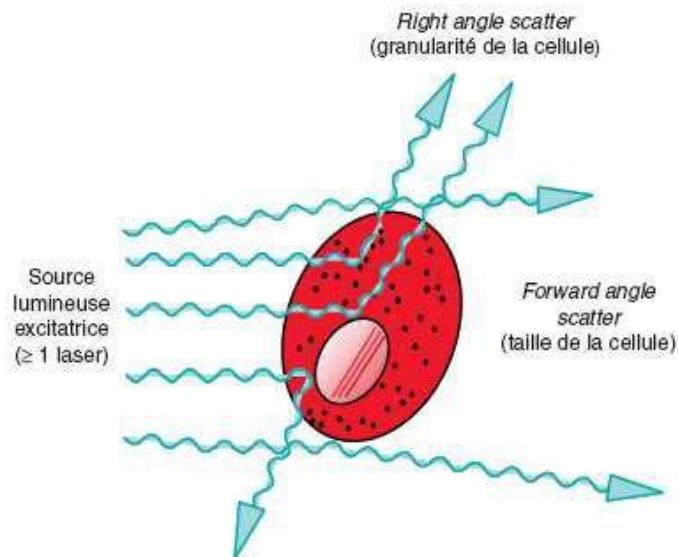


Figure 8 : Diffusions lumineuses sur une cellule.

(Source : https://www.ipmc.cnrs.fr/fichiers/recherche/microscopie/FP_Cytometrie)

Durant cet instant, chaque cellule diffuse toujours une partie de la lumière incidente et émet simultanément une ou plusieurs lumières de fluorescences en fonction des sondes fluorescentes qu'elle porte. Ces fluorescences sont enregistrées puis stockées dans un ordinateur (système électronique).

Les signaux lumineux captés par une optique appropriée sont convertis par un convertisseur d'analyse digital en valeurs, transmis à des détecteurs photoélectriques puis à un ordinateur qui mémorise toutes les données individuelles et dans l'ordre de passage de chaque cellule.

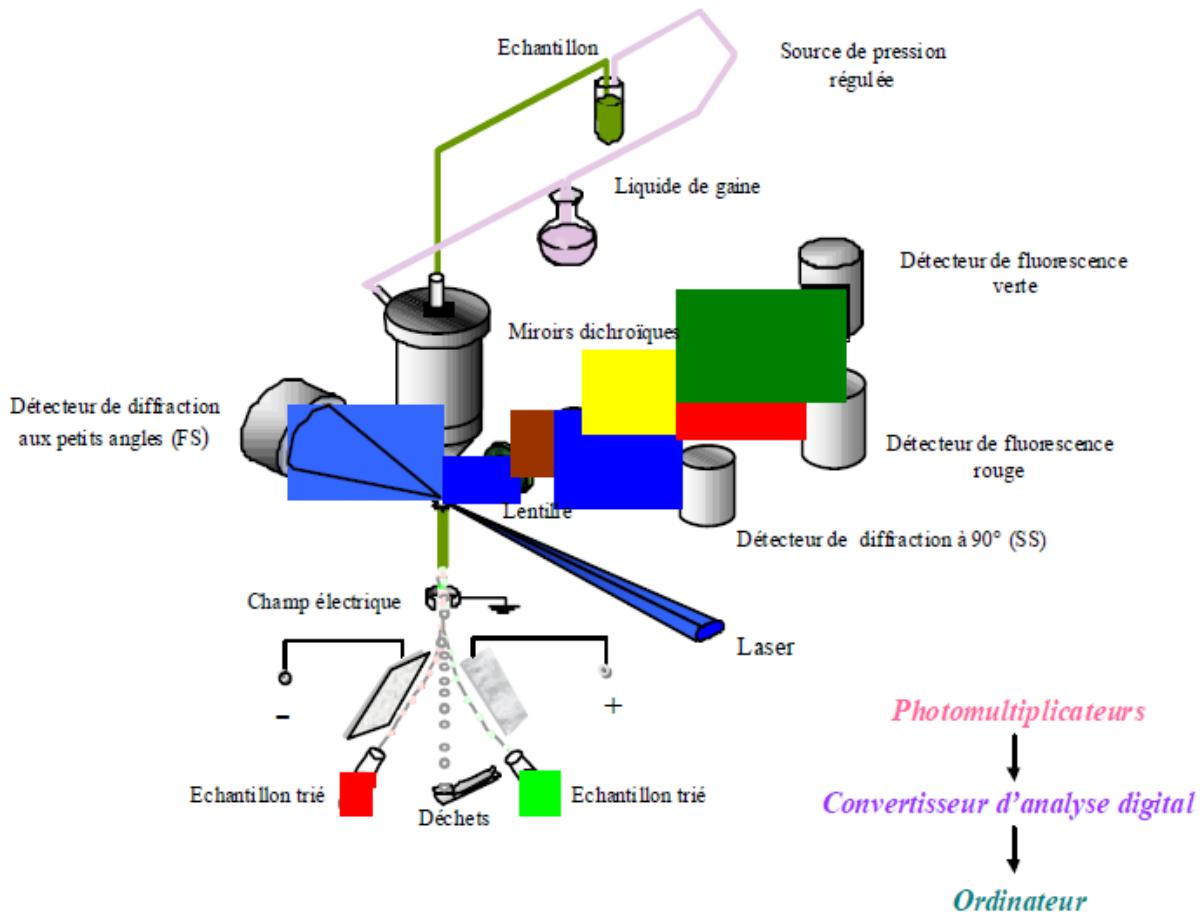


Figure 9: Appareillage d'un cytomètre en flux. (Source : L'Faqih-Olive, 2007)

Cette fluorescence peut être naturelle ou le plus souvent résulter de l'incorporation ou de la fixation de sondes spécifiques (fluorochromes, anticorps marqués). Le passage des cellules dans un cytomètre est donc précédé d'une étape de marquage avec des molécules spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire ; ces molécules étant susceptibles d'émettre une fluorescence après leur illumination. Chaque fluorochrome émet une fluorescence à une longueur d'onde précise.



Figure 10: Epics XL,Beckman Coulter. Cytomètre à 4fluorescences équipée d'un laser 488 nm équipé de plusieurs photomultiplicateurs capables de détecter quatre longueurs d'ondes d'émission différentes. FITC (Isothiocyanate de fluorescéine) émet en FL-1 à une longueur d'onde de 505-545nm, RD1/PE (Rhodamine couplé à la phycoérythrine) en FL-2 de 560-590 nm,ECD (Phycoérythrine-Texas Red -X) en FL3 de 605-635 nm,PC 5 (Phycoérythrine-Cyanine 5,1) en FL4 de 660-700 nm. (Source : IPM)

IV.3. Les fluorochromes

Un fluorochrome est une molécule qui a la propriété d'absorber l'énergie émise par une source lumineuse, à l'état de repos, pour faire passer les électrons de ses atomes d'une sous couche A à une autre sous couche B supérieure, correspondant à un état d'excitation. Les longueurs d'onde qui sont absorbées constituent le spectre d'excitation d'une molécule.

Le retour de ces électrons à leur couche initiale s'accompagne d'une libération d'énergie caractérisée par l'émission d'un photon. C'est la fluorescence. La longueur d'onde d'émission de ces photons est une propriété de chaque molécule fluorescente, et elle dépend des atomes qui constituent la molécule. Les longueurs d'onde émises par une molécule constituent son spectre d'émission. Les molécules fluorescentes utilisables sur le Coulter Epics XL (cytomètre en flux de l'unité Immunologie de l'Institut Pasteur) doivent absorber la longueur d'onde 488nm c'est-à-dire qu'elles sont excitables à 488nm.

Les fluorochromes utilisés pour les manipulations sont : Annexin V-FITC, Hydroéthidine (HE) et Fluo-4AM.

IV.3.1. Annexin V- FITC (BD PharmingenTM)

L'Annexin V est une protéine ayant un poids moléculaire de 35-36 kDa qui a une grande affinité pour le phosphatidylsérine. Le marquage avec ce fluorochrome se base sur un phénomène caractéristique ayant lieu au sein des cellules apoptotiques : l'inversion des feuillets lipidiques de la membrane cytoplasmique. Cette inversion entraîne l'exposition vers le milieu extérieur de phospholipides parmi lesquels les phosphatidylsérines. Dans des conditions normales, ce phospholipide présent dans la membrane plasmique n'est exposé qu'au milieu intracellulaire, mais se retrouve exposé à l'extérieur durant l'éryptose. Or, les annexines sont une famille de molécules impliquées dans la signalisation cellulaire et ayant la capacité de se fixer à ces phosphatidylsérines.

L'Annexin V est conjugué avec du fluorochrome FITC qui est l'Isothiocyanate de fluorescéine, un fluorochrome qui émet en FL-1 à une longueur d'onde de 505-545nm après une excitation à 494nm. Cet ensemble possède une haute affinité pour le phosphatidylsérine et permet donc des analyses probantes des cellules qui sont en apoptose précoce sur cytométrie en flux. En effet, l'externalisation du phosphatidylsérine se manifeste au début de l'apoptose, l'utilisation de l'Annexin V couplé au FITC présente un avantage pour détecter le début de l'éryptose, par rapport aux techniques de marquages visant le changement nucléaire tel que la fragmentation de l'ADN.

IV. 3.2. Hydroéthidine (Invitrogen)

L'Hydroéthidine C₂₁H₂₁N₃ est utilisé tel un colorant vital afin de sélectionner les hématies parasitées. Il permet de mettre en évidence une structure cellulaire sans provoquer la mort immédiate de la cellule. La concentration utilisée durant les marquages est extrêmement faible pour que l'ADN parasitaire puisse l'accumuler. Ce fluorochrome est métabolisé en éthidium par l'estérase du parasite. Il est détecté par sa fluorescence orange en FL-2 (émission à 595nm) après une excitation à 510nm (Wyatt *et al.* 1991).

IV.3.3. Fluo-4 AM (Invitrogen)

Le Fluo-4 (C₅₁H₅₀F₂N₂O₂₃) est utilisé pour mesurer la concentration de calcium (Ca²⁺) à l'intérieur des cellules vivantes. L'indicateur de calcium-vert fluorescent, Fluo-4, est une version améliorée de l'indicateur de calcium Fluo-3 dont deux substituants chlorés sont remplacés

par le fluor. Il est souvent utilisé pour le criblage à haut débit des ligands* de récepteurs et canaux ioniques perméables au calcium.

Cet indicateur fluorescent du Ca^{2+} est un anion* polycarboxylé imperméable. Il ne peut être introduit dans les cellules que par perméabilisation ou micro injection, travail impossible à exécuter sur des nombreuses cellules d'un tissu. Un groupement acétométhylester (AM) ajouté sert d'une part à rendre la molécule perméante et à masquer les charges négatives sur les groupements carboxyles de la molécule d'autre part. Sous cette forme, l'ester AM devient hydrophobe et peut passer à travers les membranes. La partie acétométhylester est libérée à l'intérieur de la cellule par les estérases endogènes et la sonde active s'accumule dans la cellule. Le Fluo4 AM est utilisé avec l'acide pluronic pour faciliter le chargement des cellules. Il est détecté en FL-1 : émission à 516nm après une excitation à 494nm (Gee *et al.*, 2000).

IV.4. Présentation des données et compensation

Chaque mesure issue de chaque détecteur est désignée sous le nom de “paramètre”. Les données sont enregistrées sous forme de “liste” de valeurs pour chaque “paramètre” (variable) et pour chaque “événement” (cellule). Les données peuvent être représentées sous différentes formes : histogramme, nuage de points, densité ou en 3 dimensions. Sur les graphiques, l'utilisateur définit manuellement une ou plusieurs régions pour discriminer des groupes de populations ainsi que dénombrer par des statistiques le pourcentage ou les moyennes de fluorescence. La combinaison logique de régions donne une fenêtre.

Malgré un choix judicieux des fluorochromes qui pourront être utilisés simultanément, l'utilisateur ne pourra pas éviter un chevauchement partiel de leurs spectres d'émission (Figure 11). On observe alors des fluorescences artéfactuelles du fait de ces fuites de fluorescence lues sur les autres PMT.

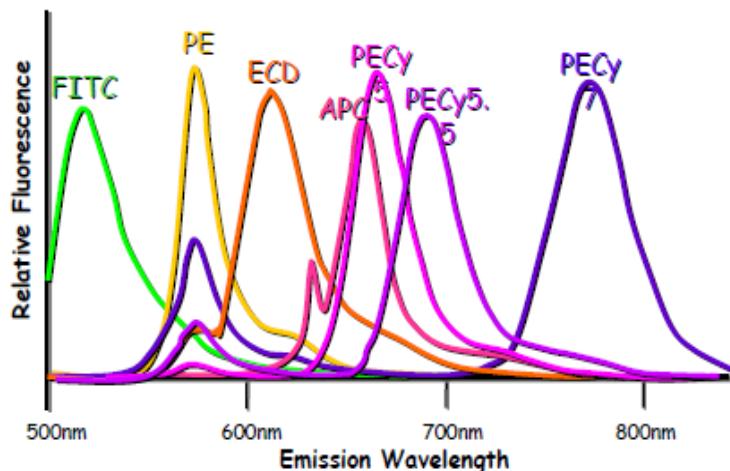


Figure 11 : Chevauchement des fluorescences relatives de plusieurs fluorochromes.

(Source : L'Faqihi-Olive, 2007)

Il est donc possible, électroniquement de retrancher un certain pourcentage de la fluorescence parasite: c'est la compensation. La compensation peut être calculée manuellement par la méthode de la médiane ou calculée par des logiciels de dernière génération par la méthode de pentes. La compensation correcte est obtenue quand la médiane de la population positive à compenser devient la même que celle de la population négative.

V. ETUDE DE L'EFFET DE L'ARTESUNATE SUR LES COCULTURES DE GLOBULES ROUGES NORMAUX ET DREPANOCYTAIRES PARASITES ET TRAITES AVEC DE L'ARTESUNATE

V.1. Matériaux

- Coculture de GRP AA et SS avec 0nM, 1nM et 10nM d'artésunate.
- Microscope optique
- Méthanol
- Colorant GIEMSA

V.2. Mode opératoire

Des frottis minces ont été effectués afin d'évaluer la croissance des parasites et de

comparer l'effet de l'artésunate chez les globules rouges parasités normaux et les globules rouges des drépanocytaires.

Pour ce faire, 20 µl de chaque échantillon dans les puits ont été prélevés puis centrifugés rapidement. Le culot est étalé sur lame et observé au microscope après fixation au méthanol et coloration au GIEMSA. Les frottis minces ont été réalisés à intervalle régulier durant l'incubation pour chaque échantillon à savoir : à T0, T4h, T18h, T24h, T36h et T48h.

VI. EVALUATION DU RETARD DE CROISSANCE DES PARASITES DANS LES GLOBULES ROUGES DREPANOCYTAIRES

VI.1. Matériels

- Coculture de GRP AA et SS avec 0nM, 1nM et 10nM d'artésunate.
- Microscope optique
- Méthanol
- Colorant GIEMSA

VI.2. Mode opératoire

Lors de l'étude de l'effet de l'artésunate sur les cocultures, les nombres de tous les globules rouges parasités par *Plasmodium* aux différents stades ont été répertoriés. Ceci afin d'évaluer le retard de croissance des parasites dans les globules rouges drépanocytaires par rapport aux globules rouges normaux. L'observation des frottis minces colorés au GIEMSA sur microscope a été réalisée à T0, T4h, T18h, T24h, T36h et T48h.

VII. ETUDE DE L'ERYPTOSE SUR DES COCULTURES AVEC DE L'ARTESUNATE

VII.1. Matériels

- Coculture de GRP AA et SS avec 0nM, 1nM et 10nM d'artésunate.
- Annexin- V FITC (BD PharmingenTM)
- Hydroéthidine (Invitrogen)

- Ionophore calcium A23187 (Sigma Aldrich)
- Cytomètre (Epics XL, Beckman Coulter)

VII.2. Mode opératoire

Pour évaluer l'éryptose chez les globules rouges drépanocytaires parasités en comparaison avec les globules rouges normaux parasités, des marquages avec un fluorochrome spécifique qui est l'Annexin V-FITC ont été effectués aux différents temps d'incubation : T0, T4h, T18h, T24h, T36h et T48h.

L'étude a été réalisée sur 18 sujets dont 5AA et 13 SS. Le principe est de faire un double marquage avec de l'Annexin V- FITC et de l'Hydroéthidine (Annexe II) des globules rouges parasités préalablement synchronisés au stade mature, les incuber avec une gamme d'artésunate (1nM et 10nM) et enfin passer l'échantillon au cytomètre en flux.

Dix mg de poudre d'Hydroéthidine ayant une concentration de 5mM diluée dans 1ml de DMSO est la solution de travail pour le marquage. Plusieurs littératures parlent de l'induction de l'apoptose par l'Ionophore calcium (Ning et Murphy 1993, Gwag *et al.*, 1999). L'Ionophore calcium A23187 (Sigma Aldrich) (1 μ M final) ajouté au globule rouge sain et marqué à l'AnnexinV- FITC est ainsi utilisé comme témoin positif pour l'éryptose.

VIII. EVALUATION DE L'HETEROGENEITE DU CALCIUM CHEZ LES GLOBULES ROUGES DREPANOCYTAIRES

VIII.1. Matériels

- GR AA, AS et SS
- Fluo-4 AM (Invitrogen)
- Hydroéthidine (Invitrogen)
- Ionophore calcium A23187 (Sigma Aldrich)
- Cytomètre (Epics XL, Beckman Coulter)

VIII.2. Mode opératoire

L'évaluation de l'hétérogénéité du calcium chez les globules rouges drépanocytaires a été réalisée sur 8 volontaires AA, 51 patients drépanocytaires dont 18 AS et 33 SS. Elle a été

effectuée en faisant un double marquage avec du Fluo-4AM et de l'Hydroéthidine (Annexe II) des hématies drépanocytaires en comparaison avec des globules rouges normaux.

Pareil à celui utilisé au marquage avec l'Annexin V-FITC, l'Hydroéthidine utilisé a une concentration de 10%. Quant au Fluo-4AM, la solution de travail est de 1 μ M.

IX. ETUDE DE LA MODULATION CALCIQUE SUR LES COCULTURES AVEC DE L'ARTESUNATE

IX.1. Matériels

- Coculture de GRP AA et SS avec 0nM, 1nM et 10nM d'artésunate.
- Fluo-4 AM (Invitrogen)
- Hydroéthidine (Invitrogen)
- Ionophore calcium A23187 (Sigma Aldrich)
- Cytomètre (Epics XL,Beckman Coulter.)

IX.2. Mode opératoire

La modulation calcique a été observée sur des cocultures de sanguins de 5 sujets AA et 13 drépanocytaires homozygotes avec des parasites et à différentes doses d'artésunate (1nM et 10nM) dans des plaques à 6 puits. Les cocultures ont été incubées à 37°C et 100 μ l de chaque puits doublement marquées avec du Fluo-4-AM et de l'Hydroéthidine (Annexe II) à différents temps d'incubation: T0, T18h, T24h, T36h, T48h.

Les concentrations en Hydroéthidine et Fluo-4 AM utilisées sont respectivement de 10% et de 1 μ M.

TROISIÈME PARTIE:

RESULTATS,

DISCUSSION,

CONCLUSION ET

PERSPECTIVES

RESULTATS

I. EFFET DE L'ARTESUNATE SUR LE CYCLE DE *Plasmodium falciparum*

La croissance parasitaire dans les globules rouges AA, AS et SS a été observée au microscope après la coloration au GIEMSA. Cette étude a été effectuée sur 5 sujets normaux (AA) et 13 patients homozygotes drépanocytaires. Sans artésunate , les parasites se multiplient en puisant leur nourriture et éléments de croissance jusqu'à épuisement des nutriments existant dans le milieu où ils vivent. L'étude montre (Annexe III, tableau VIII) que sans médicaments, les parasitémies s'accroissent autant dans les hématies normales que drépanocytaires. Citons les cas des sujets suivants : AA1 dont la parasitémie a évolué de 0.27% à 0.56% en 48 heures ; SS1 de 0.30% à 0.42% en 48 heures.

Tableau I : Evolution de la parasitémie à différentes doses de l'artésunate. La décroissance est plus marquée à 10nM ART chez certains sujets (AA2, AA6, SS1, SS7, SS11, SS12).

| Sujets | Evolution de la parasitémie en 48h (parasitémie à T48h- parasitémie à T0) [%] | | |
|----------------|---|---------|----------|
| | 0ART | 1nM ART | 10nM ART |
| AA 1 | 0.29 | -0.18 | -0.17 |
| AA 2 | 0.26 | -0.05 | -0.10 |
| AA 3 | 0.14 | 0.08 | -0.02 |
| AA4 | -0.14 | -0.34 | 0.02 |
| AA5 | 0.06 | -0.05 | -0.08 |
| Moyenne | 0.12 | -0.11 | -0.07 |
| SS 1 | 0.12 | -0.16 | -0.24 |
| SS 2 | 0.16 | 0.10 | -0.03 |
| SS 3 | 0.74 | 0.20 | -0.07 |
| SS 4 | 0.30 | -0.12 | 0.13 |
| SS 5 | -0.22 | -0.22 | -0.22 |
| SS 6 | 0.16 | 0.09 | 0.10 |
| SS 7 | -0.18 | 0.09 | -0.15 |
| SS 8 | 0.06 | 0.12 | 0.05 |
| SS 9 | 0.28 | -0.40 | -0.26 |
| SS 10 | -0.36 | -0.49 | 0.06 |
| SS 11 | -0.16 | -0.26 | -0.34 |
| SS12 | 0.53 | -0.13 | -0.29 |
| SS13 | 0.10 | -0.14 | -0.21 |
| Moyenne | 0.12 | -0.10 | -0.11 |

Aux concentrations 1nM et 10 nM, l'artésunate induit une décroissance des parasitémies sur les individus AA comme SS. Ceci indique l'effet thérapeutique de l'artésunate contre le paludisme (Tableau I).

En moyenne, l'évolution de la parasitémie chez les sujets AA est de 0.13% à 0nM de l'artésunate. Avec les concentrations de 1nM et 10 nM, les parasitémies décroissent respectivement de -0.11% et -0.07%. Chez les SS, la décroissance parasitaire s'observe aussi avec des valeurs moyennes de -0.10% et -0.11% (Tableau I et figure12).

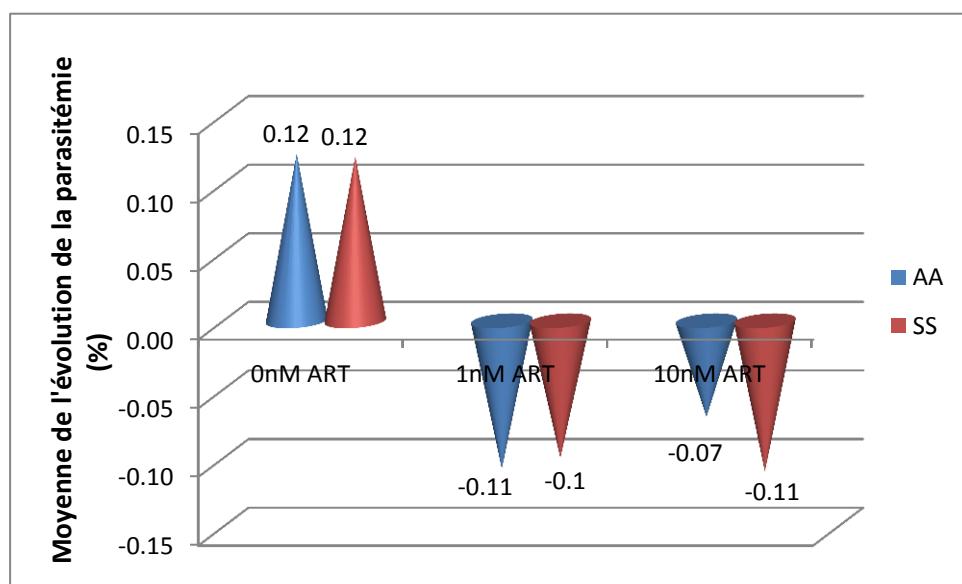


Figure 12 : Moyenne de l'évolution de la parasitémie chez l'ensemble des sujets AA et SS.

Ces résultats démontrent que durant les 48 heures d'observation, la moyenne de décroissance de la parasitémie avec les concentrations 1nM et 10nM d'artésunate sont similaires témoignant de la grande sensibilité de la souche au médicament.

II. EVALUATION DU RETARD DE CROISSANCE DES PARASITES DANS LES GLOBULES ROUGES DREPANOCYTAIRES

Le type d'hématie induit une croissance différente des parasites. En effet, un retard de croissance des parasites dans les hématies drépanocytaires SS est observé (Figure 13 et

Annexe III, tableau IX).

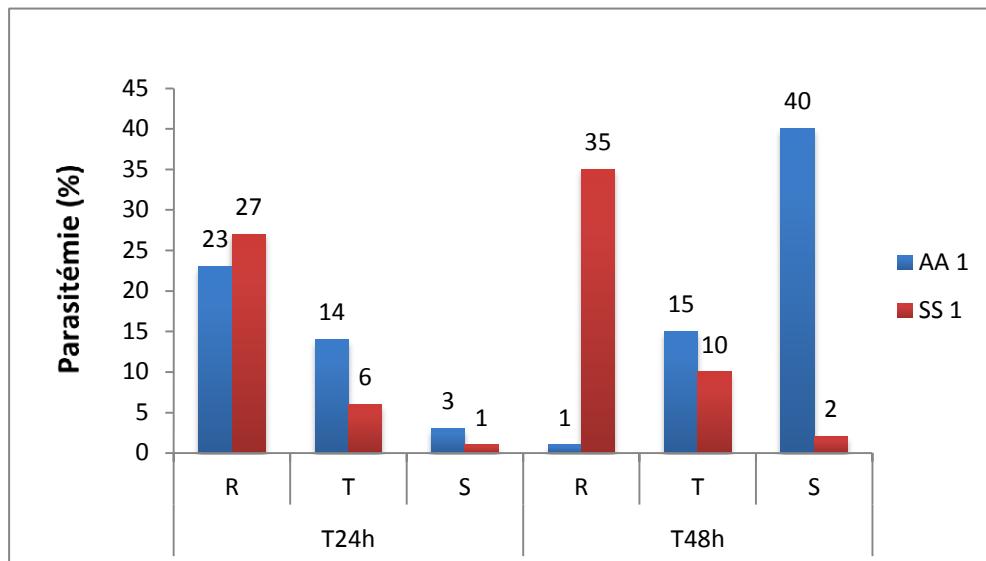


Figure 13 : Exemple de retard de croissance parasitaire chez GRSS. R= Ring, T=Trophozoite, S=Schizonte. A 24h, la plupart des parasites dans les GRAA et SS sont sous forme d'anneau (ring). A 48h, les parasites dans les GR normaux se sont développés et ont donné des schizontes tandis que ceux dans les GR drépanocytaires sont encore au stade ring.

III. ETUDE DE L'ERYPTOSE SUR DES CULTURES TRAITEES AVEC DE L'ARTESUNATE

III.1. Mise au point des marquages avec l'Annexin V-FITC et l'Hydroéthidine

Sous l'effet de l'excitation lumineuse lors du passage des échantillons au cytomètre, Annexin V- FITC et Hydroéthidine ont été détectés grâce aux fluorescences qu'ils émettent chacun dans leur canal de fluorescence respectif. La spécificité de la détection est contrôlée par la sélectivité vis à vis des longueurs d'onde des filtres optiques et des miroirs dichroïques (Figure 9) et par les contrôles négatifs inclus dans les expérimentations. La quantité de lumière (nombre de photons) diffusée ou émise par fluorescence par les particules (cellules) doit être convertie en voltage pour être mesurée. Ce voltage est ensuite converti en valeur digitale enregistrable sur ordinateur. Avec le cytomètre Epics XL, Beckman Coulter (Figure 10), Annexin V-FITC est détecté en FL-1 et Hydroéthidine en FL-2. Les événements électriques forment des nuages de points sur des cytogrammes autour desquels des fenêtres électroniques (gates) sont dessinées, par exemple région ANN+ et HE+.

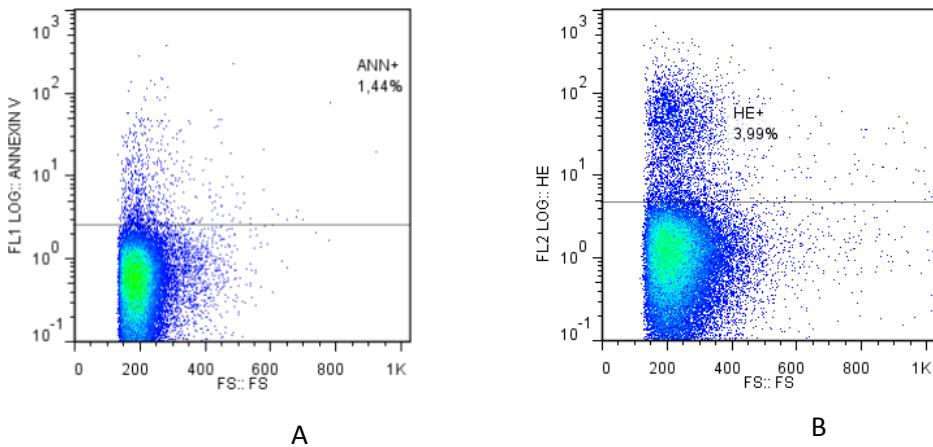


Figure 14: Cytogramme A : la fluorescence en Annexin V-FITC en fonction de la taille (FS) chez les GRP. **Région ANN+ :** Région contenant les cellules marquées par Annexin V-FITC.

Figure 15 : Cytogramme B: la fluorescence en HE en fonction de la taille (FS) des cellules. **Région HE+ :** Région contenant les cellules marquées par HE.

L'Annexin V-FITC marque les cellules qui présentent en leur surface du phosphatidylsérine preuve que l'éryptose débute ou est en cours. Ce fluorochrome peut marquer toutes les hématies parasitées ou saines. Ainsi, une région nommée ANN+ sur le cytogramme A de la figure 14 correspond aux cellules marquées par Annexin V-FITC chez les GRP.

Le deuxième fluorochrome HE ne se fixe que sur les acides nucléiques. De ce fait, la fenêtre nommée HE+ correspond aux hématies parasitées et le pourcentage des cellules doit correspondre à la parasitémie de la culture parasitaire au cours de la manipulation. Les mises au point ont été exécutées sur des GRP dont la parasitémie obtenue après observation des lames a été de 3.85%. Lors du passage au cytomètre, la valeur de l'HE+ correspondant à cette parasitémie a été de 3.99% (Figure 15).

Au sein de chaque fenêtre, il est possible d'analyser séparément les données en créant un nouveau cytogramme (Figure 16) qui est un cytogramme de la région HE+ (Figure 15). A partir de ces figures, les cellules doublement marquées par l'Annexin V- FITC et l'Hydroéthidine peuvent être détectées : ce sont les hématies parasitées par *Plasmodium falciparum* en voie d'éryptose.

Après ajout de 1µM de l'ionophore calcium, comme inducteur d'apoptose, dans les échantillons, un accroissement de fluorescence est observé en FL-1. Le pourcentage des hématies doublement marquées avec l'Annexin V-FITC et l'Hydroéthidine passe de 1.14% à 22.6%. Nous l'utilisons comme témoin positif (Figure 16 et 17). L'Ionophore calcium

employé a été dilué dans une solution de HBSS contenant elle-même du calcium à 5 μ M. Une augmentation des pourcentages des hématies parasitées marquées par l'Annexin V-FITC et l'Hydroéthidine est observée. Cet accroissement de la fluorescence indique l'induction par l'Ionophore calcium de l'apoptose dont l'un des signaux caractéristiques est la présence de la PS à l'extérieur de la membrane (Ning et Murphy, 1993, Gwag *et al.*, 1999).

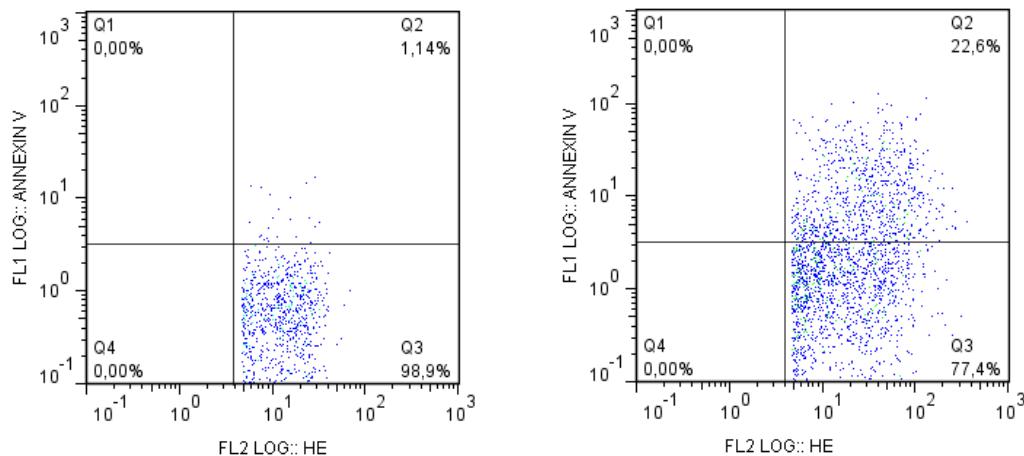


Figure 16 et 17 : Augmentation des populations marquées par l'Annexin V-FITC et l'Hydroéthidine dans la région Q2 du cytogramme de la fenêtre électronique HE+ : 1.14% à 22.6% après incubation 1h avec de l'Ionophore calcium 1 μ M. **Région Q1 :** cellules marquées seulement par l'Annexin V-FITC. **Région Q2 :** cellules doublement marquées par Annexin V-FITC et HE. **Région Q3 :** cellules marquées par l'Hydroéthidine. **Région Q4 :** cellules non marquées.

D'autres tubes ont été préparés et passés tour à tour au cytomètre afin de déterminer l'emplacement des barres de seuil utilisés pour distinguer les différentes régions qui contiennent les populations marquées. Dans le tableau II figure les pourcentages des cellules marquées par AnnexinV-FITC (ANN+), HE (HE+) et celles qui sont doublement marquées (Q2).

Tableau II : Pourcentages des cellules dans les régions ANN+, HE+ et Q2 chez les échantillons de GRS. AnnV : Annexin-V, HE : Hydroéthidine.

| GRS | sans marquages | AnnV | HE | AnnV+HE | AnnV+HE+Ionophore Ca |
|---------|----------------|-------|-------|---------|----------------------|
| ANN+(%) | 0.038 | 3.97 | 0.045 | 3.93 | 46.5 |
| HE+(%) | 0.061 | 0.046 | 0.111 | 0.068 | 0.058 |
| Q2 (%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Les valeurs sur ce tableau indiquent que les GRS en début ou/et en cours d'éryptose peuvent être marqués par Annexin V-FITC. Les pourcentages des populations marquées ne varient pas beaucoup en présence (3.93%) ou non (3.97%) de l'HE. Ce qui atteste d'un réglage correct du cytomètre et notamment des compensations FL-1/FL-2, HE n'étant pas supposé marquer les GRS ni modifier le marquage avec l'annexine. Les cellules ANN+ augmentent comme prévues à 46.5% après incubation avec l'ionophore calcium. Les pourcentages de fHE+ sont tous inférieurs ou égal à 0.111% même si les échantillons ont été marqués. Ces valeurs ne sont pas significatives puisqu'elles correspondent à des bruits de fond ou à des débris cellulaires sanguins et prouvent que les GRS ne possèdent pas d'acide nucléique et ne peuvent pas être marqués par HE.

Chez les GRP, les cellules marquées par Annexin V-FITC sont de 1.91% et de 1.44%. Après ajout de l'ionophore calcium, la valeur s'accroît à 44.7%. Lorsque les GRP sont marqués avec HE, des valeurs similaires à la parasitémie sur lame (3.85%) ont été obtenues : 3.84%, 3.99%, 3.41%.

Tableau III : Pourcentages des cellules dans les régions ANN+, HE+ et Q2 chez les échantillons de GRP (parasitémie sur lame : 3.85%) Ann V : Annexin-V, HE : Hydroéthidine.

| GRP | sans marquages | AnnV | HE | AnnV+HE | AnnV+HE+Ionophore Ca |
|----------|----------------|-------|-------|---------|----------------------|
| ANN+ (%) | 0.014 | 1.91 | 0.039 | 1.44 | 44.7 |
| HE+ (%) | 0.046 | 0.078 | 3.84 | 3.99 | 3.41 |
| Q2 (%) | 0 | 0 | 0.039 | 1.14 | 22.6 |

Les fenêtres et régions sur les cytogrammes sont des paramètres que le manipulateur définit arbitrairement durant les mises au point. D'autres techniques sont donc nécessaires afin de vérifier la véracité des valeurs. Ainsi, les régions HE+ (3.99%, 3.84%, 3.41%) sur cytomètre ont été définies en positionnant les seuils de manière à ce que les valeurs soient les plus similaires possible avec la parasitémie obtenue par observation microscopique de la lame correspondante aux échantillons (3.85%).

Chez les GRS, les pourcentages des cellules en éryptose (3.97%, 3.93%) sont plus élevés que chez les GRP (1.91%, 1.44%). Ceci prouve que les parasites retardent l'éryptose

notamment en maintenant les taux d'ATP et de calcium normaux afin de vivre plus longtemps dans les hématies et pour infecter d'autres cellules après multiplication (Huber *et al.*, 2005).

III.2. Etude de l'éryptose sur des cocultures d'hématies drépanocytaires parasitées avec différentes doses d'artésunate.

Cette étude permet d'explorer si l'artésunate influence le cycle de *Plasmodium falciparum* en accélérant l'éryptose des GRP. L'éryptose est caractérisé par l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) à l'extérieur de la membrane des GR.

Les expériences ont été réalisées sur 13 individus drépanocytaires homozygotes SS. Cinq sujets AA servent de témoins à chacune des séries de manipulation. Le tableau de l'annexe IV récapitule les pourcentages des GR parasites en voie d'éryptose marqués par l'AnnexinV-FITC et l'HE au cours du temps et à différentes concentrations d'artésunate. Après 24h d'incubation, les schizontes ont pu éclater pour donner des rings qui peuvent coloniser d'autres globules rouges (Annexe III ; tableau IX). A ce temps, T24h, la moyenne des taux de GR marqués par Annexin-V et HE a été établie sur tous les sujets AA et SS (Figure 18).

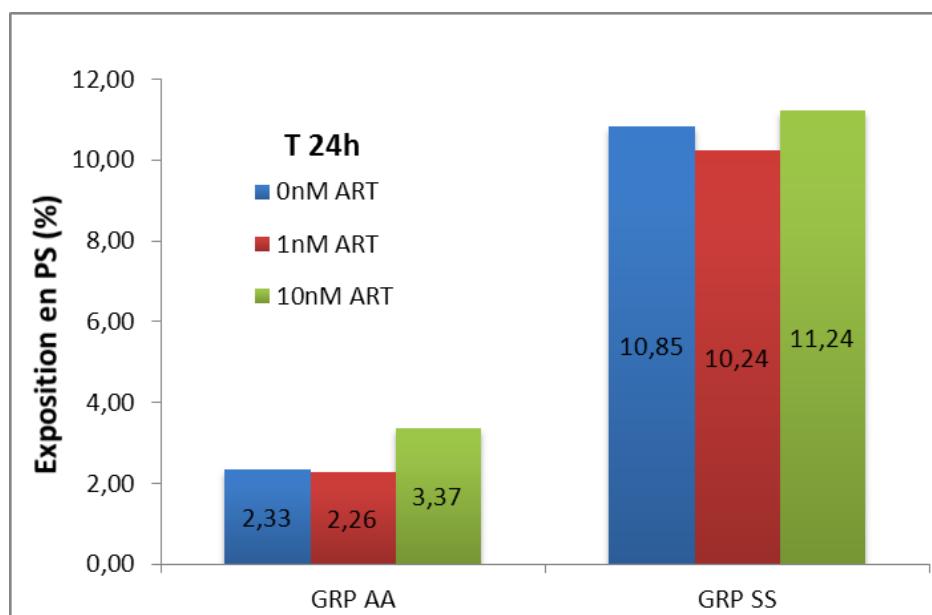


Figure 18: Moyenne (%) de l'exposition en PS (GR marqués par Annexin-V FITC et HE) chez GRP AA et SS à 24h de la coculture avec une dose croissante d'artésunate.

Sans artésunate, le taux de GRP SS en cours d'éryptose est plus élevé que celui de GRAA: 10.85% > 2.33%. En présence d'artésunate, l'exposition en PS détectée par

l'Annexin-V FITC varie peu même à 10nM du médicament chez GRP AA et SS. A T36h, la variation de l'éryptose avec 10nM d'artésunate par rapport à la coculture sans artésunate est de $\pm 1.07\%$ chez GRP AA et $\pm 5.78\%$ chez SS. A 48h, elle est de $\pm 0.22\%$ chez GRP AA et $\pm 2.98\%$ chez SS (Tableau IV).

Tableau IV : Moyenne (%) des GR marqués par Annexin-V FITC et HE selon le type d'hématie AA et SS à 24h de la coculture avec une dose croissante d'artésunate.

| | T36H | | T48H | | | | |
|--------|---------|---------|----------|---------|---------|----------|--|
| | OnM ART | 1nM ART | 10nM ART | OnM ART | 1nM ART | 10nM ART | |
| GRP AA | 3.43 | 4.39 | 4.50 | 2.03 | 2.91 | 2.25 | |
| GRP SS | 10.62 | 12.36 | 16.40 | 23.63 | 17.43 | 20.65 | |

A 24h, 36h et 48h d'incubation, les taux de GRP SS en cours d'éryptose est plus élevé que chez GRP AA. En effet, l'éryptose est sans doute augmentée par la présence des hématies falciformes chez les drépanocytaires (Lang *et al.*, 2008). Par contre, à 1nM et 10nM de concentrations en artésunate, le médicament n'agit pas au niveau de l'exposition des PS lors d'une infection à *Plasmodium falciparum*.

IV. EVALUATION DE L'HETEROGENEITE DU CALCIUM CHEZ LES GLOBULES ROUGES DREPANOCYTAIRES

IV.1. Mise au point des marquages avec Fluo-4 AM et Hydroéthidine

Sur les cytogrammes des figures 19 et 20 sont représentées les mises au point effectuées sur le cytomètre lors de l'évaluation de l'hétérogénéité du calcium chez les globules rouges drépanocytaires et de l'étude de la modulation calcique sur des cocultures avec de l'artésunate. Avec le cytomètre Epics XL, Beckman Coulter (Figure 10), le Fluo-4 AM est détecté en FL-1 et l'Hydroéthidine en FL-2. La liaison du calcium avec la sonde fluorescente (Fluo-4AM) entraîne une fluorescence verte du Ca^{2+} intracellulaire, permettant l'étude du flux calcique via cytomètre en flux, tandis que l'Hydroéthidine colore les acides nucléiques en orange qui permet de visualiser les globules rouges parasités. La région D représente les cellules marquées par la concentration de Fluo-4 AM (1 μM) utilisée (Figure 20).

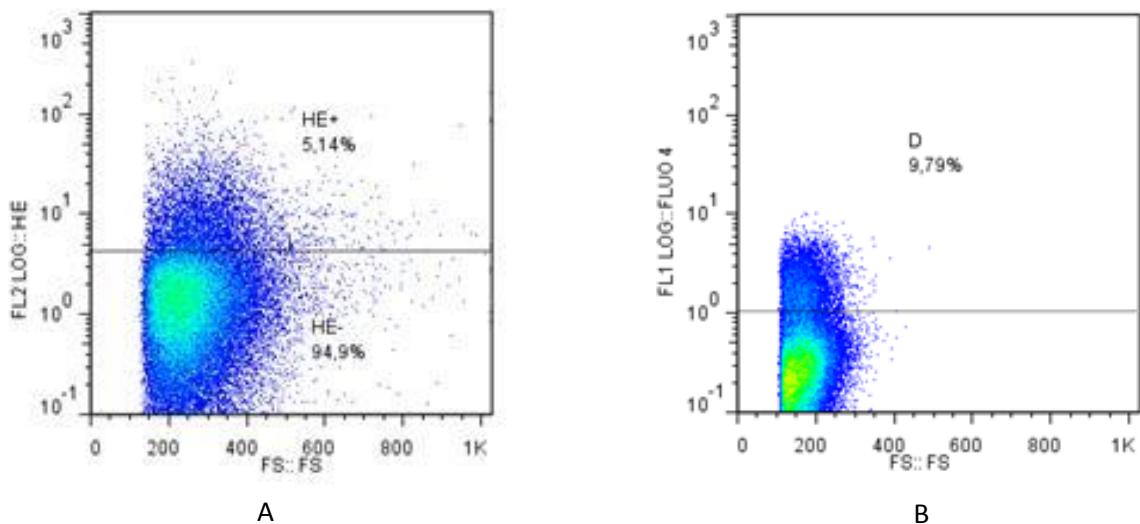


Figure 19: Cytogramme A : la fluorescence en Fluo-4 AM en fonction de la taille (FS) des cellules.

Région D : Région contenant les cellules marquées par Fluo-4 AM.

Figure 20 : Cytogramme B: la fluorescence en HE en fonction de la taille (FS) des cellules. **Région HE+ :** Région contenant les cellules marquées par Hydroéthidine.

Un nouveau cytogramme a été créé à partir de la région HE+ afin d'évaluer le pourcentage de populations doublement marqués par les deux fluorochromes. Après ajout de l'ionophore calcium ($1\mu\text{M}$) et de calcium ($5\mu\text{M}$), une augmentation de fluorescence s'est produite (Figure 21 et 22). Dans les tableaux 5 et 6 figurent des exemples de pourcentages lors d'une série de marquages sur des échantillons de GRP et GRS.

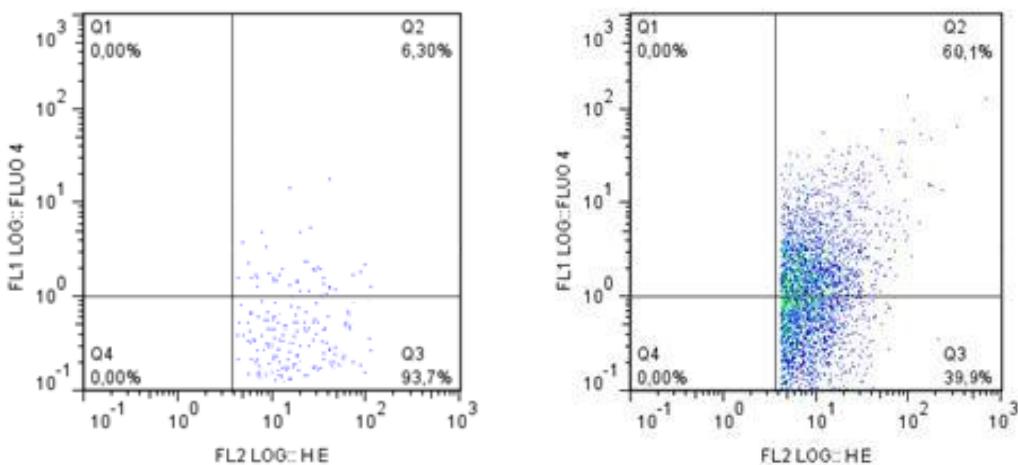


Figure 21 et 22: Accroissement des populations marquées par Fluo-4 AM et l'Hydroéthidine dans la région Q2 du cytogramme de la fenêtre électronique HE+ : 6.30% à 60.1% après incubation 1h avec de l'ionophore calcium $1\mu\text{M}$. **Région Q1 :** cellules marquées seulement par Fluo-4 AM. **Région Q2 :** cellules doublement marquées par Fluo-4 AM et HE. **Région Q3 :** cellules non marquées. **Région Q4:**cellules marquées seulement par HE.

Tableau V : Pourcentages des cellules dans les régions Fluo4+, HE+ et Q2 chez les échantillons de GRS.

| GRS | sans marquages | Fluo4-AM | HE | Fluo4-AM+HE | Fluo4-AM+HE+Ionophore Ca |
|---------------------|----------------|-------------|-------|-------------|--------------------------|
| Fluo4-AM+(D) | 0.078 | 7.51 | 0.354 | 5.92 | 63 |
| % HE+ | 0.125 | 0.028 | 0.126 | 0.119 | 0.188 |
| %Q2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tableau VI : Pourcentages des cellules dans les régions Fluo4+, HE+ et Q2 chez les échantillons de GRP.

| GRP | sans marquages | Fluo4-AM | HE | Fluo4-AM+HE | Fluo4-AM+HE+Ionophore Ca |
|---------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| Fluo4-AM+(D) | 0.025 | 11.6 | 0.01 | 9.79 | 64.7 |
| % HE+ | 0.001 | 0.043 | 5.14 | 5.2 | 5.51 |
| %Q2 | 0 | 0 | 0.04 | 5.3 | 60.1 |

Toutes les hématies possèdent des canaux qui permettent l'échange du calcium entre les milieux extra et intracellulaire. Cela implique qu'elles peuvent toutes être marquées au Fluo4 AM, qu'elles soient parasitées ou non. La région D ne représente pas toutes les GR marquées par Fluo 4 AM mais seulement celles qui présentent un niveau élevé de calcium intracellulaire.

Les GRS ne possèdent pas d'acide nucléique et ne sont pas marqués par HE. Cela est justifié par les valeurs basses dans HE+ (≤ 0.188) et les valeurs nulles dans les régions Q2. Chez les GRP par contre, la présence des plasmodes est marquée par HE et les pourcentages des cellules dans la région HE+ (5.14%, 5.2%, 5.51%) coïncident avec la parasitémie sur lame 5.36%. L'augmentation de la fluorescence après ajout de l'ionophore calcium et du calcium (5.92% à 63% chez GRS et 5.3% à 60.1 chez GRP) est due à l'ouverture de l'ensemble des canaux calciques en accord avec des résultats vues dans la littérature (Dedkova *et al.*, 2000).

IV.2. Hétérogénéité du calcium chez les globules rouges drépanocytaires

L'évaluation de l'hétérogénéité du calcium chez les globules rouges drépanocytaires a été faite sur 56 individus dont 18 AS et 38 SS. Cette étude s'effectue en faisant un double

marquage avec Fluo-4AM des hématies drépanocytaires en comparaison avec des globules rouges normaux. Les GR marqués par Fluo-4 AM sont ceux qui ont un taux élevé de calcium (Annexe V).

Puisque les valeurs minimum et maximum de taux élevé de calcium chez les trois sortes de GR sont très éloignées, les quartiles ont dû être calculés. Chez AA, les quartiles ne diffèrent que de 4 unités : ceci indique l'homogénéité de taux calcique chez les individus sains. Chez AS, l'écart entre les quartiles est de 5 à 7 unités tandis que chez les SS, cet écart est de 7 à 18 unités (Tableau VII). Ces résultats confirment l'hétérogénéité du calcium dans les hématies drépanocytaires ainsi que la concentration de ce cation plus élevée dans le globule rouge drépanocytaire (GR AS et SS) que dans le globule rouge normal (GR AA) (Steinberg *et al.*, 1978).

Tableau VII : Hétérogénéité du calcium dans les GRSS.

| Taux de Fluo-4 AM (%) | AA | AS | SS |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Valeur minimum | 0.76 | 1.81 | 2.76 |
| 1 ^{er} quartile | 10.3 | 7.8075 | 12.1 |
| 2 ^{ème} quartile | 13.55 | 9.615 | 19.4 |
| 3 ^{ème} quartile | 14.8 | 14.5 | 37.1 |
| Valeur maximum | 20.1 | 39.6 | 64.7 |

V. MODULATION CALCIQUE SUR LES COCULTURES AVEC DE L'ARTESUNATE

Les parasites modulent le taux de calcium en maintenant une faible concentration en Ca^{2+} à l'intérieur des erythrocytes grâce à des pompes à calcium (Huber *et al.*, 2005). Cette étude a été mise au point afin d'étudier si artésunate peut augmenter le taux calcique à l'intérieur des GR AA ou SS. Cette augmentation de Ca^{2+} stimulerait alors l'éryptose (Berg *et al.*, 2001; Bratosin *et al.*, 2001; Daugas *et al.*, 2001). Fluo4-AM sert à marquer le calcium intracellulaire et HE, l'ADN des parasites.

La moyenne des taux de GR fortement marqués par le Fluo-4 AM ont pu être établis. A T24h, 13.79% des GR AA ont un taux élevé de calcium pour 20.81% chez GR SS. La concentration en calcium cytosolique chez SS est supérieure à celle chez AA (Figure 23).

Les valeurs varient peu en absence ou en présence de l'artésunate.

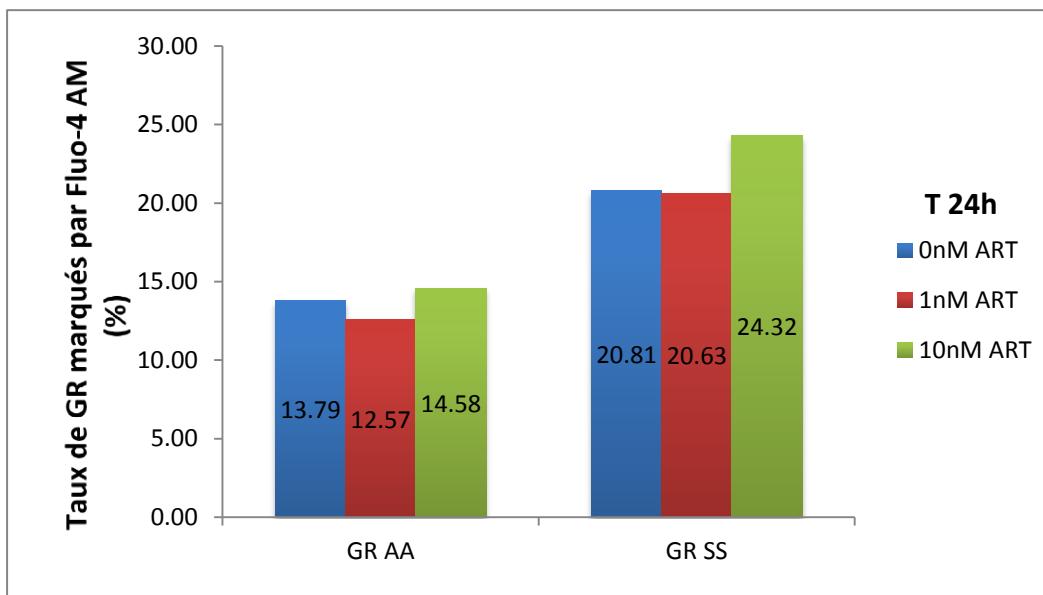


Figure 23: Moyenne des taux de GR AA et SS fortement marqués par Fluo-4 AM à 24h de la coculture (%).

Sans artésunate, *Plasmodium falciparum* module le flux calcique chez les GR AA d'où la diminution des taux de GR AA marqués par Fluo-4 AM de 13.79% à 5.74% chez GRP AA. Avec les doses croissantes d'artésunate, les taux de GRP ayant une concentration en ion calcium intercellulaire élevé varient peu : 5.74% sans artésunate à 6.17% et 6.19% à 1nM et 10nM d'artésunate (Figure 24).

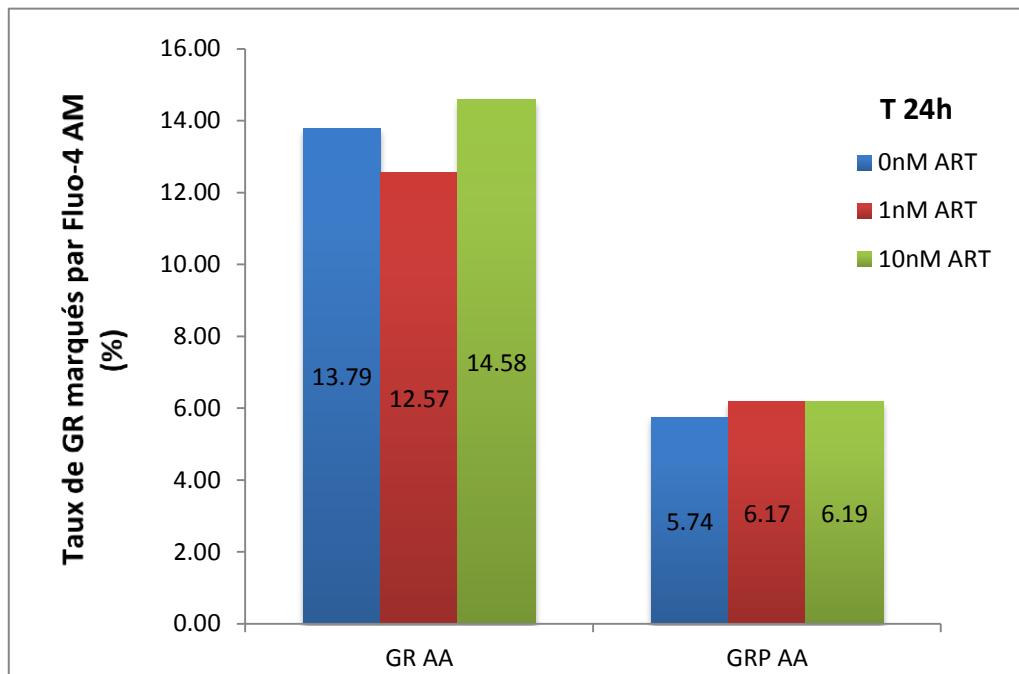


Figure 24 : Comparaison des moyennes des taux (%) de GR marqués par Fluo-4 AM avec et sans artésunate à T24h chez GR AA et GRP AA

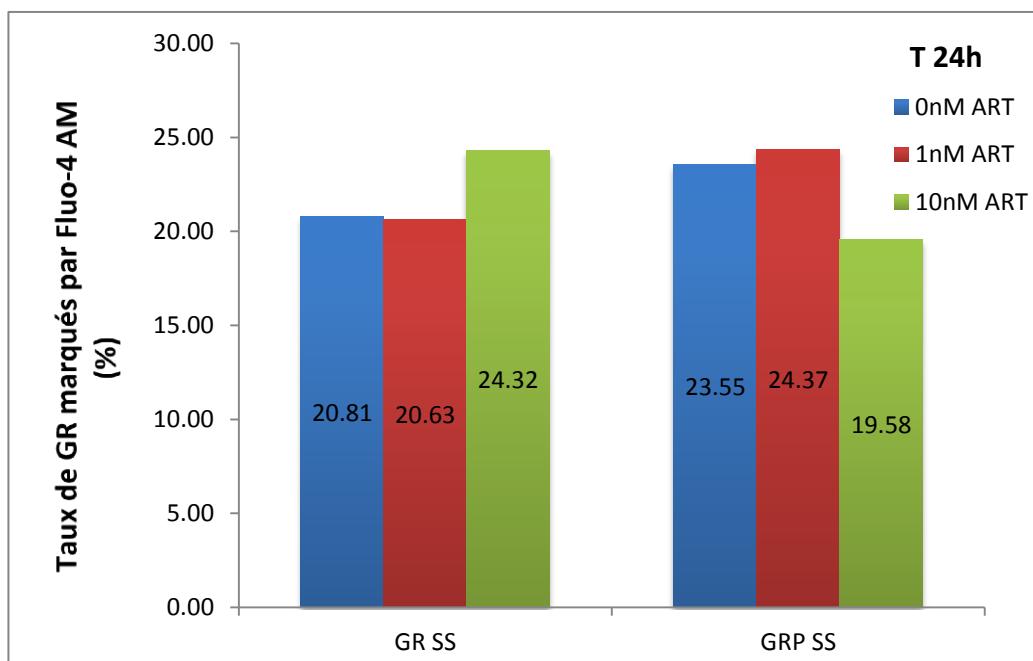


Figure 25: Comparaison des moyennes des taux (%) de GR marqués par Fluo-4 AM avec et sans artésunate à T24h chez GR SS et GRP SS.

Si les parasites arrivent à moduler le flux calcique chez les hématies normales (Figure 20), ils n'arrivent pas à abaisser la forte concentration en Ca^{2+} chez les GRP drépanocytaires d'où le taux de GRP SS marqué par Fluo-4 AM presque similaire (23.55%) à celui de GR SS (20.81%) (Figure 23). Le double marquage des hématies parasitées ne montre pas de changement significatif quant à la moyenne de fluorescence en Fluo-4 AM entre les GRP SS en absence et en présence d'artésunate 1nM et 10nM (Figure 25).

Les calculs des moyennes de taux de fluorescence en Fluo-4 AM à 36h et 48h ont donné les mêmes résultats qu'à 24h sauf pour GRP AA (T36h) où il y a un accroissement de 3 fois plus du taux de fluorescence en Fluo-4 AM lors de l'incubation avec une concentration en artésunate de 10nM (Figure 26).

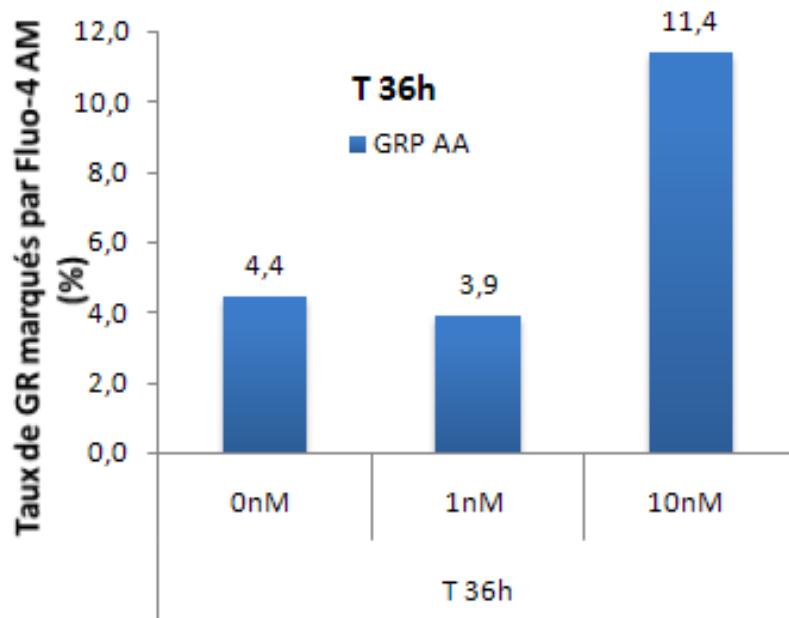


Figure 26: Accroissement de fluorescence en Fluo-4 AM avec 10nM d'artésunate chez GRP AA.

DISCUSSION

Depuis une décennie, le traitement du paludisme a évolué grâce à la combinaison de différentes variétés de molécules contenant des dérivés de l'artémisinine. Même si ces combinaisons thérapeutiques semblent efficaces, la possibilité de la résistance de *Plasmodium* à ces agents n'est pas à exclure. La meilleure façon de combattre cette résistance est d'utiliser des agents thérapeutiques afin de déclencher les mécanismes propres aux cellules comme l'éryptose chez les GR pour arrêter l'invasion des parasites.

La combinaison des dérivés de l'artémisinine, dont l'artésunate, combinés avec d'autres molécules (Artemisinin-based Combination Therapy ou ACT) est préconisée pour le traitement de paludisme (WHO, 2010). Les expériences ont été faites afin de déterminer si l'artésunate et/ou le parasite était capable de moduler le flux de calcium à l'intérieur des erythrocytes parasités normaux et drépanocytaires et s'il a un effet sur l'éryptose.

Artésunate est efficace contre les parasites utilisés *in vitro*

Les lectures des lames au microscope ont permis de calculer la moyenne de l'évolution des parasites dans deux différentes sortes de GR : sains et drépanocytaires durant 48 heures. Sans artésunate, les parasites ont un accroissement moyen de 0.13% et 0.12% (Figure 12) respectivement chez les globules rouges AA et SS. Avec 1nM et 10nM d'artésunate par contre, une décroissance à environ de -0.11% (Figure 12) de la parasitémie a été observée. Ceci démontre l'efficacité de l'artésunate pour soigner le paludisme. Concernant le mode de développement des plasmodes dans les deux différentes natures de GR, les parasites ont un retard de croissance chez les GR drépanocytaires. En effet, les schizontes ajoutés dans les cocultures ont pu se développer durant les premières 24heures pour éclater et donner des merozoites qui colonisent les autres hématies. A 48h, les parasites dans les hématies AA ont pu se développer afin de devenir des schizontes, par contre la plupart de ceux qui sont dans les hématies SS sont toujours au stade ring ou trophozoite (Figure 13 et annexe III, tableau IX) . Ils n'arrivent pas à s'adapter dans le milieu hostile qu'est l'hématie falciformée.

Artésunate ne déclenche pas l'éryptose des GRP

L'éryptose est caractérisée par un rétrécissement de la cellule, la déformation de la membrane provoquant une exposition de la phosphatidylsérine à la surface des cellules. Puisque l'exposition de la phosphatidylsérine au niveau de la membrane déclenche rapidement la clairance des GRP de la circulation sanguine, l'éryptose est considéré comme un bon mécanisme permettant de combattre le paludisme.

Les GR drépanocytaires ont une durée de vie courte qui cause chez les sujets atteints une anémie dite falciforme. Cela peut s'expliquer par une éryptose plus importante comme le traduit la valeur de l'exposition en PS chez les GRP SS (10.85%) plus élevée que chez les GR normaux (2.33%) en absence d'artésunate à T24h (Figure 17). Après comparaison de la moyenne des pourcentages de l'exposition de phosphatidylsérine au niveau de la membrane cellulaire, aucune variation n'a été démontrée avec les concentrations croissantes (1nM et 10nM) en artésunate (Tableau IV). Ce médicament n'active donc pas l'éryptose chez les deux formes de globules rouges (AA et SS) à 24h, 36h et 48h de coculture.

Artésunate module le calcium à l'intérieur des GRP AA à 36h de la coculture

L'augmentation de la concentration cytosolique de l'ion Ca^{2+} suivie par l'activation des canaux perméables aux Ca^{2+} stimule la vésiculation de la membrane. L'augmentation en ce cation à l'intérieur des cellules stimule l'éryptose (Lang *et al.*, 2005a). Les doubles marquages avec Fluo4-AM et HE ont permis de prouver l'hétérogénéité du calcium cytosolique chez les GR drépanocytaires (Tableau VII et figure 21).

La comparaison entre le taux de calcium chez les GR parasités AA et SS ont permis de montrer que les parasites abaissent la concentration en calcium cytosolique chez les GR normaux à partir de la réinvasion à 24h : 13.79% à 5.74% (Figure 22) jusqu'à 48h de coculture. Mais il n'y a aucune variation de la concentration très élevée en calcium chez les hématies drépanocytaires selon la dose d'artésunate ou en présence de parasites (aucune modification de la fluorescence en Fluo-4 AM chez GR SS et GRP SS : Figure 23). Par contre, à 36h de la coculture, l'artésunate 10 nM augmente le taux calcique intercellulaire des hématies normales parasitées de 4.4% à 11.1% (Figure 24). L'artésunate agit sur le flux calcique et sur le stockage de calcium cytosolique des hématies normales.

Ces expériences *in vitro* ont permis d'avoir plus d'information sur le mode d'action de

l'artésunate. Même si l'artésunate n'agit pas sur l'exposition en phosphatidylsérine chez les GRP, il module par contre le calcium intercellulaire des GR normaux. L'artésunate est actif sur tous les stades de développement intra érythrocytaire et présente une haute efficacité même sur les formes très jeunes (rings) des parasites qui ne sont présentes que durant quelques heures après que les globules rouges soient envahis par le stade merozoite (ter Kuile *et al.*, 1993). En outre, il réduit le nombre de gamétocytes dans le sang (Kombila *et al.*, 1997) et diminue le pouvoir invasif des gamétocytes survivants (Price et Nosten, 1996).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'éryptose est activée par plusieurs xénobiotiques* (Niemoeller *et al.*, 2008; Sopjani *et al.*, 2008) et est augmenté dans diverses maladies telles que la carence en fer, la drépanocytose, la bêta-thalassémie*, la carence en glucose-6-phosphate déshydrogénase, et le paludisme (Lang *et al.*, 2008). La stimulation de l'éryptose par un agent thérapeutique comme artésunate sur des érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* pourrait concourir à prévenir la résistance au paludisme.

Plasmodium falciparum préfère se multiplier dans des globules rouges normaux plutôt que les hématies SS. Son adaptation à ce milieu hostile fait que leur multiplication est retardée dans des érythrocytes de drépanocytaires. L'artésunate agit sur le cours du paludisme sur les différents stades erythrocytaires observés dans tous les cocultures: rings, trophozoites et schizontes. Les études *in vitro* montre que l'artésunate ne modifie pas l'exposition de phosphatidylsérine au cours de l'infection paludique pour les hématies saines ou drépanocytaires. Ces patients ont des âges et sont de sexes différents. Pour la majorité des patients AA et SS, l'artésunate ne stimule pas le système érythrocytaire responsable de l'éryptose au cours de l'infection due à *Plasmodium falciparum*. La modulation calcique lors du paludisme au niveau des globules rouges n'est pas non plus modifiée par artésunate.

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre au point des doubles marquages pour la détection de l'exposition de phosphatidylsérine et du calcium intercellulaire des érythrocytes parasitées.

De récentes études ont pu révéler que l'artémisinine cause l'apoptose des cellules cancéreuses (Singh et Lai, 2004) et l'artésunate induit l'apoptose des cellules humaines atteintes d'un syndrome myelodysplasique* (Wang *et al.*, 2014). Ainsi, les études de l'éryptose due à l'artésunate devraient être continuées pour comprendre la relation entre flux calcique, infection et efficacité de ses dérivés.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ahn, SY, Shin, MY, Kim, YA, Yoo, JA, Kwak, DH, Jung, YJ, Jun, G, Ryu, SH, Yeom, JS, Ahn, JY, Chai, JY, & Park, JW (2008) Magnetic separation: a highly effective method for synchronization of cultured erythrocytic *Plasmodium falciparum*. Parasitol Res 102(6):1195- 1200.
2. Akel, A, Hermle, T, Niemoeller, OM, Kempe, DS, Lang, PA, Attanasio, P, Podolski, M, Wieder, T, Lang, F (2006) Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine. Eur J Pharmacol 532:11-17.
3. Allan, D, Michell, RH (1977) Calcium ion-dependent diacylglycerol accumulation in erythrocytes is associated with microvesiculation but not with efflux of potassium ions. Biochem J 166:495-499.
4. Allison, AC (1964) Polymorphism and Natural Selection in Human Populations. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 29:137-149.
5. Barnes, KI, Mwenechanya, J, Tembo, M, McIlheron, H, Folb, PI, Ribeiro, I, Little, F, Gomes, M, Molyneux, ME (2004) Efficacy of rectal artesunate compared with parenteral quinine in initial treatment of moderately severe malaria in African children and adults: a randomised study. Lancet 363(9421):1598 – 1605.
6. Berg, CP, Engels, IH, Rothbart, A, Lauber, K, Renz, A, Schlosser, SF, Schulze-Osthoff, K, Wesselborg, S (2001) Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. Cell Death Differ 8:1197-1206.
7. Bernhardt, I, Weiss, E, Robinson, HC, Wilkins, R, Bennekou, P (2007) Differential effect of HOE642 on two separate monovalent cation transporters in the human red cell membrane. Cell Physiol Biochem 20:601-606.
8. Bilmen, S, Aksu, TA, Gumuslu, S, Korgun, DK, Canatan, D (2001) Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. Clin Chim Acta 303:83-86.
9. Boas, FE, Forman, L, Beutler, E (1998) Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. Proc Natl Acad Sci U.S.A 95:3077-3081.
10. Bookchin, RM, Ortiz, OE, Lew, VL (1987) Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells. Prog Clin Biol Res 240:193-200.
11. Bortner, CD, Cidlowski JA (2004) The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis. Pflugers Arch 448:313-318.

12. Brand, VB, Sandu, CD, Duranton, C, Tanneur, V, Lang, KS, Huber, SM, Lang, F (2003) Dependence of *Plasmodium falciparum* *in vitro* growth on the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell Physiol Biochem* 13:347-356.
13. Bratosin, D, Estaquier, J, Petit, F, Arnoult, D, Quatannens, B, Tissier, JP, Slomianny, C, Sartiaux, C, Alonso, C, Huart, JJ, Montreuil, J, Ameisen, JC (2001) Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 8:1143-1156.
14. Cohen, SN, Yielding, KL. 1965. Inhibition of DNA and RNA polymerase reactions by chloroquine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 54:521-527.
15. Daugas, E, Cande, C, Kroemer, G (2001) Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* 8:1131-1133.
16. Dedkova, EN, Sigova, AA, Zinchenko, VP (2000) Mechanism of action of calciumionophores on intact cells: ionophore-resistant cells. *Membr Cell Biol* 13(3) : 357-368.
17. Driss, F (2008) Transfusion sanguine et drépanocytose. Livret pratique sur les échanges transfusionnels chez les patients drépanocytaires 3.
18. Druilhe, P, Gentilini, M (1982) Culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. Intérêts et Limites – Méthodologie. *Médecine Tropicale* 42:437-462.
19. Duranton, C, Huber, SM, Lang, F (2002) Oxidation induces a Cl(-)- dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol* 539:847-855.
20. Duranton, C, Huber, SM, Tanneur, V, Lang, K, Brand, V, Sandu, C, Lang,F (2003) Electrophysiological properties of the *Plasmodium falciparum*-induced cation conductance of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 13:189-198.
21. Eaton, JW, Skelton, TD, Swofford, HS, Kolpin, CE, Jacob, HS (1973). Elevated erythrocyte calcium in sickle cell disease. *Nature* 246(5428) : 105-106.
22. Eda, S, Sherman, IW (2002) Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell PhysiolBiochem* 12:373-384.
23. Egan,TJ. (2003). Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target. *Targets* 2:115-124.
24. Egan,TJ. (2008). Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *J Inorg Biochem* 102:1288-1299.

25. El Bentati, FZ, Iobagiu, C, Lambert, C (2009) Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. Revue Francophone des Laboratoires 410:23-32.
26. Esposito, F, Gambella, R, Modiano, D, Lamizana, L, Lombardi, S, Rotigliano, G, Habluetzel, A (1991) Waiting for the vaccine: sporozoite vaccine research entails important progress in malaria epidemiology. Parasitologia 33:85-91.
27. Fadok, VA, Bratton, DL, Rose, DM, Pearson, A, Ezekowitz, RA, Henson, PM (2000) A receptor for phosphatidylserine specific clearance of apoptotic cells. Nature 405:85-90.
28. Franco, RS, Palascak, M, Thompson, H, Rucknagel, DL, Joiner, CH (1996) Dehydration of transferrin receptor-positive sickle reticulocytes during continuous or cyclic deoxygenation: role of KCl cotransport and extracellular calcium. Blood 88:4359-4365.
29. Fujioka, H, Aikawa, M (2002) Structure and life cycle. Chem Immunol 80:1-26.
30. Gee, KR, Brown, KA, Chen, W-N U, Bishop-Stewart, J, Gray, D, Johnson, I (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺ indicator dyes. 2000 Harcourt Publishers Ltd 27(2) : 97–106
31. Green, DR, Reed, JC (1998) Mitochondria and apoptosis. Science 281:1309-1312.
32. Gulbins, E, Jekle, A, Ferlinz, K, Grassme, H, Lang, F (2000) Physiology of apoptosis. Am J Physiol Renal Physiol 279:F605-F615.
33. Gulbins, E, Lang, F (2001) Pathogens, host-cell invasion and disease. Am Scientist 89:406-413.
34. Gwag, BJ, Canzoniero, LMT, Sensi, SL, DeMaro, JA, Koh, JY, Goldberg, MP, Jacquin, M, Choi, W (1999) Calcium ionophores can induce either apoptosis or necrosis in cultured cortical neurons. PLoS Med 90(4):1339–1348.
35. Hay, SI, Okiro, EA, Gething, PW, Patil, AP, Tatem, AJ, Guerra, CA, Snow, RW (2010) Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. PLoS Med 7(6) e1000290.
36. Hill, AVS, Elvin, J, Willis, AC *et al* (1991) Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. Nature 352: 595-600.
37. Huber, SM, Duranton, C, Lang, F (2005) Patch-clamp analysis of the "new permeability pathways" in malaria-infected erythrocytes. Int Rev Cytol 246:59-134.

38. Huber, SM, Gamper, N, Lang, F (2001) Chloride conductance and volume-regulatory non selective cation conductance in human red blood cell ghosts. Pflugers Arch 441:551-558.
39. Huber, SM, Uhlemann, AC, Gamper, NL, Duranton, C, Kremsner, PG, Lang, F (2002) *Plasmodium falciparum* activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation. EMBO J 21:22-30.
40. Ivanova, L, Bernhardt, R, Bernhardt, I (2008) Nongenomic Effect of Aldosterone on Ion Transport Pathways of Red Blood Cells. Cell Physiol Biochem 22:269-278.
41. Jallow, M, Teo, YY, Small, KS, Rockett, KA, Deloukas, P, Clark, TG, Kivinen, K, Bojang, KA, Conway, DJ, Pinder, M, et al (2009) Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa Nat Genet.
42. Javadov, S, Karmazyn, M (2007) Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. Cell Physiol Biochem 20:1-22.
43. Kaestner, L, Bernhardt, I (2002) Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. Bioelectrochemistry 55:71-74.
44. Kaestner, L, Tabellion, W, Lipp, P, Bernhardt, I (2004) Prostaglandin E2 activates channel mediated calcium entry in human erythrocytes: an indication for a blood clot formation supporting process. Thromb Haemost 92:1269-1272.
45. Kempe, DS, Lang, PA, Duranton, C, Akel, A, Lang, KS, Huber, SM, Wieder, T, Lang, F (2006) Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. FASEB J 20:368-370.
46. Kirk, K (2001) Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. Physiol Rev 81:495-537.
47. Kissinger, JC, Collins, WE, Li, J, Mc Cutchan, TF (1998) *Plasmodium inui* is not closely related to other quartan *Plasmodium* species. J Parasitol 84:278-282.
48. Lancellotti, M, Pereira, RF, Cury, GG, Hollanda, LM (2009) Pathogenic and opportunistic respiratory bacteria-induced apoptosis. Braz J Infect Dis 13:226-231.
49. Lang, E, Lang, PA, Shumilina, E, Qadri, SM, Kucherenko, Y, Kempe, DS, et al. (2010) Enhanced eryptosis of erythrocytes from gene-targeted mice lacking annexin A7. PflugersArchiv 460:667-76.

50. Lang, F, Gulbins, E, Lerche, H, Huber, SM, Kempe, DS, Foller, M (2008) Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem.* 22, 373–380.
51. Lang, F, Lang, KS, Lang, PA, Huber, SM, Wieder, T (2006) Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal* 8:1183-1192.
52. Lang, KS, Lang, PA, Bauer, C, Duranton, C, Wieder, T, Huber, SM, Lang, F (2005a) Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem.* 15:195-202.
53. Lang, KS, Myssina, S, Brand, V, Sandu, C, Lang, PA, Berchtold, S, Huber, SM, Lang, F, Wieder, T (2004) Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 11:231-243.
54. Lang, PA, Kaiser, S, Myssina, S, Wieder, T, Lang F, Huber SM (2003) Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C1553- C1560.
55. Lang, PA, Kempe, DS, Myssina, S, Tanneur, V, Birka, C, Laufer, S, Lang, F, Wieder, T, Huber, SM (2005b) PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ* 12:415-428.
56. Lang, PA, Kempe, DS, Tanneur, V, Eisele, K, Klarl, BA, Myssina, S, Jendrossek, V, Ishii, S, Shimizu, T, Waidmann, M, Hessler, G, Huber, SM, Lang, F, Wieder, T (2005c) Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci.* 118:1233-1243.
57. Lepers, JP, Ramanamirija, JA, Rason, MD, Coulanges, P (1988) *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine in the highland region of Madagascar in 1987. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 81(3):338-44.
58. L'Faqihi-Olive, FE (2007) Plateau technique de cytométrie. *Inserm.*
59. McAuley, CF, Webb, C, Makani, J, Macharia, A, Uyoga, S, Opi, DH, Ndila, C, Ngatia, A, Scott, JA, Marsh, K, Williams, TN (2010). High mortality from *Plasmodium falciparum* malaria in children living with sickle cell anemia on the coast of Kenya. *Blood* 116(10) : 1663-1668.
60. McW Healthcare (2008) Malaria. Life Cycle of *Plasmodium*. Vinfotech.
61. Miltenyi Biotec (2014) Whole Blood Column Kit. www.miltenyibiotec.com.

62. Nicolay, JP, Schneider, J, Niemoeller, OM, Artunc, F, Portero-Otin, M, Haik, G, Jr., Thornalley, PJ, Schleicher, E, Wieder, T, Lang, F (2006) Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. *Cell Physiol Biochem* 18:223-232.
63. Niemoeller, OM, Akel, A, Lang, PA, Attanasio, P, Kempe, DS, Hermle, T, Sobiesiak, M, Wieder, T, Lang, F (2006) Induction of eryptosis by cyclosporine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374:41-49.
64. Niemoeller, OM, Mahmud, H, Foller, M, Wieder, T, Lang, F. (2008). Ciglitazone and 15d-PGJ2 induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 22:237-244.
65. Ning, ZQ, Murphy, JJ (1993) Calcium ionophore-induced apoptosis of human B cells is preceded by the induced expression of early response genes. *Eur J Immunol* 23(12):3369-72.
66. Norbury, CJ, Hickson, ID (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:367-401.
67. Organisation Mondiale de la Santé (1997) Fiches modèles OMS d'information à l'usage des prescripteurs. Médicaments utilisés en parasitologie. 2: 55.
68. Organisation Mondiale de la Santé (2005) Roll Back Malaria. Les associations thérapeutiques à base d'artémisinine - Paludisme et aspects économiques.
69. Palek, J, Thomae, M, & Ozog, D (1977). Red cell calcium content and transmembrane calcium movements in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med*, 89(6), 1365-1374.
70. Pant, HC, Virmani, M, Gallant, PE (1983) Calcium-induced proteolysis of spectrin and band 3 protein in rat erythrocyte membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 117:372-377.
71. Paul, F, Roath, S, Melville, D, Warhurst, DC, Osisanya, JO (1981) Separation of malaria-infected erythrocytes from whole blood: use of a selective high-gradient magnetic separation technique. *Lancet* 2(8237):70-71.
72. Piel, FB, Patil, AT, Howes, RE, Nyangiri, OA, Gething, PW, Williams, TN, Weatherall, DJ, Hay, SI (2010) Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun* 1:104 doi: 10.1038/ncomms1104.
73. Pierce, SK, Miller, LH (2009) World Malaria Day 2009: what malaria knows about the immune system that immunologists still do not. *J Immunol* 182:5171-5177.

74. Randrianarivelojosia, M, Fidock, DA, Belmonte, O, Valderramos, SG, Mercereau-Puijalon,O, Ariey, F (2006) First evidence of pfcrt mutant *Plasmodium falciparum* in Madagascar. Trans R Soc Trop Med Hyg 100(9):826-30.
75. Razakandrainibe, R, Thonier, V, Ratsimbasoa, A, Rakotomalala, E, Ravaoarisoa, E, Raherinjafy, R, Andrianantenaina, H, Voahanginirina, O, Rahasana, TE, Carod, JF, Domarle, O, Menard, D (2009) Epidemiological situation of malaria in Madagascar: baseline data for monitoring the impact of malaria control programmes using serological markers. Acta Trop 111(2):160-167.
76. Renehan, AG, Booth, C, Potten, CS (2001) What is apoptosis, and why is it important? BMJ 322:1536-1538.
77. Ribaut, C, Berry, A, Chevalley, S, Reybier, K, Morlais, I, Parzy, D, Nepveu, F, Benoit-Vical, F, Valentin, A (2008) Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. Malar J 7:45.
78. Rojas, MO, Wasserman, M (1993) Effect of low temperature on the *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum*. J Euk Microbiol 40:149-152.
79. Ronot, Grunwald, D, Mayol, JF, Boutonnat, J (2007) La Cytométrie en flux coordinateurs : XEd Lavoisier, Paris 2007.
80. Scheibel, LW, Ashton, SH, Trager, W (1979) *Plasmodium falciparum*: Microaerophilic requirements in human red blood cells. Experimental Parasitology.47: 410-418.
81. Schuster, FL (2002) Cultivation of *Plasmodium* sp. Clinical Microbiology Review.15:355-364.
82. Sherman, IW (1998) Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection. Washington, D.C., ASM Press.
83. Sinclair, D, Donegan,S, Isba, R, Laloo, DG (2012) Artesunate versus quinine for treating severe malaria. Cochrane Database Syst Rev 6:CD005967.
84. Sopjani, M, Foller, M, Gulbins, E, Lang, F (2008) Suicidal death of erythrocytes due to selenium-compounds. Cell Physiol Biochem 22:387-394.
85. South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) group (2005) Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. Lancet, 366(9487):717-725.

86. Steinberg, MH, Eaton, JW, Berger, E, Coleman, MB, Oelshlegel, FJ (1978). Erythrocyte calcium abnormalities and the clinical severity of sickling disorders. Br J Haematol, 40(4):533-539.
87. Tanneur,V, Duranton,C, Brand,VB, Sandu,CD, Akkaya, C, Kasinathan,RS, Gachet,C, Sluyter,R, Barden,JA, Wiley,J S, Lang, F, Huber, SM (2005) Purinoceptors are involved in the induction of an osmolyte permeability in malaria-infected and oxidized human erythrocytes. Faseb Journal 19:133.
88. Taverne, J (2000) Albumax and global warming on the Web. Parasitol Today 16(5):190.
89. Trager, W, Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuousculture.Science193.
90. Trang, DT, Huy, NT, Kariu, T, Tajima, K, Kamei, K (2004) One-step concentration of malarial parasite-infected red blood cells and removal of contaminating white blood cells. Malar J, 3:7.
91. Troussard, X, Cornet, E (2010) Leucémie à tricholeucocytes. Hématologie.16 (6):432-42.
92. Williams, TN (2006) Human red blood cell polymorphisms and malaria. Curr Opin Microbiol 9:388–394.
93. Williams, TN, Mwangi, TW, Wambua, S, Alexander, ND, Kortok, M, Snow, RW, Marsh, K (2005) Sickle cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. J Infect Dis 192:178–186.
94. Williams, TN, Obaro, SK (2011) Sickle cell disease and malaria morbidity: a tale with two tails. Elsevier Ltd. Trends in Parasitology 27(7): 318
95. Wyatt, CR, Goff, W, & Davis, WC (1991) A flow cytometric method for assessing viability of intraerythrocytic hemoparasites. J Immunol Methods 140(1): 23-30.
96. Yamanaka, M, Eda, S, Beppu, M (2005) Carbohydrate chains and phosphatidylserine successively work as signals for apoptotic cell removal. Biochem Biophys Res Commun 328:273-280.
97. Zhou, Q, Zhao, J, Wiedmer, T, Sims, PJ (2002) Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase. Blood 99:4030-4038.
98. http://en.wikipedia.org/wiki/Sickle-cell_disease
99. https://www.ipmc.cnrs.fr/fichiers/recherche/microscopie/FP_Cytometrie

ANNEXES

Annexe I : Préparation des réactifs et milieu de culture.**1. Milieu de culture des parasites : RPMI 1640 glucosé**

| | |
|----------------------------|--------|
| NaHCO ₃ (32 mM) | 8.07g |
| Hépès (25mM) | 17.82g |
| D-Glucose | 6g |
| RPMI 1640 poudre | 31.2g |
| Hypoxanthine | 60 mg |
| Eau vive qsp | 3L |

- *Filtrer avec du filtre Nalgène*
 - *Répartir dans des flacons de 500ml*
 - *Conserver à -20°C*
- Compléter la préparation (500ml) avec :

| | |
|--------------|------|
| Albumax 0.5% | 12ml |
|--------------|------|

2. Milieu de congélation

| | |
|-----------------------|-------|
| Sorbitol 2.9% | 3g |
| NaCl 0.63% | 0.65g |
| Glycérol 38% | 28ml |
| Eau distillée stérile | 100ml |

Filtrer et conserver à +4°C pendant plus d'un mois

3. Milieu de décongélation

| | |
|------------|---------|
| Na Cl 4.5% | 500µl |
| Na Cl 3.5% | 450µl |
| RPMI vide | 14.05ml |

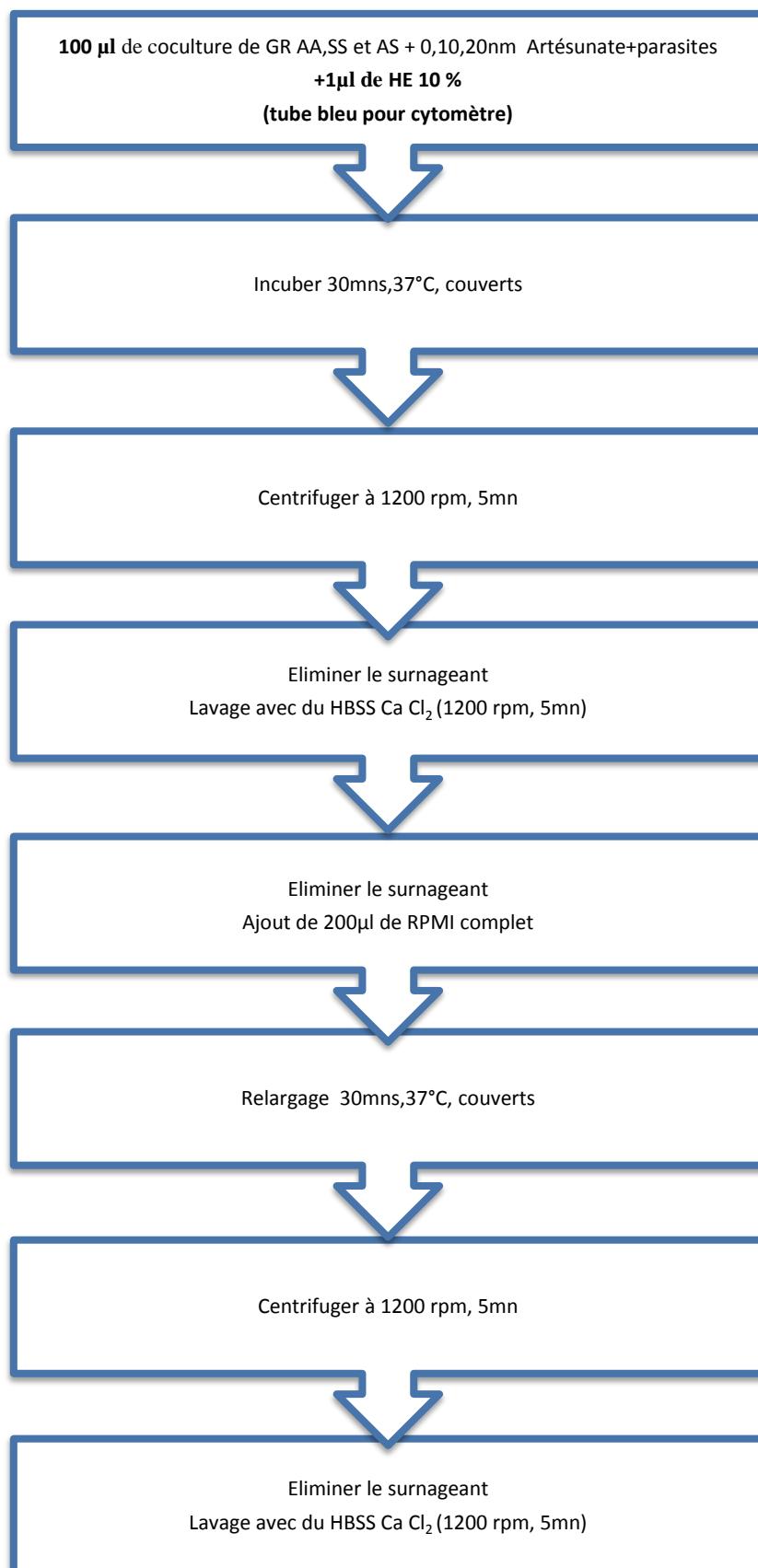
4. Solution d'Albumax II

Albumax est sous forme de poudre très volatile. La solution mère est préparée sous hotte à une concentration de 20% (20 grammes pour 100ml d'eau distillée stérile). Puis celleci est congelée à -20°C. Pendant l'entretien des cultures, Albumax est additionnée au milieu à raison de 0,5%.

Annexe II : Protocoles de marquages

1. Marquage avec hydroethidine

Diluer dans 1 ml de DMSO les 10mg de poudre d'hydroéthidine à 5mM.

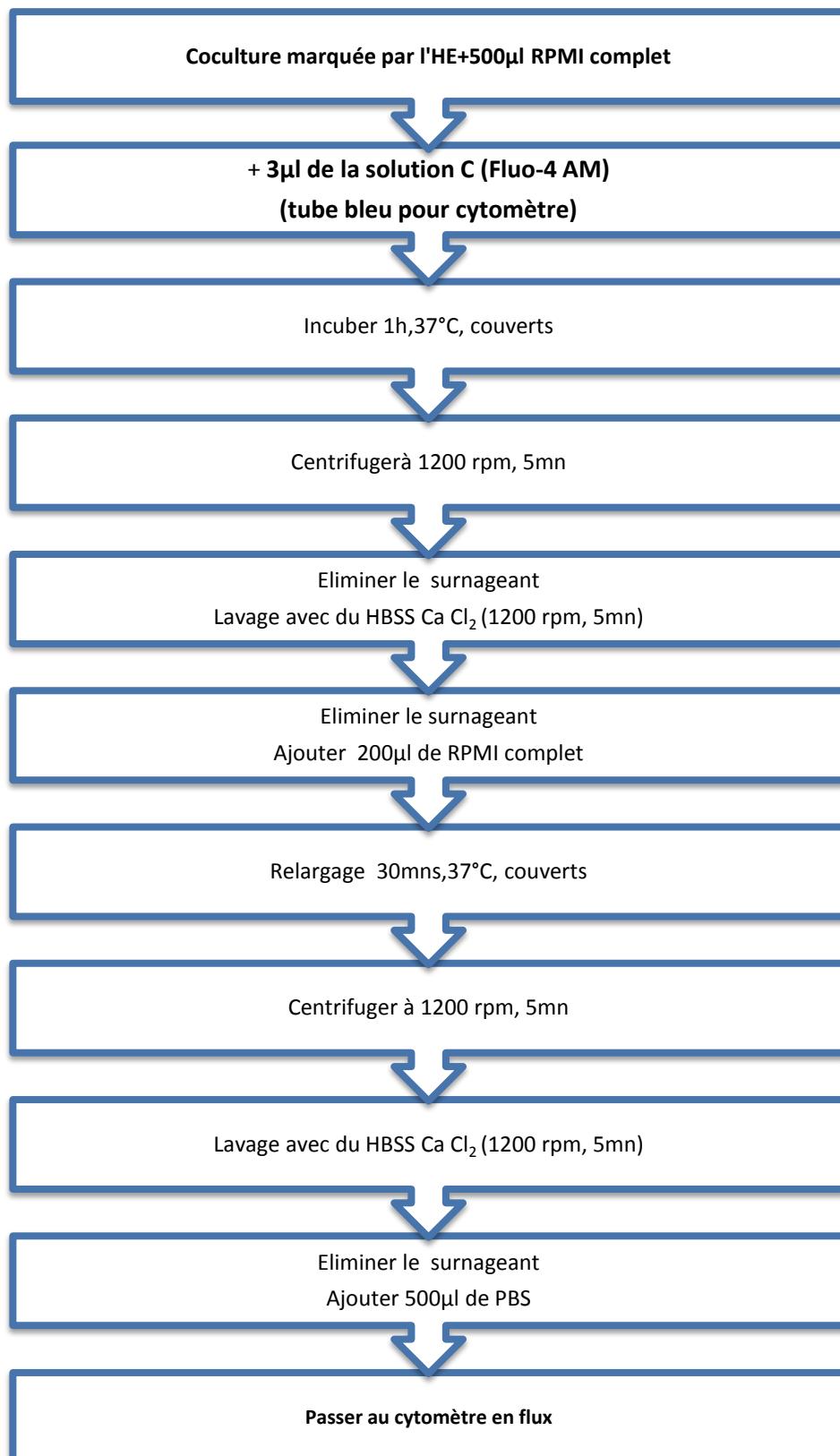


2. Marquage avec Fluo-4 AM

Fluo-4 AM sous forme d'aliquoted de 500 μ l à 1mM=**solution A**

100 μ l de la **solution A** dilué dans 100 μ l d'acide pluronic 20% =**solution B** à 500 μ M

10 μ l de la **solution B** dilué dans 490 μ l d'acide pluronic 20%=**solution C** à 1 μ M



3. Marquage avec Annexin V-FITC

- Déposer 5µL d'Annexin V dans le culot globulaire.
- Ajouter 100µL de Binding Buffer.
- Incuber pendant 15 minutes à RT, recouvert de papier aluminium.
- Ajouter 400 µL de Binding Buffer
- Passer au cytomètre en flux

Annexe III : Effets de l'artésunate sur le cours du paludisme

Tableau VIII : Parasitémie (%) des GR AA et GR SS au cours des 48 heures de coculture avec de l'artésunate à 0nM, 1nM et 10nM.

| Lames | T0 | T18h | T24h | T36h | T48h | T18h | T24h | T36h | T48h | T18h | T24h | T36h | T48h |
|--------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | 0 ART | 0 ART | 0 ART | 0 ART | 0 ART | 1 ART | 1 ART | 1 ART | 1 ART | 10 ART | 10 ART | 10 ART | 10 ART |
| AA 1 | 0.27 | 0.35 | 0.4 | 0.47 | 0.56 | 0.26 | 0.30 | 0.15 | 0.09 | 0.28 | 0.36 | 0.15 | 0.10 |
| SS 1 | 0.30 | 0.37 | 0.32 | 0.37 | 0.42 | 0.32 | 0.25 | 0.15 | 0.14 | 0.43 | 0.36 | 0.25 | 0.06 |
| SS 2 | 0.10 | 0.13 | 0.18 | 0.25 | 0.26 | 0.10 | 0.52 | 0.59 | 0.20 | 0.09 | 0.11 | 0.06 | 0.07 |
| SS 3 | 0.07 | 0.07 | 0.95 | 1.22 | 0.81 | 0.50 | 0.23 | 0.39 | 0.27 | 0.15 | 0.10 | 0.02 | |
| AA 2 | 0.14 | 0.13 | 0.26 | 0.52 | 0.40 | 0.50 | 0.18 | 0.16 | 0.09 | 0.13 | 0.23 | 0.17 | 0.04 |
| SS 4 | 0.22 | 0.20 | 0.29 | 0.68 | 0.52 | 0.25 | 0.40 | 0.37 | 0.10 | 0.27 | 0.17 | 0.36 | 0.35 |
| SS 5 | 0.22 | 0.18 | 0.30 | | | 0.25 | 0.29 | 0.35 | | 0.23 | 0.02 | | |
| AA 3 | 0.14 | 0.29 | 0.23 | 0.21 | 0.28 | 0.20 | 0.36 | 0.34 | 0.22 | 0.18 | 0.20 | 0.13 | 0.12 |
| SS 6 | 0.14 | 0.19 | 0.17 | 0.40 | 0.30 | 0.24 | 0.20 | 0.18 | 0.23 | 0.13 | 0.08 | 0.08 | 0.24 |
| SS 7 | 0.24 | 0.37 | 0.26 | 0.53 | 0.06 | 0.17 | 0.31 | 0.33 | 0.33 | 0.28 | 0.20 | 0.16 | 0.09 |
| SS 8 | 0.15 | 0.22 | 0.52 | 0.51 | 0.21 | 0.31 | 0.17 | 0.28 | 0.27 | 0.25 | 0.16 | 0.20 | 0.20 |
| AA4 | 0.54 | 0.50 | 0.34 | 0.15 | 0.40 | 0.58 | 0.35 | 0.28 | 0.20 | 0.60 | 0.38 | 0.98 | 0.56 |
| SS 9 | 0.47 | 0.85 | 0.76 | 0.24 | 0.75 | 0.36 | 0.39 | 0.13 | 0.07 | 0.35 | 0.24 | 0.25 | 0.21 |
| SS 10 | 0.62 | 0.89 | 0.56 | 0.30 | 0.26 | 0.41 | 0.35 | 0.26 | 0.13 | 0.66 | 0.54 | 0.48 | 0.68 |
| SS 11 | 0.65 | 0.68 | 0.45 | 0.32 | 0.49 | 0.63 | 0.52 | 0.46 | 0.39 | 0.49 | 0.42 | 0.38 | 0.31 |
| AA5 | 0.33 | 0.39 | 0.29 | 0.30 | 0.39 | 0.29 | 0.25 | 0.30 | 0.28 | 0.32 | 0.26 | 0.28 | 0.25 |
| SS12 | 0.45 | 0.74 | 0.64 | 0.97 | 0.98 | 0.49 | 0.68 | 0.32 | 0.32 | 0.40 | 0.35 | 0.25 | 0.16 |
| SS13 | 0.36 | 0.25 | 0.95 | 0.52 | 0.46 | 0.56 | 0.65 | 0.34 | 0.22 | 0.31 | 0.26 | 0.28 | 0.15 |

Tableau IX : Retard de croissance des parasites chez GRSS dans les cocultures sans artésunate : R : Ring, T : Trophozoite, S : Schizonte, P : Parasitémie.

| T0 | R | T | S | Totaux | P | T18h | | | T24h | | | T36h | | | T48h | | | |
|--------------|---|----|----|--------|--------------|------|----|----|--------|------|----|------|----|--------|------|----|----|---|
| | | | | | | R | T | S | Totaux | P | R | T | S | Totaux | P | R | T | S |
| AA 1 | 2 | 11 | 21 | 34 | 0.27 | 1 | 9 | 25 | 35 | 0.35 | 23 | 14 | 3 | 40 | 0.4 | 19 | 24 | 4 |
| SS 1 | 0 | 18 | 20 | 38 | 0.3 | 0 | 14 | 23 | 37 | 0.37 | 27 | 6 | 1 | 32 | 0.32 | 28 | 6 | 3 |
| SS 2 | 0 | 0 | 12 | 12 | 0.1 | 0 | 1 | 12 | 13 | 0.13 | 14 | 4 | 0 | 18 | 0.18 | 20 | 5 | 0 |
| SS 3 | 0 | 0 | 7 | 7 | 0.07 | 0 | 2 | 5 | 7 | 0.07 | 66 | 16 | 13 | 95 | 0.95 | 78 | 36 | 8 |
| AA 2 | 0 | 12 | 6 | 18 | 0.144 | 1 | 1 | 11 | 13 | 0.13 | 24 | 2 | 0 | 26 | 0.26 | 18 | 29 | 5 |
| SS 4 | 0 | 11 | 17 | 28 | 0.22 | 0 | 5 | 15 | 20 | 0.20 | 17 | 5 | 7 | 29 | 0.29 | 45 | 20 | 3 |
| SS 5 | 0 | 15 | 13 | 28 | 0.22 | 0 | 3 | 15 | 18 | 0.18 | 15 | 9 | 6 | 30 | 0.30 | | | |
| AA 3 | 0 | 7 | 11 | 18 | 0.14 | 2 | 10 | 17 | 29 | 0.29 | 17 | 3 | 3 | 23 | 0.23 | 4 | 14 | 3 |
| SS 6 | 0 | 6 | 11 | 17 | 0.14 | 3 | 5 | 11 | 19 | 0.19 | 14 | 3 | 0 | 17 | 0.17 | 27 | 11 | 2 |
| SS 7 | 0 | 7 | 23 | 30 | 0.24 | 2 | 10 | 25 | 37 | 0.37 | 22 | 4 | 0 | 26 | 0.26 | 38 | 18 | 7 |
| SS 8 | 0 | 5 | 14 | 19 | 0.15 | 1 | 5 | 16 | 22 | 0.22 | 29 | 15 | 8 | 52 | 0.52 | 27 | 18 | 6 |
| AA 4 | 0 | 13 | 54 | 67 | 0.54 | 6 | 9 | 35 | 50 | 0.50 | 27 | 5 | 2 | 34 | 0.34 | 3 | 11 | 1 |
| SS 9 | 0 | 7 | 62 | 69 | 0.47 | 8 | 18 | 58 | 85 | 0.85 | 56 | 15 | 5 | 76 | 0.76 | 22 | 2 | 0 |
| SS 10 | 0 | 3 | 75 | 78 | 0.62 | 0 | 9 | 80 | 89 | 0.89 | 48 | 8 | 0 | 56 | 0.56 | 28 | 2 | 0 |
| SS 11 | 0 | 7 | 74 | 81 | 0.65 | 0 | 12 | 56 | 68 | 0.68 | 35 | 6 | 4 | 45 | 0.45 | 20 | 8 | 4 |
| AA 5 | 4 | 11 | 26 | 41 | 0.33 | 3 | 8 | 28 | 39 | 0.39 | 27 | 1 | 1 | 29 | 0.29 | 7 | 23 | 0 |
| SS12 | 3 | 4 | 49 | 56 | 0.45 | 3 | 5 | 66 | 74 | 0.74 | 58 | 6 | 0 | 64 | 0.64 | 75 | 12 | 8 |
| SS13 | 0 | 7 | 38 | 45 | 0.36 | 0 | 8 | 17 | 25 | 0.25 | 65 | 24 | 6 | 95 | 0.95 | 38 | 9 | 5 |

■ Puits contaminés

Annexe IV : GRP AA et SS doublement marqués par Annexin V-FITC et HE durant les 48h de la coculture

| [ART] | 0nM | | | | | 1nM | | | | 10nM | | | |
|--------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | T0 | T18h | T24h | T36h | T48h | T18h | T24h | T36h | T48h | T18h | T24h | T36h | T48h |
| AA 1 | 0 | 7.09 | 2.33 | 0 | 0 | 2.17 | 0 | 0 | 1.96 | 3.06 | 3.28 | 0 | 0 |
| SS 1 | 0 | 11.3 | 1.16 | 9.06 | 10.1 | 13.9 | 0 | 19.1 | 11.2 | 8.92 | 4.17 | 14.6 | 15.7 |
| SS 2 | 0 | 9.48 | 41.7 | 12.4 | 100 | 6.96 | 17.2 | 7.96 | 0 | 7.63 | 14.3 | 9.46 | 100 |
| SS 3 | 0 | 37 | 16.9 | 18.7 | 50 | 13.4 | 47.4 | 19.8 | 100 | 26 | 22.2 | 37 | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| AA 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.86 | 0 | 0 | 0 | 4.55 | 3.45 | 3.23 | 0 |
| SS 4 | 0 | 22.6 | 13.7 | 12.5 | 28.1 | 12.2 | 10.5 | 18.4 | 16.4 | 15.9 | 26 | 21.9 | 33.9 |
| SS 5 | 0 | 1.35 | 3.7 | 0 | | 2.27 | 2.13 | 7.69 | | 3.85 | 11.1 | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| AA 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.78 | 2.08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SS 6 | 0 | 9.52 | 2.5 | 10.5 | 0 | 4 | 2.27 | 4.55 | 4.17 | 6.85 | 0 | 4.55 | 0 |
| SS 7 | 0 | 11.5 | 10.8 | 1.89 | 12.5 | 14.7 | 5.49 | 4.76 | 7.69 | 15.8 | 10.8 | 0 | 0 |
| SS 8 | 0 | 9.09 | 14.1 | 2.94 | 5.41 | 12.7 | 6.02 | 14.3 | 3.7 | 28.3 | 7.61 | 15.8 | 8.82 |
| | | | | | | | | | | | | | |
| AA4 | 0 | 0 | 0 | 2.42 | 1.73 | 0 | 0 | 5.32 | 2 | 0 | 0 | 2.86 | 3.3 |
| SS 9 | 0 | 1.69 | 4.16 | 27.9 | 6.46 | 0 | 4.51 | 17.7 | 9.72 | 0 | 13.9 | 24.5 | 7.79 |
| SS 10 | 0 | 0 | 8.72 | 16.2 | 13.3 | 14.3 | 6.13 | 15.5 | 9.72 | 28.6 | 7.92 | 13.4 | 2.2 |
| SS 11 | 0 | 0 | 11.2 | 11.1 | 0 | 0 | 12.8 | 8.28 | 0 | 11.8 | 2.31 | 11.7 | 1.59 |
| | | | | | | | | | | | | | |
| AA5 | 0 | 0 | 0 | 4.44 | 2.33 | 0 | 2.44 | 3.45 | 4.76 | 0 | 0 | 7.41 | 1.19 |
| SS12 | 0 | 18.7 | 8.13 | 7.91 | 7.3 | 17.2 | 14.3 | 14.6 | 7.07 | 15.7 | 8.47 | 16.3 | 11.1 |
| SS13 | 0 | 5.58 | 4.26 | 6.98 | 3.09 | 8.03 | 4.33 | 8.06 | 4.61 | 15.1 | 6.05 | 11.2 | 4.73 |

■ Puits contaminés

Annexe V : GR AA et SS marqués par Fluo-4 AM

| SS | Fluo-4 AM |
|----------------|------------------|
| Z0001104.LMD | 30.3 |
| Z0001105.LMD | 64.7 |
| Z0001106.LMD | 63 |
| Z0001107.LMD | 41.1 |
| Z0001108.LMD | 19.4 |
| Z0001109.LMD | 37.1 |
| Z0001159.LMD | 16.4 |
| Z0001160.LMD | 19.3 |
| Z0001244.LMD | 12.1 |
| Z0001315.LMD | 28.5 |
| Z0001349.LMD | 24.7 |
| Z0001399.LMD | 39.7 |
| Z0001498.LMD | 8.82 |
| Z0001499.LMD | 8.34 |
| AS | Fluo-4 AM |
| Z0001431.LMD | 1.81 |
| Z0001432.LMD | 2.83 |
| Z0001492.LMD | 4.74 |
| Z0001493.LMD | 8.36 |
| Z0001495.LMD | 12.1 |
| Z0001496.LMD | 13.3 |
| Z0001578.LMD | 15.6 |
| Z0001579.LMD | 14.8 |
| Z0001580.LMD | 39.6 |
| AA | Fluo-4 AM |
| Z0001103.LMD | 15.4 |
| Z0001158.LMD | 10.3 |
| Z0001243.LMD | 14.6 |
| Z0001314.LMD | 13.4 |
| Z0001400.LMD | 0.76 |
| Z0001490.LMD | 13.7 |
| Z0001574.LMD | 10.3 |
| Z0001575.LMD | 20.1 |
| Moyenne | 12.32 |
| E.T. | 5.61 |
| Moyenne | Fluo-4 AM |
| Z0001581.LMD | 8.34 |
| Z0001587.LMD | 21.5 |
| Z0001588.LMD | 9.37 |
| Z0001589.LMD | 9.38 |
| Z0001590.LMD | 9.85 |
| Z0001591.LMD | 4.86 |
| Z0001592.LMD | 7.63 |
| Z0001593.LMD | 13.6 |
| Z0001594.LMD | 16.6 |
| Moyenne | 11.9 |
| E.T. | 8.59 |
| Moyenne | Fluo-4 AM |
| Z0001560.LMD | 28.1 |
| Z0001561.LMD | 22.9 |
| Z0001562.LMD | 42.5 |
| Z0001563.LMD | 31.3 |
| Z0001564.LMD | 40.4 |
| Z0001565.LMD | 17.7 |
| Z0001566.LMD | 32.4 |
| Z0001567.LMD | 19.4 |
| Z0001568.LMD | 18.5 |
| E.T. | 24.2 |
| E.T. | 16.4 |

E.T. : Ecart-type : Racine carrée de la variance (moyenne arithmétique des carrés des écarts à la moyenne) d'une distribution statistique.

Annexe VI : GRS et GRP AA et SS marqués par Fluo-4 AM durant les 48h de la coculture

| GRS | GRP | | | | | | | | | |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | T0 | T18h | T24h | T36h | T48h | T18h | T24h | T36h | T48h | T48h |
| [ART] | 0nM | 1nM | 10nM | 0nM | 1nM | 10nM | 0nM | 1nM | 10nM | 0nM |
| AA1 | 19.5 | 27.3 | 19.5 | 52.2 | 16.5 | 15.5 | 19.1 | 22.8 | 33.2 | 35 |
| SS1 | 33.5 | 29.3 | 32 | 29.5 | 29 | 31.5 | 32.4 | 28.5 | 38.8 | 42.5 |
| SS2 | 31.9 | 32.1 | 24.3 | 12 | 32.8 | 28 | 32.7 | 19.9 | 19.8 | 19.6 |
| SS3 | 37.4 | 32.4 | 28.2 | 41.8 | 31.6 | 33.2 | 38.4 | 32 | 32.4 | 36.9 |
| | | | | | | | | | | |
| AA2 | 10.7 | 12.3 | 11.4 | 19.5 | 15.3 | 9.01 | 104 | 16.4 | 22.8 | 16 |
| SS4 | 21.7 | 25.8 | 19.7 | 18.9 | 20.1 | 21.6 | 25.6 | 19.9 | 24.6 | 22.2 |
| SS5 | 7.96 | 10.3 | 7.28 | 10.9 | 12.6 | 8.93 | 12.8 | 9.65 | 24.3 | |
| | | | | | | | | | | |
| AA3 | 13.5 | 25.6 | 7.62 | 26 | 14.3 | 11.3 | 24.3 | 9.28 | 11.9 | 22.8 |
| SS6 | 15.8 | 28 | 17.7 | 22.7 | 22.9 | 27.2 | 22.9 | 21.1 | 17 | 25.4 |
| SS7 | 16.6 | 31.7 | 31.5 | 41.9 | 25.9 | 21.4 | 32.1 | 21.3 | 13.5 | 37.9 |
| SS8 | 20.8 | 31.2 | 14.6 | 20.5 | 15.6 | 14.1 | 18.3 | 18.1 | 14.3 | 13.6 |
| | | | | | | | | | | |
| AA4 | 28.5 | 13.2 | 25 | 12.3 | 15.3 | 19.1 | 12.1 | 25.2 | 35.6 | 26.4 |
| SS9 | 16 | 20.4 | 13.3 | 33.2 | 17.5 | 23 | 18.6 | 23.9 | 21.8 | 17 |
| SS10 | 23.6 | 26.2 | 21.8 | 7.97 | 17.1 | 19.9 | 12.1 | 26.7 | 23.6 | 12.8 |
| SS11 | 13.4 | 0 | 11.5 | 19.2 | 11.9 | 9.89 | 36.5 | 11.1 | 13.7 | 14.4 |
| | | | | | | | | | | |
| AA5 | 12 | 8.2 | 7.24 | 7.84 | 7.56 | 7.92 | 7.01 | 10.2 | 15.6 | 11.7 |
| SS12 | 19.2 | 22.2 | 19.1 | 17.9 | 19.9 | 17.4 | 13.2 | 19.5 | 21.7 | 23.5 |
| SS13 | 22.5 | 18.5 | 19.1 | 25.3 | 13.6 | 12.1 | 20.5 | 15.7 | 24.5 | 20.2 |

■ Puits contaminés

Last name: ANDRIAMANANTENA

First and middle names: Zo Tsiferana Juliana

Title: «*In vitro* study of eryptosis in normal and sickle erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* and treated by artesunate».

SUMMARY

Malaria due to *Plasmodium falciparum* is one of major causes of mortality in the world especially for people suffering homozygous sickle cell disease. In case of malaria, pathogens enter erythrocytes and thus escape recognition by the immune system of the host. To eliminate the pathogen, red blood cells enter into eryptosis, a suicide death of erythrocytes. Eryptosis is triggered by an increase of cytosolic calcium in erythrocytes, and is characterized by cell shrinkage, membrane blebbing and phosphatidylserine exposure at the cell surface. Phosphatidylserine-exposing erythrocytes are identified by macrophages which engulf and degrade the eryptotic cells. Accordingly, any therapeutical intervention accelerating suicidal death of infected erythrocytes has the potential to foster elimination of infected erythrocytes, delay the development of parasitemia and favorably influence the course of malaria. Counteracting *Plasmodia* by inducing eryptosis is not expected to generate resistance of the pathogen, as the proteins involved in suicidal death of the host cell are not encoded by the pathogen and thus cannot be modified by mutations of its genes. Artesunate as an inhibitor of calcium pumps potentially has an effect on these mechanisms.

Those studies show if artesunate, promotes eryptosis in parasitized normal and sickle erythrocytes. For the *in vitro* assay, synchronized parasitized AA and SS erythrocytes were grown with different doses of artesunate (0,1nM and 10 nM) during 48 h. Parasites prefer to develop in normal erythrocytes and show growth retardation in sickle erythrocytes SS. Decrease of parasitemia (-0.11 %) in presence of artesunate attests efficacy of this drug against malaria.

Phosphatidylserine-exposing and level of calcium fluctuation in PRBCs (Parasitized Red Blood Cells) AA and SS were studied by flow cytometry. Double staining with Annexin V - FITC and HE shows that exposition of phosphatidylserine at the surface of SS PRBCs is higher (10.85 %) than in AA PRBCs (2.83 %) at 24h of coculture . Thus, SS PRBCs enter more easily in eryptosis than AA PRBCs. As against, the rate of eryptosis in PRBCs do not vary neither with time nor with artesunate in the two forms of erythrocytes.

Double labeling with Fluo -4 AM and HE demonstrate the heterogeneity of calcium inside SS RBCs. To survive, pathogen modulates the cytosolic calcium concentration in normal RBC at 24h (13.8 % in non-parasitized erythrocytes and 5.74 % in PRBCs) and up to 48h of coculture. In SS RBCs, no significant change is observed in calcium content between SS RBCs and PRBCs (20.81 % and 23.51 %). Increase of intracellular calcium influx by 10 nM of artesunate are observed after 36h of parasite coculture on normal RBCs (4.4 % of cells stained by Fluo- 4 AM in absence of artesunate and 11.1 % at 10 nM of artesunate). Rates of SS PRBCs marked with Fluo- 4 AM and HE doesn't show significant variation during the 48 hours of coculture in absence or presence of artesunate.

These results show a complex regulation of calcium and eryptosis in parasitized erythrocytes AA or SS. Variable effect of artesunate by type of erythrocyte suggest new avenues of study about relation between calcium flux, infection and efficiency of artesunates derivates.

Passwords: *Plasmodium falciparum*, sickle cell disease, eryptosis, artesunate, phosphatidylserine, calcium, flow cytometry.

Nom: ANDRIAMANANTENA

Prénoms: Zo Tsiferana Juliana

Titre: « Etude *in vitro* de l'éryptose sur des cultures d'hématies normales et drépanocytaires parasitées par *Plasmodium falciparum* et traitées par l'artésunate ».

RESUME

Le paludisme dû à *Plasmodium falciparum* est l'une des majeures causes de mortalité dans le monde surtout chez les individus drépanocytaires homozygotes. Lors d'une infection paludique, le pathogène entre à l'intérieur de l'érythrocyte et échappe ainsi au système immunitaire de l'hôte. Afin d'éliminer le pathogène, les globules rouges entrent en éryptose qui est la mort par suicide des hématies. L'éryptose est déclenchée par l'augmentation de la concentration en ion calcium à l'intérieur des hématies, et est caractérisée par un rétrécissement cellulaire, une déformation membranaire et une exposition de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane. L'exposition de la phosphatidylsérine est identifiée par les macrophages qui vont dégrader les cellules éryptotiques. Ainsi, tout médicament visant à accélérer l'éryptose des hématies parasitées a le potentiel de retarder la multiplication des parasites et influencer ainsi sur le cours du paludisme. Combattre les parasites par l'éryptose n'induit pas une résistance du pathogène puisque les protéines impliquées dans l'éryptose de la cellule hôte ne sont pas codées par le pathogène et ceci ne peut les modifier par mutation des gènes. L'artesunate comme inhibiteur des pompes à calcium a potentiellement une action sur ces mécanismes.

Les études ont permis de savoir si l'artésunate favorise l'éryptose chez les hématies normales et drépanocytaires parasitées. Pour l'étude *in vitro*, les parasites synchronisés au stade schizonte dans des hématies AA et SS ont été mis en présence de différentes concentrations d'artésunate (0,1nM et 10nM) durant 48h. Les parasites préfèrent se développer dans des hématies normales et ont un retard de croissance dans les hématies drépanocytaires SS. La décroissance de la parasitémie (-0.11%) en présence d'artésunate atteste l'efficacité de ce médicament contre le paludisme.

L'exposition en phosphatidylsérine et la fluctuation calcique au niveau des GRP AA et SS ont été étudiés par cytométrie en flux. Le double marquage avec Annexin-V FITC et HE démontre que l'exposition de la phosphatidylsérine chez les GRP SS est supérieure (10.85%) à celle des GRP AA (2.83%) à 24h de la coculture. Ainsi, les GRP SS entrent plus facilement en éryptose que les GRP AA. Par contre, les taux de GRP en voie d'éryptose ne varient ni avec le temps ni en présence de l'artésunate à 1nM et 10nM chez les deux types d'hématies.

Le double marquage avec le Fluo-4 AM et l'HE a permis de démontrer l'hétérogénéité du calcium à l'intérieur des hématies SS. Afin de survivre, le pathogène module la concentration en calcium cytosolique chez les GR normaux à 24h (13.8% chez les hématies non parasitées et 5.74% chez les GRP) et jusqu'à 48h de coculture. Aucune modification n'est par contre observée chez les hématies SS parasitées ou non (20.81% et 23.51%). Une augmentation du flux calcique a été observée après 36h de coculture des parasites dans les hématies normales avec artésunate 10nM (4.4% de cellules marquées par Fluo-4 AM en absence d'artésunate et 11.1% à 10nM d'artésunate). Les taux de GRP SS marqués par Fluo-4 AM et HE varient peu durant les 48h de coculture avec ou sans artésunate.

Ces résultats montrent donc une régulation complexe du calcium et de l'éryptose dans les hématies parasitées AA ou SS. L'effet variable de l'artésunate selon le type d'hématie suggère de nouvelles voies d'études sur la relation entre flux calcique, infection et efficacité des dérivés de l'artésunate.

Mots-clés : *Plasmodium falciparum*, drépanocytose, éryptose, artésunate, phosphatidylsérine, calcium, cytométrie en flux