

THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole Doctorale Complexité du Vivant  
Laboratoire de recherche de Biologie Moléculaire et Immunologie de  
l'infection hépatique lors du paludisme

Présentée par

**Selma Topçu**

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Infection des hépatocytes par *Plasmodium*: rôle des  
protéines de micronèmes des sporozoïtes**

Soutenance le jeudi 10 mars 2016

Devant le jury composé de

Pr. Christophe Hennequin  
Dr. Jean-Christophe Barale  
Dr. Mathieu Gissot  
Dr. Rogerio Amino  
Dr. Maryse Lebrun  
Dr. Olivier Silvie

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

*Je dédie cette thèse  
A mes parents que j'aime*

*La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.  
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.  
Ici, nous avons réuni théorie et pratique : rien ne fonctionne...  
et personne ne sait pourquoi*

***Albert Einstein***

## *Remerciements*

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse Olivier SILVIE, de m'avoir accueillie au sein de son équipe. Merci de m'avoir accordée ta confiance, et de m'avoir donné les moyens d'avancer le plus loin possible dans les différents projets ambitieux du laboratoire.

Je souhaite également remercier les membres de jury, les rapporteurs, Jean-Christophe BARALE et Mathieu GISSOT, d'avoir accepté d'étudier mon travail, d'avoir accordé du temps à la lecture de ma thèse et à l'élaboration de leur rapport. Merci à Christophe HENNEQUIN, d'avoir accepté d'être président de mon jury de thèse, ainsi qu'à Maryse LEBRUN et Rogerio AMINO d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier Sylvie BRIQUET qui a toujours été présente pour moi. Je tiens à te remercier de m'avoir ouvert les bras dès mon arrivée dans l'équipe. Tu as réussi à m'initier à la biologie moléculaire, au point de l'apprécier. Tu es une personne exceptionnelle, toujours à l'écoute et me donnant en même temps de très bons conseils. J'ai gagné une amie.

Un affectueux merci à Catherine Vaquero qui par tes questions très pointeuses m'ont permis de me poser plus de questions mais surtout de me remettre en question et d'acquérir un esprit critique sur l'ensemble de mon projet de thèse. Ton aide pour la rédaction et la correction de ma thèse m'a beaucoup aidé et encouragé à prendre confiance en moi.

Par-dessus tout, je tiens à remercier du fond du coeur Giulia Manzoni. Tu es une personne à part, qui voit toujours le bon côté des gens et des situations de manières générales, ça m'a aidé à avancer. Ta bonne humeur, nos nombreux délires et surtout les parties de rigolade au quotidien vont beaucoup me manquer. Mais je sais que j'ai gagné une très amie, sur qui je pourrai toujours compter. Merci chica.

Je remercie également Véronica Risco, la première des Chicas de l'équipe Rose. Merci de m'avoir initiée à la dissection des moustiques, et à bien d'autres techniques. L'image que je garderai de toi sera la cannette de coca-cola que tu embarquais partout avec toi, même dans les laboratoires. Merci pour tout.

Je tiens également à remercier Carine pour nos délires au laboratoire et pour la contribution de la bonne humeur dans l'équipe. Valérie, pour l'animation par tes coups de gueule et ton aide scientifique qui m'a aidé à me remettre en question. Ainsi qu'à Amélie pour les échanges qu'on a pu avoir qui ont contribué à voir les choses sous un autre angle.

Un merci également à Marion Gransagne pour les bons moments passés ensemble, mais surtout merci d'avoir pris le temps de m'écouter et de me soutenir, tu es une bonne personne. J'espère t'avoir transmis mes connaissances qui pourront te permettre de continuer dans de bonne condition ta thèse, je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite.

Je tiens également à remercier Julien Lescar d'avoir contribué à mon projet de thèse. Discuter avec toi fut très enrichissant, j'ai beaucoup appris sur les modèles moléculaires.

Je tiens à remercier toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées durant ma thèse. Un ensemble de stagiaire avec qui j'ai passé de très bon moment, Morgane Mitermite, Elise Bousseynol, Viviane David, Tania Jauslin, Hanna Lesme, Sandra Brochet, Matthieu Tolle, Chriss'Even Mouanga. Je tiens également à remercier Cassandra Gaspar, pour ton réconfort et ton aide, je ne t'oublierai pas.

Un grand merci à Delphine Bonhomme pour ton aide scientifique et ta bonne humeur. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir suivie dans les moments les plus extravagants. Tu as été une parfaite assistante réalisatrice.

J'espère vous avoir transmis un peu de mes connaissances scientifiques, et de mon expérience acquise durant ma thèse.

Un grand merci à mes amis Gigliola Zanghi d'avoir été présente pour moi, de m'avoir soutenu dans les bons moments comme dans les moins bons. Tu es une personne exceptionnelle, merci pour tout. Merci également à Clémentine, Henriette, Daniel, Roger, Audrey et Guang avec qui j'ai partagé de très bon moment enrichissant au laboratoire, ainsi qu'en dehors. Merci à Jean-François, Thierry, Maurel, Angelita, Ioannis, Jean-Yves, Eliane, Yvette pour vos soutiens tout au long de ma thèse ainsi que pour les bons moments ensembles.

Un énorme merci à Maryse Gerain pour son soutien, les câlins, les « Je t'aime », et surtout sa bonne humeur. Je ne sais comment la remercier d'avantage. Je remercie également

Saddi Saïbi pour ton aide précieuse, et ta patience. Je tiens également à remercier Djamila, Sandrine, Corinne, et Jean-pierre pour votre bonne humeur au quotidien.

Je remercie également l'ensemble des membres du CIMI, pour les bons moments passés ensemble qui resteront gravé à jamais dans mes souvenirs.

Merci à ma Grecque-Egyptienne préférée, Virginia Felouzis, tu es une personne exceptionnelle sur qui j'ai pu et je pourrai toujours compter. Merci pour tes nombreuses petites attentions que tu m'as apporté au quotidien. Merci pour tout ma belle, et tu peux me faire confiance je ne te laisserai jamais tombé car j'ai gagné une amie.

Merci à ma meilleure amie Kahina, pour ta patience, ton écoute, et ton soutien durant ces quinze dernières années d'amitié. Durant ma thèse, tu m'as permis de décompresser, surtout durant les moments difficiles. Je remercie également toute ta famille, de m'avoir soutenu et encouragé. Merci pour leur bonne humeur.

Enfin, les mots les plus forts deviennent à ma famille à qui j'adresse toute mon affection, de m'avoir écoutée dans mes débats scientifiques, réconforté, et en particulier de m'avoir fait comprendre que la vie n'est pas faite que de problèmes. Votre amour, votre tendresse et surtout votre confiance me portent et me guident chaque jour. Papa merci pour tes petits plats qui ont régalés le labo ces trois dernières années. Maman d'avoir été là chaque fois que j'en ai eu besoin, notamment lorsqu'il fallait venir me chercher sur paris. Merci à vous deux pour votre soutien et d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui, je vous aime mes parents. Ma sœur, ma moitié, je tiens à te dire MERCI du fond du cœur, tu es et sera toujours ma petite chieuse préférée. Mon grand petit frère, merci pour ton écoute et pour la mise en place de plan machiavélique. Je vous aime tous très fort.

# Table des matières

<b>Table des illustrations</b> .....	<b>10</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>11</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>14</b>
<b>Summary</b> .....	<b>15</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>16</b>
I. <i>Plasmodium</i> et paludisme.....	17
I.1. Généralités.....	17
I.2. Cycle parasitaire.....	17
I.3. Aspects cliniques.....	20
I.4. Traitements.....	22
I.5. Développement de vaccins.....	25
I.5.1) Vaccins sous-unitaires .....	25
I.5.2) Parasites vivants atténués.....	28
II. Biologie des sporozoïtes de <i>Plasmodium</i> .....	30
II.1. Structure cellulaire et motilité des sporozoïtes de <i>Plasmodium</i> .....	31
II.1.1. Structure cellulaire .....	31
II.1.2) Motilité .....	33
II.2. Infection de l'hôte mammifère.....	35
II.2.1. Migration de la peau jusqu'au foie .....	35
Migration à travers la peau .....	35
Séquestration dans le foie.....	36
Traversée de la barrière sinusoidale .....	38
Rôle de la traversée cellulaire dans l'activation des parasites.....	39
II.2.2. Invasion productive des hépatocytes et développement des formes exo-érythrocytaires .....	41
III. Mécanismes d'entrée de <i>Plasmodium</i> dans les cellules .....	43
III.1. Description du processus d'entrée à travers une jonction .....	43
III.2. Composition moléculaire de la jonction mobile.....	45

III.2.1. AMA1 et les RONS.....	45
III.2.2. Données de structures.....	46
III.2.3. Données fonctionnelles : AMA1 et AMA1-like.....	48
La protéine AMA1 .....	48
Les homologues d'AMA1 .....	49
III.3. Mécanismes d'activation impliqués en amont de la MJ.....	50
III.3.1. Interactions ligands-récepteurs lors de l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes.....	51
III.3.2. Protéines du sporozoïte impliquées dans l'invasion productive.....	52
III.3.3. Protéines de l'hôte impliquées dans l'infection du foie par <i>Plasmodium</i> ...	55
<b>Objectifs .....</b>	<b>57</b>
<b>Modèles expérimentaux .....</b>	<b>59</b>
I. Modèles parasitaires.....	60
II. Modèles cellulaires .....	61
<b>Résultats .....</b>	<b>62</b>
Résultat 1 .....	63
A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites .....	63
Contexte.....	63
Objectifs de l'étude.....	64
Résultats. ....	64
Résultat 2 .....	66
CD81 is required for rhoptry discharge during host cell invasion by <i>Plasmodium yoelii</i> sporozoites.....	66
Contexte.....	66
Résultats .....	67
Conclusion.....	68
Résultat 3 .....	69
Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles.....	69
Contexte.....	69
Résultats .....	70
Conclusion.....	71
Résultat 4 .....	72
Analyse génétique moléculaire d'AMA1 chez <i>P. yoelii</i> .....	72



Introduction .....	72
Résultats et discussion .....	74
1. Stratégie directe de délétion du gène <i>ama1</i> chez <i>P. yoelii</i> par GOMO .....	74
2. Stratégie indirecte de délétion du gène <i>ama1</i> chez <i>P. yoelii</i> par KIGOMO.....	76
3. Combinaison de la stratégie CRISPR-Cas et KICAGOMO.....	79
Conclusion .....	82
Résultat 5 .....	84
The <i>Plasmodium</i> 6-cysteine protein P36 mediates CD81-independent entry of malaria sporozoites via SR-BI in human host cells .....	84
Contexte.....	84
Résultats .....	85
Conclusion.....	86
<b>Discussion.....</b>	<b>87</b>
Chapitre 1. Développement de nouveaux outils pour l'étude de l'invasion.....	88
1.1. Aspects techniques .....	88
1.2. Nouvelles données sur les cinétiques d'infection des sporozoïtes .....	90
Chapitre 2. Rôle de la perforine parasitaire PLP1 .....	91
2.1 Résumé des données .....	91
2.2. Mécanismes de traversée cellulaire .....	92
2.3. Passage de la vacuole transitoire à la vacuole parasitophore .....	93
Chapitre 3. Rôle de la protéine Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) .....	94
3.1. Possibilité d'essentialité du gène <i>ama1</i> chez <i>P. yoelii</i> au stade sanguin.....	94
3.2. Rôle controversé des protéines impliquées dans la JM .....	95
3.3. AMA1 est-il essentiel au stade sporozoïte ?.....	96
Chapitre 4. Rôle des protéines à 6-cystéine.....	97
4.1. Résumé des données.....	97
4.2. Rôle des protéines à domaine 6-cystéines .....	99
<b>Conclusion.....</b>	<b>101</b>
<b>Liste des publications .....</b>	<b>104</b>

# Table des illustrations

FIGURE 1. CYCLE DE VIE DU PARASITE <i>PLASMODIUM</i> .....	18
FIGURE 2. SCHEMA DU CYCLE DE VIE DU PARASITE DE <i>PLASMODIUM</i> DANS LE MOUSTIQUE. ....	19
FIGURE 3. SCHEMA DE LA STRUCTURE D'UN <i>SPOROZOÏTE</i> ET LES ORGANITES SECRETOIRES INDISPENSABLE A LA SURVIE DU PARASITE (LES MICRONEMES, LES RHOPTRIES).. ....	32
FIGURE 4. LES COMPOSANTS DU MOTEUR D'INVASION DU PARASITE <i>PLASMODIUM</i> DANS LES CELLULES. ....	34
FIGURE 5. MIGRATION DES <i>SPOROZOÏTES</i> DE LA PEAU JUSQU'AU FOIE .....	35
FIGURE 6. LA PROTEINE DE LA CIRCUMSPOROZOÏTE (CSP).. ....	37
FIGURE 7. TRAVERSEE CELLULAIRE DES <i>SPOROZOÏTES</i> DANS LE FOIE.....	38
FIGURE 8. MODELE D'INFECTION DES HEPATOCYTES PAR LES <i>SPOROZOÏTES</i> DE <i>PLASMODIUM</i> . ....	40
FIGURE 9. DEVELOPPEMENT PRE-ERYTHROCYTAIRE DU PARASITE <i>PLASMODIUM</i> .....	42
FIGURE 10. ÉTAPES DE L'INVASION DES ERYTHROCYTES PAR LES <i>MEROZOÏTES</i> DE <i>PLASMODIUM</i> . ....	44
FIGURE 11. FORMATION DE LA JONCTION ENTRE LE TACHYZOÏTE ET LA CELLULE HOTE.....	45
FIGURE 12. MODELE D'INTERACTION ENTRE AMA1 ET RON2 AU MOMENT DE LA FORMATION DE LA JM CHEZ <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	47
FIGURE 13. HOMOLOGIE ENTRE AMA1 ET MAEBL. ....	50
FIGURE 14. LES LIGANDS-RECEPTEURS SPECIFIQUES DE <i>P. FALCIPARUM</i> SUR LES ERYTHROCYTES. ....	51
FIGURE 15. CARACTERISATION DES PROTEINES DE LA FAMILLE A DOMAINE 6-CYSTEINES DE <i>PLASMODIUM</i> . ....	53
FIGURE 16. LE CYCLE COMPLET DU PARASITE RONGEUR <i>P. YOELII</i> REALISE EN ROUTINE AU LABORATOIRE.....	60
FIGURE 17. STRATÉGIE GOMO (GENE OUT MARKER OUT).....	74
FIGURE 18. GENOTYPAGE DES PARASITES TRANSFECTES AVEC LA CONSTRUCTION GOMO-AMA1. ....	75
FIGURE 19. GENERATION DE PARASITES <i>P. YOELII</i> $\Delta$ <i>AMA1</i> AVEC LA STRATEGIE INDIRECTE KIGOMO.. ....	76
FIGURE 20. GENOTYPAGE DES PARASITES <i>P. YOELII</i> APRES TRANSFECTION KIGOMO.. ....	77
FIGURE 21. ANALYSE AU CYTOMETRE EN FLUX.....	78
FIGURE 22. ANALYSE DE L'ADN GENOMIQUE DES PARASITES <i>P. YOELII</i> APRES 5-FC. ....	79
FIGURE 23. STRATEGIE KICA-GOMO : KNOCK-IN COMPLEMENTATION ASSISTED-GENE OUT MARKER OUT AVEC LA TECHNIQUE CRISPR/CAS9. ....	81

# Abréviations

5-FC	5-fluorocytosine
ACT	artémisinin-based combination therapies
AMA1	apical membrane antigen 1
AMPc	adenosine monophosphate cyclique
CD	cluster of differentiation
CeITOS	cell traversal protein for ookinete and sporozoite
CHMI	controlled human malaria infection
CPS	chimioprophylaxie sprozoite
CR1	complement receptor 1
CSA	chondroïtine sulfate A
CSP	circumsporozoïte protein
CT	cell traversal
DBL	duffy binding-like
DBP	duffy binding protein
EBA	erythrocyte binding antigen
EBL	erythrocyte binding-like
ECM	extracellular matrix
EEF	exo-erythrocytic form
EGFR	epithelial growth factor receptor
EI	erythrocyte infecté
EMP1	erythrocyte membrane protein-1
EPH	ephrine
EPHA2	EPH Receptor A2
ETRAMP	early transcribed membrane proteins
FACS	fluorescent-activated cell sorting
GAG	glycosaminoglycan
GAP	genetically attenuated parasite
GAP-45	glideosomeO-45

GFP	green fluorescent protein
GOMO	gene out marker out
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GYP	glycophorin
HCV	hepatitis C virus
HGF	hepatocyte growth factor
HSPG	heparan sulfate proteoglycans
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
IMC	complexe membranaire interne
KC	Kupffer cells
KICA-GOMO	knock in-complemented assisted-gene out marker out
KIGOMO	knock in gene out marker out
KO	knock out
LDL	low-density lipoproteins
L-FABP	liver-type fatty acid-binding protein
LSA-1	liver stage antigen-1
LUC	luciferase
MAC	complexe attaque membranaire
MACPF	membrane attack complex/perforin
MAEBL	membrane antigen erythrocyte binding like protein
M $\beta$ CD	methyl- $\beta$ -cyclodextrin
MJ	moving junction
MPL	3'-O-désacyl-4'-monophosphoryl-lipide A
MSP	merozoite surface protein
MTIP	myosin a tail domain interacting protein
MyoA	myosin A
NF-kB	nuclear factor- kB
OOC	oocyste
OOK	ookinète
oxLDL	oxidized low-density lipoprotein
PAM	protospacer Adjacent <i>Motif</i>
PLP1	perforin like protein-1
PV	parasitophorous vacuole
PVM	parasitophorous vacuole membrane

PYR	pyriméthamine
QS21	quillaja saponaria 21
RAP2/3	rhoptry-associated protein 2/3
RAS	radiation-attenuated sporozoites
RBL	reticulocyte-binding like
RD	rhodamine dextran
RH5	reticulocyte-binding protein homologue 5
RON2	rhoptry neck proteins
RTS,S	radiation-attenuated sporozoites
SAG-1	surface antigen-1
SLARP	sporozoite and liver stage asparagin-rich protein
SP	sulfadoxine-pyriméthamine
SPECT	sporozoite protein essential for cell traversal
SPO	sporozoite
SR-B1	scavenger receptor-BI
SRS	surface antigen-1 (SAG-1)-related sequence
TBV	transmission-blocking vaccine
TDR	test de diagnostic rapide
TEM	tetraspanin enriched microdomains
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor - $\alpha$
TRAMP	Thrombospondin related apical merozoite protein
TRAP	thrombospondin-related anonymous protein
TSR	thrombospondin repeats
TV	transient vacuole
UIS	up-regulated in infective sporozoites
UTR	UnTranslated Region
VAR	variant
VSA	variant surface antigens
WHO	world health organization

# Résumé

L'infection par *Plasmodium*, parasite responsable du paludisme, débute par l'injection de sporozoïtes par un moustique du genre *Anopheles*. La première cible des sporozoïtes est le foie, où le parasite se développe avant l'initiation d'une phase d'infection érythrocytaire symptomatique. Dans le foie, les sporozoïtes pénètrent activement les hépatocytes en formant une vacuole parasitophore, dans laquelle le parasite se multiplie. Cette étape, appelée invasion productive, implique des facteurs parasitaires et des protéines de l'hôte, notamment CD81. Toutefois, les mécanismes mis en jeu restent méconnus. À l'aide d'une nouvelle approche génétique développée au laboratoire, nous avons produit de nouvelles souches de parasites transgéniques fluorescents, notamment chez le parasite de rongeurs *P. yoelii*. L'utilisation des parasites de *P. yoelii* GFP et d'un système cellulaire de lignées permissives ou non à l'infection, nous a permis de mieux caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu lors de l'invasion. Nous avons confirmé que l'invasion productive est précédée d'une phase de traversée cellulaire. Nous avons découvert et caractérisé la formation de vacuoles transitoires lors de cette phase de traversée cellulaire, distinctes des vacuoles parasitophores productives. Nos résultats montrent que le parasite se sert d'une perforine parasitaire, PLP1 (Perforin-Like Protein 1), pour sortir de cette vacuole transitoire et échapper à la dégradation par les lysosomes cellulaires. Une fois activés, les sporozoïtes passent d'un mode de traversée à un mode d'invasion productive. Nous avons montré que CD81 joue un rôle dans l'invasion productive. CD81 est nécessaire pour induire la sécrétion des rhoptries parasitaires, impliquées dans la formation de la jonction mobile, une structure à travers laquelle le parasite se glisse pour pénétrer dans la cellule. Nous avons pu aussi montrer qu'une autre protéine des hépatocytes, SRBI (scavenger receptor BI), définit une voie d'entrée indépendante de CD81 pour *P. berghei* et *P. vivax*. Par une approche génétique originale, nous avons pu montrer que deux protéines des micronèmes des sporozoïtes, P52 et P36, jouent un rôle majeur dans l'entrée via CD81 et SRBI, et mis à jour un lien fonctionnel entre P36 et l'entrée via SRBI. Enfin, nous avons développé plusieurs approches génétiques pour cibler le gène d'*ama1* chez *P. yoelii*, une protéine des micronèmes impliquées dans la formation de la jonction. Nos résultats nous éclairent un peu plus sur les mécanismes d'invasion des sporozoïtes, et ouvrent des perspectives intéressantes vers le développement de nouvelles stratégies vaccinales.

# Summary

Infection with the *Plasmodium* parasite begins with the injection of sporozoites by an *Anopheles* mosquito. The first target is the liver where the parasite replicates as a prerequisite to the development of pathogenic blood stage infection. In the liver, sporozoites penetrate hepatocytes forming a parasitophorous vacuole in which the parasite multiplies. This step, the productive invasion, involves parasitic factors and host proteins, particularly CD81, but the underlying mechanisms remain largely unknown. To facilitate monitoring of sporozoite invasion, we generated novel transgenic fluorescent parasites, using a new selection strategy named GOMO (gene out marker out) in the rodent parasite *P. yoelii*. The use of this transgenic parasite and of host cell lines permissive or not to infection, has allowed us to better characterize the cellular and molecular mechanisms involved during invasion. We have confirmed that the productive invasion is preceded by a cell traversal phase. We discovered and characterized the formation of transient vacuoles during this step, before formation of the parasitophorous vacuole. Our results uncovered that the perforin-like protein (PLP1) mediates sporozoite egress from transient vacuoles and escape from degradation by the cell lysosomes. Once activated, the sporozoites switch from the mode of cell traversal to productive invasion. We show that CD81 plays a role in the productive invasion. CD81 is necessary to induce the secretion of rhoptries proteins, involved in the formation of the moving junction, a structure through which the parasite glides to enter the cell. We could also show that another hepatocyte protein, SR-B1 (scavenger receptor B1), defines a CD81-independent pathway for *P. berghei* and *P. vivax* infection. Using an original genetic approach, we have shown that two sporozoite micronemal proteins, P52 and P36, play a role in the entry *via* CD81 and SR-B1, and highlighted a functional link between P36 and entry *via* SR-B1. Finally, we have developed several genetic approaches to target *ama1* gene in *P. yoelii*, which encodes a protein involved in the formation of the moving junction. Altogether, our results contribute to improve our understanding of the mechanisms of sporozoite invasion, and open interesting perspectives for the development of novel vaccine strategies.

# **Introduction**



## I. Plasmodium et paludisme

### I.1. Généralités

L'agent responsable du paludisme est un parasite du genre *Plasmodium*, un protozoaire du *Phylum* des *Apicomplexa* qui infecte les érythrocytes circulants chez l'hôte. Le genre *Plasmodium* compte une centaine d'espèces infectant de nombreux mammifères. Quatre espèces peuvent engendrer le paludisme chez l'homme (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*), *P. falciparum* et *P. vivax* étant les plus répandus et l'infection à *P. falciparum* pouvant être mortelle. Ces dernières années, il a été montré que *P. knowlesi*, agent du paludisme du singe rencontré dans certaines zones des forêts d'Asie du Sud-Est pouvait aussi infecter l'homme.

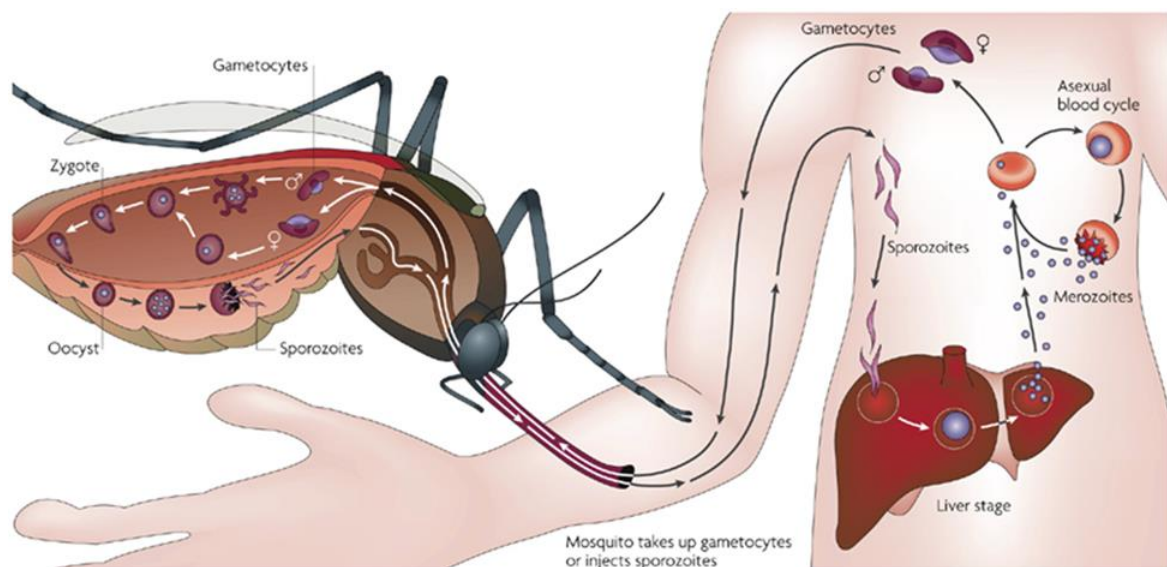
Le paludisme est la maladie parasitaire la plus fréquente dans le monde (près de 40% de la population mondiale est exposée) et touche principalement les régions tropicales et subtropicales. Selon les dernières estimations de l'OMS (décembre 2015), 198 millions de cas de paludisme et 584 000 décès ont été enregistrés. La majorité des décès survient chez les enfants vivant en Afrique, surtout en Afrique sub-Saharienne, où à chaque minute un enfant meurt du paludisme. Même s'il y a eu des réductions importantes de la mortalité et morbidité dans certaines régions, comme l'Asie du Sud, à la suite de la mise en place de traitements prophylactiques anti-paludiques et de l'utilisation de moustiquaires, le paludisme reste un grave problème de santé chez les enfants, qui meurent d'anémie et de neuropaludisme ou peuvent souffrir de séquelles neurologiques graves, et chez les femmes enceintes, qui peuvent présenter un paludisme gestationnel.

La situation est d'autant plus préoccupante, selon l'OMS, que depuis plusieurs années les parasites développent des résistances aux molécules anti-paludiques et les moustiques résistent de plus en plus aux insecticides.

### I.2. Cycle parasitaire

Le cycle de *Plasmodium* implique deux hôtes différents et se compose de trois phases de multiplication du parasite : une phase sexuée appelée sporogonie chez la moustique femelle du genre *Anopheles* et deux phases asexuées, appelées schizogonie intra-hépatique puis schizogonie intra-érythrocytaire chez l'hôte vertébré (Figure 1).

**Chez l'hôte vertébré**, la piqûre d'un anophèle femelle initie la première étape de l'infection avec la libération de sporozoïtes des glandes salivaires du moustique. Les sporozoïtes traversent le derme, puis migrent rapidement *via* la circulation sanguine principalement, vers le foie pour s'y développer dans une vacuole parasitophore. Le parasite entre alors dans une première phase de différenciation en forme répliquative exo-érythrocytaire (EEF) et de multiplication asexuée intense (schizogonie intra-hépatique) aboutissant à la libération au bout d'une semaine de dizaines de milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Cette phase de réplication intra-hépatique est asymptomatique. Les mérozoïtes vont adhérer rapidement aux érythrocytes et les envahir pour s'y multiplier (schizogonie intra-érythrocytaire), générer des mérozoïtes et provoquer la rupture de la membrane du globule rouge parasité, libérant au bout de 48 heures de nouveaux mérozoïtes dans la circulation sanguine (Cowman and Crabb 2006), qui à leur tour infectent des globules rouges. Ce cycle de multiplication érythrocytaire est responsable de la symptomatologie. Au cours du cycle sanguin, certains parasites se différencient en formes sexuées, les gamétocytes, mâles et femelles.

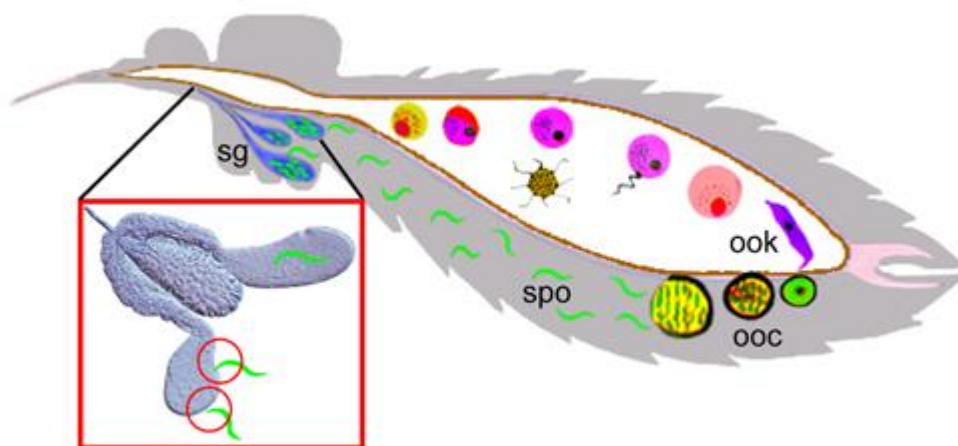


**Figure 1. Cycle de vie du parasite *Plasmodium*.** Lors du repas sanguin, un moustique femelle du genre *Anopheles*, injecte à partir de ses glandes salivaires des sporozoïtes dans la peau. Ces sporozoïtes vont gagner le foie en quelques minutes par la circulation sanguine. Les sporozoïtes vont infecter les hépatocytes, où ils se différencient en schizontes hépatiques. Après 5 à 7 jours de divisions nucléaires, le schizonte mature libère dans la circulation sanguine jusqu'à 30 000 mérozoïtes. Ces mérozoïtes infectent les érythrocytes, initiant un cycle de multiplication érythrocytaire responsable de la symptomatologie. Certains parasites se différencient en formes sexuées, les gamétocytes, qui, une fois ingérés par un moustique, se développent pour aboutir à la formation de sporozoïtes, qui gagneront les glandes salivaires du moustique (X. Su, Hayton, and Wellem 2007).

**Chez le moustique**, dans les quelques minutes qui suivent l'ingestion des gamétoctes mâles et femelles, la reproduction sexuée est initiée dans la lumière intestinale du moustique avec fécondation des gamètes mâles et femelles, qui engendre la formation d'un zygote. Cette activation de la reproduction sexuée est déclenchée par différents paramètres, le changement de température, mais également le changement du pH, par production d'acide xanthurénique dans l'estomac du moustique, qui va permettre d'activer la gamétogenèse des microgamètes mâles (après exflagellation) avant fécondation avec les gamètes femelles formant ainsi les zygotes (Figure 2).

L'**ookinète** débute ensuite sa formation par un bourgeonnement du zygote, puis commence son court voyage en traversant la couche de cellules épithéliales de l'estomac du moustique afin d'atteindre la lame basale (Garcia, Puentes, and Patarroyo 2006). Les ookinètes survivants traversent la paroi du tube digestif pour se différencier en oocystes où seront formés les sporozoïtes. Le système de défense du moustique réduit sévèrement le nombre d'ookinètes qui parviennent à se transformer en oocystes (Han et al. 2000).

L'**oocyste** est le seul stade du parasite de développement extracellulaire. L'hémolymphe fournit les nutriments pour permettre le développement des oocystes. Après maturation, les oocystes libèrent des centaines de sporozoïtes dans l'hémolymphe, le liquide qui baigne la cavité du corps du moustique. La sortie des sporozoïtes de l'oocyste est un processus actif, qui nécessite l'activité d'une cystéine protéase du parasite (Aly and Matuschewski 2005). Les sporozoïtes libérés migrent vers les glandes salivaires du moustique et les colonisent.



**Figure 2. Schéma du cycle de vie du parasite de *Plasmodium* dans le moustique.** Après développement initial dans la lumière de l'estomac de l'insecte, les ookinètes mobiles (OOK) traversent l'épithélium de l'estomac et se différencient en oocystes (OOC). Les oocystes matures libèrent dans l'hémolymphe du moustique les sporozoïtes (SPO), qui vont alors coloniser les glandes salivaires (Ghosh et al. 2009)

Pour cela, les sporozoïtes vont alors traverser la lame basale, puis traversent le cytoplasme des cellules avant de pénétrer dans les acini où ils attendent d'être injectés avec la salive *via* le canal salivaire. Dans les glandes salivaires ils acquièrent leur motilité et leur maturité (Kai Matuschewski et al. 2002), avant d'être transmis à un nouvel hôte vertébré à l'occasion d'une piqûre.

### I.3. Aspects cliniques

Chez l'homme les symptômes de la maladie sont associés à la phase sanguine, pendant laquelle le parasite se multiplie de façon exponentielle dans les globules rouges. Les signes cliniques du paludisme sont très divers et non spécifiques, pouvant associer fièvre, maux de tête, douleurs musculaires, asthénie, douleurs abdominales, frissons, sueurs. L'infection peut se manifester sous la forme d'accès rythmés de fièvre, frissons et sueurs. La périodicité de ces accès dépend de l'espèce de parasite en cause et coïncide avec la multiplication des parasites et l'éclatement des globules rouges. *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* provoquent une fièvre tierce (survenant toutes les 48h) alors que *P. malariae* provoque une fièvre quarte (survenant toutes les 72h).

Les accès à *P. falciparum*, en l'absence de traitement, peuvent conduire à des complications potentiellement mortelles. Les enfants fortement atteints développent fréquemment un ou plusieurs des symptômes suivant: anémie sévère, détresse respiratoire consécutive à une acidose métabolique ou neuropaludisme. En effet, les globules rouges infectés par *P. falciparum* cytoadhèrent aux cellules endothéliales et peuvent bloquer les vaisseaux sanguins, notamment dans le cerveau. Ce neuropaludisme est souvent mortel, et en cas de survie peut entraîner d'importantes séquelles neurologiques. Une protéine présente à la surface des érythrocytes infectés, PfEMP1 (« *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 ») est responsable de la cytoadhérence des globules rouges infectés (Dror I. Baruch 1999; Q. Chen, Schlichtherle, and Wahlgren 2000; Newbold et al. 1999). PfEMP1 est codée par une famille de gènes variables, les gènes *var*, responsables d'un phénomène de variation antigénique et jouant un rôle central dans la pathogénicité de *P. falciparum* (D. I. Baruch et al. 1995; Smith et al. 1995; Su et al. 1995). Les multiples domaines d'adhésion situés au niveau de la région extracellulaire de PfEMP1 peuvent se fixer à différents récepteurs des cellules endothéliales de l'hôte. PfEMP1 est à l'origine de la séquestration de ces érythrocytes infectés, qui conduit à un blocage des vaisseaux sanguins, des hémorragies et la formation de thrombus, dans un contexte inflammatoire contribuant à la pathogénèse du neuropaludisme (D. I. Baruch et al. 1995).

Dans les zones d'endémie, les individus exposés à l'infection développent graduellement une protection contre les manifestations cliniques et notamment les complications du paludisme, ce qui explique que ce sont surtout les jeunes enfants qui sont les plus touchés par les formes graves de la maladie. La connaissance d'une protection acquise contre le paludisme est antérieure à toute information sur la cause spécifique de la maladie. En 1900, Robert Koch a rapporté les premiers résultats sur une acquisition de l'immunité contre *Plasmodium*, corrélée à une faible parasitémie (Marsh 1992; Trape et al. 1994). Dans les régions où le paludisme est endémique avec une transmission annuelle stable, les enfants nés de mères semi-immunes seraient protégés contre la maladie durant la première moitié de leur première année de vie par les anticorps maternels. Cette immunité des enfants est dite passive s'estompant au cours du temps. Après le sixième mois de sa vie, une augmentation de la sensibilité au paludisme est observée. Cette période dure jusqu'à environ neuf ans, selon les enfants. Ensuite, se développe progressivement l'acquisition d'une immunité semi-protectrice active dite semi-immunité (Marsh 1992).

Dans les années 1960, des études ont montré la puissance de **l'immunité** dans le contrôle de la maladie du paludisme. En 1961, Sydney Cohen et ses collègues ont montré que le transfert passif d'immunoglobulines gamma des adultes vivant dans les zones de forte endémie du paludisme à des jeunes enfants atteints du paludisme grave pouvait aider à éliminer les parasites du sang. Cette étude a clairement démontré la capacité de l'immunité humorale à contrôler la maladie (Cohen, McGREGOR, and Carrington 1961; Bejon et al. 2009; Doolan, Dobaño, and Baird 2009). En général, l'acquisition d'une immunité semi protectrice contre le paludisme est lente. Elle est associée à une exposition continue au parasite. Les personnes vivant dans les zones où la transmission est faible développent plus lentement leur immunité. Celle-ci est occasionnée par les piqûres répétées de l'anophèle. L'acquisition de l'immunité semi protectrice est également retardée par divers autres facteurs. La variabilité génétique de l'hôte et celle du parasite en sont les facteurs majeurs. L'immunosuppression induite par le parasite ou d'autres causes participeraient aussi à ce phénomène (Mohan and Stevenson 1998).

**Chez les femmes enceintes**, le paludisme associé à la grossesse, ou paludisme gestationnel (PG), est une cause majeure de faible poids de naissance (FPN) du nouveau-né et d'anémie maternelle sévère (Shulman and Dorman 2003). Le paludisme est responsable d'un quart des cas d'anémie sévère (H. L. Guyatt and Snow 2001) et le FPN est la principale cause de morbidité et de mortalité dans la première année de vie (Helen L. Guyatt and Snow 2004). La prévalence de l'anémie fœtale à la naissance est élevée dans

les zones d'endémie palustre et encore plus chez les nouveau-nés dont les mères sont infectées par *P. falciparum* (Nosten et al. 2004). Plusieurs travaux ont montré une différence de susceptibilité au paludisme entre les zones hypo-endémiques et les zones à forte endémicité palustre. En zone hypo-endémique et méso-endémique les femmes enceintes sont à nouveau sujettes à toutes les formes graves du paludisme (dont le neuropaludisme) avec des taux de mortalité 2 à 10 fois plus élevés que ceux observés chez les femmes non gravides (Brabin 1983; McGregor 1984; Nosten et al. 2004).

Cette forme clinique du paludisme associé à la grossesse est caractérisée par la séquestration des érythrocytes infectés (EI) par *P. falciparum*, dans le placenta. La sévérité ou non de l'infection par *P. falciparum* est en grande partie liée à la propriété de cytoadhérence acquise par les EI. Les EI isolés du placenta, expriment à leur surface des antigènes variants de surface (VSA) particuliers qui vont favoriser le tropisme placentaire (Fried and Duffy 1996), par l'adhérence préférentielle aux récepteurs exprimés à la surface des syncytiotrophoblastes, dont le principal est la chondroïtine sulfate A (CSA) (Fried and Duffy 1996; Beeson et al. 1999; Tuikue Ndam et al. 2004).

Un variant de PfEMP1 codé par le gène VAR2CSA a été identifié comme la protéine parasitaire majeure impliquée dans la pathogenèse du paludisme gestationnel. Le gène est le seul gène var surexprimé par les EI sélectionnés pour adhérer à la CSA, la protéine qui en résulte est le principal récepteur responsable de l'adhérence des EI au placenta (Salanti et al. 2003; Duffy and Fried 2005). Dès lors, de nombreux travaux de recherche ont été menés pour développer un vaccin à base de VAR2CSA qui empêcherait l'adhérence des EI au placenta et protégerait ainsi les femmes enceintes contre une séquestration placentaire.

**Pour les infections à *P. vivax* et à *P. ovale***, des rechutes cliniques peuvent se produire des semaines ou des mois après la première infection même si le patient a quitté la zone impaludée. Ces nouveaux épisodes sont dus à des formes hépatiques « dormantes », appelées « hypnozoïtes » (qui n'existent pas avec *P. falciparum*), et un traitement spécial, ciblé sur ces stades hépatiques, est impératif pour guérir complètement le malade. Si dans la majorité des cas *P. vivax* et *P. ovale* causent des accès de paludisme non sévères, *P. vivax* peut néanmoins occasionner des complications, potentiellement mortelles.

#### **I.4. Traitements**

Le premier produit utilisé avec succès pour traiter les fièvres engendrées par le paludisme au 16<sup>e</sup> siècle est la « poudre des jésuites », soit une poudre de l'écorce d'un

arbre, le quinquina. Les premières études chimiques sur les quinquinas ont été réalisées par François-Antoine de Fourcroy (1755-1804). Elles furent suivies par celles de Louis-Nicolas Vauquelin (1763-1829) qui se borna à enregistrer l'action de divers réactifs sur les espèces connues. Après les travaux du docteur Gomez sur la cinchonine, ce sont deux pharmaciens français Joseph Pelletier (1788-1842) et Joseph Caventou (1795-1877), qui vont parvenir à isoler la quinine. Alors que le docteur Gomez avait travaillé sur des écorces de quinquina gris et obtenu un composé non-fébrifuge, Joseph Pelletier et Joseph Caventou vont, eux mener leurs expériences sur des échantillons de quinquina jaune. C'est ainsi qu'ils vont isoler, en 1820, une base cristallisée, qu'ils vont nommer *quinine* (l'analyse chimique des quinquina par MM. Pelletier et Caventou sera publié en février 1821 dans le *Journal de pharmacie et des sciences accessoires*). Et en 1830, la quinine sera fabriquée et commercialisée. Malgré ses vertus certaines, la quinine présentait aussi certains désavantages en raison de sa disponibilité limitée, de son obligation d'être administrée quotidiennement et d'effets secondaires parfois importants. Tout ceci amena à lui trouver d'autres substituts comme la chloroquine, qui a un effet sur les parasites au stade sanguin.

Dans les années 1970-1980, la chloroquine et la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) posaient de nombreux problèmes récurrents de résistances. Depuis les années 1990, cette résistance a empiré dans les régions du monde où le paludisme est endémique. Comme conséquence directe, la morbidité et la mortalité associée au paludisme ont augmenté, en particulier chez les enfants africains, qui représentent la majorité des décès dus au paludisme (Snow, Trape, and Marsh 2001).

Les thérapies combinées à base d'artémisinine ont été introduites dans le milieu des années 1990 après apparition de résistances à tous les médicaments antipaludiques disponible en Asie du Sud. L'artémisinine a été isolée pendant la guerre du Vietnam (1955-1975) d'une plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise, l'armoise *Artemisia annua*. En 1972, une substance cristalline incolore a été purifiée par **Youyou Tu** et décrite comme étant la partie active des extraits de la plante. En 1975, la structure fut obtenue, et publiée pour la première fois en anglais ("Antimalaria Studies on Qinghaosu. - PubMed - NCBI" 2016; Tu 2011). **Youyou Tu a reçu en 2015 le prix Nobel de médecine** pour la découverte de l'artémisinine. La molécule a été nommée *qinghaosu*, *su* signifiant « élément de base » en chinois, et prendra le nom d'*artémisinine* pour les occidentaux. L'artémisinine a pour structure chimique une sesquiterpène lactone avec un pont endoperoxyde. Par interaction avec le fer organique, ce pont est clivé et libère des radicaux libres toxiques pour le parasite (Rosenthal 2008; Woodrow, Haynes, and Krishna 2005).

Contrairement aux antipaludiques les plus utilisés (quinine, méfloquine, pyriméthamine), l'artémisinine agit sur tous les stades de multiplication du parasite intra-érythrocytaire, en particulier les stades précoces, bloquant en quelques heures la maturation des plasmodies et empêchant les phénomènes de séquestration des globules rouges parasités par *P. falciparum* à l'intérieur des micro-vaisseaux. Comme la demi-vie d'élimination sanguine de l'artémisinine est courte, quelques heures, pour éviter les échecs thérapeutiques et limiter l'apparition de la résistance, elle est associée à un médicament à demi-vie plus longue et au mode d'action complémentaire ou synergique dans des combinaisons appelées « *artémisinin-based combination therapies* » (ACT). En 2005, l'OMS a recommandé que les thérapies combinées à base d'artémisinine soient utilisées comme traitement de première intention contre l'infection à *P. falciparum* dans tous les pays où le paludisme est endémique.

L'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine, combinée à l'utilisation accrue de moustiquaires imprégnées d'insecticide, ont permis de sensiblement réduire la morbidité et de la mortalité mondiale du paludisme (Bhattarai et al. 2007).

Cependant, les perspectives d'élimination du paludisme sont maintenant menacées par l'émergence de souches de *P. falciparum* résistantes à l'artémisinine. Cette résistance est caractérisée par l'élimination de plus en plus lente du parasite (Noedl et al. 2008; Dondorp et al. 2009) qui reflète la diminution de la sensibilité des parasites au stade anneau (Saralamba et al. 2011; Witkowski, Amaratunga, et al. 2013; Mok et al. 2011; Witkowski, Khim, et al. 2013; Chotivanich et al. 2014).

La résistance à l'artémisinine a été signalée pour la première fois dans l'ouest du Cambodge (Noedl et al. 2008; Dondorp et al. 2009), où le taux d'échec des thérapies combinées à base d'artémisinine augmentent rapidement. La résistance à l'artémisinine s'est depuis étendue, de manière indépendante, sur les deux régions de la partie continentale de l'Asie du Sud (Phyo et al. 2012; Amaratunga et al. 2012; Kyaw et al. 2013; Hien et al. 2012) au niveau de la frontière Thaïlande-Myanmar (Phyo et al. 2012). La résistance à l'artémisinine de *P. falciparum* est maintenant fermement établie dans l'Est du Myanmar, l'Ouest du Cambodge, et de la Thaïlande, et le Sud du Vietnam, et est en train d'émerger dans le Sud du Laos et dans le Nord du Cambodge. Malgré la récente propagation de la résistance, les thérapies combinées à base d'artémisinine dans ces régions reste encore efficace (Ashley and White 2014), probablement grâce à la combinaison avec d'autres médicaments. La combinaison reste à l'heure actuelle le traitement le plus utilisé et le plus efficace dans un certain nombre de pays, notamment en Afrique, où la résistance à l'artémisinine n'a pas encore été décrite.



Enfin, l'éradication du paludisme est un problème complexe en plus de la résistance aux drogues et aux insecticides. Le traitement doit être initié le plus rapidement possible après le diagnostic de la maladie pour éviter les complications et la transmission de la maladie. Le diagnostic est un élément important pour initier le traitement. Il est fait soit par examen microscopique soit au moyen d'un test de diagnostic rapide (TDR). Les TDR du paludisme détectent des antigènes spécifiques (des protéines) produits par les plasmodies présentes dans le sang des personnes infectées. Certains TDR détectent les infections monospécifiques (soit *P. falciparum*, soit *P. vivax*), d'autres détectent des infections mixtes (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*) tandis que d'autres distinguent les infections par *P. falciparum* et non-*P. falciparum*, ou des espèces spécifiques, grâce à une goutte de sang prélevée par piqûre au doigt, avec un résultat au bout de 15 à 30 minutes. Une autre difficulté aussi est l'utilisation de médicaments de contrefaçon soit au niveau de la molécule soit de la concentration qui se répandent de par le monde, surtout en Afrique.

## **I.5. Développement de vaccins**

A l'heure actuelle, un moyen efficace de contrôle des maladies infectieuses est la vaccination. L'homme a ainsi réussi à éliminer la variole avec cette stratégie. À l'heure actuelle, il n'existe aucun vaccin efficace disponible contre le paludisme.

Plusieurs stratégies de vaccins anti-paludiques ont été développées. Il est possible d'agir 1) sur le premier stade du développement du parasite pour empêcher l'entrée du sporozoïte et son développement dans les cellules du foie; 2) sur le stade sanguin (le stade asexué), pour empêcher le développement dans les érythrocytes et ainsi l'apparition des signes cliniques; et 3) contre les formes sexuées du stade sanguin, afin d'éviter la transmission aux moustiques, et ainsi éviter le développement dans le moustique, qui est l'hôte vecteur.

### **I.5.1) Vaccins sous-unitaires**

Le financement de la lutte contre le paludisme a considérablement augmenté au cours des 15 dernières années avec des contributions d'organismes tels que la Fondation Bill et Melinda Gates (notamment par PATH Malaria Vaccine Initiative), l'Institut national américain de l'allergie et des maladies infectieuses, l'Union européenne et d'autres encore, qui ont permis de développer des essais cliniques pour différentes préparations vaccinales en partenariat avec l'OMS.

A l'heure actuelle, le vaccin Mosquirix de GSK contre *P. falciparum* au **stade pré-érythrocytaire**, connu sous le nom de RTS,S/AS01, est le premier et seul vaccin anti-paludique évalué dans des essais cliniques de phase III. Le vaccin RTS,S/AS01 a pour cible les sporozoïtes libres avant l'invasion dans les hépatocytes (stage pré-érythrocytaire). Le mode d'action de ce vaccin est d'induire des anticorps contre la principale protéine de surface des sporozoïtes, la circumsporozoite protein (CSP), pour réduire la charge de sporozoïtes atteignant le foie, et conduire à une baisse significative des taux d'infection chez les vaccinés. En cas d'effet partiel, une réduction de la charge de parasites émergeant du foie peut avoir un effet bénéfique sur la sévérité de la maladie.

Le principe actif du vaccin RTS,S/AS01 est un antigène recombinant, RTS,S exprimé chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'antigène RTS,S est une protéine hybride composée d'une partie C-terminale de la CSP, fusionnée à la protéine S du virus de l'hépatite B. L'adjuvant choisi est AS01, constitué de liposomes à deux composants immunostimulants : 3'-O-désacyl-4'-monophosphoryl-lipide A (MPL) et *Quillaja saponaria 2I* (QS21), dans le but de stimuler le système immunitaire.

Les résultats finaux de l'essai de phase III ont montré une protection d'environ 28% observée chez les enfants, et de 18% chez les nourrissons, contre les épisodes cliniques de paludisme. Une quatrième dose de rappel améliore la protection, qui reste cependant très partielle (RTS,S Clinical Trials Partnership 2015). En résumé, le vaccin RTS,S est très peu efficace et ne permettra probablement pas de réduire la transmission du paludisme.

Jusqu'à présent, les résultats des vaccins développés contre les **stades sanguins** ont été encore plus mitigés et les progrès ont été généralement plus lents (Goodman and Draper 2010). Un certain nombre de candidats vaccins, ciblant les protéines de surface du parasite, ont été testés, mais aucun n'a montré une preuve d'efficacité protectrice contre le paludisme. Beaucoup de ces candidats sont basés sur quelques antigènes, notamment MSP1 et AMA1 en particulier, qui sont des protéines parasitaires exprimées au stade sanguin, et ayant un rôle dans l'invasion du parasite dans les globules rouges, mais il y a des centaines d'antigènes exprimés par les parasites au stade sanguin qui pourraient être utilisés dans le développement d'un vaccin.

Toutes les approches vaccinales contiennent une protéine cible ainsi qu'un adjuvant permettant d'induire des anticorps protecteurs spécifiques. Certaines approches se sont concentrées sur l'induction d'anticorps qui nuisent à la croissance du parasite, comme démontré dans des essais *in vitro* utilisant l'antigène AMA1 (Ellis et al. 2009), tandis que

d'autres ont pour but d'induire des anticorps qui permettent d'atteindre leur effet en collaboration avec des cellules effectrices (Druilhe et al. 2005).

Il y a trois défis particuliers pour le développement de vaccins contre les stades sanguins. L'un est la difficulté d'exprimer des formes recombinantes des antigènes de *Plasmodium*, dans des conformations correctes, notamment à grande échelle. Le deuxième défi est d'induire de fortes réponses anticorps, et d'obtenir des titres élevés de façon durable, difficiles à obtenir même avec une gamme de nouveaux adjuvants. La troisième difficulté est posée par le polymorphisme extensif de nombreux antigènes parasitaires.

Malgré la complexité de produire des antigènes dans le but d'obtenir des vaccins contre les parasites du stade sanguin, un certain nombre d'études sont entrées en phase II d'essais cliniques (Genton et al. 2002). Des essais ont été réalisés sur des enfants de Papouasie Nouvelle Guinée, avec des vaccins dirigés contre des protéines impliquées au stade sanguin, notamment la « merozoite surface protein 2 » (MSP2), avec une réduction de 62% de la densité du parasite chez ces enfants (McCarthy et al. 2011), ou encore le « apical membrane antigen 1 » (AMA1), avec des effets de protection partielle (M. D. Spring et al. 2009).

Récemment, l'identification de la protéine Rh5 (Reticulocyte-binding protein homologue 5), ligand clef de *P. falciparum* essentiel à l'invasion des globules rouges, chez toutes les souches testées jusqu'à présent, ouvre l'espoir de développer un vaccin efficace contre les stades sanguins. La basigine a été identifiée comme le récepteur érythrocytaire de PfRh5 (Crosnier et al. 2011). Il a été montré que PfRH5 est une cible vaccinale potentielle, des études ont montré que PfRH5 est sensible aux anticorps neutralisants induits par l'immunisation par ce ligand dans un modèle primate non humain du paludisme à *P. falciparum* (Draper et al. 2015).

Des études antérieures indiquent qu'un vaccin combiné ciblant différents stades du cycle de vie du parasite est susceptible de fournir une efficacité meilleure contre le paludisme. Les recherches de Thompson FM et collaborateurs, ont ainsi combiné deux stratégies de vaccination existante pour produire un vaccin induisant des réponses immunitaires contre le stade pré-érythrocytaire et le stade sanguin de *P. falciparum*. Le vaccin de cette étude est arrivé en phase I/II, nommé PEV3A. PEV3A comprend des peptides dirigés contre des protéines de sporozoïte, la CSP et l'antigène du stade sanguin, AMA1. Après vaccination avec le PEV3A, il a été observé des titres anticorps élevés, mais avec une protection très partielle (Thompson et al. 2008).

Une autre approche consiste à cibler la transmission hôte-moustique, ce sont les **vaccins bloquant la transmission (TBV)**. Les antigènes parasitaires exprimés par les parasites du stade sexué (les gamétocytes) ou durant le développement du parasite dans le moustique peuvent être utilisés comme cibles de TBV. Ces vaccins sont des vaccins altruistes, car ils ne protègent pas directement l'individu vacciné mais empêche la transmission du parasite à d'autres individus via le moustique. Parmi les cibles potentielles, on peut citer les protéines Pfs48/45 (Rener et al. 1983; Vermeulen et al. 1985), Pfs230 (Quakyi et al. 1987) et Pfs25 (Vermeulen et al. 1985).

### I.5.2) Parasites vivants atténués

En 1967, Nussenzweig et collaborateurs ont rapporté que des souris immunisées avec des sporozoïtes de *P. berghei* atténués par irradiation étaient protégées contre une infection d'épreuve (challenge) (Nussenzweig et al. 1967). Ces études initiales sur les rongeurs ont été suivies de plusieurs études sur l'homme durant les années 1970. Ces études ont établi que l'immunisation de volontaires humains avec des sporozoïtes irradiés de *P. falciparum* ou *P. vivax* conférait une protection durable contre une infection d'épreuve par les parasites homologues non atténués (Clyde et al. 1973; Hoffman et al. 2002). Étant donné les résultats décevants des vaccins antipaludiques sous-unitaires, la vaccination par des parasites vivants atténués qui avaient montré leur efficacité, est récemment redevenue un sujet important de recherches.

S'il est possible d'induire une protection complète contre le paludisme par immunisation avec des sporozoïtes vivants atténués (Hoffman et al. 2002), ces approches restent difficiles à envisager sur le terrain, notamment parce que la production de sporozoïtes vivants, chez le moustique, est impossible à réaliser à grande échelle, d'autre part parce qu'une injection des parasites par voie intraveineuse est nécessaire pour l'induction efficace d'une protection (Seder et al. 2013).

Parallèlement à ces premières études chez l'homme de nombreux scientifiques ont mis l'accent sur la compréhension des mécanismes immunitaires conduisant à la protection stérile, de nombreuses études ont été faites dans des modèles animaux et en particulier murins comme *P. berghei*, *P. yoelii* ou encore *P. chabaudi*. De nombreuses études chez la souris ont montré que la protection induite par sporozoïtes irradiés repose avant tout sur l'action des lymphocytes T, notamment CD8+, capables d'éliminer les hépatocytes infectés (Guthmiller, Zander, and Butler 2015).

L'**atténuation génétique du parasite** (GAP: genetically attenuated parasite) offre une alternative intéressante à l'irradiation. Des travaux antérieurs utilisant des parasites de rongeurs (*P. berghei* et *P. yoelii*) ont démontré l'utilité de l'atténuation génétique par délétion de gènes (ou knock out: KO) exprimés au stade pré-érythrocytaire, tels que *uis3* et *uis4* (« up-regulated in infective sporozoites gene 3 or 4 »), qui entraîne un arrêt du développement du parasite (Mueller, Labaied, et al. 2005; Mueller, Camargo, et al. 2005; Tarun et al. 2007). L'inactivation de *p52* et *p36* a abouti à l'arrêt du développement du parasite au stade hépatique (van Schaijk et al. 2008; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b). L'immunisation de souris avec des parasites déficients en UIS3, UIS4 ou P52 induit une protection complète de longue durée contre l'infection ultérieure avec des sporozoïtes contrôles pathogènes, validant la stratégie GAP (Mueller, Labaied, et al. 2005; Mueller, Camargo, et al. 2005; Tarun et al. 2007). Par la suite, une double délétion du gène *p52* et *p36* a été générée chez *P. yoelii* (Labaied et al. 2007), ces gènes font partis de la famille à 6-cystéine. L'infection par ce parasite *PyP52/P36<sup>-/-</sup>* n'a pas causé d'infection au stade sanguin chez les souris et la vaccination avec ce même parasite confère une protection stérile complète contre le parasite témoin (sporozoïtes) injecté en intraveineux ou par piqûre de moustiques. La même double délétion de *p52* et *p36* a été réalisée chez *P. falciparum* (VanBuskirk et al. 2009), mais un essai clinique chez l'homme a montré que ce mutant n'est pas complètement atténué (M. Spring et al. 2013).

Dans une étude antérieure, le gène « *sporozoite asparagine rich protein 1* » (*sap1*, ou *slarp*) a été décrit comme essentiel pour le développement au stade hépatique de *P. yoelii* (Aly et al. 2008) et *P. berghei* (Silvie, Goetz, and Matuschewski 2008). La protéine est exprimée par les sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique, la suppression du gène *sap1/slarp* conduit à la réduction de la transcription de gènes *uis* (Aly et al. 2008; Aly et al. 2011; Silvie, Goetz, and Matuschewski 2008) chez *P. yoelii* et *P. berghei*, avec un arrêt de développement au stade hépatique et une absence de parasitémie au stade sanguin chez les souris (Aly et al. 2008; Silvie, Goetz, and Matuschewski 2008). Une triple délétion (KO : « Knock Out ») de *p52*, *p36* et *sap1/slarp* a été réalisée chez *P. falciparum*. Une étude dans un modèle d'infection de souris humanisées a montré que ce mutant triple KO est complètement atténué lors du développement intra-hépatique du parasite, et pourrait constituer un vaccin atténué plus sûr que le double mutant *p52/p36* (Mikolajczak et al. 2014).

Des approches d'immunisation hautement efficace basées sur **l'infection contrôlée du paludisme humain** (« **controlled human malaria infection** » : **CHMI**) ont été mises en place, afin d'induire une plus longue immunité chez les individus.

Les volontaires sont infectés par injection de sporozoïtes sauvages vivants non atténués, et reçoivent simultanément un traitement prophylactique par la chloroquine. Ce procédé d'immunisation par sporozoïtes sous couvert de chimioprophylaxie (CPS), initialement développé chez la souris, a permis d'obtenir une protection complète chez l'homme, persistant pendant plus de 2 ans (Belnoue *et al.* 2004; Roestenberg *et al.* 2009; Roestenberg *et al.* 2011). Ces études ont révélé l'induction de lymphocytes T mémoires spécifiques du parasite, produisant de l'interféron- $\gamma$ , du facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), et de l'interleukine-2 en tant que marqueurs immunologiques associés à la protection (Roestenberg *et al.* 2009; Roestenberg *et al.* 2011). L'immunisation par la CPS permet la maturation complète du parasite au stade hépatique et au stade sanguin, qui s'accompagne d'une protection ciblant le stade pré-érythrocytaire (Bijker *et al.* 2013; Roestenberg *et al.* 2011; Teirlinck *et al.* 2011). Des analyses des réponses anticorps contre *P. falciparum* ont permis d'identifier deux antigènes pré-érythrocytaires correspondant aux protéines CSP et LSA-1 principalement reconnues après une vaccination par CPS (Felgner *et al.* 2013). L'immunisation par CPS a permis d'identifier une induction plus efficace des lymphocytes B et une production d'anticorps plus rapide (Nahrendorf *et al.* 2014).

## II. Biologie des sporozoïtes de *Plasmodium*

*Plasmodium* appartient au phylum des *Apicomplexa*, un groupe de parasites intracellulaires obligatoires dont certains sont responsables de maladies chez l'homme (comme *Plasmodium*, *Toxoplasma*) ou les animaux (comme *Theileria* ou *Eimeria*). Le génome nucléaire de *P. falciparum*, la principale espèce pathogène pour l'homme, comprend 23 millions de paires de bases (souche de référence 3D7), est extrêmement riche en adénines et thymines (environ 80%), et est composé d'environ 5300 gènes répartis sur 14 chromosomes (Gardner *et al.* 2002).

Le sporozoïte, transmis par piqûre du moustique anophèle femelle lors de son repas sanguin, est le stade d'infection pour l'homme, et se multiplie dans les hépatocytes, avant de libérer des milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine, où ils vont infecter les érythrocytes. Les sporozoïtes sont formés dans les oocystes, au niveau de l'estomac du moustique, et une fois libérés colonisent les glandes salivaires de l'insecte. Les sporozoïtes

peuvent persister sous une forme infectieuse toute la vie de l'insecte. Lors du repas sanguin du moustique, des sporozoïtes motiles sont injectés dans le derme de l'hôte. Ces sporozoïtes migrent à travers le derme et gagnent le foie par la circulation sanguine. Dans le foie, les sporozoïtes infectent un hépatocyte en formant une vacuole parasitophore.

Afin de pouvoir étudier dans le détail les mécanismes d'invasion et de développement du parasite dans les hépatocytes, la plupart des laboratoires utilisent couramment deux espèces de parasites infectant les rongeurs, *P. yoelii* et *P. berghei*, qui permettent un accès relativement facile à toutes les phases de développement du parasite.

## **II.1. Structure cellulaire et motilité des sporozoïtes de *Plasmodium***

### **II.1.1. Structure cellulaire**

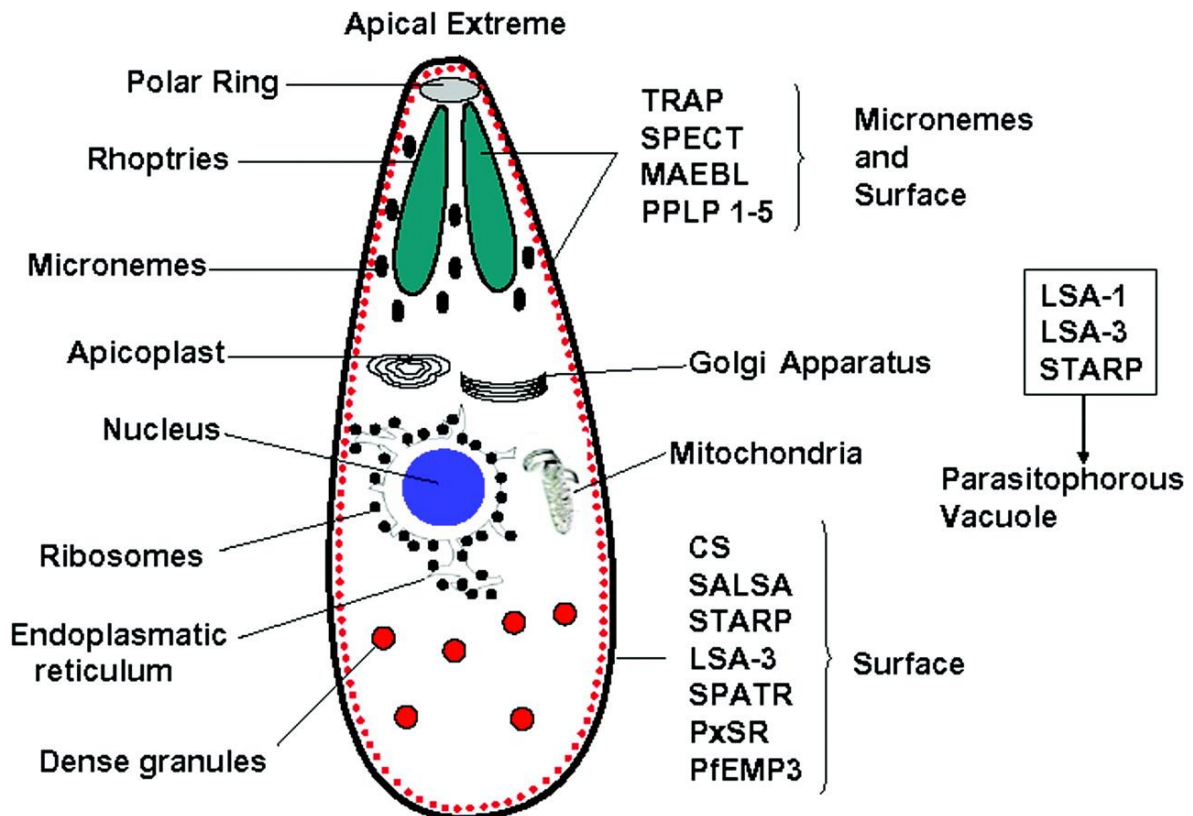
Les sporozoïtes de *Plasmodium* sont des cellules polarisées de forme allongée, mesurant environ 10 à 15 µm de long et environ 1 µm de large. Les sporozoïtes sont délimités par une triple membrane, constituée par la membrane plasmique du parasite, sous laquelle est apposé un ensemble de larges vésicules aplaties appelées complexe membranaire interne (IMC) (S. H. I. Kappe, Buscaglia, and Nussenzweig 2004). Le cortex du sporozoïte est maintenu par des microtubules ancrés à l'anneau polaire antérieur (Morrisette and Sibley 2002). Un moteur actine-myosine, à l'origine de la motilité des parasites, est situé dans l'espace étroit entre la membrane plasmique et la membrane extérieure de l'IMC (S. H. I. Kappe, Buscaglia, and Nussenzweig 2004).

La surface du sporozoïte est couverte d'une protéine membranaire abondante, la circumsporozoïte (CSP). La CSP est essentielle à la formation des sporozoïtes dans les oocystes (R. Ménard et al. 1997), et joue de multiples rôles chez les sporozoïtes, non seulement lors de la colonisation des glandes salivaires du moustique mais aussi dans la migration des sporozoïtes de la peau jusqu'au foie et pendant l'infection des hépatocytes (Robert Ménard et al. 2013).

Le sporozoïte contient à son extrémité apicale des vésicules sécrétoires spécifiques des Apicomplexa, les micronèmes et les rhoptries, qui définissent le complexe apical et sécrètent leur contenu de façon séquentielle lors de la migration des parasites et l'invasion des cellules (Carruthers, Giddings, and Sibley 1999) (Figure 3).

**Les micronèmes** sont des petites vésicules de densité variable qui sécrètent un diverses protéines ayant un rôle dans la motilité du parasite, l'adhérence aux substrats, la migration des parasites, l'attachement et l'invasion des cellules. Parmi ces protéines, on

compte la thrombospondin-related anonymous protein (TRAP), qui joue un rôle majeur dans la motilité du parasite, la Perforin like protein-1 (PLP-1) et la Cell traversal protein for ookinete and sporozoite (CelTOS), impliquées dans la traversée cellulaire, ainsi que la protéine Membrane Antigen Erythrocyte Binding Like Protein (MAEBL), indispensable à l'invasion des glandes salivaires du moustique, ou l'Apical membrane antigen-1 (AMA1), impliqué dans l'invasion des cellules de l'hôte mammifère.



**Figure 3.** Schéma de la structure d'un *sporozoïte* et les organites sécrétoires indispensables à la survie du parasite (les micronèmes, les rhoptries). Qui sont à l'origine de la sécrétion de certaines de ces principales molécules qui lui sont associées. Les localisations des différentes protéines *sporozoïtes* qui ont été liés à la survie du parasite peuvent être observées.

**Les rhoptries** sont des vésicules allongées, en général présentes en paire, qui sécrètent des protéines impliquées dans l'invasion des cellules et la formation de la vacuole parasitophore. On distingue deux parties dans les rhoptries : le collet, qui contient des protéines comme les RON (Rhoptry Neck Proteins), impliquées dans la formation de la jonction mobile, et le bulbe des rhoptries, qui contient des protéines et des lipides impliqués dans la formation de la vacuole, où le parasite se trouve et se réplique à l'intérieur de la cellule hôte (S. H. I. Kappe, Buscaglia, and Nussenzweig 2004).



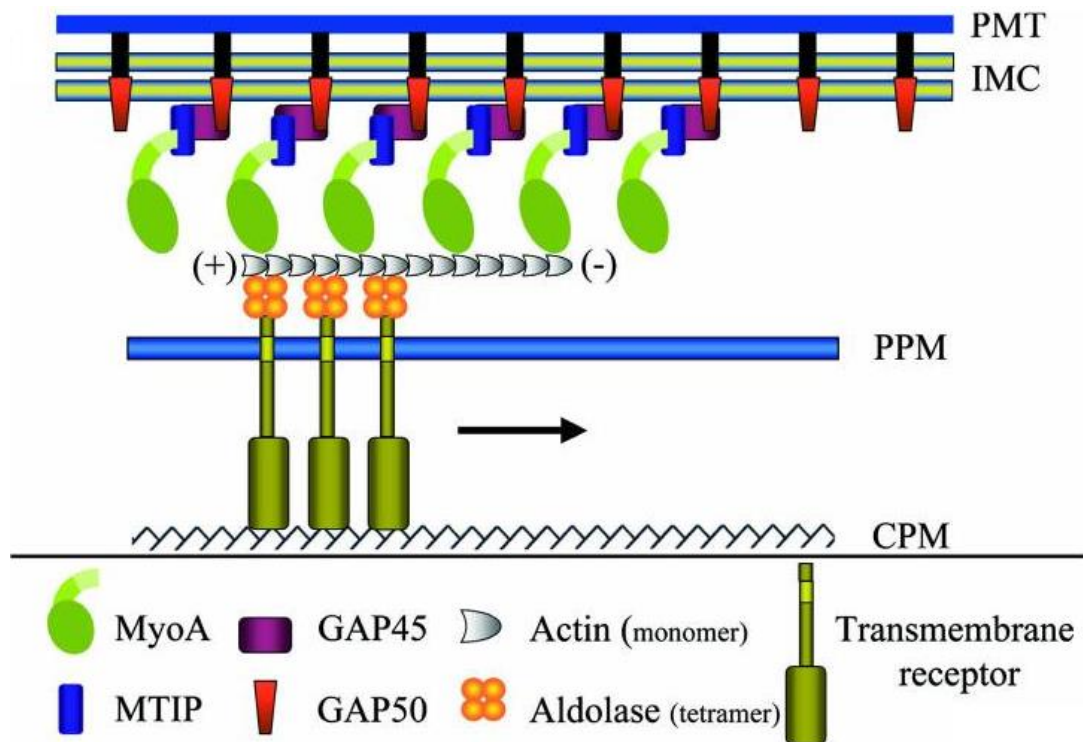
Les sporozoïtes contiennent un autre organelle typique des Apicomplexa, l'apicoplaste. Il s'agit d'un plaste essentiel homologue à un chloroplaste, bien qu'il ne développe pas de photosynthèse (Foth and McFadden 2003). L'apicoplaste est notamment impliqué dans le métabolisme des acides gras (Gardner et al. 2002), et joue un rôle essentiel dans le développement de *Plasmodium* chez le moustique et dans les hépatocytes infectés (van Schaijk et al. 2014; Vaughan, Aly, and Kappe 2008; Yu et al. 2008).

### II.1.2) Motilité

Les sporozoïtes présentent un mode de déplacement relativement rapide appelé motilité par glissement (« **gliding motility** »), caractéristique des Apicomplexa. Ces parasites sont dépourvus de cils ou flagelles, et n'étendent pas de pseudopodes. Des sporozoïtes observés sur une surface plane comme une lame de microscope présentent un mouvement circulaire. Dans un environnement plus complexe (matrices 3D comme les tissus), les sporozoïtes peuvent se déplacer dans de multiples directions. Cette motilité est essentielle pour permettre au parasite de migrer de la peau jusqu'au foie, et est médiée par un moteur actine-myosine et des protéines adhésives sécrétées des micronèmes vers la surface du parasite.

La motilité par glissement se fait sans changement de forme, et repose sur la translocation antéro-postérieure de molécules adhésives de surface couplées au moteur actine-myosine localisé sous la membrane du parasite. La motilité par glissement repose sur la redistribution antéro-postérieure (« capping ») de molécules adhésives de surface appelées adhésines. Ces adhésines sont des protéines transmembranaires dont l'extrémité cytoplasmique est connectée à un moteur dépendant de l'actine (Dobrowolski and Sibley 1996; Wetzel et al. 2003) et de la myosine (Pinder et al. 1998; K. Matuschewski et al. 2001; Meissner, Schlüter, and Soldati 2002).

La protéine TRAP joue un rôle majeur dans la motilité des sporozoïtes (Sultan et al. 1997). Il s'agit d'une protéine adhésive découverte en 1988 (Robson et al. 1995) et est conservée dans toutes les espèces de *Plasmodium*. TRAP est principalement située dans les micronèmes et est transportée à la surface du sporozoïte au cours de son processus de locomotion et d'invasion (Rogers et al. 1992; Spaccapelo et al. 1997; S. Kappe et al. 1999; Gantt et al. 2000; Pradel, Garapaty, and Frevert 2002).



**Figure 4. Les composants du moteur d'invasion du parasite *Plasmodium* dans les cellules.** Représentation schématique de l'organisation des composants de la machinerie d'invasion de *Plasmodium*. MTIP lie la queue de MyoA localisée au niveau de la membrane interne ICM via l'interaction avec le complexe GAP45-GAP50. La tête du domaine MyoA interagit avec de courts filaments d'actine qui sont indirectement reliés via un tétramère d'aldolase au domaine cytoplasmique des protéines transmembranaires, qui se lient à la cellule ou aux substrats extracellulaires par l'intermédiaire de domaines adhésifs extracellulaires (Bosch et al. 2006)

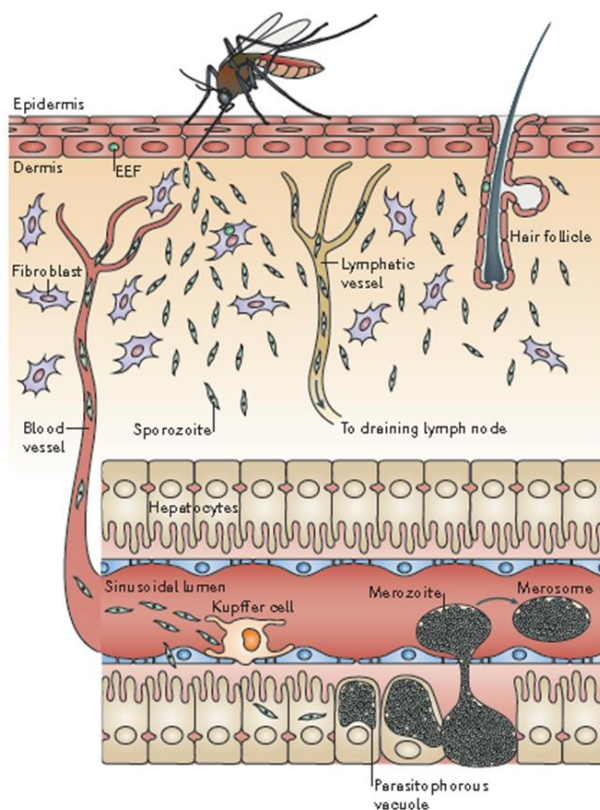
Les membres de la famille TRAP sont des protéines transmembranaires de type I pourtant des domaines extracellulaires avec deux domaines adhésifs : un domaine A et un domaine répété de type thrombospondine (TSR). TRAP est une protéine transmembranaire dont l'extrémité cytoplasmique pourrait interagir avec l'actine, via l'enzyme glycolytique aldolase (S. H. I. Kappe, Buscaglia, and Nussenzweig 2004; Ghosh et al. 2009; Ejigiri et al. 2012). La myosine A identifiée chez *Plasmodium* et *Toxoplasma*, est conservée chez les *Apicomplexa*, et localisée sous la membrane plasmique. Elle est associée à la protéine Myosin a Tail domain Interacting Protein (MTIP) et est ancrée au Complexe Membranaire Interne (CMI) par l'intermédiaire des protéines Glideosome Associated Protein-45 (GAP-45) et GAP-50 (Heintzelman and Schwartzman 1997; Heintzelman and Schwartzman 1999; Meissner, Schlüter, and Soldati 2002) qui permettent de renforcer l'espace cortical (Fréchal et al. 2010) (Figure 4).

## II.2. Infection de l'hôte mammifère

### II.2.1. Migration de la peau jusqu'au foie

#### Migration à travers la peau

Lors du repas sanguin, le moustique anophèle femelle sonde la peau à la recherche d'un capillaire. Pendant cette étape, il injecte dans le derme un mélange d'anticoagulants et de vasodilatateurs présents dans sa salive ainsi qu'un faible nombre de sporozoïtes (entre 20 et 200). Une fois dans la peau, les sporozoïtes motiles se déplacent activement à travers le tissu dermique avant de pénétrer un capillaire sanguin pour rejoindre la circulation sanguine. Les sporozoïtes peuvent se déplacer à grand vitesse par « gliding » (J. P. Vanderberg 1974) et sont capables de traverser les cellules de l'hôte en perforant les membranes (J. P. Vanderberg, Chew, and Stewart 1990; M. M. Mota, Pradel, et al. 2001).



**Figure 5. Migration des sporozoïtes de la peau jusqu'au foie.** Les sporozoïtes injectés dans la peau lors du repas sanguin du moustique migrent à travers le derme. Certains sporozoïtes sont drainés par les vaisseaux lymphatiques et seront pour la plupart dégradés dans le ganglion drainant. Certains sporozoïtes peuvent persister dans la peau et initier leur développement en formes exo-érythrocytaires. Seule une fraction des sporozoïtes parvient à gagner la circulation sanguine puis à rejoindre le foie. Ces sporozoïtes traversent alors plusieurs cellules de la barrière sinusoidale et du parenchyme hépatique, avant d'infecter un hépatocyte dans une vacuole parasitophore, pour s'y multiplier et s'y différencier avant la libération des mérozoïtes dans la circulation sanguine.

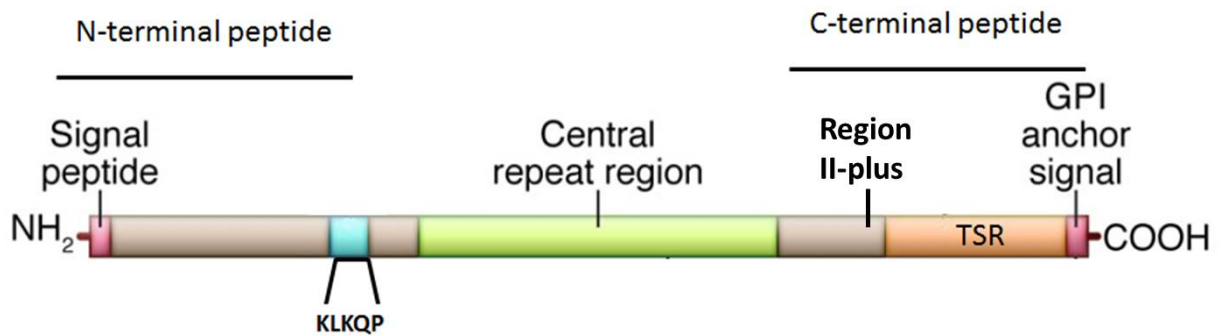
Les sporozoïtes se déplacent à une vitesse de 1 à 2  $\mu\text{m}/\text{sec}$ , pendant environ une heure, bien que la vitesse diminue progressivement avec le temps, avec un mouvement aléatoire (Jerome P. Vanderberg and Frevert 2004; Amino et al. 2006; Amino et al. 2007). Les sporozoïtes qui arrivent à atteindre la circulation sanguine, seront transportés jusqu'au foie. Seule une fraction des sporozoïtes injectés parvient à rejoindre le foie, les autres restant bloqués dans la peau ou passant dans la circulation lymphatique (Amino et al.

2006). Dans la peau, certains sporozoïtes peuvent débuter un développement en formes exo-érythrocytaires, au moins chez les *Plasmodium* de rongeurs *P. berghei* et *P. yoelii* (Voza et al. 2012; Gueirard et al. 2010). Les sporozoïtes drainés par les vaisseaux lymphatiques sont piégés dans les ganglions lymphatiques drainant le site de piqûre, où la plupart sont dégradés mais certains peuvent partiellement se développer et délivrer des antigènes de sporozoïte mais également d'EEF au système immunitaire (Amino et al. 2006) (Figure 5).

### **Séquestration dans le foie**

Une fois que les sporozoïtes ont atteint la circulation sanguine, ils sont transportés jusqu'au foie par l'intermédiaire de l'artère hépatique ou la veine porte vers les sinusoides hépatiques, qui sont bordés de cellules endothéliales et de macrophages résidents, les cellules de Kupffer.

La séquestration rapide des sporozoïtes dans le sinusoides hépatique est médiée par des interactions entre la principale protéine de surface des sporozoïtes, la CSP, et les héparan sulfate proteoglycans (HSPGs) hépatiques (R. Ménard and Nussenzweig 2000; Photini Sinnis and Nardin 2002). La structure de la protéine de la CSP est conservée parmi les espèces de *Plasmodium* infectant les rongeurs, les primates et les humains. La CSP est constituée d'un domaine central fait de répétitions (« repeats » sur la figure 6) variables d'une espèce plasmodiale à l'autre et contenant des épitopes B immunodominants (Godson et al. 1983). Ces répétitions sont flanquées de deux régions conservées : la région I, une séquence de 5 acides aminés (KLKQP) impliquée dans l'attachement des sporozoïtes aux glandes salivaires du moustique (Sidjanski, Vanderberg, and Sinnis 1997), et la région II-plus, une séquence de 18 acides aminés insérée au sein d'un domaine de répétition de type thrombospondine (TSR, thrombospondin repeats), impliqué dans l'adhérence du parasite sur les cellules de l'hôte (Holt, Pangburn, and Ginsburg 1990) (Figure 6).



**Figure 6. La protéine de la « circumsporozoïte » (CSP).** La CSP possède plusieurs caractéristiques conservées chez toutes les espèces de *Plasmodium* : une région répétée centrale (région en vert), deux régions conservées (régions en cyan et orange), soit la région I, et le domaine thrombospondine de type I (TSR en orange) impliquées dans l'adhérence du parasite aux cellules hôtes. Les 20 premiers résidus de la CSP ont des caractéristiques d'une séquence signal eucaryote (Nielsen et al. 1997) et la séquence COOH-terminal contient un signal d'ancrage GPI (d'après (Crompton, Pierce, and Miller 2010)).

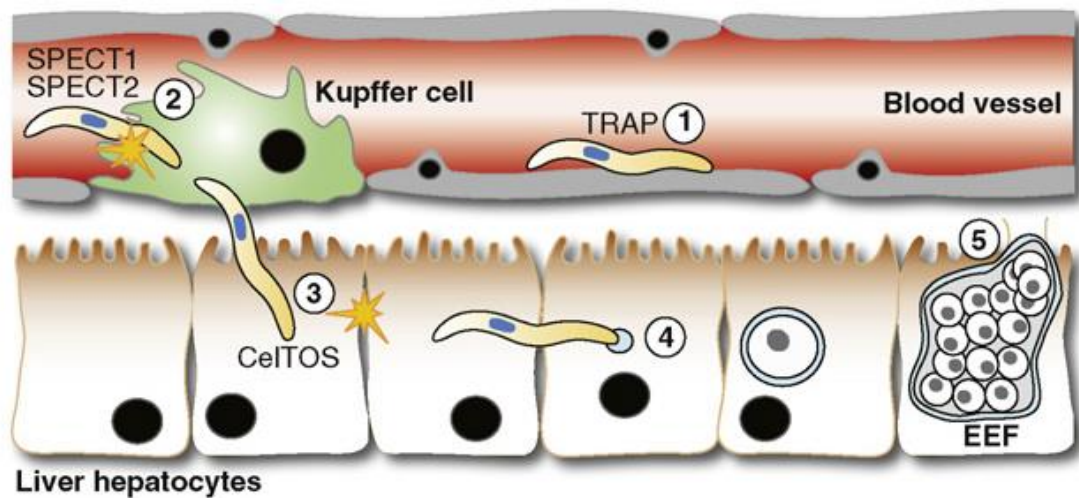
Les domaines TSR correspondent à un domaine d'une soixantaine de résidus et sont trouvés chez différents membres d'une superfamille de protéines adhésives apparentées à la thrombospondine. Le domaine TSR se lie avec une grande affinité aux glycoconjugués sulfatés (Holt, Pangburn, and Ginsburg 1990). La région II-plus de la CSP est impliquée dans l'adhérence des sporozoïtes aux héparanes sulfate protéoglycanes (HSPG) hépatiques (Cerami et al. 1992; U. Frevert et al. 1993; Cerami et al. 1994; P. Sinnis et al. 1994), et participe à la motilité et à l'infectiosité des sporozoïtes (Pradel, Garapaty, and Frevert 2002; Rathore et al. 2002; Tewari et al. 2002; Tewari, Rathore, and Crisanti 2005a). L'extrémité C-terminale de la CSP (ancrage) comprend une séquence canonique d'insertion d'un glycoposphatidyl inositol (GPI) (McCutchan et al. 1996), participant à son ancrage à la membrane plasmique du parasite. La suppression de cette séquence et son remplacement par un segment transmembranaire empêchent le développement des sporozoïtes dans l'oocyste (Wang et al. 2005).

Les **HSPG** sont des molécules ubiquitaires présentes à la surface de la plupart des cellules de mammifères. Les chaînes de glycosaminoglycane (GAG) de l'HSPG sont faites de motifs récurrents disaccharidiques de N-acétyl-glucosamine et acide glucuronique qui peuvent subir une série de modifications, donnant lieu à une grande hétérogénéité structurelle. L'addition de sulfates est une de ces modifications et les HSPGs hépatiques sont plus fortement sulfatés comparés aux HSPGs d'autres organes (Lyon et al. 1994), ce qui joue un rôle dans le ciblage sélectif des sporozoïtes dans le foie (S. H. I. Kappe, Buscaglia, and Nussenzweig 2004). La CSP interagit préférentiellement avec les HSPGs

très sulfatés (Pinzon-Ortiz et al. 2001; Pradel, Garapaty, and Frevert 2002) et l'attachement des sporozoïtes diminue à mesure que le taux de sulfatation des chaînes de GAGs diminue (Pinzon-Ortiz et al. 2001).

### Traversée de la barrière sinusoidale

Pour atteindre les hépatocytes, leurs cellules cibles, les sporozoïtes doivent traverser la barrière sinusoidale. Pour cela, ils utilisent leur capacité à traverser les cellules (Figure 7).



**Figure 7. Traversée cellulaire des sporozoïtes dans le foie.** Après injection par le moustique à l'hôte mammifère, le sporozoïte est véhiculé par la circulation sanguine jusqu'au foie. Dans le foie, le parasite passe la barrière sinusoidale en traversant les cellules, par perforation de leur membrane. Plusieurs protéines parasitaires sont impliquées dans la migration des sporozoïtes à travers les cellules, dont SPECT1 et SPECT2, ainsi que CelTOS. Des molécules permettant au sporozoïte d'adhérer aux cellules et de se mouvoir par glissement (**TRAP**) sont également indispensables au parasite (Baum et al. 2008).

La traversée cellulaire (Cell Traversal, CT) joue un rôle majeur pour permettre au sporozoïte de traverser des barrières cellulaires chez l'hôte vertébré, dans le derme et le foie (Amino et al. 2008; T. Ishino et al. 2004). Lors de la traversée cellulaire, les sporozoïtes rompent la membrane plasmique de la cellule hôte et glissent à dans le cytoplasme avant de ressortir de la cellule (M. M. Mota, Pradel, et al. 2001). Ce phénomène de traversée cellulaire a été observé pour la première fois dans des macrophages (J. P. Vanderberg, Chew, and Stewart 1990), et plus tard dans les cellules épithéliales, fibroblastes et les hépatocytes (M. M. Mota, Pradel, et al. 2001; Amino et al. 2008).

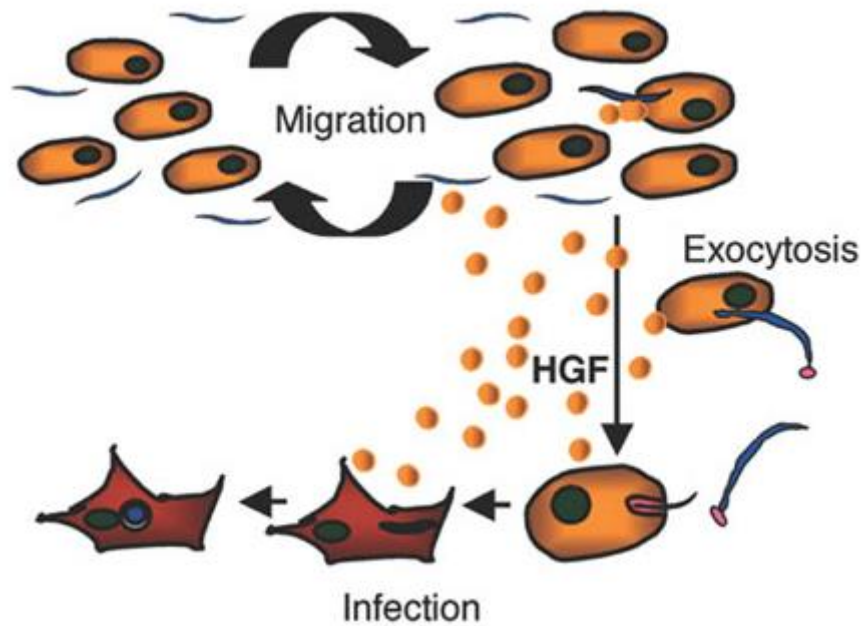
Des études génétiques chez *P. berghei* ont permis d'identifier plusieurs protéines parasitaires sécrétées par les micronèmes et impliquées dans le processus de traversée, dont



« Sporozoite Protein Essential for Cell Traversal » (SPECT) (T. Ishino et al. 2004), SPECT2, également nommée PLP1 (« Perforin-Like Protein 1 ») (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b) et CelTOS (Kariu et al. 2006). La fonction de ces protéines est inconnue, à l'exception de SPECT2/PLP1, qui contient un domaine de type Membrane Attack Complex/Perforin (MACPF). Cette protéine est essentielle pour permettre aux sporozoïtes de traverser la peau et les cellules sinusoïdales. *Plasmodium* possède 5 protéines à domaine MACPF, dont seule PLP1 est exprimée au stade sporozoïte (Carlton et al. 2002; Gardner et al. 2002; Kaiser et al. 2004). Le domaine MACPF est présent dans les protéines formant des pores dans les membranes des cellules, comme la perforine. Les protéines de type MACPF se fixent à la membrane plasmique des cellules cibles, et après oligomérisation et changement de conformation, deviennent transmembranaires, avec formation d'un pore (Peitsch et al. 1990). Le complexe d'attaque membranaire (MAC) du système du complément est inséré dans la bicouche phospholipidique de la cellule cibles formant ainsi des canaux transmembranaires. Cela conduit à la cytolysse osmotique de la cellule cible. MAC est composé de C5b-C6-C7-C8-C9. La protéine CelTOS est exprimée chez les ookinètes et les sporozoïtes, et est impliquée à la fois dans la traversée des cellules de l'estomac du moustique par les ookinètes, ainsi que dans la traversée cellulaire par les sporozoïtes (Kariu et al. 2006). Son mécanisme d'action est inconnu, mais CelTOS pourrait être impliquée dans la migration à travers le cytoplasme (Kariu et al. 2006).

### **Rôle de la traversée cellulaire dans l'activation des parasites**

Plusieurs études sur la traversée cellulaire des sporozoïtes ont proposé un rôle de la traversée dans l'activation des sporozoïtes et/ou des hépatocytes. Des études ont initialement montré que les hépatocytes traversés permettent de rendre les sporozoïtes compétents pour l'invasion productive (Maria M. Mota, Hafalla, and Rodriguez 2002), et que les hépatocytes participent au développement du parasite dans la vacuole parasitophore via l'activité du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) libérée par les hépatocytes traversés (Carrolo et al. 2003) (Figure 8). A l'inverse, les hépatocytes traversés ont également été rapportés pour limiter le développement des parasites intracellulaires par l'expression de la NO synthase inductible via l'activation de NF- $\kappa$ B (Torgler et al. 2008).



**Figure 8. Modèle d'infection des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*.** Les sporozoïtes traversent plusieurs hépatocytes, avant d'infecter une cellule cible en formant une vacuole. La migration à travers les cellules entraînerait la sécrétion d'HGF à partir des hépatocytes. L'HGF se lie à son récepteur MET, et permet la transduction de signaux qui favoriseraient le développement du parasite (Carrolo et al. 2003).

D'autres études ont montré que la transmigration du sporozoïte dans le cytosol de la cellule hôte peut déclencher l'exocytose des protéines de micronèmes, elle-même stimulée par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Maria M. Mota, Hafalla, and Rodriguez 2002). L'exposition aux concentrations cytosoliques de potassium a également été suggérée comme un facteur stimulant l'activation de l'étape d'invasion productive des sporozoïtes (K. A. Kumar et al. 2007).

Cependant, si la traversée cellulaire est clairement indispensable lors de l'infection *in vivo*, lors de la migration dans le derme et à travers la barrière sinusoidale (Amino et al. 2008; T. Ishino et al. 2004), les sporozoïtes mutants déficients en traversée restent infectieux *in vitro*, ce qui indique que la traversée cellulaire en soi n'est pas requise pour l'étape d'infection productive. De plus, les mutants déficients en traversée (SPECT ou SPECT2) injectés par voie intraveineuse chez la souris voient leur infectiosité restaurée lorsque la barrière sinusoidale est altérée de façon expérimentale par déplétion des cellules de Kupffer au chlodronate (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b; Baer et al. 2007).



## II.2.2. Invasion productive des hépatocytes et développement des formes exo-érythrocytaires

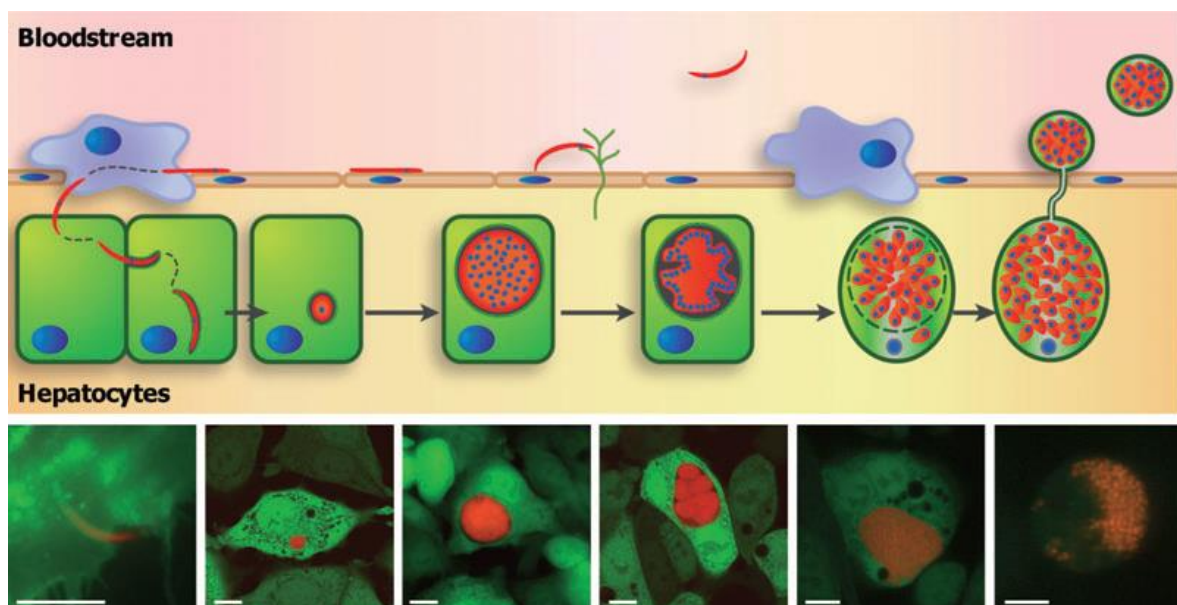
Une fois dans le parenchyme hépatique, les sporozoïtes passent d'un mode de traversée cellulaire à un mode d'invasion productive, sans rupture membranaire mais avec formation d'une vacuole parasitophore (voir chapitre suivant), dans laquelle ils se différencient en formes exo-érythrocytaires répliquatives (EEFs). Les mécanismes impliqués dans l'activation des sporozoïtes restent très mal caractérisés. Les travaux de Sinnis et Coppi ont permis de montrer que l'interaction avec les HSPGs hépatiques entraîne un clivage de la CSP, associé à l'arrêt de l'activité de migration et au passage au mode d'invasion productive (Photini Sinnis and Coppi 2007; Coppi et al. 2005; Coppi et al. 2007; Coppi et al. 2011). Ces données suggèrent que les sporozoïtes pourraient utiliser les HSPGs hautement sulfatés comme GPS pour détecter leur arrivée dans le parenchyme hépatique et s'activer au moment opportun, dans un organe situé loin du site d'injection dans la peau. Le clivage protéolytique de la CSP induit un changement de conformation et donc de l'adhérence du sporozoïte à la cellule (Coppi et al. 2011). La région I hautement conservée dans les différentes espèces de *Plasmodium* joue alors un rôle essentiel dans ce processus (Figure 6). La CSP comprenant un domaine de répétition centrale flanquée par une partie N-terminale contenant le site de clivage protéolytique conservé, et en C-terminal par un domaine TSR. Lorsque le sporozoïte est injecté dans la peau, la CSP à une conformation repliée, telle que la région N-terminale masque la région C-terminale de la TSR. Le clivage de la CSP exposerait la région TSR pour permettre l'invasion des hépatocytes (Tewari, Rathore, and Crisanti 2005b; Coppi et al. 2011; Herrera et al. 2015).

D'autres protéines parasitaires sont impliquées dans l'activation des sporozoïtes. Deux protéines parasitaires de la famille à domaine 6-cys, P52 et P36, ont été impliquées dans le switch de la migration vers l'invasion productive. En particulier, Ishino et al ont montré que des sporozoïtes de *P. berghei* déficients en P52 ou P36 ont une activité de traversée cellulaire augmentée et un défaut majeur d'invasion productive (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b). Ce rôle de P52 et P36 dans l'invasion a été montré non seulement chez les *Plasmodium* de rongeurs mais aussi chez *P. falciparum* (Melissa R. van Dijk et al. 2005; Labaied et al. 2007; van Schaijk et al. 2008). La fonction précise de ces protéines reste à déterminer.

L'invasion productive des hépatocytes conduisant à la multiplication du parasite est une étape indispensable et asymptomatique permettant aux sporozoïtes de se différencier en formes exo-érythrocytaires (EEFs), au sein d'une vacuole, la vacuole parasitophore

(PV), formée lors de l'invasion. Cette étape conduit au développement ultérieur des stades érythrocytaires, phase symptomatique de la maladie chez les mammifères (Figure 9).

Dans la vacuole parasitophore, le parasite va subir une réplication très rapide et intense. La PV échappe à la fusion avec les lysosomes de la cellule, protégeant le parasite de la dégradation par la cellule (Laliberté and Carruthers 2008; Goldszmid et al. 2009). La membrane de la PV (PVM) contient des canaux qui permettent un transfert de divers éléments nutritifs du cytosol de l'hôte vers la vacuole (Bano et al. 2007). Les études utilisant la micro-injection de molécules fluorescentes ont déterminé que le passage à travers la PVM dans l'infection du foie est restreint à des molécules de moins de 1 kDa (Bano et al. 2007), une taille comparable à des canaux présents lors des interactions cellule-cellule en culture (Schwarzmann et al. 1981).



**Figure 9. Développement pré-érythrocytaire du parasite *Plasmodium*.** Une fois les sporozoïtes dans le foie, ils traversent la barrière sinusoidale pour atteindre et infecter les hépatocytes, en formant une vacuole parasitophore. A l'intérieur de la vacuole, le parasite se développe en mérozoïtes qui seront alors libérés dans la circulation sanguine. La figure représente des cellules HepG2 exprimant la GFP (vert), infectées par les parasites mCherry (en rouge), observées en microscopie confocale (Rankin et al. 2010).

La membrane de la PV émane de la membrane plasmique de la cellule hôte, mais est ensuite remodelée par des protéines d'origine parasitaire. En particulier, deux membres de la famille ETRAMP ont été identifiés comme ayant un rôle majeur au stade pré-érythrocytaire : UIS3 et UIS4 (« Up-regulated in Infectious Sporozoïtes ») chez *P. berghei* et *P. yoelii* (Kai Matuschewski et al. 2002; Kaiser et al. 2004). Ces protéines sont localisées au niveau de la membrane de PV au stade hépatique et chacune des protéines est essentielle pour le développement au stade hépatique (Mueller, Camargo, et al. 2005;

Mikolajczak et al. 2007). UIS3 a été décrite comme interagissant avec une protéine des hépatocytes, L-FABP, pour permettre la croissance du parasite au stade hépatique (Mikolajczak et al. 2007).

La multiplication d'un sporozoïte en milliers de mérozoïtes pour former un schizonte est un événement complexe, car le parasite doit survivre et se développer rapidement sans déclencher la mort de la cellule hôte. La schizogonie hépatique dure environ 7 jours dans le cas de *P. falciparum*, alors qu'elle n'est que de 2 jours pour *P. yoelii* et *P. berghei*. La schizogonie comprend des cycles multiples de réplication de l'ADN et des mitoses sans division nucléaire immédiate, qui conduisent à la formation d'un syncytium multinucléaire. Une étape appelée cytomère consiste en l'invagination membranaire du parasite, entourant de grands groupes de noyaux parasitaires. A ce stade, la membrane de la PV s'est perméabilisée, observée sur la figure 9, puis l'invagination de la membrane du parasite continue, pour finalement entourer les noyaux simples de chaque parasite, ce qui se traduit par la formation des méroblastes qui entraîne un endommagement rapide et complète de la PV. Ceci entraîne la libération des mérozoïtes dans le cytoplasme de la cellule hôte. Au cours de ce processus, la cellule infectée bourgeonne, libérant les parasites sous la forme de mérosomes, sacs membranaires contenant des mérozoïtes, qui seront ensuite libérés dans la circulation sanguine.

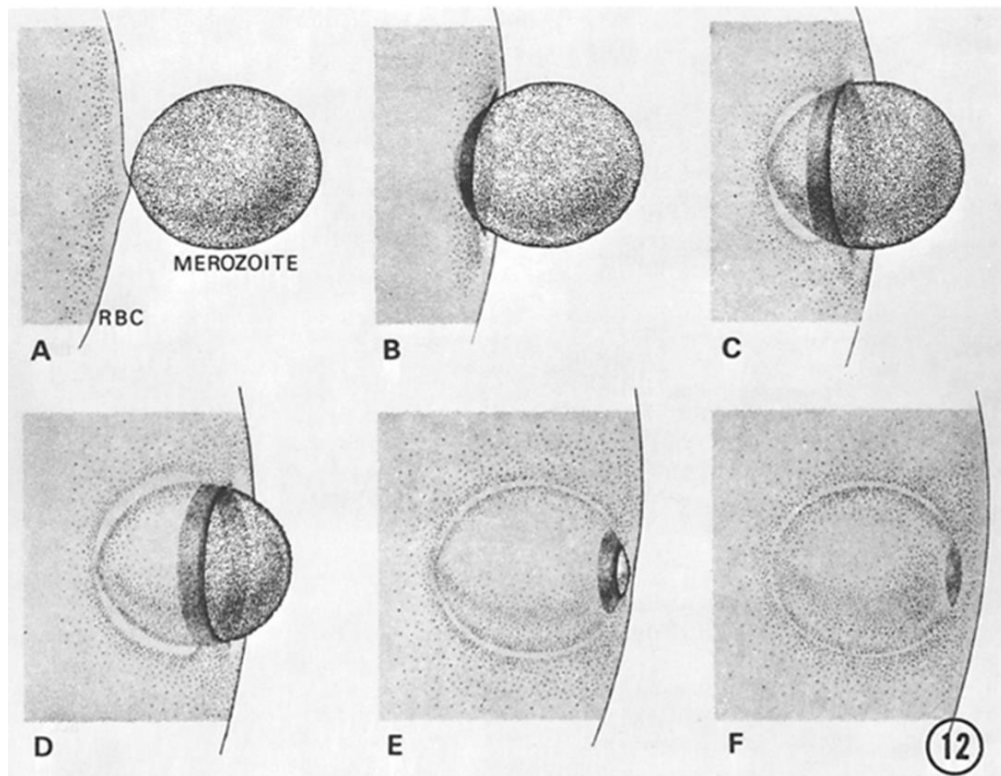
### III. Mécanismes d'entrée de *Plasmodium* dans les cellules

L'entrée des sporozoïtes dans les hépatocytes est une étape complexe encore très mal connue. Cependant, les mécanismes d'invasion des mérozoïtes de *Plasmodium* et des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* ont été assez bien caractérisés. Il a été montré que l'invasion productive des cellules implique la formation d'une jonction mobile (Moving Junction, MJ) entre le parasite et la cellule hôte, qui permet l'internalisation du parasite avec formation d'une vacuole parasitophore dans laquelle le parasite pourra se développer.

#### **III.1. Description du processus d'entrée à travers une jonction**

Les mécanismes d'invasion sont globalement conservés chez les *Apicomplexa*, mais ont été le mieux caractérisés dans l'invasion des mérozoïtes chez *Plasmodium* et des tachyzoïtes chez *Toxoplasma gondii*. Il y a plus de 35 ans, des études

en microscopie électronique ont permis de définir la jonction comme une interface dense en électrons au point de contact entre le parasite et la cellule hôte. La jonction forme un anneau encerclant le parasite lors de son internalisation (Aikawa et al. 1978).



**Figure 10.** Étapes de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *Plasmodium*. Après un attachement à l'érythrocyte, suivi d'une réorientation du pôle apical du parasite, le mérozoïte établit une jonction mobile (A). Grâce au moteur d'actine-myosine le parasite pénètre dans le globule rouge (B-C), en formant une vacuole parasitophore autour du mérozoïte (D), qui s'achève à la fin de l'invagination totale du parasite dans l'érythrocyte (E-F) (Aikawa et al. 1978).

Le parasite commence à pénétrer dans la cellule hôte par son extrémité apicale. Un premier contact entre le parasite et la cellule permet la formation d'une jonction mobile (MJ). Cette dernière assure l'ancrage du parasite à la cellule, et sa mobilisation grâce au moteur actine-myosine parasitaire propulse le parasite à l'intérieur de la cellule, au sein d'une invagination de la membrane plasmique de la cellule aboutissant à la formation d'une vacuole (Besteiro, Dubremetz, and Lebrun 2011; Riglar et al. 2011). L'entrée s'accompagne du remodelage de la membrane de la vacuole, qui échappe à la fusion avec les lysosomes présents dans la cellule hôte (Mordue et al. 1999) (Figure 10).

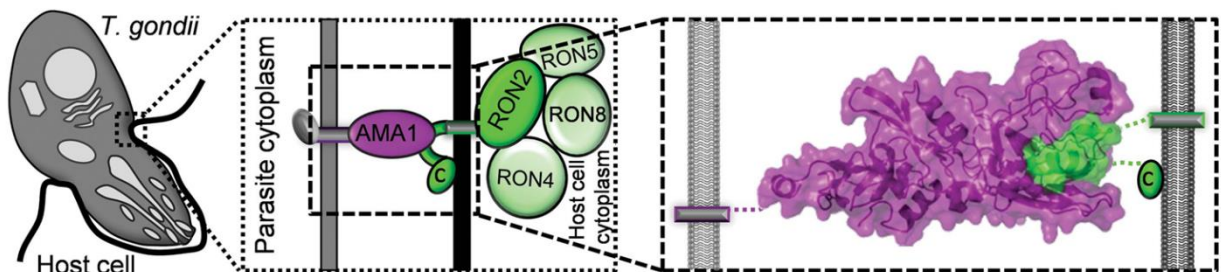
## III.2. Composition moléculaire de la jonction mobile

Jusqu'à récemment, la composition moléculaire de la JM était restée totalement énigmatique. Au cours des dix dernières années, diverses études ont permis d'élucider la composition moléculaire et structurale de la jonction, et son mécanisme de formation.

### III.2.1. AMA1 et les RONS

La nature moléculaire de la MJ a initialement été caractérisée chez *Toxoplasma gondii*. Suite à des expériences d'immunoprécipitation chez *Toxoplasma* avec des anticorps spécifiques, un complexe macromoléculaire de protéines de rhoptries, comprenant RON2, RON4, RON5 et RON8 (Alexander et al. 2005; Lebrun et al. 2005; Besteiro et al. 2009; M. H. Lamarque et al. 2014) a été identifié. Ces protéines sont sécrétées par les rhoptries à l'extrémité apicale du parasite et colocalisent avec la MJ lors de l'invasion, formant une structure en forme d'anneau caractéristique. Il a été démontré que l'antigène de micronème Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) interagit avec le complexe macromoléculaire de la MJ qui peut être isolé *in vitro* tandis que la protéine est sécrétée à la surface des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* sur les parasites extracellulaires, et est aussi être trouvée au niveau de la jonction au cours de l'invasion (Alexander et al. 2005; Lebrun et al. 2005; Besteiro et al. 2009).

Par la suite, il a été montré qu'au sein des complexes RONS c'est la région C-terminale de l'ectodomaine de RON2 qui lie la protéine AMA1 (M. Lamarque et al. 2011a; Tyler and Boothroyd 2011). Les protéines RON2, RON4, RON5, et des orthologues d'AMA1 peuvent être retrouvés dans le génome de différents *Apicomplexa* différentes que ce soit (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Neospora*, *Eimeria*, *Theileria*, et *Babesia*...). Cela suggère qu'une fonction de la jonction mobile est conservée au sein de ces parasites.



**Figure 11. Formation de la jonction entre le tachyzoïte et la cellule hôte.** Sécrétion et exportation des protéines de rhoptries (RON2, RON4, RON5 et RON8) à la membrane de la cellule hôte. AMA1 sécrétée à la surface du parasite, va venir se lier à RON2 pour former la jonction mobile et permettre l'entrée du parasite dans la cellule hôte (Tonkin et al. 2011).

En 2009, Besteiro et al ont proposé un mécanisme remarquable par lequel les parasites fournissent à la fois le ligand et le récepteur afin de former la jonction mobile entre la membrane de la cellule hôte et le parasite, lors de l'invasion (Besteiro et al. 2009) (Figure 11).

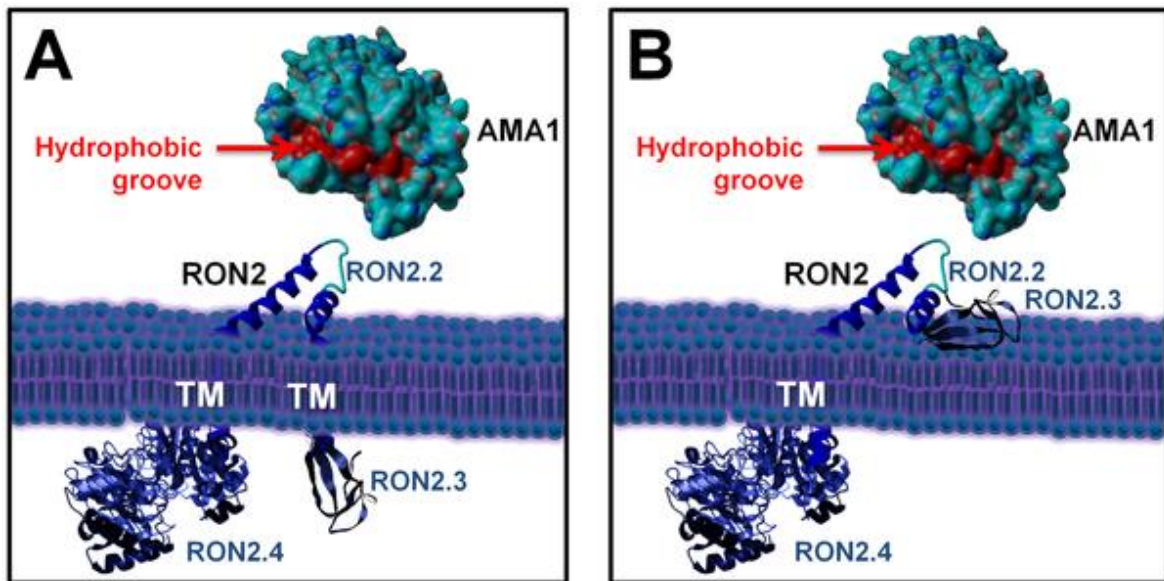
Après attachement du zoïte à la cellule, les protéines RONs sont sécrétées des rhoptries et exportées au niveau de la membrane de la cellule hôte. RON2 adopte une conformation transmembranaire de telle sorte que la boucle de la région C-terminale est exposée à la surface de la cellule hôte (M. Lamarque et al. 2011a; Srinivasan et al. 2011). Les protéines RON4 et RON5 (et RON8) ne présentent pas de régions transmembranaires et semblent localisées entièrement dans le cytosol de la cellule hôte, où elles pourraient interagir avec le cytosquelette de la cellule hôte (Riglar et al. 2011; Srinivasan et al. 2011; Takemae et al. 2013). Ce complexe pourrait fournir un lien physique entre le cytosquelette cortical des deux cellules pour servir de structure d'ancrage stable sur laquelle le zoïte peut exercer une traction (Hossain, Dhawan, and Mohammed 2012). AMA1 sécrétée à la surface du parasite vient se lier aux protéines de rhoptries RON2, permettant ainsi l'invasion du parasite dans la cellule hôte.

### III.2.2. Données de structures

AMA1 est une protéine membranaire de type I, conservée au sein du genre *Plasmodium* (Richard et al. 2010; Waters et al. 1990). La région extracellulaire se compose de trois domaines: le domaine I en N-terminal, le domaine central II, et le domaine III en C-terminal (Hodder et al. 1996; Nair et al. 2002).

Le domaine I est caractérisé par la présence d'un sillon hydrophobe (Bai et al. 2005; Lim et al. 2014). La nature topologique de ce creux chez *P. falciparum* est également conservée chez *P. vivax* (Pizarro et al. 2005) ainsi que chez *Toxoplasma gondii* (Crawford, Tonkin, et al. 2010), et contient un certain nombre de résidus qui sont conservés ou semi-conservés à travers les espèces de *Plasmodium*, ainsi que d'autres membres des *Apicomplexa* (Chesne-Seck et al. 2005). La région hydrophobe de DI est entourée d'une boucle formée dans le domaine DII, qui affiche une forte propension à la mobilité chez *P. falciparum* (Coley et al. 2007; Bai et al. 2005) et *P. vivax* (Pizarro et al. 2005). Chez *Toxoplasma gondii*, la boucle DII est constituée de 14 résidus plus courts que chez les orthologues de *Plasmodium*, ce qui les rend moins mobile.





**Figure 12. Modèle d'interaction entre AMA1 et RON2 au moment de la formation de la JM chez *Toxoplasma gondii*.** (A) avec le domaine C-terminal exposé à l'intérieur de la cellule hôte pour TgRON2, (B) avec le domaine C-terminal exposé à l'extérieur pour TgRON2. Les acides aminés du sillon hydrophobe sont colorés en rouge.

Chez *P. falciparum*, la boucle DII englobe les résidus 346 à 396 (soit 50 acides aminés) qui subit des changements de conformation importante ce qui révèle le site de liaison avec *PfRON2* dans le domaine I (Tonkin et al. 2011). La structure du complexe *PfAMA1* avec le peptide *PfRON2* cristallisée a montré une boucle DII désordonnée (Figure 12). L'absence de polymorphismes dans cette boucle DII suggère donc un rôle important pour cette sous structure (Chesne-Seck et al. 2005).

Grâce à la co-cristallisation AMA1-RON2 chez *Toxoplasma gondii* et *P. falciparum*, il a été mis en évidence une interaction de RON2 au niveau du sillon hydrophobe d'AMA1 (Tonkin et al. 2011; Vulliez-Le Normand et al. 2012). Ce résultat permet de renforcer le modèle d'interaction constituant le point d'ancrage de l'entrée du parasite dans la cellule hôte avec la formation d'une vacuole parasitophore (Besteiro, Dubremetz, and Lebrun 2011; Tyler and Boothroyd 2011; Baum and Cowman 2011; Mullard 2012). Cette association de haute affinité entre AMA1-RON2 permet ainsi de maintenir la liaison étroite hôte-parasite durant l'invasion.

### III.2.3. Données fonctionnelles : AMA1 et AMA1-like

#### La protéine AMA1

La protéine transmembranaire AMA1 est sans doute une des protéines les plus étudiées dans le phylum des *Apicomplexa*. Différentes études ont analysé le rôle d'AMA1 dans différents parasites que ce soit chez *Plasmodium* ou chez *Toxoplasma gondii*. L'ectodomaine d'AMA1 se lie étroitement avec la protéine RON2 (Tyler and Boothroyd 2011; M. Lamarque et al. 2011a), une protéine sécrétée par les rhoptries du parasite et localisée spécifiquement à la JM, où elle est insérée dans la membrane de la cellule hôte.

AMA1 est une protéine sécrétée par les micronèmes, et exportée à la surface du parasite. AMA1 fait partie de la jonction mobile, qui est un complexe essentiel pour l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *Plasmodium*, et les ligands qui perturbent la fonction d'AMA1 inhibent la croissance *in vitro* des stades sanguins de *P. falciparum* (Collins et al. 2007; Harris et al. 2009; Henderson et al. 2007; Vulliez-Le Normand et al. 2012). En outre, un knockdown conditionnel de *PfAMA1* voit sa capacité d'envahir les érythrocytes sévèrement altérée (Yap et al. 2014) et un knock-out du gène complet n'est pas viable pour *P. falciparum* (Triglia et al. 2000). Des anticorps dirigés contre AMA1 peuvent également bloquer l'invasion des érythrocytes par *P. falciparum in vitro* et contribuent à la réponse immunitaire adaptative qui protège partiellement les personnes exposées contre le paludisme (Kennedy et al. 2002; Dicko et al. 2007; M. D. Spring et al. 2009).

Des anticorps ou des peptides qui inhibent l'interaction AMA1-RON2 réduisent considérablement l'invasion des cellules hôtes par les mérozoïtes de *Plasmodium* (Silvie et al. 2004; Collins et al. 2009; Richard et al. 2010; Srinivasan et al. 2011; Srinivasan et al. 2013) et les tachyzoïtes de *Toxoplasma* (Tyler and Boothroyd 2011; M. Lamarque et al. 2011a).

D'autres études ont montré que des anticorps spécifiques d'AMA1 inhibent l'infection des hépatocytes humains par les sporozoïtes de *P. falciparum* dans un modèle *in vitro* (Silvie et al. 2004), et que la vaccination de souris contre AMA1 protège contre un challenge par sporozoïtes de *P. yoelii* (Schusseck et al. 2013). Plus récemment, une autre étude a montré qu'une immunisation par le complexe AMA1-RON2 permettait d'induire une meilleure protection chez la souris (Srinivasan et al. 2014).

En 2011, Giovannini et al ont obtenu un KO conditionnel du gène *ama1* chez *P. berghei* par délétion spécifique de la région non traduite en 3', utilisant un système de

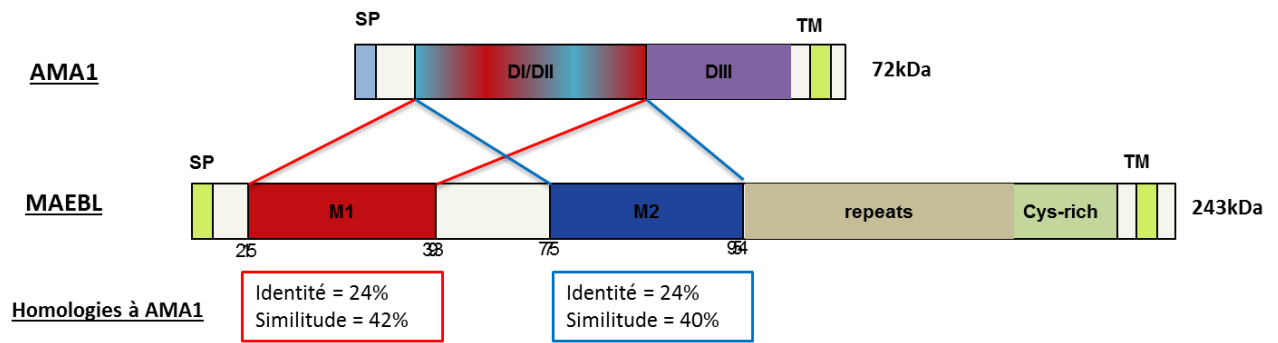


recombinase activée au stade sporozoïte. Les résultats ont montré que sans AMA1, les sporozoïtes mutants peuvent infecter efficacement les hépatocytes et s'y développer, mais que les mérozoïtes formés dans le foie sont incapables d'infecter les globules rouges (Giovannini et al. 2011). Plus récemment, la même équipe a rapporté l'obtention d'un KO d'*ama1* chez *P. berghei* (Bargieri et al. 2013a). Bien que l'isolement de clones mutants se soit révélé impossible, les auteurs ont observé une réduction partielle de l'invasion des mérozoïtes déficients en *ama1*, et confirmé l'absence d'impact de la délétion sur l'entrée des sporozoïtes. A l'inverse, une délétion de RON4 bloque l'invasion des mérozoïtes et des sporozoïtes (Giovannini et al. 2011). Face à ces résultats, les auteurs ont remis en cause de rôle d'AMA1 dans la formation de la jonction, et proposé qu'AMA1 joue plutôt un rôle d'adhésine en amont de la jonction (Bargieri et al. 2013a).

### **Les homologues d'AMA1**

Chez *Toxoplasma*, des clones défectifs pour *ama1* n'ont été que récemment décrits (Bargieri et al. 2013a; M. H. Lamarque et al. 2014). L'analyse phénotypique de ces mutants montre une réduction majeure de l'infection des cellules, mais la persistance d'une invasion résiduelle. Des études plus poussées ont montré qu'un homologue d'AMA1, AMA1-like ou AMA2, est surexprimé chez les mutants *ama1*-KO et peut compenser l'absence d'AMA1 et permettre au parasite d'envahir la cellule hôte par formation d'une jonction mobile via l'interaction avec RON2 (M. H. Lamarque et al. 2014). De façon remarquable, une double délétion d'AMA1 et AMA2 ne suffit pas à supprimer totalement l'invasion des tachyzoïtes, et chez ces mutants deux autres couples, AMA3-RON2L2 et AMA4-RON2L1, peuvent compenser l'absence d'AMA1/2-RON2 (M. H. Lamarque et al. 2014). Ces résultats illustrent les redondances des facteurs d'entrée et la plasticité de *Toxoplasma gondii*, qui possède plusieurs complexes lui permettant de former la jonction mobile et ainsi faciliter l'invasion.

Bien qu'il n'y ait aucun homologue d'AMA1 évident exprimé chez les espèces de *Plasmodium*, une protéine a été décrite comme paralogue à AMA1 : MAEBL (Membrane Antigen Erythrocyte Binding Like Protein) qui est une protéine de 243 kDa conservée chez *Plasmodium* (S. H. Kappe et al. 1998; Blair et al. 2002; Ghai et al. 2002). Cette protéine appartient à la famille des Erythrocyte Binding-Like (EBL). Elle possède des régions riches en cystéine, avec deux domaines M1 et M2 chacun possédant des similitudes avec les domaines I et II d'AMA1 (Figure 13) (S. H. Kappe et al. 1998).



**Figure 13. Homologie entre AMA1 et MAEBL.** Homologie entre les domaines DI/DII d'AMA1 et M1-M2 de MAEBL. Avec une identité de 24% et une similitude de 40-42% pour *P. falciparum*.

Les domaines de MAEBL M1 et M2 sont responsables de la reconnaissance d'un récepteur spécifique présumé (Ghai et al. 2002). Les deux domaines sont conservés, mais seul le domaine M2 de MAEBL semble être essentiel pour la liaison de son récepteur sur les érythrocytes (Ghai et al. 2002).

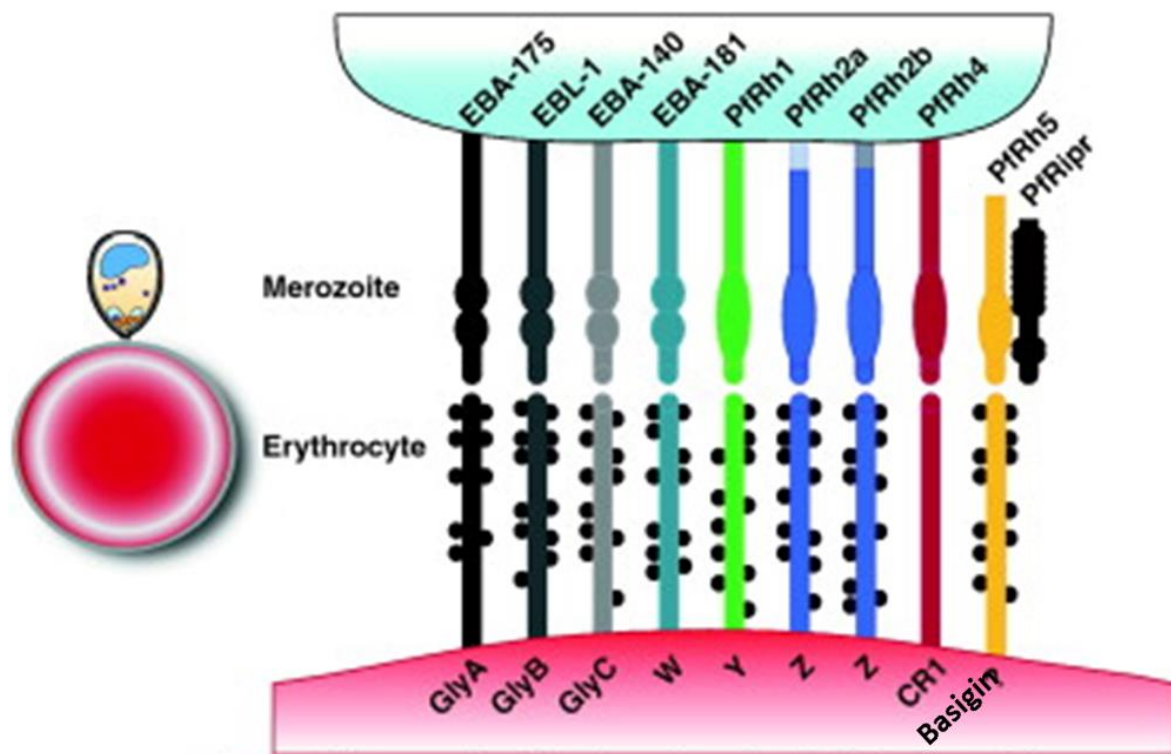
MAEBL est localisée au niveau des micronèmes puis sécrétée à la surface du parasite, et a un rôle dans la colonisation des glandes salivaires des moustiques, ce qui a été montré par délétion du gène chez *P. berghei* et *P. falciparum* (Kariu et al. 2002; Fu et al. 2005; Saenz et al. 2008). Des anticorps anti-MAEBL bloquent l'infection des hépatocytes *in vitro* (Preiser et al. 2004). Une étude plus récente, montre que l'immunisation avec le domaine M2 de *maeb1* de *P. yoelii*, permet d'inhiber de manière significative l'invasion *ex vivo* des mérozoïtes de ce parasite (Leite et al. 2015).

### III.3. Mécanismes d'activation impliqués en amont de la MJ

Les tachyzoïtes chez *Toxoplasma gondii* sont capables d'infecter de nombreux types de cellules. En revanche, les sporozoïtes et les mérozoïtes de *Plasmodium* sont très sélectifs, ils infectent les hépatocytes et les globules rouges, respectivement. Dans le cas des mérozoïtes, des interactions spécifiques entre des ligands parasitaires et des récepteurs érythrocytaires ont été caractérisées, et jouent un rôle clef d'activation en amont de la formation de la jonction, pour engager le mérozoïte dans le processus d'entrée. Dans le cas des sporozoïtes, des facteurs cellulaires ont été identifiés, mais les ligands du sporozoïte restent inconnus.

### III.3.1. Interactions ligands-récepteurs lors de l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes

L'invasion des érythrocytes par le mérozoïte a été étudiée en détail et les mécanismes moléculaires sont assez bien caractérisés. Il est aujourd'hui clair que le parasite établit de multiples interactions de type ligand-récepteur (Figure 14). Les ligands du mérozoïte appartiennent à deux familles principales : les protéines EBL (erythrocyte-binding like) et les protéines Rh (reticulocyte-binding-like homologue). Chez *P. falciparum*, Erythrocyte binding Antigen-175 (EBA-175) (Orlandi et al. 1990; Sim et al. 1994), interagit avec la glycophorine A (GYPA) (Pandey et al. 2002), EBA-140 (ou Bael) interagit avec la glycophorine C (Maier et al. 2003), et EBA-181 (ou Jesbl) avec un récepteur résistant à la trypsine, sensible à la neuraminidase (Gilberger et al. 2003) qui pourrait être la glycophorine B (Gaur et al. 2003) (Figure 14).



**Figure 14.** Les ligands-récepteurs spécifiques de *P. falciparum* sur les érythrocytes : Le bas de la figure représente la membrane de l'érythrocyte (en rouge) et le haut la membrane du mérozoïte (en bleu).

Les protéines Rh (PfRH1, PfRH2a, PfRH2b, PfRH4 et PfRH5) sont également impliquées dans l'invasion des mérozoïtes chez *P. falciparum* (Tham, Healer, and Cowman 2012). PfRH5 diffère des autres membres de la famille PfRH, d'une part par sa plus petite taille, d'autre part car le gène *Rh5* est essentiel, contrairement à tous les autres

ligands (Baum et al. 2009). Elle diffère également des autres PfrH par l'absence de domaine transmembranaire, et est maintenue à la surface des mérozoïtes en se liant à une protéine riche en cystéine (Baum et al. 2009; Hayton et al. 2008; Rodriguez et al. 2008; Wanaguru et al. 2013; Reddy et al. 2015; L. Chen et al. 2011; Weiss et al. 2015). Le récepteur de PfrH5 a été identifié comme étant la Basigine/CD147 (Crosnier et al. 2011; Bustamante et al. 2013; Forni et al. 2015).

La basigine est un membre de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) et est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques. Elle existe sous deux formes : une longue (trois domaines :IgSF-L) et une courte (deux domaines : IgSF-S), cette dernière étant l'isoforme principale exprimée sur les érythrocytes et qui interagit avec PfrH5 (Crosnier et al. 2013). La liaison basigine-RH5 semble essentielle à une étape juste en amont de la formation de la jonction mobile, impliquant l'ouverture d'un pore et un flux calcique à l'interface hôte-parasite (Weiss et al. 2015).

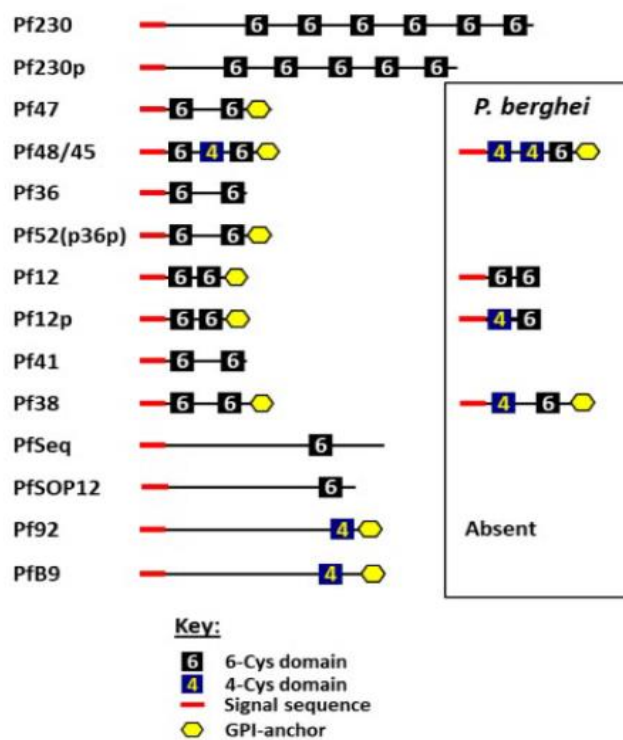
Le calcium est un des messagers précoces de la signalisation cellulaire des eucaryotes (Erxleben et al. 1997). Chez *Toxoplasma gondii* une augmentation du calcium intracellulaire déclenche la sécrétion des protéines de micronèmes du parasite et lui permet ainsi sa sortie de la cellule hôte (Carruthers, Giddings, and Sibley 1999; Lovett and Sibley 2003). Cela a aussi été montré chez *Plasmodium* (Singh et al. 2010). Les mécanismes de signalisation qui mènent à la libération des protéines d'invasion ne sont pas très clairs. De récents travaux ont montré que l'augmentation du calcium intracellulaire était une étape clé conduisant à la libération des protéines de micronèmes comme EBA-175, qui après interaction avec leurs récepteurs érythrocytaires conduisent à la libération de certaines protéines de rhoptries (Singh et al. 2010; Gao et al. 2013).

### **III.3.2. Protéines du sporozoïte impliquées dans l'invasion productive**

Les protéines parasitaires impliquées dans des interactions spécifiques de type ligand-récepteur au cours de l'invasion des hépatocytes restent à identifier, mais deux facteurs candidats ont été caractérisés, P52 et P36, appartenant à la famille des protéines à domaine « 6-cystéines ».

La famille à domaines 6-cys comporte 14 membres chez *Plasmodium* (Figure 15). Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine « 6-cys » d'environ 350 acides aminés, défini par la présence de 6 cystéines conservées engagées dans 3 ponts disulfures

qui contribuent à la structure tertiaire de ces protéines (Carter et al. 1995; Gerloff et al. 2005; Annoura et al. 2014; Parker et al. 2015). Ce domaine est typiquement présent en tandem. La plupart des protéines 6-cys sont exprimées d'une manière spécifique à certains stades du cycle de vie du parasite : gamétocytes, sporozoïtes ou mérozoïtes (van Schaijk et al. 2006; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b; Melissa R. van Dijk et al. 2005). Certaines de ces protéines jouent un rôle dans les interactions cellule-cellule, notamment P48/45 qui est impliquée dans l'adhérence entre les gamètes mâles et femelles (Roeffen et al. 1995; Severini et al. 1999; Talman, Blagborough, and Sinden 2010; Hirai et al. 2008; Hirai and Mori 2010).



**Figure 15. Caractérisation des protéines de la famille à domaine 6-cystéines de *Plasmodium*.** Représentation schématique de l'architecture des domaines des protéines de la famille à 6-cystéines de *P. falciparum* et particularités observées chez *P. berghei* représentées dans l'encadré. Les hexagones en jaunes représentent une séquence prédite d'ancrage GPI, la séquence signal en ligne épaisse rouge, les carrés noirs ou bleu représentent les domaines 6-cys (Annoura et al. 2014).

Situé à la surface du gamète, Pfs48/45 possède un ancrage GPI (Gilson et al. 2006), avec laquelle Pfs230, une protéine soluble, va s'associer (N. Kumar 1987). La suppression de *Pfs48/45* ou *Pfs230*, réduit considérablement la formation de zygotes (Eksi et al. 2006; M. R. van Dijk et al. 2001).

En plus de P48/45, cinq autres gènes sont transcrits dans les gamétocytes, dont trois (*p230*, *p230p*, *p47*) sont exclusivement exprimés dans ce stade du cycle de vie du parasite (Melissa R. van Dijk et al. 2005; Khan et al. 2005). Des anticorps spécifiques de P48/45 ou P230, peuvent empêcher la formation du zygote chez *P. falciparum* et ainsi bloquer la

transmission du parasite (Roeffen et al. 1995; Outchkourov et al. 2008). Une autre étude a montré que les parasites mutants pour P230 chez *P. falciparum* produisent des gamètes mâles qui ne parviennent pas à exflageller et ont par conséquent un défaut de production d'oocystes chez le moustique (Eksi et al. 2006).

Pfs47, un paralogue de Pfs48/45, se situe sur les gamètes femelles, sa suppression chez *P. berghei*, mais pas chez *P. falciparum*, réduit considérablement la formation d'oocystes dans le moustique (Melissa R. van Dijk et al. 2010; van Schaijk et al. 2006).

Malgré une grande divergence des séquences, la structure a été identifiée comme étant similaire à celle des protéines SRS (Surface antigen-1 (SAG-1)-related sequence (SRS)) chez *Toxoplasma gondii* (Crawford, Lamb, et al. 2010; Arredondo et al. 2012a). Une conservation spatiale des ponts disulfures a été observée, suggérant que les domaines 6-cys ont évolué à partir d'un ancêtre commun (Arredondo et al. 2012a).

P36 et P52 (aussi appelée P36p) sont conservées chez *Plasmodium* et exprimées spécifiquement au stade sporozoïte. Elles sont sécrétées par les micronèmes, et semblent impliquées spécifiquement lors de l'invasion productive. Une simple délétion du gène *p52* chez *P. berghei* et *P. falciparum* entraîne un défaut d'invasion et de développement du parasite dans les hépatocytes (Melissa R. van Dijk et al. 2005; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b; van Schaijk et al. 2008). Chez *P. yoelii*, la double délétion des gènes *p52* et *p36* entraîne le même défaut d'infection, associé à l'incapacité du parasite à former une vacuole parasitophore (Labaied et al. 2007).

Le gène *p52* de *Plasmodium*, code pour une protéine avec un ancrage GPI (Melissa R. van Dijk et al. 2005; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b), alors que le gène *p36* exprime une protéine soluble, qui pourrait s'associer à la membrane via P52. Une étude a montré que la délétion de l'un de ces gènes (*p36* ou *p52*) chez *P. berghei* entraîne une augmentation de la traversée cellulaire (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b) et un défaut d'invasion au stade hépatique, suggérant un rôle de ces protéines dans le passage du mode de traversée au mode d'invasion productive. Il faut noter que les mutants *p52/p36* produits chez *P. berghei* restent capables d'infecter les souris (Annoura et al. 2012), alors que les doubles mutants KO produits chez *P. yoelii* sont complètement atténués (Labaied et al. 2007). La fonction moléculaire de P36 et P52 reste à l'heure actuelle inconnue.

### III.3.3. Protéines de l'hôte impliquées dans l'infection du foie par *Plasmodium*

Si les facteurs parasitaires impliqués dans l'entrée restent à identifier, plusieurs protéines des hépatocytes ont été impliquées dans l'entrée des sporozoïtes, notamment 3 facteurs d'entrée du virus de l'hépatite C : la tétraspanine CD81, le scavenger recepteur BI (SRBI) et le récepteur d'Éphrine EPHA2.

CD81, initialement décrite comme récepteur hépatique pour la glycoprotéine d'enveloppe E2 du virus de l'hépatite C (Pileri et al. 1998), joue un rôle majeur dans l'infection par les sporozoïtes de *P. falciparum* et *P. yoelii* (Silvie et al. 2003; Silvie et al. 2006). CD81 est une protéine de 26kDa, qui appartient à la famille des tétraspanines, des protéines à quatre domaines transmembranaire retrouvées sur de nombreux types de cellules et impliquées dans divers processus biologiques tels que l'adhérence cellulaire, la migration, la fusion cellulaire, la co-stimulation, la transduction du signal et la différenciation cellulaire. Comme les autres tétraspanines, CD81 interagit avec de nombreux partenaires à la surface des cellules, notamment des intégrines et des molécules de la superfamille des immunoglobulines, au sein de microdomaines membranaires riches en cholestérol (Charrin et al. 2009). Les travaux du laboratoire ont montré que CD81 est nécessaire à l'infection par *P. falciparum* et *P. yoelii* (Silvie et al. 2003; Silvie et al. 2006). En revanche, *P. berghei* peut infecter les cellules en présence ou non de CD81 (Silvie et al. 2003). CD81 n'est pas impliqué dans la migration des sporozoïtes à travers les cellules mais est indispensable à la pénétration des parasites par formation d'une vacuole parasitophore, elle-même indispensable à la différenciation en mérozoïtes chez *P. falciparum* et *P. yoelii*. Les différentes études montrent l'existence de plusieurs voies distinctes d'invasion des sporozoïtes de *P. berghei*, qui sont capable d'infecter un large éventail de types cellulaire *in vitro* (Silvie et al. 2007).

En 2008, deux études ont montré l'importance de **SR-B1**, un autre récepteur de l'hépatite C, lors de l'infection par *Plasmodium*. Une première étude a montré que SR-B1 augmente de manière significative la permissivité des hépatocytes à l'entrée de *P. falciparum* et *P. yoelii* spécifiquement (Yalaoui et al. 2008), par utilisation d'anticorps ou de cellules knock-out. Ils ont également montré que SR-B1 agit via la régulation du cholestérol membranaire et de CD81, pour rendre la cellule hautement permissive à la pénétration du sporozoïte. L'importance de SR-B1 a également été montrée par l'utilisation d'ARN interférence pour l'infection de *P. berghei* dans des cellules Huh7, et la surexpression de SR-B1 a conduit l'augmentation de l'infection (Rodriguez et al. 2008).

CD81 n'est pas nécessaire à l'infection des Huh7 par *P. berghei* (Silvie et al. 2007), ce qui suggère un possible rôle de SRBI indépendant de CD81.

Une autre protéine cellulaire a été identifiée comme jouant un rôle dans l'invasion des sporozoïtes de *Plasmodium*, il s'agit du récepteur d'**éphrine A2** (EPHA2) présent à la surface des hépatocytes, et permettant la permissivité de ces cellules à l'infection par *Plasmodium* (Kaushansky et al. 2015). EPHA2 appartient à la sous-famille des récepteurs d'éphrine, une famille de protéines tyrosine kinases impliquées dans les interactions cellulaires. Kaushansky et collaborateurs ont montré que les cellules sur-exprimant EPHA2 étaient plus permissives à l'infection par *P. yoelii*, alors que l'infection est réduite chez les souris EPHA2<sup>-/-</sup> (Kaushansky et al. 2015). Les auteurs ont proposé un lien entre la protéine à domaine 6-cys P36 et EPHA2 au cours de l'infection des hépatocytes, mais l'importance fonctionnelle de EPHA2 et son éventuelle interaction avec P36 restent à démontrer.



# Objectifs

L'infection des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium* est une étape initiale et obligatoire du développement du parasite chez l'homme, et constitue une cible idéale pour des approches vaccinales contre le paludisme. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'entrée des sporozoïtes dans les hépatocytes restent très mal connus. Au cours de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes d'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes, avec les objectifs suivants :

1] Mise en place d'outils pour obtenir des parasites transgéniques fluorescents afin de suivre les différentes étapes d'invasion des parasites par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence.

Pour cela, nous avons développé une nouvelle stratégie, Gene Out Maker Out (GOMO), qui nous permet de modifier génétiquement le parasite tout en le rendant fluorescent (**Résultat 1**). Les protéines de rhoptries étant impliquées et sécrétées au moment de la formation de la jonction mobile, et par conséquent durant l'invasion productive, un étiquetage de ces protéines par mCherry chez *P. yoelii* nous a permis de suivre la sécrétion des rhoptries lors de l'invasion productive des cellules (**Résultat 2**).

2] Caractériser les cinétiques de traversée et d'invasion cellulaire des sporozoïtes.

Les parasites transgéniques fluorescents nous ont permis de différencier la traversée cellulaire de l'invasion productive dans le temps lors de l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes. Nous avons mis en évidence la formation de vacuoles transitoires durant la traversée cellulaire, sans sécrétion des protéines de rhoptries, donc mettant en jeu un mécanisme différent de l'invasion productive. Par la même occasion, nous avons découvert que les sporozoïtes utilisent la perforin-like protein 1 (PLP1), une protéine impliquée dans la traversée cellulaire, pour sortir de cette vacuole transitoire et échapper à la dégradation par les lysosomes cellulaires (**Résultat 3**).

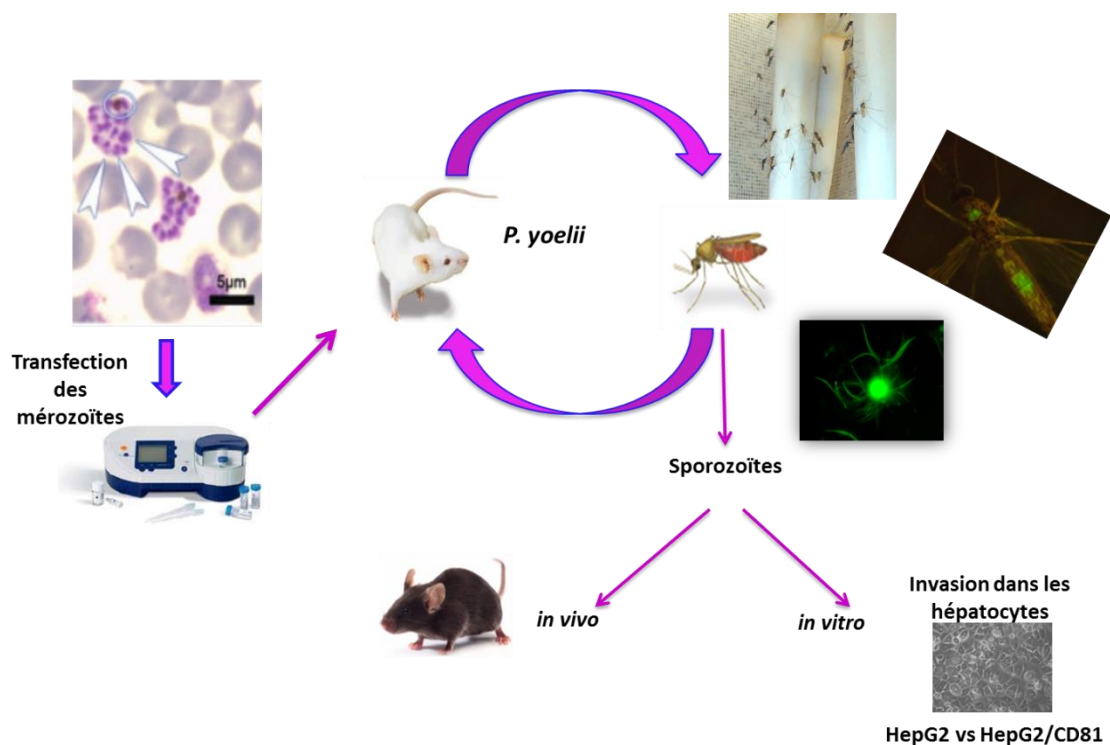
3] Etudier le rôle de protéines parasitaires sécrétées par les micronèmes au cours de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes.

À l'aide d'approches génétiques, nous nous sommes intéressés à trois protéines de micronèmes des sporozoïtes : AMA1, une protéine également exprimée par les mérozoïtes et impliquée dans l'invasion des globules rouges, et P52 et P36, deux protéines de la famille 6-cys impliquées dans l'infection du foie. Malgré la mise en place de nouvelles stratégies de génétique moléculaire, il nous a été impossible d'invalider le gène *ama1* chez les stades sanguins de *P. yoelii*, ce qui suggère un possible rôle essentiel lors de la phase érythrocytaire (**Résultat 4**). Par contre, nous avons pu générer et caractériser des parasites déficients pour les deux gènes *p52* et *p36*, chez *P. yoelii* et *P. berghei* (**Résultat 5**).

# **Modèles expérimentaux**

## I. Modèles parasitaires

Dans le cadre de ma thèse, j'ai travaillé sur les parasites de rongeurs *P. berghei* (souche de référence ANKA) et *P. yoelii* (souche de référence 17XNL), qui sont utilisés en routine du laboratoire. Ces parasites nous donnent accès au cycle entier du parasite : le stade sanguin dans la souris, le stade sporozoïte après infection de moustiques, et le stade hépatique avec infection de lignées cellulaires permissives à l'infection par ces parasites. Le laboratoire est équipé d'un insectarium où une colonie d'*Anopheles stephensi* est entretenue, pour permettre la production en routine des sporozoïtes de *P. yoelii* et *P. berghei*.



**Figure 16.** Le cycle complet du parasite rongeur *P. yoelii* réalisé en routine au laboratoire.

Ce modèle murin nous permet de modifier génétiquement le parasite aux stades sanguins, par recombinaison homologe après transfection. Les délétions de gènes cibles combinés à un marquage fluorescent sont possibles, dans le but de visualiser et d'analyser les interactions hôtes-parasites *in vitro* et *in vivo*. En particulier, nous avons développé une stratégie qui permet de déléter des gènes de manière successive après recyclage des marqueurs de sélection (Manzoni et al. 2014).

Ces délétions se font par introduction d'une construction ayant des domaines d'homologie en 5' et en 3' de part et d'autre du gène cible lors de la transfection. Ce vecteur permet

d'obtenir des parasites knock-out fluorescents (GFP) à tous les stades du cycle parasitaire, et sans cassette de résistance, permettant de réaliser de nouvelles modification génétiques du parasite. Les transfections sont réalisées avec les schizontes/mérozoïtes érythrocytaires (Figure 16). La sélection des parasites transgéniques est réalisée directement chez la souris, toujours au stade sanguin, par administration de drogues diluées dans l'eau de boisson. Les parasites recombinants sélectionnés peuvent ensuite être transmis aux moustiques. Au bout de 2 semaines pour *P. yoelii*, ou 3 semaines pour *P. berghei*, les sporozoïtes peuvent être isolés des glandes salivaires des moustiques infectés. L'utilisation de parasites fluorescents (GFP+ ou autre) facilite le suivi du développement du parasite dans le moustique. Ces sporozoïtes seront utilisés pour étudier le stade hépatique, en infectant des lignées cellulaires *in vitro* (HepG2/CD81 et sa lignée parentale HepG2) mais également *in vivo* par injection de sporozoïtes chez les souris (Bas droite de la figure 16).

## II. Modèles cellulaires

Le principal modèle cellulaire utilisé pour caractériser l'infection hépatique *in vitro* est le modèle HepG2/CD81. Cette lignée provient de la lignée de référence HepG2 (lignée d'hépatocarcinome humain), qui a été modifiée par transduction lentivirale pour exprimer le facteur d'entrée CD81, nécessaire à l'infection par *P. yoelii* (Silvie et al. 2003; Silvie et al. 2006).

Contrairement à *P. yoelii*, les sporozoïtes de *P. berghei* peuvent infecter les cellules hépatocytaires en l'absence de CD81, et se développent de façon efficace aussi bien dans les cellules HepG2 que dans les cellules HepG2/CD81 (Silvie et al. 2007).

Après infection par des sporozoïtes GFP+, les taux d'invasion peuvent être suivis par microscopie à fluorescence ou par FACS. Afin de visualiser l'invasion, les lignées cellulaires ont été transfectées avec un vecteur lentiviral (Vectalys) permettant l'expression membranaire de la protéine mCherry fusionnée à 20 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la neuromoduline. L'activité de traversée cellulaire est suivie par FACS après incorporation de dextran fluorescent (Prudêncio et al. 2008).

Le développement des sporozoïtes en EEFs est analysé par FACS ou par microscopie à fluorescence, typiquement à 24-36h pour *P. yoelii*. Un marquage en immunofluorescence par des anticorps anti-UIS4 permet de révéler la membrane de la vacuole parasitophore (Mueller, Labaied, et al. 2005; Mueller, Camargo, et al. 2005).

# Résultats

## Résultat 1

# **A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites**

Manzoni G\*, Briquet S\*, Risco-Castillo V, Gaultier C, **Topçu S**, Ivănescu ML, Franetich JF, Hoareau-Coudert B, Mazier D, Silvie O. (\*co-first authors)

**Scientific Reports 2014** Apr 23;4:4760

### **Contexte**

Les parasites de rongeurs tels que *P. berghei* et *P. yoelii* sont de bons modèles pour étudier les mécanismes d'invasion car le cycle complet de vie du parasite entre le moustique et l'hôte mammifère est obtenu au laboratoire. Il est aussi possible de modifier génétiquement ces parasites, par recombinaison homologue. Les manipulations génétiques chez *P. berghei* et *P. yoelii* sont réalisées sur les stades sanguins, et des étapes de sélection des parasites recombinants sont réalisées *in vivo* chez la souris. Les modifications génétiques comme la délétion des gènes (knockout) ou l'étiquetage de protéines d'intérêt sont des approches utiles pour décrypter la biologie du parasite. L'inactivation de gènes permet de comprendre le rôle des protéines codées par ces gènes dans le développement du parasite. L'ajout d'étiquettes permet d'obtenir des parasites fluorescents (fluorescence verte, GFP) et/ou luminescents à l'aide de la luciférase (LUC), largement utilisées pour analyser et visualiser les interactions hôte-parasite *in vitro* et *in vivo*. Cependant, plusieurs modifications génétiques successives sont actuellement difficiles à réaliser chez les *Plasmodium* de rongeurs en raison du nombre limité de drogues de sélection (en pratique seule la pyriméthamine est utilisée de façon efficace) et du nombre important de souris nécessaires particulièrement lors d'isolement *in vivo* de clones de parasites transgéniques. A l'heure actuelle, il n'existe que deux marqueurs de sélection, la forme modifiée de la synthase dihydrofolate-réductase-thymidylate (DHFR-TS) provenant de *Toxoplasma gondii* ou *P. berghei*, conférant une résistance à la pyriméthamine, et la DHFR humaine (hDHFR) conférant une résistance à la pyriméthamine ainsi qu'au composé WR99210 (de Koning-

Ward et al. 2000). La sélection avec ces deux drogues utilisées successivement n'est pas très efficace, et nécessite un grand nombre d'animaux avec un faible taux de réussite.

### Objectifs de l'étude.

Afin de générer de façon rapide des parasites génétiquement modifiés exprimant une cassette de fluorescence et dépourvus de gène de résistance, pour permettre des modifications ultérieures, nous avons développé une nouvelle stratégie, appelée GOMO (pour Gene Out Marker Out). Cette stratégie repose sur une double sélection positive et négative associée à une sélection des parasites recombinants par cytomètre en flux, pour obtenir *in fine* des parasites mutants dépourvus de marqueurs de sélection, de façon rapide et en utilisant un faible nombre de souris. Cette stratégie ouvre la possibilité d'effectuer ultérieurement de nouvelles modifications du génome du parasite.

### Résultats.

Nous avons assemblé des vecteurs pour la transfection qui contiennent d'une part une cassette de sélection par des drogues, d'autre part des cassettes de fluorescence. La cassette de sélection par des drogues code pour une protéine de fusion entre la DHFR humaine et yFCU, une protéine bifonctionnelle de levure (cytosine désaminase et uridylphosphoribosyl-transférase). Cette cassette confère à la fois une résistance à la pyriméthamine (gène *DHFR*, marqueur de sélection positive) et une sensibilité à la 5-fluorocytosine (5-FC) (gène *yFCU*, marqueur de sélection négative). En plus de la cassette hDHFR-yFCU, les vecteurs contiennent deux marqueurs de fluorescence, GFP et mCherry. Deux séquences identiques ont été introduites de part et d'autre des cassettes *DHFR-yFCU* et mCherry. Une recombinaison entre ces séquences entraîne l'excision de la cassette contenant les gènes *hDHFR-yFCU* et mCherry, dans le but d'obtenir un parasite sans marqueur de sélection, et n'exprimant qu'une cassette de fluorescence GFP ou GFP-LUC. La stratégie comporte quatre étapes successives de sélection : 1) sélection positive avec la pyriméthamine, 2) premier tri au cytomètre en flux des parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup>, 3) sélection négative avec le 5-FC et 4) passage au cytomètre en flux pour un deuxième tri des parasite GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>-</sup>.

Cette stratégie nous a permis d'obtenir rapidement des parasites transgéniques de rongeurs, *P. berghei* et *P. yoelii*, exprimant la GFP et /ou une protéine de fusion GFP-luciférase, permettant d'analyser le phénotype des mutants grâce à la fluorescence ou à l'imagerie en bioluminescence. La GFP est exprimée sous le promoteur de l'HSP70, qui permet une expression élevée de la protéine à tous les stades parasitaires, y compris les



sporozoïtes, et facilite l'analyse quantitative de l'invasion *in vitro*. L'expression de la luciférase permet une analyse qualitative et quantitative *in vivo* chez la souris vivante par bioluminescence.

Afin de valider cette stratégie, nous avons procédé à l'invalidation d'un gène décrit comme facultatif. Des études antérieures avaient montré aucun effet phénotypique de la délétion du gène *p230p* au cours du cycle de vie des parasites de rongeurs, *P. berghei* et *P. yoelii* (Melissa R. van Dijk et al. 2010). Les parasites génétiquement modifiés *P. berghei* et *P. yoelii* n'expriment plus ce gène, mais expriment la GFP et/ou la luciférase en l'absence de gènes de résistance aux drogues. Ces parasites sont désormais utilisés en routine au laboratoire et considérés comme des parasites contrôles.

Dans un deuxième temps, afin d'illustrer l'intérêt de la stratégie, le gène « *Sporozoite and Liver Stage Asparagin-Rich Protein* » (SLARP) a été invalidé chez *P. berghei*, pour générer des mutants exprimant la GFP et/ou la GFP-Luciférase. La protéine SLARP est exprimée au stade pré-érythrocytaire (sporozoïtes et formes exo-érythrocytaires) et est nécessaire pour le développement du parasite dans le foie. Les parasites mutants envahissent les cellules efficacement *in vitro*, mais disparaissent ensuite au bout de 24 heures d'incubation post-infection (Aly et al. 2008; Silvie, Goetz, and Matuschewski 2008). Les parasites obtenus grâce à la stratégie GOMO, nous ont permis d'observer l'arrêt du développement des sporozoïtes *PbΔSLARP-GFP in vitro* en temps réel par microscopie à fluorescence, mais également *in vivo* après injection de sporozoïtes *PbΔSLARP-GFP-LUC* dans la souris, par imagerie en bioluminescence.

Un intérêt de la stratégie GOMO est de permettre de recycler le marqueur de sélection par les drogues et de permettre de réaliser aisément une deuxième modification génétique. À partir des parasites exprimant la GFP, une deuxième modification du génome a été introduite afin d'étiqueter des protéines de rhoptries avec mCherry, dans le but de permettre de suivre la sécrétion de ces protéines de rhoptries lors de l'invasion des cellules par les sporozoïtes. Nous avons choisi d'étiqueter deux protéines du collet des rhoptries, RON2 et RON4, et une protéine du bulbe des rhoptries, RAP2/3 (Résultat 2). La stratégie GOMO a aussi été utilisée pour générer des parasites déficients pour la traversée cellulaire, par délétion du gène « *perforin-like protein 1* » (*plp1*) chez *P. yoelii* et *P. berghei*, et d'étiqueter des protéines de rhoptries avec mCherry chez les mutants knockout obtenus (Résultat 3). Enfin, nous avons utilisé la stratégie GOMO pour cibler des protéines des micronèmes potentiellement impliquées dans l'entrée des sporozoïtes, dont AMA1, MAEBL, et les protéines à 6-cystéines P52 et P36 (Résultats 4 et 5).

## Résultat 2

### **CD81 is required for rhoptry discharge during host cell invasion by *Plasmodium yoelii* sporozoites**

Risco-Castillo V, Topçu S, Son O, Briquet S, Manzoni G, Silvie O.

**Cellular Microbiology** 2014 Oct;16(10):1533-48

#### **Contexte**

Les mécanismes d'infection des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium* sont très mal connus. Dans d'autres modèles d'invasion, il a été montré que des protéines sécrétées à partir des organites apicaux parasites, et notamment des rhoptries, jouent un rôle dans la formation de la jonction mobile et de la vacuole parasitophore lors de l'invasion productive (Besteiro, Dubremetz, and Lebrun 2011; Shen and Sibley 2012) (Baum et al. 2008; Santos et al. 2009; Counihan et al. 2013). Les protéines rhoptries RON (« Rhoptry neck proteins »), et tout particulièrement RON2, localisées au niveau du col des rhoptries, participent à la formation de la jonction mobile (Lebrun et al. 2005; Alexander et al. 2005). A l'heure actuelle, la jonction mobile a été caractérisée chez *Toxoplasma* ou sur les mérozoïtes chez *Plasmodium*, alors que la formation de la MJ par les sporozoïtes n'a pas encore été caractérisée.

La protéine RON2, en particulier est insérée dans la membrane de la cellule hôte et peut interagir *en trans* avec la protéine AMA1 sécrétée par les micronèmes à la surface du parasite (Besteiro et al. 2009; Tonkin et al. 2011; Tyler and Boothroyd 2011). L'interaction RON2-AMA1 joue un rôle central lors de l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes de *Plasmodium* (Narum et al. 2008; Cao et al. 2009; Collins et al. 2009; Richard et al. 2010; M. Lamarque et al. 2011b; Srinivasan et al. 2011; Hossain, Dhawan, and Mohammed 2012). Les sporozoïtes de *Plasmodium* expriment également les protéines AMA1, RON2 et RON4 (Le Roch et al. 2003; Silvie et al. 2004; Srinivasan et al. 2004; Tufet-Bayona et al. 2009; Giovannini et al. 2011), ce qui suggère une implication de ces protéines dans l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*. Une autre protéine, la protéine Rhoptry Associated Protein 2/3 (RAP2/3), est présente dans les rhoptries des mérozoïtes et des sporozoïtes de *P. berghei* (Tufet-Bayona et al. 2009). La protéine RAP2/3 fait partie d'un complexe de protéines de faible poids moléculaire

composé de trois protéines du bulbe des rhoptries chez *P. falciparum*, RAP1, RAP2 et RAP3 (D. L. Baldi et al. 2000; Deborah L. Baldi et al. 2002). Contrairement à *P. falciparum*, qui expriment deux protéines RAP2 et RAP3, les protéines homologues sont codées par un seul gène (*rap2/3*) chez les *Plasmodium* de rongeurs. Tout comme RON2 et RON4 (Tufet-Bayona et al. 2009; Giovannini et al. 2011), le gène *rap2/3* est réfractaire à une délétion chez *P. berghei*, ce qui suggère un rôle essentiel de ces protéines au cours du développement des stades sanguins asexués du parasite. La fonction de RAP2/3 reste inconnue.

Afin de pouvoir visualiser les rhoptries des sporozoïtes, y compris lors de l'entrée, nous avons développé une stratégie d'étiquetage de RON2, RON4 et RAP2/3 chez *P. yoelii*. Grâce aux parasites *P. yoelii* exprimant la GFP, produit au laboratoire avec la stratégie GOMO, nous avons effectué un étiquetage par mCherry des protéines du col des rhoptries RON2 et RON4, ainsi que la protéine du bulbe des rhoptries RAP2/3. Notre objectif était d'utiliser ces protéines fluorescentes comme marqueurs pour observer la formation de la jonction et de la vacuole parasitophore. Nous avons utilisé ces parasites afin de mieux caractériser la contribution de CD81 durant l'infection par les sporozoïtes. CD81 a été identifié comme un facteur d'entrée crucial pour l'infection par *P. falciparum* et *P. yoelii* (Silvie et al. 2003). Il est impliqué dans la phase précoce de l'infection du foie (Silvie et al. 2003; Silvie et al. 2006), mais son rôle pendant la formation de la MJ ou la PV reste à être clarifié. Nous avons notamment évalué si CD81 pouvait être impliqué en amont ou pendant la formation de la MJ, ou à des étapes post-invasion, après la sécrétion des protéines de rhoptries.

## Résultats

En partant des parasites *P. yoelii* transgéniques exprimant la GFP (PyGFP), produits grâce à la stratégie GOMO décrite précédemment (Manzoni et al. 2014), nous avons introduit une modification supplémentaire consistant à étiqueter l'une des protéines de rhoptries par mCherry, pour obtenir des parasites exprimant une protéine RON2-, RON4- ou RAP2/3-mCherry. Nous avons ensuite analysé par microscopie à fluorescence l'expression des protéines de fusion lors du cycle de vie du parasite, et en particulier lors de l'infection des hépatocytes. L'analyse phénotypique a confirmé le développement normal des parasites transgéniques par rapport à la souche parentale. Nous avons montré que les trois protéines sont exprimées aux stades schizontes et mérozoïtes dans les érythrocytes isolés de souris infectées, ainsi que dans les sporozoïtes isolés de moustiques infectés.

Nous avons examiné plus précisément le devenir des trois protéines lors de l'infection des hépatocytaires, à l'aide d'un modèle *in vitro* de culture de cellules HepG2 versus HepG2/CD81. Nous avons observé une disparition de RON2 et RON4 après invasion productive, obtenue uniquement dans le HepG2/CD81. Au contraire, lors de l'invasion non productive des HepG2 on ne détecte pas de sécrétion des RONS. Contrairement aux RONS, dont le signal disparaît près l'entrée productive, RAP2/3-mCherry est détectée, de manière transitoire, dans la vacuole parasitophore, dont cette protéine pourrait constituer un marqueur précoce. RON2-mCherry et RON4-mCherry sont encore détectées dans les sporozoïtes au cours de l'infection des HepG2, mais pas à l'intérieur des cellules HepG2/CD81, ce qui permet de différencier spécifiquement l'invasion productive CD81-dépendante dans les hépatocytes. De même, la sécrétion de RAP2/3 dans la PV a été détectée que dans les HepG2/CD81 permissive et non dans les HepG2. Ces résultats permettent donc d'établir que CD81 joue un rôle à une étape précoce de l'entrée, probablement en amont de la sécrétion des rhoptries et de la formation de la jonction.

## Conclusion

Les parasites transgéniques exprimant des protéines de rhoptries marquées par la fluorescence représentent un outil unique pour analyser la sécrétion des rhoptries lors de l'invasion de la cellule hôte. Ces parasites offrent maintenant la possibilité de développer des approches d'imagerie en temps réel de la formation de la jonction mobile ainsi que l'étape précoce d'invasion des sporozoïtes, ce qui n'a jamais été réalisé jusqu'à présent.

## Résultat 3

### **Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles**

Veronica Risco-Castillo\*, **Selma Topçu\***, Carine Marinach\*, Giulia Manzoni, Amélie E. Bigorgne, Sylvie Briquet, Xavier Baudin, Maryse Lebrun, Jean-François Dubremetz and Olivier Silvie (\*co-first authors)

**Cell Host & Microbe** 2015 Oct 21. pii: S1931-3128(15)00388-1.

#### **Contexte**

L'invasion productive des hépatocytes par les sporozoïtes est précédée par une étape de traversée cellulaire, un processus où le sporozoïte rompt la membrane des cellules et glisse à travers leur cytoplasme (M. M. Mota, Pradel, et al. 2001). Plusieurs facteurs sont impliqués au cours de ce processus (Bhanot et al. 2005; T. Ishino et al. 2004; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b; Kariu et al. 2006; Moreira et al. 2008; Talman et al. 2011). Parmi ces facteurs, la protéine perforine-like protein 1 (PLP1), aussi appelée SPECT2, appartient à une large famille de protéines à domaine MACPF formant des pores (Kaiser et al. 2004), et dont l'activité membranolytique a été démontrée (Garg et al. 2013). Ishino et collaborateurs, ont proposé que le rôle de PLP1 est de perforer la membrane de la cellule hôte afin de faciliter l'entrée des parasites durant la traversée cellulaire (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b). Cependant, les mécanismes utilisés pour l'entrée et la sortie de la cellule durant la traversée cellulaire restent inconnus.

L'observation selon laquelle les sporozoïtes traversent plusieurs hépatocytes *in vitro* et *in vivo* avant l'étape d'invasion productive d'un hépatocyte cible, a conduit à l'hypothèse que la traversée cellulaire participe à l'activation du parasite pour l'invasion productive (M. M. Mota, Pradel, et al. 2001; Maria M. Mota, Hafalla, and Rodriguez 2002; Ute Frevert et al. 2005). Cependant, cette hypothèse a été remise en cause par l'observation que les sporozoïtes de *P. berghei* déficients pour la traversée cellulaire (par exemple après knockout de *plp1*) peuvent infecter et se développer dans les hépatocytes *in vitro* (T. Ishino et al. 2004; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b; Amino et al. 2008). Par contre, ces mutants présentent une réduction majeure d'infectiosité *in vivo* (T. Ishino, Chinzei, and

Yuda 2005b; Amino et al. 2008; Tavares et al. 2013). Ces résultats suggèrent fortement que le parasite utilise principalement la traversée des cellules dans sa progression à travers le derme et la barrière sinusoidale du foie, pour finalement atteindre les hépatocytes où il peut se développer. Une étude a révélé que les parasites déficients en *plp1* peuvent infecter les hépatocytes plus précocement que les parasites contrôles, suggérant que la traversée cellulaire pourrait retarder plutôt qu'activer l'invasion productive par le sporozoïte (Amino et al. 2008). Cependant, les cinétiques de traversée cellulaire et d'invasion productive n'ont pas été examinées en détail dans ces différentes études.

## Résultats

La combinaison de la nouvelle souche de *P. yoelii* *PyGFP*, exprimant la GFP de façon constitutive (Manzoni et al. 2014), et les lignées hépatocytaires HepG2 versus HepG2/CD81 (Silvie et al. 2006), nous a permis de caractériser les mécanismes temporels et moléculaires qui régissent la traversée cellulaire et l'invasion productive. La traversée cellulaire a lieu dans les deux lignées cellulaires alors que l'invasion productive est uniquement observée dans les HepG2/CD81, car CD81 est nécessaire à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* dans les hépatocytes (Silvie et al. 2003; Silvie et al. 2006; Risco-Castillo et al. 2014). La détection par cytométrie en flux de la prise de dextran fluorescent (rhodamine-dextran, RD) par les cellules traversées (M. M. Mota, Pradel, et al. 2001) permet de différencier la traversée cellulaire (entrée du RD dans la cellule au moment de la rupture membranaire par le sporozoïte) de l'invasion sans rupture membranaire (grâce à la fluorescence des parasites *PyGFP*). Cependant, le test au dextran, s'il permet de quantifier l'activité de traversée cellulaire, reste indirect, et la simple détection des parasites *PyGFP* ne suffit pas à différencier l'invasion productive des événements non-productifs. Pour pallier ce problème, nous avons développé un nouveau test basé sur l'analyse du développement des EEFs après dissociation et réensemencement des cultures infectées.

Nos résultats montrent que les parasites détectés dans les HepG2/CD81 à des temps précoces correspondent à des événements d'entrée non-productifs, et que l'invasion productive, caractérisée par le développement des parasites en EEFs, survient de manière retardée *in vitro*.

*P. yoelii* peut traverser les cellules HepG2 mais pas les infecter, car elles n'expriment pas le facteur d'entrée CD81. En analysant les cinétiques d'invasion dans ces cellules, nous avons observé un pourcentage élevé de cellules GFP-positives (envahie par un sporozoïte *PyGFP*) mais dextran-négatives à des temps précoces *in vitro*. Cette observation originale

implique que le parasite ne perce pas la membrane cellulaire au moment de l'entrée durant la CT, comme décrit jusqu'à maintenant (M. M. Mota, Pradel, et al. 2001; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b), et pourrait former des vacuoles non-productives. Nous avons pu confirmer l'existence de ces vacuoles non-productives par microscopie électronique et microscopie à fluorescence en utilisant des marqueurs membranaires de la cellule. Grâce à la vidéo-microscopie confocale, nous avons pu suivre la sortie de sporozoïtes de vacuoles non-productives. Ces données révèlent la formation d'une vacuole transitoire (TV) durant la traversée cellulaire. A l'aide des parasites *PyG(PV) FP* exprimant RON4-mCherry, nous avons pu observer que la formation de cette TV ne s'accompagne pas de la sécrétion des rhoptries, à la différence des vacuoles parasitophores productives. En outre, la membrane de la TV s'avère différente de celle de la PV, qui elle est remodelée, probablement lors de l'invasion à travers une jonction mobile.

Nous avons ensuite émis l'hypothèse que PLP1, qui est nécessaire pour la traversée cellulaire, pourrait être impliquée dans la sortie de la TV. Pour mieux évaluer son rôle, des parasites déficients pour *plp1* ont été générés à l'aide de la stratégie GOMO, chez *P. yoelii*. De manière très intéressante, une accumulation des parasites *PyΔplp1-GFP* a été observée dans les cellules HepG2, où l'invasion productive n'est pas possible. Nous avons montré que les sporozoïtes *PyΔplp1-GFP* sont bloqués dans les TV, ce qui montre que PLP1 n'est pas nécessaire pour l'entrée lors de la traversée cellulaire mais pour la sortie des vacuoles transitoires. Ces mêmes sporozoïtes bloqués dans la TV des cellules, ne pouvant se développer dans les HepG2, sont éliminés après fusion avec les lysosomes de la cellule.

## Conclusion

Nos résultats montrent l'existence d'une vacuole transitoire formée autour des sporozoïtes lors de la traversée cellulaire. Cette TV est différente de la PV tant au niveau de sa composition membranaire que dans son mécanisme de formation. Alors que la formation de la PV définit l'invasion productive et aboutit au développement du parasite, il n'y a pas de réplication du parasite dans la TV. Nos résultats révèlent donc que le parasite utilise la sortie de vacuoles non-productives ou le remodelage de la membrane des vacuoles productives comme moyens d'échapper aux défenses cellulaires de l'hôte.

## Résultat 4

### **Analyse génétique moléculaire d'AMA1 chez *P. yoelii***

#### **Introduction**

Les *Apicomplexa* sont des parasites intracellulaires qui envahissent obligatoirement une cellule hôte au cours de leur cycle de vie. Le mécanisme d'invasion des cellules hôtes est conservé chez ces parasites, et implique la formation d'une zone de fixation de l'extrémité apicale du parasite avec la membrane de la cellule hôte, conduisant à la formation d'une jonction mobile (Moving Junction, MJ). La MJ est un pont moléculaire entre le moteur sous membranaire d'actine-myosine du parasite et des récepteurs de la cellule hôte. Cet ancrage est stable et associée à la surface de la cellule hôte et du parasite pour permettre l'entrée et la formation d'une vacuole parasitophore. Ce processus d'invasion comprend une série d'étapes étroitement régulées. Des études chez *Toxoplasma* ont montré que la jonction mobile au niveau du site d'entrée du parasite implique une interaction entre AMA1 (apical membrane antigen 1), une protéine des micronèmes sécrétée à la surface des tachyzoïtes, et RON2, une protéine sécrétée des rhoptries et exportée à la membrane plasmique de la cellule cible sous la forme de complexes RONS (Alexander et al. 2005; Manzoni et al. 2014; Besteiro et al. 2009; M. H. Lamarque et al. 2014). RON2 se retrouve exposée à la surface de la cellule hôte pour servir de récepteur à AMA1 pour former la jonction (Alexander et al. 2005; Lebrun et al. 2005). AMA1 et les protéines RONS sont également présentes chez *Plasmodium*, notamment *P. falciparum* où un rôle similaire a été montré lors de l'entrée des mérozoïtes dans les globules rouges (Collins et al. 2007; Harris et al. 2009; Henderson et al. 2007; Vulliez-Le Normand et al. 2012). AMA1 a été décrit comme essentiel chez *P. falciparum*, où le gène est réfractaire à la délétion (Yap et al. 2014). De plus, des anticorps anti-AMA1 et des peptides interférant avec l'interaction AMA1-RON2 bloquent l'infection des globules rouges par *P. falciparum* (Triglia et al. 2000). AMA1 est considérée comme une cible potentielle pour des vaccins antipaludiques érythrocytaires.

À la différence de *Toxoplasma* ou des mérozoïtes de *Plasmodium*, les mécanismes d'entrée des sporozoïtes de *Plasmodium* sont bien moins connus, et la jonction formée par les sporozoïtes lors de l'infection des hépatocytes n'a jamais été caractérisée à ce jour. AMA1 et les RONS sont également exprimés par les sporozoïtes de *Plasmodium* (Tufet-Bayona et al. 2009). Un rôle d'AMA1 chez les sporozoïtes de *P. falciparum* a été suggéré



par l'observation que des anticorps anti-AMA1 bloquent l'infection d'hépatocytes humains par *P. falciparum* (Silvie et al. 2004). Cependant, une approche de KO conditionnel d'*ama1* chez *P. berghei* a montré que la protéine est essentielle au stade mérozoïte seulement, mais pas lors de l'entrée dans les hépatocytes, qui s'avère inchangée malgré la déplétion d'AMA1 (Giovannini et al. 2011). Plus récemment, la même équipe a rapporté l'obtention d'un parasite KO pour *ama1*, toujours chez *P. berghei* (Bargieri et al. 2013b). Les résultats confirment l'absence apparente de rôle d'AMA1 dans l'infection du foie, et montrent que les mérozoïtes de *P. berghei* KO pour *ama1* parviennent à infecter les globules rouges, même si les auteurs n'ont pas réussi à isoler de clones invalidés pour AMA1. Le gène *ama1* a également pu être délété de *Toxoplasma*, et les études phénotypiques ont montré que les tachyzoïtes mutants présentent une capacité d'invasion résiduelle >20% (Besteiro et al. 2009; M. H. Lamarque et al. 2014). Ces différents résultats ont amené certains à remettre en cause le rôle d'AMA1 dans la formation de la jonction mobile, non seulement chez les sporozoïtes mais plus généralement chez les zoïtes des Apicomplexa (Giovannini et al. 2011; Besteiro et al. 2009; M. H. Lamarque et al. 2014). Cependant, une autre étude plus récente a démontré que chez les mutants de *T. gondii* KO pour *ama1*, on observe une surexpression de gènes *ama1-like*, ce qui suggère que la fonction « AMA1 » est essentielle, mais peut être assurée par d'autres protéines homologues en l'absence d'AMA1, au moins chez *Toxoplasma* (M. H. Lamarque et al. 2014).

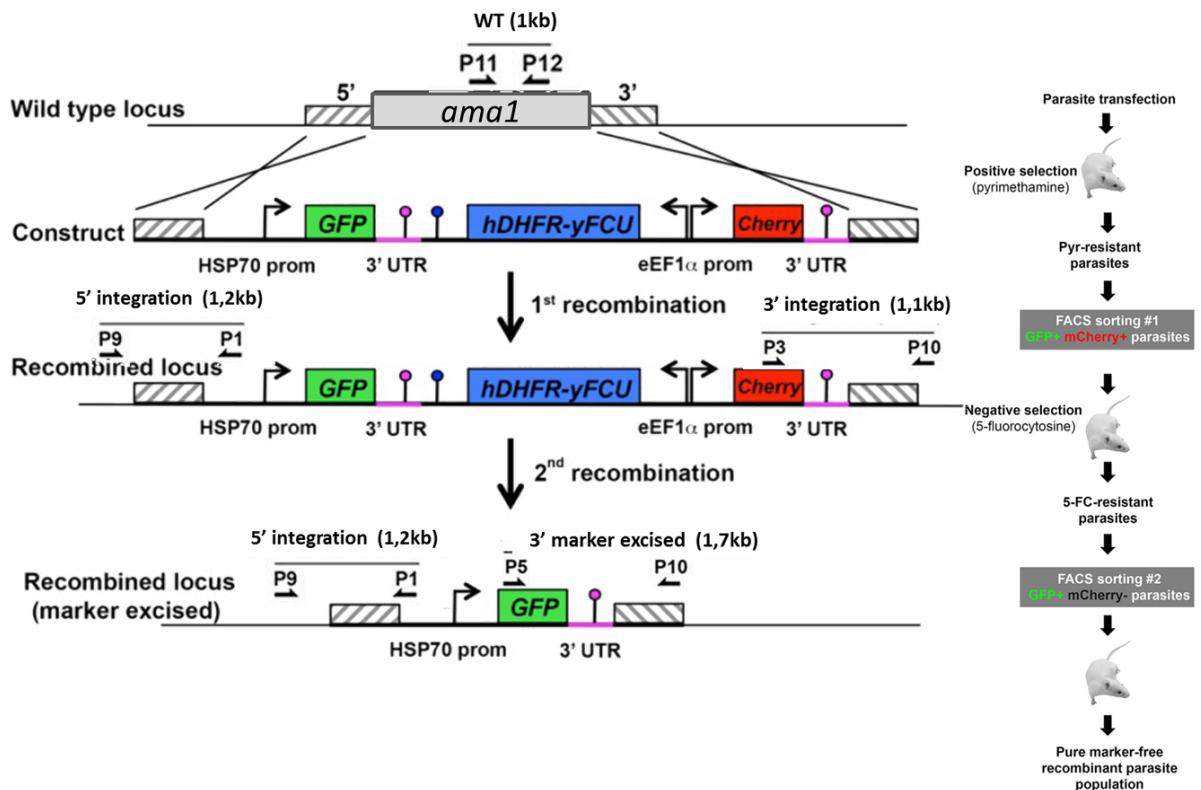
Les données sur le rôle d'AMA1 chez les sporozoïtes ne sont pas concordantes. D'une part des anticorps anti-AMA1 peuvent bloquer l'infection par des sporozoïtes de *P. falciparum* *in vitro* (Silvie et al. 2004) et de *P. yoelii* *in vivo* (Schussek et al. 2013). D'autre part, les sporozoïtes de *P. berghei* déficients en AMA1 ne présentent pas de défaut d'invasion (Giovannini et al. 2011; Bargieri et al. 2013b). L'ensemble des résultats publiés sur AMA1 suggère trois hypothèses : i) AMA1 pourrait jouer un rôle essentiel dans la formation de la jonction par *P. falciparum* et *P. yoelii*, mais pas *P. berghei*; ii) AMA1 est impliquée comme adhésine, en amont de la formation de la jonction des mérozoïtes, mais pas des sporozoïtes ; iii) les sporozoïtes infectent les hépatocytes sans former de jonction « conventionnelle ». Les études précédentes du laboratoire ont montré que contrairement à *P. berghei*, l'infection par *P. yoelii* et *P. falciparum* nécessite l'expression de CD81 à la surface des hépatocytes. Notre objectif a donc été de déterminer le rôle d'AMA1 dans l'invasion productive des sporozoïtes de *P. yoelii*, en utilisant des approches génétiques. En particulier, nous avons décidé de tenter d'invalider le gène *ama1* chez *P. yoelii*. Pour cela, nous avons successivement développé trois approches :

- 1) une approche directe de knockout par la stratégie GOMO
- 2) une approche en deux étapes (KIGOMO)
- 3) une approche basée sur CRISPR/Cas9 et la complémentation génétique

## Résultats et discussion

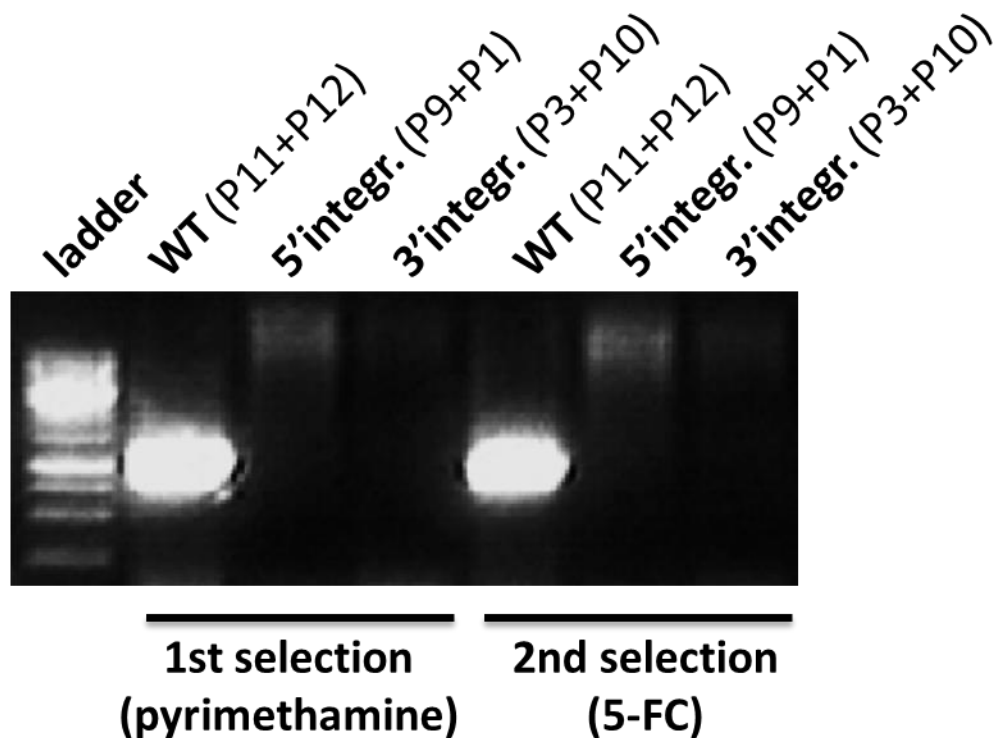
### 1. Stratégie directe de délétion du gène *ama1* chez *P. yoelii* par GOMO

Nous avons utilisé une approche directe pour exciser le gène *Pyama1*, ceci grâce à l'approche GOMO (*Gene Out Maker Out*), une stratégie mise en place au laboratoire (Manzoni et al. 2014). Il s'agit d'une approche rapide et efficace, permettant d'obtenir des mutants GFP+ et sans gène de résistance, et par conséquent remodifiable. Cette délétion repose sur la recombinaison homologue entre la séquence du gène cible dans le génome du parasite et une construction d'ADN qui contient une double cassette de sélection. Deux étapes de sélection, combinées à un tri par FACS des parasites, permettent d'obtenir rapidement des parasites fluorescents (Résultat 1 (Manzoni et al. 2014)).



**Figure 17. Stratégie GOMO (Gene Out Marker Out).** Insertion d'un plasmide avec des fragments d'homologie en 5' et 3' de part et d'autre du gène *ama1*, et contenant une cassette GFP sous le contrôle du promoteur PbHSP70, une cassette hDHFR-yFCU et une cassette mCherry. Ces deux dernières seront éliminées après recombinaison homologue à l'intérieur de la construction. Les fragments 3'UTR sont deux fragments homologues permettant d'exciser les marqueurs de résistance et la fluorescence mCherry. P1 à P12 sont les sites des amorces utilisées pour les PCR de génotypage (Manzoni et al. 2014).

Nous avons produit un vecteur plasmidique pour déléter le gène *ama1* chez *P. yoelii*, en introduisant deux fragments d'homologie 5' et 3' de part et d'autre de la cassette de sélection dans le plasmide GOMO-GFP. Puis une transfection chez *P. yoelii* par électroporation de schizontes purifiés a été réalisée, immédiatement suivie de l'injection des parasites transfectés chez une souris. Après traitement à la pyriméthamine, nous avons pu sélectionner des parasites résistants. Un premier tri a été réalisé afin de sélectionner les parasites ayant incorporé la construction (parasites GFP<sup>+</sup>/mCherry<sup>+</sup>). Après injection de ces parasites dans une nouvelle souris et traitement au 5FC, une deuxième analyse par FACS a été réalisée, dans le but de trier les parasites GFP<sup>+</sup>/mCherry<sup>-</sup>, qui correspondent aux parasites ayant intégré la construction et subi une recombinaison des fragments 3'UTR (en rose sur la figure 17). Dans les expériences de transfection réalisées avec cette construction, nous n'avons jamais pu observer de parasite GFP<sup>+</sup>/mCherry<sup>-</sup> après l'étape de sélection au 5FC, ce qui suggère que les parasites sélectionnés précédemment étaient uniquement des parasites porteurs de la construction sous forme épisomale. Cela a été confirmé par PCR, qui nous a permis de constater l'absence d'intégration de la construction dans le locus *ama1* (Figure 18).

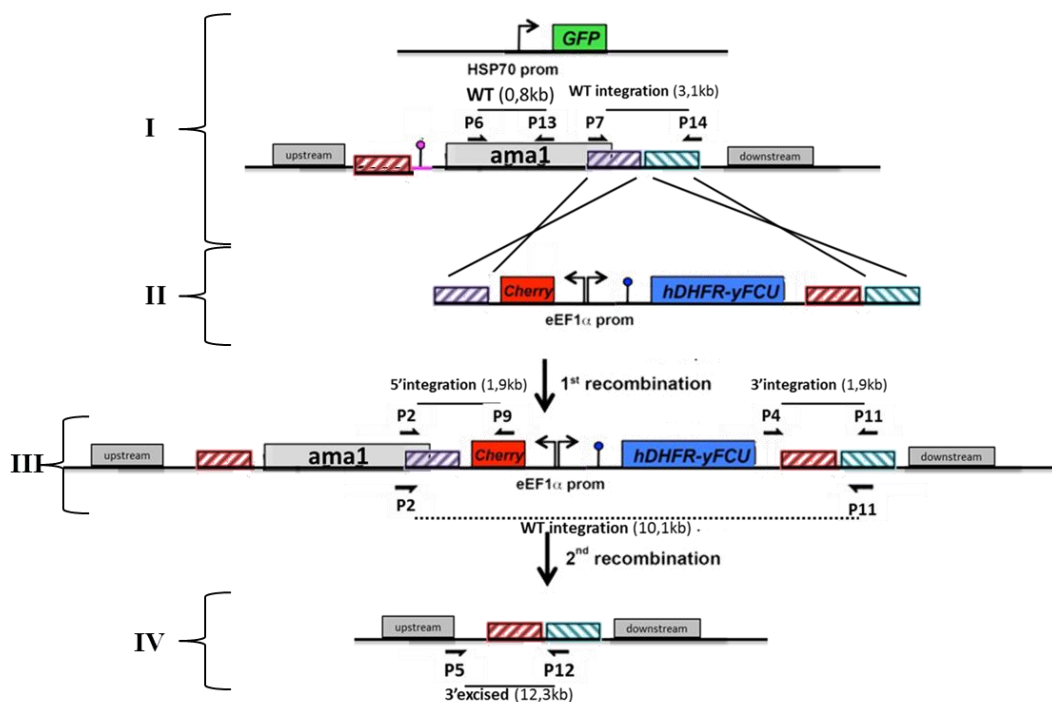


**Figure 18. Génotypage des parasites transfectés avec la construction GOMO-AMA1.** Analyse par PCR de l'ADN génomique isolé des parasites récupérés après la première étape de sélection positive avec la pyriméthamine (gauche de l'image) et après la deuxième étape de sélection négative avec le 5-FC (droite de l'image), après un tri des parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup> et GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>-</sup> respectivement, au cytomètre en flux. La présence de parasites WT (800-bp), et l'absence d'intégration en 5' (1200-bp) et en 3' (1100-bp) indique l'absence d'intégration de la construction dans le parasite. P1 à P12 représentent les amorces utilisées pour le génotypage, et sont représentées la figure 17.

## 2. Stratégie indirecte de délétion du gène *ama1* chez *P. yoelii* par KIGOMO

Face à l'échec de la stratégie GOMO ciblant *ama1* chez *P. yoelii*, deux hypothèses ont été envisagées : i) AMA1 est essentiel chez *P. yoelii* ; ii) la stratégie GOMO n'est pas assez efficace pour ce gène. En effet, comme pour toute stratégie de knockout par double recombinaison homologue, le rendement de GOMO est limité d'une part par le rendement de la transfection, d'autre part par le faible rendement de double recombinaison homologue.

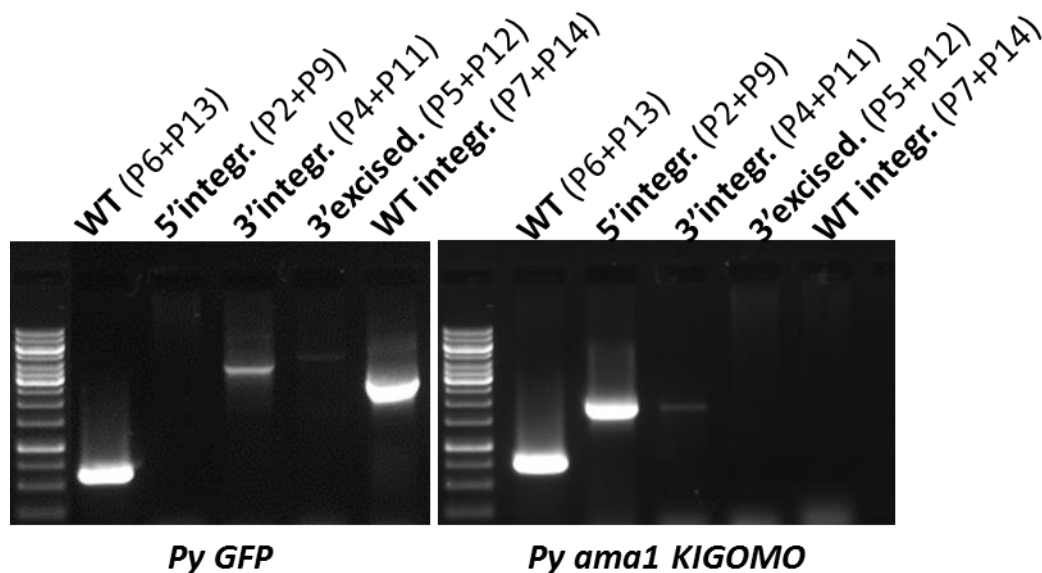
Afin d'augmenter le rendement de recombinaison, une nouvelle stratégie a été mise en place. Il s'agit d'une invalidation du gène de manière indirecte et en deux étapes : KIGOMO (Knock In Gene Out Marker Out). La première étape consiste en l'intégration de la construction (« KI »), en aval du gène *ama1*, sans invalider le gène, chez des parasites déjà GFP (PyGFP, locus *p230p*). La construction utilisée contient un gène de sélection négative (*yFCU*), une cassette de fluorescence rouge (mCherry) et un fragment d'homologie également présent en amont du gène (Figure 19). Après sélection des parasites ayant intégré cette construction en aval d'*ama1*, une deuxième étape de sélection (négative) par exposition au 5FC permet d'isoler des parasites ayant excisé la cassette *yFCU*, par recombinaison entre les deux séquences identiques, excisant de façon simultanée non seulement le gène *yFCU* mais aussi la cassette mCherry et le gène *ama1*.



**Figure 19. Génération de parasites *P. yoelii* $\Delta$ *ama1* avec la stratégie indirecte KIGOMO.** Après mise en culture, les parasites *PyGFP* (I) sont transfectés avec la construction KIGOMO (II), une première sélection positive avec la pyriméthamine suivie d'un tri au FACS permet de récupérer les parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup> (III). Après clonage des parasites, une deuxième étape de sélection négative avec le 5-FC permet en théorie d'obtenir des parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>-</sup> (IV), après excision du gène *ama1* et des cassettes *hDHFR-yFCU* et mCherry.

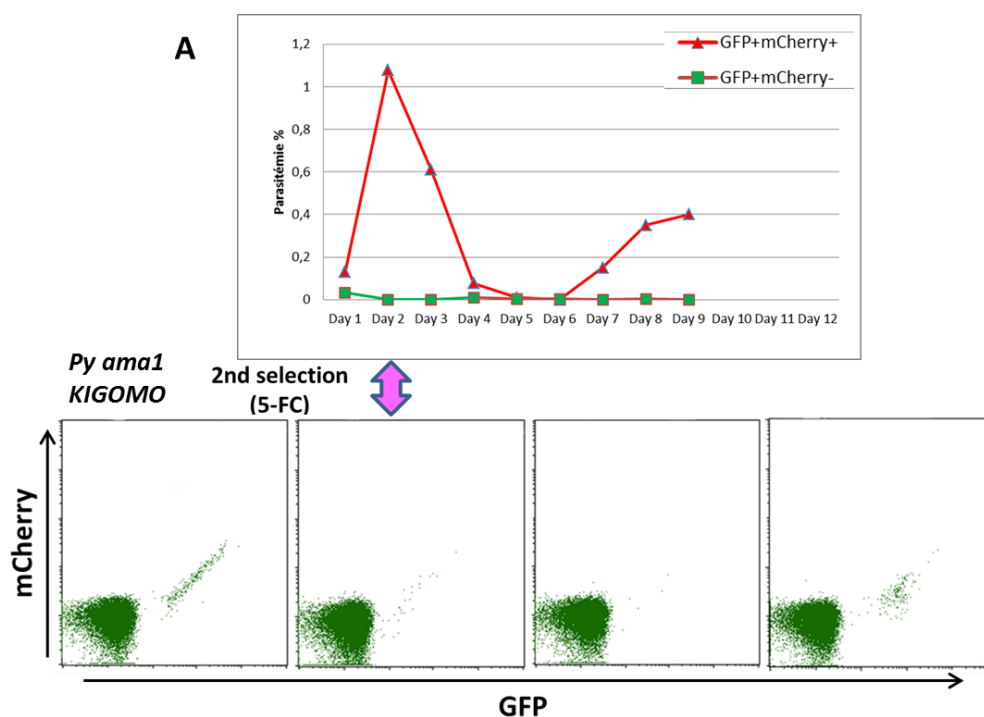
L'inconvénient de cette stratégie est de rajouter une étape de « knock-in » imposant un clonage des parasites recombinants avant la deuxième étape. Par contre, la stratégie KIGOMO permet d'améliorer le rendement de la recombinaison KO car lors de la deuxième étape nous partons d'une population totalement recombinante « knock-in » (ce qui équivaut à un rendement de transfection de 100%), et la recombinaison d'excision correspond à un simple crossing-over, plus fréquent que le double. La cassette GFP intégrée à un autre locus (P230p) permet de suivre les parasites, et la cassette mCherry permet de détecter les évènements de recombinaison avec perte d'*ama1* (perte concomitante de la fluorescence mCherry).

Afin de visualiser la première recombinaison après transfection, la parasitémie a été suivie par cytométrie en flux. Nous avons pu observer des parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup>, qui ont été isolés par tri au FACS (Figure 19, III). Le génotypage par PCR, à l'aide d'amorces spécifiques des différentes recombinaisons attendues, nous a permis de valider l'intégration de la construction chez les parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup> et l'absence (après clonage des parasites) d'une contamination par la population parentale n'ayant pas intégré la construction KIGOMO (Figure 19, III). Le locus *ama1* WT est toujours détecté à cette étape, puisqu'il ne s'agit alors que de l'étape « knock-in ».



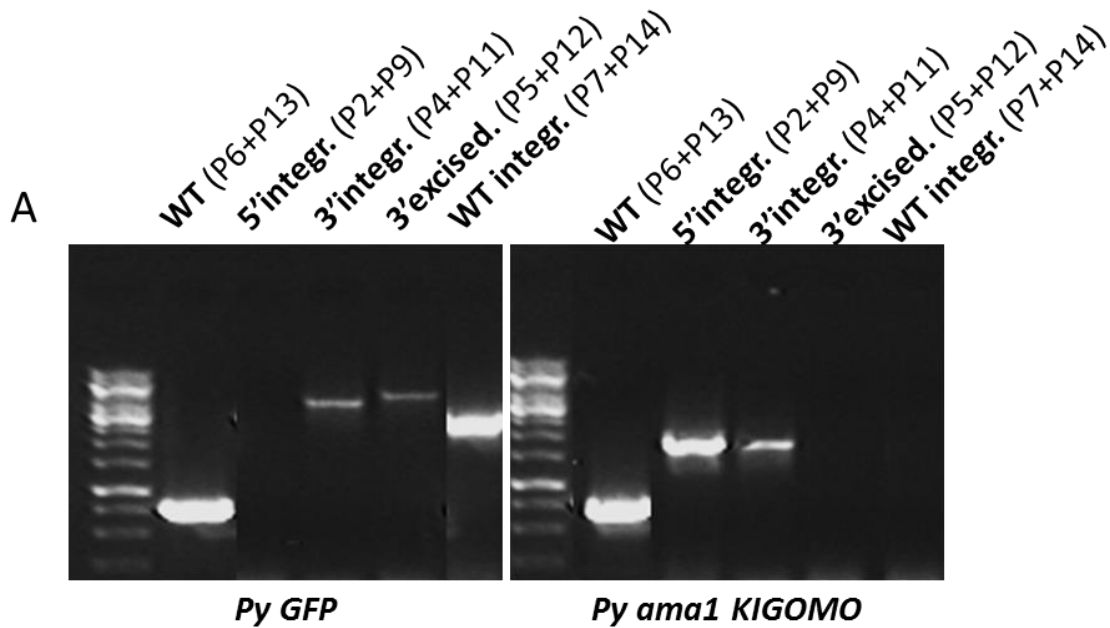
**Figure 20. Génotypage des parasites *P. yoelii* après transfection KIGOMO.** L'ADN a été préparé à partir de stade sanguin des parasites après traitement à la pyriméthamine et passage au trieur. Le génotypage par PCR confirme l'obtention de parasites KI (droite). La présence d'une bande WT reflète la présence d'AMA1 (791\_bp). Les autres combinaisons d'amorces utilisées sont spécifiques de l'intégration en 5' (1915-bp chez KI seulement), l'intégration en 3' (4270-bp chez le parasite WT, 1898-bp chez le KI), de l'excision (2743-bp après excision) et du locus WT pour les parasites contrôles n'ayant pas intégrés de construction (WT integr.). P1 à P12 représentent les amorces utilisés pour le génotypage, comme indiqué sur la figure 19.

Ensuite, les parasites recombinants KIGOMO (Figure 19, III) ont été traités avec la deuxième drogue (5-FC), afin de sélectionner des parasites knock-out (par excision des cassettes et du gène *ama1*). Une forte diminution de la parasitémie a pu être initialement observée sous 5FC, suivie d'une augmentation liée à l'apparition de parasites résistants au 5FC. Alors que nous attendions une population GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>-</sup>, seuls des parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup> ont été observés.



**Figure 21. Analyse au cytomètre en flux.** Après la première sélection avec la pyriméthamine et isolement de populations knock-in, les parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup> sont traités avec la seconde drogue 5-FC, afin d'obtenir une population ayant excisé le gène ainsi que les marqueurs de sélection. Après quelques jours de traitement la population émergente est une population GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup>, correspondant vraisemblablement à des parasites ayant acquis une résistance au 5-FC, sans excision de la construction.

Pour confirmer l'absence de parasites *PyΔama1* un génotypage a été réalisé après la première sélection à la pyriméthamine, ainsi qu'après la deuxième sélection au 5-FC. Les résultats du génotypage sont identiques avant ou après la deuxième sélection, montrant la présence de parasite exprimant *Pyama1*, ayant intégré la construction, mais n'ayant pas excisé ni le gène *Pyama1* ni les marqueurs de sélection (Figure 19-III).



**Figure 22.** Analyse de l'ADN génomique des parasites *P. yoelii* après 5-FC. L'ADN a été isolé des parasites au stade sanguin après traitement par 5-FC. Avec comme contrôle *PyGFP* à gauche de chaque analyse. Nous pouvons voir une bonne intégration en 5' et en 3' grâce aux différentes combinaisons d'amorces utilisées, ainsi que la présence d'*ama1* et l'absence de parasites n'ayant pas intégré la construction. Après la deuxième sélection au 5-FC, on retrouve le même génotype qu'après la première sélection avec la pyriméthamine.

L'expérience a été répétée, mais il nous a été impossible d'obtenir des parasites *Py $\Delta$ ama1* au stade sanguin (Figure 22). Face à l'échec de la stratégie KIGOMO, nous avons conclu qu'AMA1 est véritablement essentiel aux stades sanguins chez *P. yoelii*. En parallèle, nous avons utilisé l'approche KIGOMO avec succès pour invalider en deux temps les gènes *p52* et *p36* chez *P. yoelii* (voir résultats 5).

### 3. Combinaison de la stratégie CRISPR-Cas et KICAGOMO

Suite aux échecs des tentatives de knock-out d'*ama1* chez *P. yoelii*, nous avons décidé de développer une troisième approche, consistant à compléter le parasite par une copie épisomale du gène *Pyama1* pour permettre dans un deuxième temps l'élimination de la copie endogène par KI-GOMO. Notre objectif était d'obtenir des parasites déplétés en AMA1 au stade sporozoïte, grâce notamment à une expression conditionnelle de la copie épisomale additionnelle. Un problème cependant était

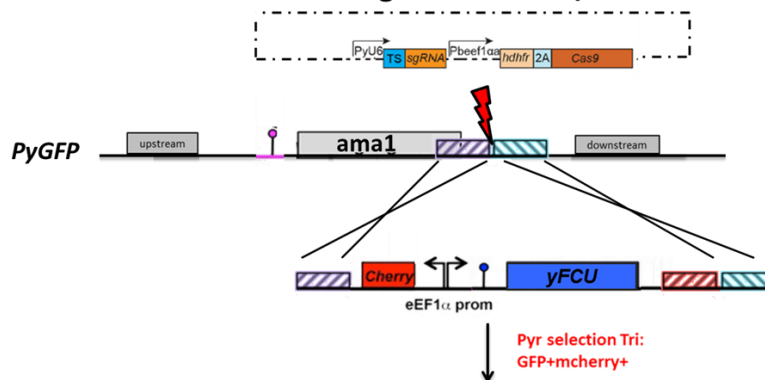
d'introduire deux modifications simultanément dans le génome de parasites GFP (PyGFP) - d'une part la construction knock-in (KIGOMO), d'autre part la construction épisomale à l'aide du seul facteur de sélection dont nous disposons, la pyriméthamine. Pour résoudre ce problème, nous avons choisi d'utiliser la technologie CRISPR/Cas9, afin d'obtenir l'intégration d'une construction KIGOMO modifiée, dépourvue de gène de résistance à la pyriméthamine.

Le système CRISPR a été découvert en 1987 chez *E. coli* (Y. Ishino et al. 1987). Cependant, l'intérêt de ces éléments génétiques a augmenté au début des années 2000 et plusieurs protéines associées au système CRISPR dont « cas » ont été décrites chez plusieurs procaryotes (Jansen et al. 2002; Mojica et al. 2000). Le système CRISPR-Cas9 est un mécanisme de défense adaptatif utilisé par les bactéries et les *Archaea* pour la dégradation du matériel génétique qui leur est étranger. Dans ces organismes, le matériel génétique étranger provenant d'un bactériophage est acquis et intégré dans le locus CRISPR (van der Oost et al. 2014; Hsu, Lander, and Zhang 2014; Jinek et al. 2012). Ce nouveau matériau, aussi reconnu comme un élément d'espacement (« spacer »), crée un fragment spécifique de la séquence utilisée pour la résistance contre une future infection bactériophage. Ces fragments spécifiques d'une séquence sont convertis en CRISPR contenant un fragment court d'ARNsg (crARNsg) et fonctionnent comme guide pour diriger le clivage de l'ADN complémentaire invasif par l'activité nucléase de la protéine associée Cas, également codée par le locus CRISPR (van der Oost et al. 2014; Hsu, Lander, and Zhang 2014). Ce système a été à l'origine d'une nucléase programmable qui peut introduire une coupure double brin (DSB : Double-Strand break) à un site spécifique sur un chromosome par l'expression hétérologue de deux composants : la nucléase cas9 et un ciblage par un guide unique d'ARN (ARNsg) (Jinek et al. 2012). L'ARN court synthétique est composé d'une séquence de liaison à la cas9 et d'un « spacer » de 20 nucléotides défini par l'utilisateur, correspondant à une séquence génomique dans le locus ciblé. La cassure double brin spécifique introduite par le système CRISPR/cas9 peut être réparée soit en activant la voie de réparation de l'ADN NHEJ (non-homologous end joining), qui permet d'introduire des délétions ou mutations au site de réparation (Bibikova et al. 2002), ou par recombinaison homologue par introduction d'une séquence donneuse (Urnov et al. 2005). Le système CRISPR/cas9 a désormais démontré son efficacité pour la manipulation génétique de nombreux organismes et a révolutionné de multitude de domaines de la recherche biomédicale (Mali, Esvelt, and Church 2013).

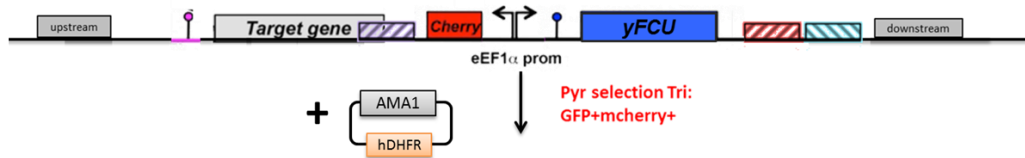


Le système CRISPR-Cas9 a été utilisé avec succès chez *P. falciparum* (Ghorbal et al. 2014) et *P. yoelii* (Zhang et al. 2014). Nous avons pu obtenir de l'équipe de Zhang et al le plasmide PYC, utilisé pour CRISPR chez *P. yoelii*. Ce plasmide contient une cassette d'expression de Cas9 et de la DHFR humaine, et un site d'insertion de l'ARNsg sous contrôle du promoteur U6 (Zhang et al. 2014). Des séquences d'ARNsg de 20 bases, avec un motif PAM (-NGG), spécifiques d'AMA1, ont été sélectionnées grâce à un programme développé par Cameron MacPherson (laboratoire Artur Scherf), et introduites dans le plasmide PYC (Zhang et al. 2014). En parallèle, nous avons modifié la construction KIGOMO pour remplacer la double cassette hDHFR-yFCU par une simple cassette yFCU.

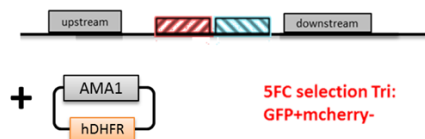
### Etape 1: insertion de la construction grâce à CRISPR/Cas9



### Etape 2: introduire une plasmide contenant une copie d'*ama1*



### Etape 3: procéder à une sélection négative pour éliminer du gène *ama1* endogène



**Figure 23. Stratégie KICA-GOMO : Knock-In Complementation assisted-Gene Out Marker Out avec la technique CRISPR/Cas9.** Génération de parasites *P. yoelii*  $\Delta$ *ama1* complétés avec un plasmide contenant une cassette d'expression d'AMA1. Après mise en culture, les parasites PyGFP sont transfectés avec la construction KIGOMO ainsi que CRISPR/Cas9, une première sélection positive avec la pyriméthamine permet de récupérer les parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup>. Après une deuxième transfection avec le plasmide codant *Pyama1* (sous forme d'épisome), une deuxième sélection avec la pyriméthamine va permettre de sélectionner les parasites portant l'épisome. La troisième sélection, négative, au 5-FC, va permettre de récupérer des parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>-</sup>, ayant excisé le gène *Pyama1* endogène et possédant uniquement la copie épisomale de *Pyama1*.

Le plasmide PYC-ama1 et la construction KIGOMO modifiée ont été transfectées simultanément dans des parasites GFP (PyGFP). Durant la transfection, le plasmide PYC va induire un clivage au locus PyAMA1, et le plasmide KIGOMO permet la réparation de la cassure en introduisant la construction en aval du gène *Pyama1*, comme dans l'approche décrite au chapitre précédent (Figure 23 étape 1). Une sélection à la pyriméthamine permet de sélectionner les parasites ayant d'une part incorporé le plasmide PYC (qui induit un clivage CRISPR-Cas au locus ama1), d'autre part la construction KIGOMO (pour réparer la cassure double brin) (Figure 23 fin de l'étape 1). **Les premières transfactions correspondant à cette nouvelle stratégie sont actuellement en cours.**

Les parasites recombinants ainsi obtenus seront ensuite maintenus sans pression de sélection, pour permettre la perte de la cassette CRISPR/Cas (épisomale). Après tri au FACS de parasites GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup>, nous réaliserons alors une deuxième transfection pour introduire une copie épisomale de PyAMA1 (Figure 23 étape 2). Enfin, une troisième étape de sélection négative par exposition au 5FC permettra de sélectionner les parasites ayant excisé la cassette yFCU, et de façon concomitante la copie endogène d'*ama1* et la cassette mCherry, pour obtenir une population finale de parasites GFP<sup>+</sup> mCherry<sup>-</sup>, n'exprimant que la copie épisomale de PyAMA1.

Afin de valider cette nouvelle stratégie, appelée KICAGOMO (knock-in complementation assisted gene out marker out), nous avons assemblé un plasmide de complémentation PyAMA1 centromérique, permettant le maintien stable de l'épisome (Iwanaga et al. 2010). En parallèle, nous avons produit différentes constructions de complémentations, qui nous permettront de manipuler la version épisomale de PyAMA1 : fusion PyAMA1-mCherry, PyAMA1 possédant des mutations à des sites potentiels d'interaction avec RON2. Des complémentations avec un promoteur spécifique du stade sanguin (MSP1) nous permettront d'induire une déplétion spécifique au stade sporozoïte, afin d'obtenir un knock-out conditionnel, et d'analyser le rôle d'AMA1 dans l'invasion des sporozoïtes de *P. yoelii* dans les hépatocytes. (Figure 16).

## Conclusion

Afin d'étudier le rôle de PyAMA1 chez les sporozoïtes de *P. yoelii*, nous avons initialement tenté d'invalider le gène, comme cela avait été décrit pour *P. berghei*. Malheureusement, deux stratégies successives, GOMO et KIGOMO, ne nous ont pas permis d'obtenir de mutants KO pour le gène *Pyama1*. Nous en avons déduit l'importance d'AMA1 pour la multiplication de *P. yoelii* aux stades sanguins.

Nous avons alors décidé de développer une approche CRISPR/Cas9 pour tenter d'obtenir un KO chez les sporozoïtes à l'aide d'une étape de complémentation transitoire au stade sanguin. Toutes les constructions ont été finalisées et des transfections sont en cours. Cette dernière stratégie devrait nous permettre d'obtenir des sporozoïtes déficients en AMA1, et d'étudier le rôle de cette protéine dans l'invasion des hépatocytes. Si la complémentation fonctionne, nous pourrions en outre étudier des versions modifiées d'AMA1, par exemple fusionnées à une protéine fluorescente ou encore mutées sur des résidus impliqués dans des interactions avec RON2.

## Résultat 5

### **The *Plasmodium* 6-cysteine protein P36 mediates CD81-independent entry of malaria sporozoites via SR-B1 in human host cells**

Giulia Manzoni, **Selma Topçu**, Chiara Andolina, Carine Marinach, Mirjam Zeisel, Thierry Huby, Matthieu Tolle, Sylvie Briquet, Jean-François Franetich, Julien Lescar, Eric Rubinstein, Georges Snounou, Dominique Mazier, François Nosten, Thomas Baumert, Olivier Silvie

(manuscrit en preparation)

#### **Contexte**

Le laboratoire a précédemment montré que la tétraspanine CD81, un des récepteurs du virus de l'hépatite C, joue un rôle majeur dans l'infection par les sporozoïtes de *P. falciparum* et *P. yoelii* (Silvie et al. 2003; Silvie et al. 2006). En particulier, les souris déficientes en CD81 sont totalement réfractaires à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*, et des anticorps ou des siRNA spécifiques de CD81 peuvent bloquer l'infection par *P. yoelii* et *P. falciparum*. CD81 est nécessaire pour l'entrée des sporozoïtes mais aucune interaction directe n'a été démontrée entre le parasite et CD81, ce qui suggère que CD81 intervient peut-être indirectement, via une ou plusieurs molécules associées au sein des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol (Charrin et al. 2009). En revanche, *P. berghei* peut infecter les cellules en présence ou non de CD81 (Silvie et al. 2003), en fonction du type cellulaire. CD81 est nécessaire pour l'infection par les sporozoïtes de *P. berghei* dans la lignée hépatique murine Hepa1-6, mais pas dans les cellules humaines, ce qui indique l'existence de voies alternatives d'entrée (Silvie et al. 2007). En 2008, deux études ont montré l'importance de **SR-B1**, un autre récepteur de l'hépatite C, lors de l'infection par *Plasmodium*. Une première étude a montré que SR-B1 augmente de manière significative la permissivité des hépatocytes à l'entrée de *P. falciparum* et *P. yoelii* spécifiquement (Yalaoui et al. 2008), par utilisation d'anticorps ou de cellules knock-out. Ils ont également montré que SR-B1 agit via la régulation du cholestérol membranaire et de CD81, pour rendre la cellule hautement permissive à la pénétration du sporozoïte. Plus récemment, une étude a montré que l'infection de souris humanisées par des sporozoïtes de

*P. falciparum* est inhibée par des anticorps anti-CD81 mais pas par des anti-SRBI (Foquet et al. 2015). Par contre, l'utilisation d'ARN interférence a révélé un rôle de SR-B1 pour l'infection de *P. berghei* dans des cellules Huh7, et la surexpression de SR-B1 a conduit à l'augmentation de l'infection (Rodriguez et al. 2008). CD81 n'est pas nécessaire à l'infection des Huh7 par *P. berghei* (Silvie et al. 2007), ce qui suggère un possible rôle de SRBI indépendant de CD81. Jusqu'à présent, les facteurs parasitaires impliqués dans l'utilisation de CD81 et/ou SR-B1 pour l'entrée des sporozoïtes n'étaient pas connus.

## Résultats

Grâce à une collaboration établie entre notre laboratoire et celui de François Nosten en Thaïlande, nous avons pu avoir accès à des sporozoïtes de *P. vivax*, et tester l'effet d'anticorps anti-CD81 et anti-SR-B1 sur l'infection d'hépatocytes primaires humains par ce parasite, en comparaison avec *P. falciparum*. Nous avons observé que des anticorps anti-CD81 n'ont aucun effet sur l'infection par *P. vivax* mais inhibent *P. falciparum*. Au contraire, des anticorps anti-SR-B1 inhibent l'invasion d'hépatocytes par les sporozoïtes de *P. vivax* mais n'ont aucun effet sur *P. falciparum* (ce qui confirme les résultats de Foquet et al). Ces résultats suggèrent un rôle indépendant de CD81 et SR-B1 lors de l'infection par *Plasmodium*. Pour étudier plus en détail le rôle de SR-B1 au cours de l'infection, nous avons utilisé *P. berghei*, qui a la faculté d'infecter les cellules par une voie CD81-indépendante. Dans les cellules HepG2, qui expriment SR-B1 mais pas CD81, nous avons observé une réduction majeure de l'infection après inhibition de SR-B1 par des anticorps ou des siRNA spécifiques. Par contre, ces mêmes inhibiteurs n'ont aucun effet dans les cellules HepG2/CD81, qui ne diffèrent des premières que par l'expression de CD81. Nous avons ensuite analysé le rôle de SR-B1 dans les cellules Hepa16, de *P. berghei* infecte via CD81 seulement (Silvie et al. 2007). De façon surprenante, nous avons découvert que les Hepa16 n'expriment pas SR-B1. Alors que des anticorps ou des siRNA ciblant CD81 murin bloquent efficacement l'infection de *P. berghei* dans les Hepa16, la transfection de CD81 humain ou de SR-B1 suffit à restaurer l'infection dans ces cellules. Ce résultat confirme que CD81 et SR-B1 définissent deux voies alternatives utilisées par *P. berghei* pour entrer dans les cellules.

Nos résultats suggèrent donc que *P. berghei* (et *P. vivax*) possèdent un ou plusieurs facteurs permettant l'entrée via SR-BI, facteur qui fait défaut chez *P. falciparum* et *P. yoelii*. Parmi les protéines candidates des sporozoïtes, nous nous sommes intéressés aux protéines à domaine 6-cys P52 et P36, dont le rôle au cours de l'infection avait été

démontré (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b). Grâce à la stratégie GOMO, nous avons invalidé les deux gènes chez *P. berghei* et *P. yoelii*, et analysé les cinétiques d'invasion et de traversée grâce au test au dextran. Nous avons observé que les mutants  $\Delta P52/\Delta P36$  ne présentent pas de modification de la traversée cellulaire, mais un défaut d'invasion productive, aussi bien chez *P. yoelii* que chez *P. berghei*. En analysant le phénotype des mutants *Py* $\Delta p52\Delta p36$  et *Pb* $\Delta p52\Delta p36$ , nous avons pu déterminer que la déplétion des deux protéines supprime l'entrée des sporozoïtes aussi bien via CD81 que via SRBI.

Afin de tester si P52 et/ou P36 contribuent au choix de la voie d'entrée, nous avons développé une approche par complémentation génétique chez les mutants, à l'aide de plasmides centromériques (Iwanaga et al. 2010) permettant l'expression de transgènes sous forme épisomale chez les sporozoïtes après transfection de mérozoïtes et passage au moustique. De manière remarquable, nous avons découvert que l'introduction de P52 et P36 de *P. berghei* chez le mutant *Py* $\Delta p52\Delta p36$  suffit à rétablir non seulement l'infection dans les HepG2/CD81 mais aussi dans les HepG2. Inversement, Les protéines P52 et P36 de *P. yoelii* introduites chez le mutant *Pb* $\Delta p52\Delta p36$  restaurent l'infection des HepG2/CD81 mais pas des HepG2. Ces résultats démontrent que P52 et/ou P36 de *P. berghei* mais pas *P. yoelii* sont associées à l'utilisation de la voie CD81-indépendante. Une étude de la contribution individuelle des deux protéines, toujours par complémentation génétique, nous a permis d'identifier P36 comme le facteur de *P. berghei* permettant l'infection en l'absence de CD81. Les mêmes expériences réalisées en présence d'anticorps bloquant SR-BI nous ont ensuite permis de démontrer que le mutant *Py* $\Delta p52p36$  complétement avec P36 (et P52) de *P. berghei* utilise SRBI pour infecter les HepG2, établissant un lien fonctionnel entre P36 et SRBI. P36 n'est probablement pas le seul facteur impliqué, car le mutant *Py* $\Delta p52p36$  complétement avec P36 de *P. berghei* utilise préférentiellement CD81 dans les HepG2/CD81, et le mutant *Pb* $\Delta p52p36$  complétement avec P36 de *P. yoelii* conserve une capacité résiduelle à infecter les HepG2.

## Conclusion

Pour la première fois, nous avons identifié une protéine des sporozoïtes, P36, comme associée fonctionnellement à l'utilisation d'un facteur d'hôte, SR-B1, pour l'entrée. Ces résultats ouvrent des perspectives nouvelles d'une part pour étudier les interactions moléculaires mises en jeu lors de l'infection du foie par *Plasmodium*, d'autre part pour développer de nouvelles approches vaccinales visant à bloquer l'entrée des sporozoïtes.

# Discussion

L'infection par *Plasmodium*, parasite responsable du paludisme, implique l'injection des sporozoïtes par un moustique anophèle. La première cible du sporozoïte est le foie, où le parasite se développe avant l'initiation d'une phase d'infection érythrocytaire symptomatique. Dans le foie, après une première étape de traversée cellulaire, les sporozoïtes infectent les hépatocytes en formant une vacuole parasitophore. Cette étape, appelée invasion productive, implique des facteurs parasitaires et des protéines de l'hôte, notamment CD81. Le parasite utilise plusieurs voies d'invasion dans la cellule hôte, mais les mécanismes exacts restent mal compris. Mes travaux de thèse visaient à améliorer notre compréhension des mécanismes d'invasion des sporozoïtes dans le foie, en s'intéressant plus particulièrement au rôle de plusieurs protéines des micronèmes des sporozoïtes : PLP1, AMA1, MAEBL, et les protéines à domaine « 6-cys » P52 et P36. J'ai utilisé les *Plasmodium* de rongeurs *P. berghei* et *P. yoelii*, qui nous permettent d'avoir accès en routine à tous les stades du cycle de vie du parasite, y compris aux sporozoïtes produits chez les moustiques.

## Chapitre 1. Développement de nouveaux outils pour l'étude de l'invasion

### 1.1. Aspects techniques

Le ciblage de gènes chez les *Plasmodium* de rongeurs a d'abord été mis au point chez *P. berghei* (R. Ménard et al. 1997), et a permis d'identifier les fonctions de différentes protéines à différents stades du cycle de vie du parasite. La génération de lignées de parasites exprimant la GFP chez *P. berghei* (Natarajan et al. 2001; Franke-Fayard et al. 2004) a permis d'ouvrir les champs de compréhension des processus biologiques fondamentaux du parasite. Au cours des quinze dernières années, de nombreuses études ont utilisé ces parasites pour comprendre les mécanismes d'invasion utilisés par *Plasmodium* dans le foie, aux stades sanguins ou chez le moustique (Frischknecht et al. 2004; Jerome P. Vanderberg and Frevert 2004; Vlachou et al. 2004; Franke-Fayard et al. 2005; Ute Frevert et al. 2005). Le ciblage de gènes chez *P. yoelii* a également été développé en 2001 (M. M. Mota, Thathy, et al. 2001), avec la production de souches exprimant la GFP tout au long du cycle de développement du parasite.

Afin de faciliter nos études de l'invasion de *Plasmodium*, nous avons généré de nouveaux parasites transgéniques exprimant la GFP à un haut niveau d'expression à tous



les stades du cycle, en particulier chez les sporozoïtes. Pour cela, nous avons développé une nouvelle stratégie, nommée GOMO (« Gene Out Marker Out »), qui consiste en une procédure de sélection rapide pour générer des parasites de *Plasmodium* recombinants sans marqueur de résistance aux drogues de sélection (Article 1, Figure 1). La stratégie combine une double sélection positive/négative et le tri des parasites rendus fluorescents par cytométrie en flux. Cette stratégie permet de minimiser le nombre de souris utilisées pour la transgénèse.

Grâce à la stratégie GOMO, nous avons pu générer différentes lignées transgéniques chez *P. berghei* et *P. yoelii*. Tout d'abord, en ciblant le gène *p230p*, un gène facultatif souvent utilisé comme locus d'intégration chez *P. berghei*, nous avons produit de nouvelles souches de référence exprimant la GFP, PbGFP et PyGFP. Ces nouvelles souches, dont nous avons vérifié le développement normal tout au long du cycle de vie du parasite, sont désormais utilisées en routine au laboratoire comme parasites contrôles.

Par ailleurs, nous avons produit plusieurs knockout de gènes impliqués dans la migration ou l'invasion des sporozoïtes: parasites  $\Delta plp1$  chez *P. yoelii* et *P. berghei*,  $\Delta maeb1$  chez *P. yoelii*, parasites  $\Delta p52\Delta p36$  chez *P. berghei* et *P. yoelii*. Tous ces parasites expriment la GFP à tous les stades du cycle de vie du parasite, ce qui facilite le suivi des infections, notamment chez le moustique ou encore dans les cultures cellulaires, où nous pouvons quantifier les taux d'infection des cellules par cytométrie en flux. Un avantage de la stratégie GOMO est de produire des mutants sans marqueur de résistance aux drogues de sélection. Cela nous a permis de réaliser des modifications génétiques supplémentaires dans ces lignées : étiquetage de protéines de rhoptries, mais également complémentation génétique des mutants  $\Delta p52\Delta p36$ .

L'étiquetage des protéines de rhoptries RON2, RON4 et RAP2/3 chez *P. yoelii* nous a permis de visualiser les rhoptries des sporozoïtes et étudier leur sécrétion. Nous avons ainsi montré que RON2-mCherry et RON4-mCherry ne sont plus détectées après invasion productive. RON2 et RON4 sont des protéines du col des rhoptries, probablement associées à la formation de la MJ. Nos résultats suggèrent donc une sécrétion massive des rhoptries des sporozoïtes lors de la formation de la jonction et de la vacuole. Jusqu'à présent, nous n'avons pas pu visualiser l'événement d'entrée lui-même, mais les parasites exprimant RON2-mCherry et RON4-mCherry seront des outils précieux pour développer des approches d'imagerie en temps réel de l'entrée. RAP2/3 est localisée dans le bulbe des rhoptries, et nos données suggèrent sa sécrétion lors de la formation de la vacuole parasitophore, où RAP2/3-mCherry est détectée de manière transitoire. Ces marqueurs nous ont permis de démontrer que la sécrétion des rhoptries est spécifiquement observée

lors de l'invasion productive dans les HepG2/CD81, et pas en l'absence de CD81 chez *P. yoelii* (Risco-Castillo et al. 2014).

GOMO est une stratégie qui permet d'obtenir des parasites génétiquement modifiés exprimant un marqueur de fluorescence, sans gène de résistance, de façon rapide et en limitant le nombre de souris nécessaires pour la production des mutants. Afin d'améliorer encore cette stratégie, nous avons décidé de la combiner avec la technologie CRISPR/Cas, utilisant une endonucléase bactérienne (coupant l'ADN à un endroit précis) appelée Cas9, guider vers des sites spécifiques du génome cible grâce à de petits ARNs non codants. La stratégie CRISPR/Cas devrait nous permettre de générer des parasites transgéniques encore plus rapidement, en insérant directement une cassette de fluorescence en remplacement d'un gène d'intérêt, ciblé grâce à CRISPR/Cas.

## **1.2. Nouvelles données sur les cinétiques d'infection des sporozoïtes**

Grâce à la nouvelle lignée fluorescente PyGFP, et en utilisant deux lignées hépatocytaires permissives (HepG2/CD81) ou non (lignée parentale HepG2) (Silvie et al. 2006), nous avons pour caractérisé les mécanismes cellulaires et moléculaires de la traversée cellulaire et de l'invasion productive, en utilisant un test au rhodamine-dextran comme marqueur de l'activité de transmigration. Les cinétiques de traversée cellulaire des parasites *PyGFP* sont identiques quel que soit le type cellulaire utilisé (HepG2 versus HepG2/CD81), ce qui confirme que CD81 n'intervient pas lors de la traversée des cellules. L'analyse par FACS des cinétiques d'invasion dans les HepG2/CD81 montre un délai de 30-60 minutes avant l'activation de l'invasion productive. Ce délai est observé indépendamment de la traversée cellulaire, et pourrait correspondre au temps d'activation nécessaire au parasite lors de la migration de la peau jusqu'au foie.

En comparant les cinétiques d'invasion des sporozoïtes GFP dans les HepG2 par rapport aux cellules HepG2/CD81, nous avons mis en évidence la formation de vacuoles transitoire durant la traversée cellulaire. Les sporozoïtes de *Plasmodium* peuvent envahir les cellules soit en formant une vacuole transitoire pendant la traversée, soit établir une vacuole parasitophore dans lequel ils vont se développer pour former des formes exo-érythrocytaires.

L'entrée des sporozoïtes dans les vacuoles non répliquatives se produit indépendamment de CD81 et sans décharge des rhoptries, tandis que la formation de PV nécessite la présence de CD81 à la surface de la cellule hôte (pour *PyGFP*), et

s'accompagne de la sécrétion des protéines de rhoptries (Silvie et al. 2003; Risco-Castillo et al. 2014). De plus, nos données montrent que la formation de TV se produit sans remodelage de la membrane de la vacuole, qui présente une composition similaire à la membrane plasmique de la cellule. En revanche, la formation de la PV est associée à une exclusion des protéines membranaires de l'hôte, probablement par partition moléculaire au moment de l'invasion au niveau de la jonction mobile, comme décrit précédemment chez *Toxoplasma* (Charron and Sibley 2004).

## Chapitre 2. Rôle de la perforine parasitaire PLP1

### 2.1 Résumé des données

Jusqu'à maintenant, la traversée cellulaire des sporozoïtes a été décrite comme un mode d'entrée du sporozoïte avec perforation de la membrane cellulaire, suivie de la migration du parasite à travers le cytoplasme de la cellule traversée. PLP1 est nécessaire pour la traversée des sporozoïtes (M. M. Mota, Thathy, et al. 2001; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005a). L'analyse des cinétiques d'invasion des mutants *PyΔplp1* dans les cellules non permissives HepG2 a révélé qu'en l'absence de PLP1 les sporozoïtes s'accumulent dans des vacuoles non productives. Ce résultat illustre que PLP1 est nécessaire non pas pour l'entrée dans les cellules traversées mais pour la sortie des sporozoïtes des vacuoles transitoires. Il a été proposé que la traversée active les sporozoïtes pour permettre l'invasion productive (Maria M. Mota, Hafalla, and Rodriguez 2002). Cependant, les parasites déficients pour la traversée chez *P. berghei* (T. Ishino et al. 2004; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005a) infectent normalement les hépatocytes *in vitro*, montrant que le contact préalable avec le cytoplasme de la cellule hôte n'est pas requis pour l'activation du parasite. Une autre étude a indiqué que la traversée des cellules retarde l'invasion productive, en s'appuyant sur l'observation que les sporozoïtes *PbΔplp1* envahissent les cellules plus rapidement que les parasites témoins (Amino et al. 2008). Nous avons aussi observé que les sporozoïtes *PyΔplp1* et *PbΔplp1* envahissent les cellules plus rapidement, mais nos données montrent clairement que ces événements précoces sont non productifs. L'invasion productive se produit après un retard important chez les deux parasites, *PyGFP* et *PyΔplp1*, ce qui suggère que la migration transcellulaire n'a pas d'impact en elle-même sur l'activation du parasite. L'apparition retardée de l'invasion productive que nous observons *in vitro* est compatible avec le besoin physiologique du parasite de migrer à

partir du site d'infection dans la peau vers le foie, où il va pouvoir se répliquer *in vivo*, ce temps de migration pouvant atteindre une heure ou plus (Yamauchi et al. 2007).

## 2.2. Mécanismes de traversée cellulaire

Nous avons mis en évidence un nouveau rôle de la perforine PLP1 chez les sporozoïtes, dans la sortie de la vacuole transitoire lors de la traversée cellulaire. PLP1 (« Perforin-Like Protein ») appartient à la famille des protéines à domaine MACPF (« Membrane Attack Complex/Perforin ») (Kaiser et al. 2004). Plusieurs protéines PLP ont été impliquées dans des évènements de sortie cellulaire chez les Apicomplexa, comme PLP2 qui joue un rôle dans la perméabilisation de la membrane des érythrocytes pendant la sortie des gamétocytes chez *P. falciparum* et *P. berghei* (Deligianni et al. 2013; Wirth et al. 2014). Plus récemment, un rôle de PLP1 dans la sortie des mérozoïtes des érythrocytes infectés par *P. falciparum* a été proposé (Garg et al. 2013). De manière intéressante, des études antérieures de protéomiques chez *P. falciparum* ont identifié PLP1 au stade de sporozoïte uniquement (PlasmoDB.org), et une délétion de ce gène chez *P. berghei* (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b) et *P. yoelii* (Risco-Castillo et al. 2015) n'ont montré aucun défaut de croissance des parasites dans les érythrocytes, excluant ainsi tout rôle essentiel de la protéine PLP1 aux stades sanguins des parasites de rongeurs. Chez *Toxoplasma gondii*, TgPLP1 intervient dans la sortie rapide des tachyzoïtes de la cellule hôte après sa répllication, et est impliquée dans la perméabilisation à la fois de la membrane de la PV et de la membrane de la cellule hôte (Kafsack et al. 2009).

En plus des protéines PLP1/SPECT2, d'autres protéines parasitaires sont impliquées dans la traversée des cellules par les sporozoïtes, dont SPECT, GEST et CelTOS. La protéine CelTOS est également exprimée au stade ookinète, où elle joue un rôle dans le passage de la lame basale de l'estomac du moustique. Les ookinètes déficients en CelTOS restent bloqués dans le cytoplasme des cellules épithéliales du moustique. Ce phénotype indique que CelTOS est impliquée après la rupture de la membrane cellulaire, c'est-à-dire pendant la migration à travers le cytoplasme (Kariu et al. 2006). De même, l'inactivation de CelTOS par knockout perturbe également le sporozoïte, puisqu'un parasite déficient a une capacité de traversée cellulaire réduite, malgré une motilité par glissement normale *in vitro* (Kariu et al. 2006; Kusi et al. 2014). Le défaut de traversée cellulaire pourrait être dû à un défaut de sortie de la cellule, au cours de laquelle CelTOS pourrait jouer un rôle dans la rupture de la membrane plasmique cellulaire.

Nos résultats suggèrent un modèle dans lequel les sporozoïtes de *Plasmodium* utilisent leur sensibilité au pH comme détecteur de fusion entre la vacuole et les lysosomes, activant ainsi la protéine PLP1 afin de permettre la sortie du parasite. Il s'agit d'un mécanisme de défense contre le système de défense de la cellule hôte, afin de permettre au parasite d'envahir un hépatocyte par invasion productive. Ce mécanisme est essentiel lors de la migration des parasites de la peau vers le foie, où le parasite doit franchir différentes barrières de l'hôte. Les sporozoïtes déficients pour la CT chez *P. berghei* (T. Ishino et al. 2004; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005b) et *P. yoelii* (Risco-Castillo et al. 2015) ne peuvent infecter *in vivo*, mais peuvent toujours infecter les hépatocytes *in vitro*. Ces résultats suggèrent que le contact préalable avec le cytoplasme de la cellule hôte n'est pas nécessaire pour l'activation du parasite, contrairement à ce qui a été proposé précédemment (M. M. Mota, Pradel, et al. 2001; Maria M. Mota, Hafalla, and Rodriguez 2002; Ute Frevert et al. 2005), mais que la traversée des cellules joue un rôle pour permettre au parasite d'échapper à la dégradation par les lysosomes cellulaires.

### **2.3. Passage de la vacuole transitoire à la vacuole parasitophore**

Le sporozoïte traverse un certain nombre de cellules avant d'envahir productivement une cellule en formant une PV. L'invasion productive est tardive et implique des facteurs de l'hôte. De manière générale, nos données proposent comme modèle la sécrétion des protéines parasitaires à la surface du sporozoïte activé, provenant probablement des micronèmes. Ces protéines interagiraient directement ou indirectement avec des protéines de l'hôte, notamment CD81 présent à la surface de l'hépatocyte pour *P. yoelii* ainsi que *P. falciparum*, entraînant la sécrétion des rhoptries et permettant l'invasion cellulaire. En ce qui concerne *P. berghei*, sachant qu'il peut infecter indépendamment de CD81, une autre voie permet l'invasion productive du parasite (Silvie et al. 2007). Nos résultats montrent que SR-B1 est l'un des facteurs définissant une voie d'entrée CD81-indépendante pour *P. berghei* (manuscrit en préparation).

Durant l'invasion productive, le sporozoïte doit éteindre sa machinerie de CT, afin d'éviter la rupture de la membrane de la vacuole parasitophore. Ceci peut être réalisé par le contrôle de la sécrétion de PLP1 depuis les micronèmes et/ou par la régulation de son activité. Nous avons montré que le traitement des cellules avec la bafilomycine A1, un inhibiteur de l'acidification lysosomale, inhibe la traversée cellulaire, par inhibition de la

sortie de la TV (Risco-Castillo et al. 2015). Ce qui permet de suggérer que le sporozoïte régule l'activité de PLP1 grâce en détectant les changements de pH. Une acidification de la vacuole stimulerait la sortie en activant PLP1, afin d'éviter la dégradation par les lysosomes de la cellule infectée. Cependant, ce modèle reste à confirmer, et les mécanismes mis en jeu ne sont pas connus.

## Chapitre 3. Rôle de la protéine Apical Membrane Antigen

### 1 (AMA1)

#### **3.1. Possibilité d'essentialité du gène *ama1* chez *P. yoelii* au stade sanguin**

Le rôle d'AMA1 a été clairement établi dans l'invasion par les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* et des mérozoïtes de *Plasmodium*, où AMA1, en se fixant à RON2, contribue à la formation de la jonction et à l'entrée du parasite. Ce modèle a été remis en cause avec l'observation que les sporozoïtes de *P. berghei* ne nécessitent pas AMA1 pour infecter les hépatocytes, et avec la description d'un mutant KO pour *ama1* chez *P. berghei* (Giovannini et al. 2011; Bargieri et al. 2013a). Nous avons décidé d'étudier l'importance d'AMA1 chez *P. yoelii*, un parasite murin qui infecte les hépatocytes via CD81, comme *P. falciparum*. Avec la stratégie GOMO (Gee Out Marker Out) (Manzoni et al. 2014), plusieurs tentatives directes de délétion du gène *ama1* chez *P. yoelii* ont été réalisées, sans succès. Face à ce résultat négatif, nous avons émis plusieurs hypothèses : soit le gène est essentiel au stade sanguin chez *P. yoelii*, soit l'approche expérimentale n'est pas assez efficace pour ce gène en particulier, même si cette stratégie est utilisée en routine au sein du laboratoire (Manzoni et al. 2014). Nous avons donc mis en place une stratégie de délétion indirecte, KIGOMO (Knock-In Gene Out Marker Out), dans l'idée d'augmenter le rendement de recombinaison. La stratégie de délétion indirecte n'a pas été non plus efficace, malgré la validation la stratégie sur un autre locus (P52/P36). À l'heure actuelle, une troisième tentative de délétion du gène est en cours, combinant la stratégie GOMO/KIGOMO à CRISPR/Cas9. Il s'agit d'une nouvelle technologie utilisant une endonucléase bactérienne appelée **Cas9** (permettant de couper l'ADN) avec des petits ARN non codants (qui agissent comme guide) pour permettre de cliver de manière spécifique à l'endroit désiré du génome (Jinek et al. 2012). Puis grâce à un plasmide de réparation, dans notre cas il s'agit des plasmides GOMO et/ou KIGOMO, cela va permettre de déléter le gène.

Après introduction du plasmide CRISPR/Cas9, le parasite n'aura pas d'autre choix que d'insérer la construction GOMO/KIGOMO, il s'agit d'un ultimatum pour sa survie. La transfection est actuellement en cours, mais si notre hypothèse est correcte, nous saurons rapidement si *ama1* est primordial au bon développement du parasite au stade sanguin.

Mais une question reste ouverte : pourquoi est-il possible d'exciser ce gène chez *P. berghei* et non chez *P. yoelii* ? La réponse pourrait être que la transfection du gène n'a pas été suffisamment efficace et qu'une concentration indétectable d'expression d'AMA1, pourrait permettre au parasite de survivre au stade sanguin dans le cas du mutant de *P. berghei* (Bargieri et al. 2013a). Une autre hypothèse serait que chez *P. berghei*, où un KO d'*ama1* est potentiellement possible, le parasite compense l'absence d'AMA1 par une surexpression d'AMA1-like, par exemple MAEBL, dont il serait judicieux de mesurer l'expression chez les mutants KO *ama1*.

Des études transcriptomiques ont montré que l'ARN d'AMA1 était exprimé au stade sanguin ainsi qu'au stade sporozoïte. Chez le moustique le gène est transcrit à la fin du développement et la maturation des sporozoïtes dans les oocystes, et la protéine n'est exprimée qu'au stade mature dans les glandes salivaires (Srinivasan et al. 2004). AMA1 n'est donc pas essentiel au développement du parasite dans le moustique.

### 3.2. Rôle controversé des protéines impliquées dans la JM

L'importance de l'interaction spécifique entre AMA1 et RON2 chez *Toxoplasma gondii* (Lebrun et al. 2005; Alexander et al. 2005; Chesne-Seck et al. 2005; Poukchanski et al. 2013; M. H. Lamarque et al. 2014) est illustrée par le fait qu'en l'absence d'AMA1, chez les mutants KO, le parasite surexprime des protéines AMA1-like. *Toxoplasma gondii* possède trois paralogues d'AMA1 ainsi que deux paralogues de RON2, formant des couples AMA-RONs : TgAMA2 – TgRON2, TgAMA3 – TgRON2<sub>L2</sub>, et TgAMA4 – TgRON2<sub>L1</sub> (M. H. Lamarque et al. 2014) (Poukchanski et al. 2013). Des données ont ainsi montré que les mutants *TgΔama1* surexpriment TgAMA2, et que chez les doubles mutants *TgΔama1-ama2*, une surexpression de TgAMA4 permet une invasion résiduelle, via RON2L1. Une triple délétion AMA1, AMA2 et AMA4 chez *Toxoplasma gondii* a pour effet une forte diminution de l'infection dans la cellule hôte (Parker et al. 2015). AMA4 est également un élément important dans la formation de la jonction mobile avec RON2L1 et dans l'invasion du sporozoïte chez *Toxoplasma gondii*. AMA4 possède une structure différente des autres paralogues d'AMA1 chez *Toxoplasma gondii* (Parker et al. 2015), mais possède des similitudes avec MAEBL de *Plasmodium*. MAEBL a été décrit comme



étant un homologue d'AMA1 chez *Plasmodium*, mais un KO de ce gène n'a aucun effet sur l'invasion au stade sanguin, mais entraîne une absence de colonisation des glandes salivaires du moustique par les sporozoïtes et par conséquent une absence de maturation des sporozoïtes (Kariu et al. 2002; Fu et al. 2005; Saenz et al. 2008).

Des études préliminaires au laboratoire ont montré que les sporozoïtes *PyΔmaebl* dans les moustiques ne parviennent pas à envahir les glandes salivaires. MAEBL étant un homologue d'AMA1, il serait intéressant de tester si l'expression de MAEBL peut compenser la fonction d'AMA1 chez les mérozoïtes, et inversement si AMA1 peut remplacer MAEBL chez les sporozoïtes pour l'infection des glandes salivaires. Pour tester la première hypothèse, nous envisageons de compléter le parasite KIGOMO avec MAEBL sous le promoteur d'AMA1 (sous forme d'une copie épisomale), afin de déléter le gène *ama1* endogène. Par cette approche, nous pourrions valider ou non le rôle de MAEBL en remplacement d'AMA1. Pour tester la deuxième hypothèse, nous envisageons de compléter le mutant *PyΔmaebl* avec un plasmide centromérique exprimant AMA1 sous le promoteur de MAEBL, pour tester si l'expression précoce d'AMA1 chez le moustique permet de compenser l'absence de MAEBL et permettre la migration des sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique.

### 3.3. AMA1 est-il essentiel au stade sporozoïte ?

Toutes nos tentatives de délétion au stade sanguin ont échoué, mais reste à déterminer le rôle d'AMA1 chez le sporozoïte, dans l'interaction avec RON2 dans la formation de la jonction mobile lors de l'invasion dans les hépatocytes.

Des études montrent que des anticorps dirigés contre AMA1 bloquent l'invasion des sporozoïtes de *P. falciparum*, ainsi que *P. yoelii* (Silvie et al. 2004; Schussek et al. 2013). Tout comme le stade sanguin, des études ont montré que *PbΔama1cond* ne présentaient pas d'inhibition d'invasion des *sporozoïtes* dans les hépatocytes (Giovannini et al. 2011). Mais, dans cette étude, on ne peut pas exclure qu'une expression résiduelle du gène au stade sporozoïte suffise à permettre l'entrée.

Sachant que pour le moment il nous est impossible d'obtenir un clone *PyΔama1* au stade sanguin, nous ne pouvons donc pas déterminer son rôle au stade sporozoïte. Les expériences CRISPR/Cas9 étant en cours, nous avons anticipé notre hypothèse de son importance. Nous avons donc décidé de mettre en place une dernière approche, qui va nous permettre d'étudier le rôle d'AMA1 au stade sporozoïte, grâce à une stratégie de complémentation transitoire pour permettre la délétion de la copie endogène d'*ama1*



(stratégie appelée KI-CAGOMO). En jouant sur le promoteur contrôlant l'expression de la copie épisomale d'AMA1, nous pourrions générer des mutants déplétés de façon conditionnelle au stade sporozoïte. La même approche nous permettra d'introduire des mutations dans AMA1, notamment au niveau du site d'interaction avec la protéine RON2, afin de disséquer les éléments structuraux impliqués dans la fonction d'AMA1.

## Chapitre 4. Rôle des protéines à 6-cystéine

### 4.1. Résumé des données

**P52 et P36** ont été identifiées en 2005 comme importantes pour l'infection du foie par les sporozoïtes de *P. berghei* (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005c), mais la fonction de ces protéines n'est pas connue. Une étude a montré qu'une simple délétion génique pour l'une ou l'autre de ces protéines a pour conséquence une augmentation de la traversée cellulaire (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005c), ainsi qu'une forte inhibition de l'infection (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005c; Annoura et al. 2014; Melissa R. van Dijk et al. 2005). Cette forte inhibition semble donc liée à un défaut d'activation du sporozoïte (T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005c), mais d'autres études ont suggéré un défaut de formation de la PV (Annoura et al. 2014; Melissa R. van Dijk et al. 2005).

Grâce à la stratégie GOMO, nous avons invalidé les deux gènes chez *P. berghei* et *P. yoelii*, et analysé les cinétiques d'invasion et de traversée grâce au test au dextran. Nous avons montré que les mutants  $\Delta P52/P36$  ne présentent pas de modification de la traversée cellulaire, mais un défaut d'invasion productive, aussi bien chez *P. yoelii* que chez *P. berghei*. Nous avons pu observer le développement des *Py* $\Delta p52p36$  et *Pb* $\Delta p52p36$  dans le noyau des cellules, indépendamment de CD81. Le laboratoire a montré par le passé que ces formes intranucléaires résultent de sporozoïtes arrêtés pendant leur traversée des cellules (Silvie et al. 2006). Les résultats montrent donc qu'en l'absence de P52 et P36 les parasites n'ont aucun défaut intrinsèque de développement, mais sont déficients dans l'entrée productive.

P52 et P36 sont impliquées dans l'entrée du parasite, probablement en amont de la formation de la jonction mobile et de la vacuole parasitophore. L'importance de CD81 a été identifiée lors de l'infection par *P. yoelii* mais également par *P. falciparum* contrairement à *P. berghei* (Silvie et al. 2003). L'identification d'une deuxième voie alternative à CD81 d'invasion pour *P. berghei* a été mise en évidence (Silvie et al. 2007). Les travaux de thèse de Giulia Manzoni nous ont permis récemment d'identifier SRBI

comme facteur d'entrée définissant une voie d'entrée CD81-indépendante dans les cellules humaines. De manière remarquable, *P. berghei* peut infecter les cellules en utilisant soit CD81 soit SRBI, comme le montrent les expériences d'inhibition par anticorps ou par siRNA, où la présence d'une voie fonctionnelle est suffisante pour permettre l'infection. Seul CD81 est nécessaire pour l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*, sur lesquels ni les anticorps ni les siRNA spécifiques de SRBI n'ont d'effet inhibiteur. Ces résultats sont pertinents pour l'étude des *Plasmodium* humains, car nous avons montré que le ciblage de CD81 affecte l'infection par *P. falciparum* mais pas *P. vivax*, alors que l'inhibition de SRBI par des anticorps a un effet inhibiteur sur les sporozoïtes de *P. vivax* mais pas *P. falciparum*, dans un modèle de culture primaire d'hépatocytes humains (manuscrit en préparation). Ces résultats suggèrent que *P. berghei* (et *P. vivax*) possèdent un ou plusieurs facteurs permettant l'entrée via SRBI, facteur qui fait défaut chez *P. falciparum* et *P. yoelii*.

En analysant le phénotype des mutants *PyΔp52Δp36* et *PbΔp52Δp36*, nous avons pu déterminer que la déplétion des deux protéines supprime l'entrée des sporozoïtes aussi bien via CD81 que via SRBI. Afin de tester si P52 et/ou P36 contribuent au choix de la voie d'entrée, nous avons développé une approche par complémentation génétique chez les mutants, à l'aide de plasmides centromériques permettant l'expression de transgènes sous forme épisomale chez les sporozoïtes après transfection de mérozoïtes et passage au moustique. De manière remarquable, nos résultats montrent que l'introduction de P52 et P36 de *P. berghei* chez le mutant *PyΔp52Δp36* suffit à rétablir non seulement l'infection dans les HepG2/CD81 mais aussi dans les HepG2. Inversement, Les protéines P52 et P36 de *P. yoelii* introduites chez le mutant *PbΔp52Δp36* restaure l'infection des HepG2/CD81 mais pas des HepG2. Ces résultats démontrent que P52 et/ou P36 de *P. berghei* mais pas *P. yoelii* sont associées à l'utilisation de la voie CD81-indépendante. Une étude de la contribution individuelle des deux protéines, toujours par complémentation génétique, nous a permis d'identifier P36 comme le facteur de *P. berghei* permettant l'infection en l'absence de CD81. Les mêmes expériences réalisées en présence d'anticorps bloquant SRBI nous ont permis de démontrer que le mutant *PyΔp52Δp36* complétement avec P36 (et P52) de *P. berghei* utilise SRBI pour infecter les HepG2, établissant un lien fonctionnel entre P36 et SRBI. P36 n'est probablement pas le seul facteur impliqué, car le mutant *PyΔp52Δp36* complétement avec P36 de *P. berghei* utilise préférentiellement CD81 dans les HepG2/CD81, et le mutant *PbΔp52Δp36* complétement avec P36 de *P. yoelii* conserve une capacité résiduelle à infecter les HepG2.

## 4.2. Rôle des protéines à domaine 6-cystéines

Les protéines à domaine 6-cys sont exprimées de manière spécifique à différents stades du cycle de vie du parasite, et sont impliquées pour certaines dans des interactions cellule-cellule (van Schaijk et al. 2006; T. Ishino, Chinzei, and Yuda 2005c; Sanders et al. 2005). P48/45 est une protéine de surface des gamètes et joue un rôle crucial pour les gamètes mâles dans l'attachement aux femelles. **Pfs47** joue un rôle majeur dans la modulation de la réponse immunitaire dans le moustique infecté par *P. falciparum* (van Schaijk et al. 2006; Melissa R. van Dijk et al. 2010; Ramphul et al. 2015). Une invalidation de Pfs47 réduit considérablement la survie du parasite dans les moustiques (Molina-Cruz et al. 2013). Pfs47 agit sur la survie du parasite en évitant le système immunitaire du moustique, soit l'activation de l'apoptose des cellules dans l'estomac du moustique en empêchant l'activation de plusieurs caspases (Ramphul et al. 2015).

Les protéines de la famille à domaine 6-cystéines sont conservées chez toutes les espèces de *Plasmodium*, et sont caractérisées par des doubles domaines riches en cystéines qui sont d'environ 350 acides aminés de longueur (Arredondo et al. 2012b; Carter et al. 1995; Gerloff et al. 2005; Gilson et al. 2006). Les domaines ont typiquement trois ponts disulfures qui contribuent à la structure tertiaire de ces protéines, entre Cys 1 et Cys 2, Cys 6 et Cys 3, et Cys 4 et Cys 5 (Gerloff et al. 2005). La structure 3D des deux domaines de deux protéines de la famille exprimées au stade sanguin, Pfp12 et Pfp41, a été déterminée par cristallographie. Ces structures montrent un arrangement en sandwich beta pour chaque domaine.

Certaines protéines ne possèdent que 4 des 6 résidus cystéines conservés, notamment B9. B9 est une protéine essentielle pour le développement du sporozoïte de *Plasmodium* au stade hépatique (Annoura et al. 2014). Les auteurs de cette étude ont conclu de leurs résultats que la traduction de B9 est réprimée au stade sporozoïte, mais est exprimée après l'invasion des hépatocytes où elle se localise dans la membrane plasmique du parasite (Annoura et al. 2014). Une invalidation de ce gène chez les parasites rongeurs (*P. berghei* et *P. yoelii*) et humain (*P. falciparum*) entraîne un arrêt du développement du parasite dans les hépatocytes, associé à un défaut de formation de la PV (Annoura et al. 2014). Cependant, un rôle de B9 dans l'invasion n'est pas exclu, car les données de protéomique disponibles montrent que la protéine B9 est exprimée au stade sporozoïte, aussi bien chez *P. falciparum* que chez *P. yoelii*, et les données phénotypiques de cette étude sont tout à fait compatibles avec un défaut d'invasion des mutants  $\Delta b9$ .

Cependant, les protéines à 6-cys ont des rôles bien distincts dans l'établissement et la maintenance de la PV ainsi que dans le développement au stade hépatique, car une autre

protéine de la famille, la séquestrine, aussi appelée LISP2, joue clairement un rôle majeur aux stades tardifs du développement intra-hépatocytaire du parasite (Annoura et al. 2014; Orito et al. 2013)

Chez les stades sanguins, Pfp12 et Pfp41 (Tonkin et al. 2013; Parker et al. 2015, respectivement), forment un hétéromère stable à la surface des mérozoïtes infectieux, et sont sécrétées à la suite de l'invasion du parasite (Taechalertpaisarn et al. 2012), sans jouer de rôle évident dans l'adhérence via un récepteur de la surface des érythrocytes. L'utilisation d'un anticorps, ne semble pas non plus inhiber l'invasion des érythrocytes, ce qui va dans le sens de la non essentialité du gène (Taechalertpaisarn et al. 2012) au stade érythrocytaire.

D'après les données de PlasmoDB, une autre protéine à 6cys, P12p, est également retrouvée au stade sporozoïte, comme B9. Il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie le rôle de ces deux protéines dans le moustique mais également au stade sporozoïte, afin d'étudier les effets d'une simple ou double délétion de ces gènes sur l'invasion au stade hépatique, grâce à la stratégie GOMO qui nous permettrait d'obtenir un parasite délété de ces gènes, exprimant la GFP. Nous pourrions également étiqueter ces protéines afin de visualiser le moment de leur expression, afin de mieux caractériser leurs rôles dans le cycle entier du parasite murin, pour commencer, et pourquoi pas chez *P. falciparum*.

Les hépatocytes présentent une différence de susceptibilité à l'infection. Les sporozoïtes entrent préférentiellement dans les hépatocytes polyploïdes (Austin, Kaushansky, and Kappe 2014). Le groupe de S. Kappe a tout récemment rapporté une corrélation entre le niveau d'expression de la protéine EphA2 à la surface des hépatocytes et le niveau d'infection par *P. yoelii* (Kaushansky et al. 2015). Les récepteurs de type EphA2 et leurs ligands éphrines sont impliqués dans les interactions cellule-cellule (Lisabeth, Falivelli, and Pasquale 2013), faisant d'EphA2 un candidat intéressant comme récepteur impliqué dans les interactions entre sporozoïtes et hépatocytes. De façon intéressante, cette étude a établi un lien entre P36 et EphA2. En particulier, une forme recombinante de P36 inhibe la signalisation induite par un ligand d'EphA2. Ces données, combinées aux nôtres, suggèrent que le rôle de P36 est peut-être d'induire un signal via SRBI et EphA2 vers la cellule, pour permettre le processus d'invasion. Si ces résultats sont confirmés, P36 et d'autres protéines à domaine 6-cys pourraient constituer des cibles intéressantes pour le développement de nouvelles approches vaccinales contre le paludisme.

# Conclusion

Mes travaux de thèse ont contribué à mieux caractériser les mécanismes d'invasion des sporozoïtes de *Plasmodium* dans les hépatocytes, notamment à l'aide de parasites génétiquement modifiés. Ces parasites nous ont permis d'étudier les cinétiques de traversée cellulaire et d'invasion productive. Nous avons pu montrer que les sporozoïtes forment successivement deux types de vacuoles, tout d'abord une vacuole transitoire, qui est formée durant la traversée cellulaire, qui peut être reconnue par les lysosomes de la cellule hôte. Grâce à une perforine parasitaire, PLP1, le sporozoïte s'échappe de la vacuole transitoire et échappe ainsi à la dégradation par les défenses cellulaires. Cette vacuole transitoire ne permet pas le développement contrairement à la vacuole parasitophore, qui est formée plus tardivement après activation du sporozoïte pour l'invasion productive. La composition moléculaire de la PV est différente de la TV, permettant d'échapper à la fusion avec les lysosomes.

Deux protéines de la famille 6-cystéine, P52 et P36, ont été impliquées dans l'infection des hépatocytes. Grâce à des nouveaux mutants KO pour *p52* et *p36*, nous avons pu montrer que ces protéines jouent un rôle essentiel dans l'activation de l'invasion productive par les sporozoïtes chez *P. yoelii* et *P. berghei*, aussi bien via CD81 que par des voies CD81-indépendantes. Nos résultats montrent que P36 est spécifiquement associée à l'utilisation de la voie CD81-indépendante, ce qui ouvre des perspectives intéressantes pour élucider les interactions ligands-récepteurs mises en jeu lors de l'entrée.

Un phénomène central de l'entrée chez les *Apicomplexa* est la formation d'une jonction mobile, qui implique une interaction entre AMA1 et RON2. Dans le cas des sporozoïtes, la jonction n'a jamais été caractérisée, et le rôle d'AMA1 a été remis en cause chez *P. berghei*. Nous avons mis en place différentes approches génétiques ciblant AMA1 chez *P. yoelii*. Nos résultats suggèrent qu'AMA1 est essentiel lors de la multiplication aux stades sanguins de *P. yoelii*. Grâce à une approche de complémentation et de KO conditionnel, nous espérons pouvoir étudier l'implication d'AMA1 durant l'invasion des sporozoïtes dans les hépatocytes.

En conclusion, nos résultats illustrent que différentes protéines des micronèmes sont impliquées à différentes étapes de l'infection, y compris chez les sporozoïtes, et ouvrent des perspectives nouvelles pour identifier les facteurs parasitaires impliqués dans des interactions avec les hépatocytes lors de l'entrée. Ces facteurs constitueront de potentielles cibles pour de nouvelles approches vaccinales visant à bloquer précocement l'infection par *Plasmodium* dans le foie, pour prévenir le paludisme.



# Liste des publications



- Aikawa, M., L. H. Miller, J. Johnson, and J. Rabbege. 1978. "Erythrocyte Entry by Malarial Parasites. A Moving Junction between Erythrocyte and Parasite." *The Journal of Cell Biology* 77 (1): 72–82.
- Alexander, David L., Jeffrey Mital, Gary E. Ward, Peter Bradley, and John C. Boothroyd. 2005. "Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma Gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles." *PLoS Pathogens* 1 (2): e17. doi:10.1371/journal.ppat.0010017.
- Aly, Ahmed S. I., Scott E. Lindner, Drew C. MacKellar, Xinxia Peng, and Stefan H. I. Kappe. 2011. "SAP1 Is a Critical Post-Transcriptional Regulator of Infectivity in Malaria Parasite Sporozoite Stages." *Molecular Microbiology* 79 (4): 929–39. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07497.x.
- Aly, Ahmed S. I., and Kai Matuschewski. 2005. "A Malarial Cysteine Protease Is Necessary for *Plasmodium* Sporozoite Egress from Oocysts." *The Journal of Experimental Medicine* 202 (2): 225–30. doi:10.1084/jem.20050545.
- Aly, Ahmed S. I., Sebastian A. Mikolajczak, Hilda Silva Rivera, Nelly Camargo, Vanessa Jacobs-Lorena, Mehdi Labaied, Isabelle Coppens, and Stefan H. I. Kappe. 2008. "Targeted Deletion of SAP1 Abolishes the Expression of Infectivity Factors Necessary for Successful Malaria Parasite Liver Infection." *Molecular Microbiology* 69 (1): 152–63. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06271.x.
- Amaratunga, Chanaki, Sokunthea Sreng, Seila Suon, Erika S. Phelps, Kasia Stepniewska, Pharath Lim, Chongjun Zhou, et al. 2012. "Artemisinin-Resistant *Plasmodium Falciparum* in Pursat Province, Western Cambodia: A Parasite Clearance Rate Study." *The Lancet. Infectious Diseases* 12 (11): 851–58. doi:10.1016/S1473-3099(12)70181-0.
- Amino, Rogerio, Donatella Giovannini, Sabine Thiberge, Pascale Gueirard, Bertrand Boisson, Jean-François Dubremetz, Marie-Christine Prévost, Tomoko Ishino, Masao Yuda, and Robert Ménard. 2008. "Host Cell Traversal Is Important for Progression of the Malaria Parasite through the Dermis to the Liver." *Cell Host & Microbe* 3 (2): 88–96. doi:10.1016/j.chom.2007.12.007.
- Amino, Rogerio, Sabine Thiberge, Samantha Blazquez, Patricia Baldacci, Olivier Renaud, Spencer Shorte, and Robert Ménard. 2007. "Imaging Malaria Sporozoites in the Dermis of the Mammalian Host." *Nature Protocols* 2 (7): 1705–12. doi:10.1038/nprot.2007.120.
- Amino, Rogerio, Sabine Thiberge, Béatrice Martin, Susanna Celli, Spencer Shorte, Friedrich Frischknecht, and Robert Ménard. 2006. "Quantitative Imaging of *Plasmodium* Transmission from Mosquito to Mammal." *Nature Medicine* 12 (2): 220–24. doi:10.1038/nm1350.
- Annoura, Takeshi, Ivo H. J. Ploemen, Ben C. L. van Schaijk, Mohammed Sajid, Martijn W. Vos, Geert-Jan van Gemert, Severine Chevalley-Maurel, et al. 2012. "Assessing the Adequacy of Attenuation of Genetically Modified Malaria Parasite Vaccine Candidates." *Vaccine* 30 (16): 2662–70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.02.010.
- Annoura, Takeshi, Ben C. L. van Schaijk, Ivo H. J. Ploemen, Mohammed Sajid, Jing-wen Lin, Martijn W. Vos, Avinash G. Dinmohamed, et al. 2014. "Two *Plasmodium* 6-Cys Family-Related Proteins Have Distinct and Critical Roles in Liver-Stage Development." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (5): 2158–70. doi:10.1096/fj.13-241570.
- "Antimalaria Studies on Qinghaosu. - PubMed - NCBI." 2016. Accessed January 11. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Antimalaria+studies+on+Qinghaosu.+Chin+Med+J+\(Engl\)+1979+%3B+92+%3A+811-6](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Antimalaria+studies+on+Qinghaosu.+Chin+Med+J+(Engl)+1979+%3B+92+%3A+811-6).

- Arredondo, Silvia A., Mengli Cai, Yuki Takayama, Nicholas J. MacDonald, D. Eric Anderson, L. Aravind, G. Marius Clore, and Louis H. Miller. 2012a. "Structure of the Plasmodium 6-Cysteine s48/45 Domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (17): 6692–97. doi:10.1073/pnas.1204363109.
- . 2012b. "Structure of the Plasmodium 6-Cysteine s48/45 Domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (17): 6692–97. doi:10.1073/pnas.1204363109.
- Ashley, Elizabeth A., and Nicholas J. White. 2014. "The Duration of Plasmodium Falciparum Infections." *Malaria Journal* 13: 500. doi:10.1186/1475-2875-13-500.
- Austin, Laura S., Alexis Kaushansky, and Stefan H.I. Kappe. 2014. "Susceptibility to Plasmodium Liver Stage Infection Is Altered by Hepatocyte Polyploidy." *Cellular Microbiology* 16 (5): 784–95. doi:10.1111/cmi.12282.
- Baer, Kerstin, Michael Roosevelt, Allen B. Clarkson, Nico van Rooijen, Thomas Schnieder, and Ute Frevert. 2007. "Kupffer Cells Are Obligatory for Plasmodium Yoelii Sporozoite Infection of the Liver." *Cellular Microbiology* 9 (2): 397–412. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00798.x.
- Bai, Tao, Michael Becker, Aditi Gupta, Phillip Strike, Vince J. Murphy, Robin F. Anders, and Adrian H. Batchelor. 2005. "Structure of AMA1 from Plasmodium Falciparum Reveals a Clustering of Polymorphisms That Surround a Conserved Hydrophobic Pocket." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (36): 12736–41. doi:10.1073/pnas.0501808102.
- Baldi, Deborah L., Robert Good, Manoj T. Duraisingh, Brendan S. Crabb, and Alan F. Cowman. 2002. "Identification and Disruption of the Gene Encoding the Third Member of the Low-Molecular-Mass Rhoptry Complex in Plasmodium Falciparum." *Infection and Immunity* 70 (9): 5236–45.
- Baldi, D. L., K. T. Andrews, R. F. Waller, D. S. Roos, R. F. Howard, B. S. Crabb, and A. F. Cowman. 2000. "RAP1 Controls Rhoptry Targeting of RAP2 in the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *The EMBO Journal* 19 (11): 2435–43. doi:10.1093/emboj/19.11.2435.
- Bano, Nazneen, Julia D. Romano, Bamini Jayabalasingham, and Isabelle Coppens. 2007. "Cellular Interactions of Plasmodium Liver Stage with Its Host Mammalian Cell." *International Journal for Parasitology* 37 (12): 1329–41. doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.005.
- Bargieri, Daniel Y., Nicole Andenmatten, Vanessa Lagal, Sabine Thiberge, Jamie A. Whitelaw, Isabelle Tardieux, Markus Meissner, and Robert Ménard. 2013a. "Apical Membrane Antigen 1 Mediates Apicomplexan Parasite Attachment but Is Dispensable for Host Cell Invasion." *Nature Communications* 4: 2552. doi:10.1038/ncomms3552.
- . 2013b. "Apical Membrane Antigen 1 Mediates Apicomplexan Parasite Attachment but Is Dispensable for Host Cell Invasion." *Nature Communications* 4: 2552. doi:10.1038/ncomms3552.
- Baruch, D. I., B. L. Pasloske, H. B. Singh, X. Bi, X. C. Ma, M. Feldman, T. F. Taraschi, and R. J. Howard. 1995. "Cloning the P. Falciparum Gene Encoding PfEMP1, a Malarial Variant Antigen and Adherence Receptor on the Surface of Parasitized Human Erythrocytes." *Cell* 82 (1): 77–87.
- Baruch, Dror I. 1999. "Adhesive Receptors on Malaria-Parasitized Red Cells." *Best Practice & Research Clinical Haematology* 12 (4): 747–61. doi:10.1053/beha.1999.0051.
- Baum, Jake, Lin Chen, Julie Healer, Sash Lopaticki, Michelle Boyle, Tony Triglia, Florian Ehlgen, Stuart A. Ralph, James G. Beeson, and Alan F. Cowman. 2009. "Reticulocyte-Binding Protein Homologue 5 - an Essential Adhesin Involved in

- Invasion of Human Erythrocytes by Plasmodium Falciparum.” *International Journal for Parasitology* 39 (3): 371–80. doi:10.1016/j.ijpara.2008.10.006.
- Baum, Jake, and Alan F. Cowman. 2011. “Biochemistry. Revealing a Parasite’s Invasive Trick.” *Science (New York, N.Y.)* 333 (6041): 410–11. doi:10.1126/science.1209875.
- Baum, Jake, Tim-Wolf Gilberger, Freddy Frischknecht, and Markus Meissner. 2008. “Host-Cell Invasion by Malaria Parasites: Insights from Plasmodium and Toxoplasma.” *Trends in Parasitology* 24 (12): 557–63. doi:10.1016/j.pt.2008.08.006.
- Beeson, J. G., G. V. Brown, M. E. Molyneux, C. Mhango, F. Dzinjalama, and S. J. Rogerson. 1999. “Plasmodium Falciparum Isolates from Infected Pregnant Women and Children Are Associated with Distinct Adhesive and Antigenic Properties.” *The Journal of Infectious Diseases* 180 (2): 464–72. doi:10.1086/314899.
- Bejon, Philip, George Warimwe, Claire L. Mackintosh, Margaret J. Mackinnon, Sam M. Kinyanjui, Jennifer N. Musyoki, Peter C. Bull, and Kevin Marsh. 2009. “Analysis of Immunity to Febrile Malaria in Children That Distinguishes Immunity from Lack of Exposure.” *Infection and Immunity* 77 (5): 1917–23. doi:10.1128/IAI.01358-08.
- Belnoue, Elodie, Fabio T. M. Costa, Tobias Frankenberg, Ana Margarida Vigário, Tatiana Voza, Nicolas Leroy, Mauricio M. Rodrigues, Irène Landau, Georges Snounou, and Laurent Rénia. 2004. “Protective T Cell Immunity against Malaria Liver Stage after Vaccination with Live Sporozoites under Chloroquine Treatment.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (4): 2487–95.
- Besteiro, Sébastien, Jean-François Dubremetz, and Maryse Lebrun. 2011. “The Moving Junction of Apicomplexan Parasites: A Key Structure for Invasion.” *Cellular Microbiology* 13 (6): 797–805. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x.
- Besteiro, Sébastien, Adeline Michelin, Joël Poncet, Jean-François Dubremetz, and Maryse Lebrun. 2009. “Export of a Toxoplasma Gondii Rhoptry Neck Protein Complex at the Host Cell Membrane to Form the Moving Junction during Invasion.” *PLoS Pathogens* 5 (2): e1000309. doi:10.1371/journal.ppat.1000309.
- Bhanot, Purnima, Kristine Schauer, Isabelle Coppens, and Victor Nussenzweig. 2005. “A Surface Phospholipase Is Involved in the Migration of Plasmodium Sporozoites through Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (8): 6752–60. doi:10.1074/jbc.M411465200.
- Bhattarai, Achuyt, Abdullah S. Ali, S. Patrick Kachur, Andreas Mårtensson, Ali K. Abbas, Rashid Khatib, Abdul-Wahiyd Al-Mafazy, et al. 2007. “Impact of Artemisinin-Based Combination Therapy and Insecticide-Treated Nets on Malaria Burden in Zanzibar.” *PLoS Medicine* 4 (11): e309. doi:10.1371/journal.pmed.0040309.
- Bibikova, Marina, Mary Golic, Kent G. Golic, and Dana Carroll. 2002. “Targeted Chromosomal Cleavage and Mutagenesis in Drosophila Using Zinc-Finger Nucleases.” *Genetics* 161 (3): 1169–75.
- Bijker, Else M., Guido J. H. Bastiaens, Anne C. Teirlinck, Geert-Jan van Gemert, Wouter Graumans, Marga van de Vegte-Bolmer, Rianne Siebelink-Stoter, et al. 2013. “Protection against Malaria after Immunization by Chloroquine Prophylaxis and Sporozoites Is Mediated by Preerythrocytic Immunity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (19): 7862–67. doi:10.1073/pnas.1220360110.
- Blair, Peter L., Stefan H. I. Kappe, Jorge E. Maciel, Bharath Balu, and John H. Adams. 2002. “Plasmodium Falciparum MAEBL Is a Unique Member of the Ebl Family.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 122 (1): 35–44.
- Brabin, B. J. 1983. “An Analysis of Malaria in Pregnancy in Africa.” *Bulletin of the World Health Organization* 61 (6): 1005–16.

- Bustamante, Leyla Y., S. Josefin Bartholdson, Cecile Crosnier, Marta G. Campos, Madushi Wanaguru, Chea Nguon, Dominic P. Kwiatkowski, Gavin J. Wright, and Julian C. Rayner. 2013. "A Full-Length Recombinant Plasmodium Falciparum PfRH5 Protein Induces Inhibitory Antibodies That Are Effective across Common PfRH5 Genetic Variants." *Vaccine* 31 (2): 373–79. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.106.
- Cao, Jun, Osamu Kaneko, Amporn Thongkukiatkul, Mayumi Tachibana, Hitoshi Otsuki, Qi Gao, Takafumi Tsuboi, and Motomi Torii. 2009. "Rhoptry Neck Protein RON2 Forms a Complex with Microneme Protein AMA1 in Plasmodium Falciparum Merozoites." *Parasitology International* 58 (1): 29–35. doi:10.1016/j.parint.2008.09.005.
- Carlton, Jane M., Samuel V. Angiuoli, Bernard B. Suh, Taco W. Kooij, Mihaela Pertea, Joana C. Silva, Maria D. Ermolaeva, et al. 2002. "Genome Sequence and Comparative Analysis of the Model Rodent Malaria Parasite Plasmodium Yoelii Yoelii." *Nature* 419 (6906): 512–19. doi:10.1038/nature01099.
- Carrolo, Margarida, Silvia Giordano, Laura Cabrita-Santos, Simona Corso, Ana M. Vigário, Susana Silva, Patricia Leirião, et al. 2003. "Hepatocyte Growth Factor and Its Receptor Are Required for Malaria Infection." *Nature Medicine* 9 (11): 1363–69. doi:10.1038/nm947.
- Carruthers, V. B., O. K. Giddings, and L. D. Sibley. 1999. "Secretion of Micronemal Proteins Is Associated with Toxoplasma Invasion of Host Cells." *Cellular Microbiology* 1 (3): 225–35.
- Carter, R., A. Coulson, S. Bhatti, B. J. Taylor, and J. F. Elliott. 1995. "Predicted Disulfide-Bonded Structures for Three Uniquely Related Proteins of Plasmodium Falciparum, Pfs230, Pfs48/45 and Pf12." *Molecular and Biochemical Parasitology* 71 (2): 203–10.
- Cerami, C., U. Frevert, P. Sinnis, B. Takacs, P. Clavijo, M. J. Santos, and V. Nussenzweig. 1992. "The Basolateral Domain of the Hepatocyte Plasma Membrane Bears Receptors for the Circumsporozoite Protein of Plasmodium Falciparum Sporozoites." *Cell* 70 (6): 1021–33.
- Cerami, C., U. Frevert, P. Sinnis, B. Takacs, and V. Nussenzweig. 1994. "Rapid Clearance of Malaria Circumsporozoite Protein (CS) by Hepatocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 179 (2): 695–701.
- Charrin, Stéphanie, François le Naour, Olivier Silvie, Pierre-Emmanuel Milhiet, Claude Boucheix, and Eric Rubinstein. 2009. "Lateral Organization of Membrane Proteins: Tetraspanins Spin Their Web." *The Biochemical Journal* 420 (2): 133–54. doi:10.1042/BJ20082422.
- Charron, Audra J., and L. David Sibley. 2004. "Molecular Partitioning during Host Cell Penetration by Toxoplasma Gondii." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5 (11): 855–67. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.00228.x.
- Chen, Lin, Sash Lopatnicki, David T. Riglar, Chaitali Dekiwadia, Alex D. Uboldi, Wai-Hong Tham, Matthew T. O'Neill, et al. 2011. "An EGF-like Protein Forms a Complex with PfRh5 and Is Required for Invasion of Human Erythrocytes by Plasmodium Falciparum." *PLoS Pathogens* 7 (9): e1002199. doi:10.1371/journal.ppat.1002199.
- Chen, Qijun, Martha Schlichtherle, and Mats Wahlgren. 2000. "Molecular Aspects of Severe Malaria." *Clinical Microbiology Reviews* 13 (3): 439–50. doi:10.1128/CMR.13.3.439-450.2000.
- Chesne-Seck, Marie-Laure, Juan Carlos Pizarro, Brigitte Vulliez-Le Normand, Christine R. Collins, Michael J. Blackman, Bart W. Faber, Edmond J. Remarque, Clemens H. M. Kocken, Alan W. Thomas, and Graham A. Bentley. 2005. "Structural Comparison of Apical Membrane Antigen 1 Orthologues and Paralogues in

- Apicomplexan Parasites.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 144 (1): 55–67. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.07.007.
- Chotivanich, Kesinee, Rupam Tripura, Debashish Das, Poravuth Yi, Nicholas P. J. Day, Sasithon Pukrittayakamee, Char Meng Chuor, Duong Soheat, Arjen M. Dondorp, and Nicholas J. White. 2014. “Laboratory Detection of Artemisinin-Resistant Plasmodium Falciparum.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (6): 3157–61. doi:10.1128/AAC.01924-13.
- Clyde, D. F., V. C. McCarthy, R. M. Miller, and R. B. Hornick. 1973. “Specificity of Protection of Man Immunized against Sporozoite-Induced Falciparum Malaria.” *The American Journal of the Medical Sciences* 266 (6): 398–403.
- Cohen, S., I. A. McGREGOR, and S. Carrington. 1961. “Gamma-Globulin and Acquired Immunity to Human Malaria.” *Nature* 192 (November): 733–37.
- Coley, Andrew M., Aditi Gupta, Vince J. Murphy, Tao Bai, Hanna Kim, Michael Foley, Robin F. Anders, and Adrian H. Batchelor. 2007. “Structure of the Malaria Antigen AMA1 in Complex with a Growth-Inhibitory Antibody.” *PLoS Pathogens* 3 (9): 1308–19. doi:10.1371/journal.ppat.0030138.
- Collins, Christine R., Chrislaine Withers-Martinez, Graham A. Bentley, Adrian H. Batchelor, Alan W. Thomas, and Michael J. Blackman. 2007. “Fine Mapping of an Epitope Recognized by an Invasion-Inhibitory Monoclonal Antibody on the Malaria Vaccine Candidate Apical Membrane Antigen 1.” *The Journal of Biological Chemistry* 282 (10): 7431–41. doi:10.1074/jbc.M610562200.
- Collins, Christine R., Chrislaine Withers-Martinez, Fiona Hackett, and Michael J. Blackman. 2009. “An Inhibitory Antibody Blocks Interactions between Components of the Malarial Invasion Machinery.” *PLoS Pathogens* 5 (1): e1000273. doi:10.1371/journal.ppat.1000273.
- Coppi, Alida, Ramya Natarajan, Gabriele Pradel, Brandy L. Bennett, Eric R. James, Mario A. Roggero, Giampietro Corradin, Cathrine Persson, Rita Tewari, and Photini Sinnis. 2011. “The Malaria Circumsporozoite Protein Has Two Functional Domains, Each with Distinct Roles as Sporozoites Journey from Mosquito to Mammalian Host.” *The Journal of Experimental Medicine* 208 (2): 341–56. doi:10.1084/jem.20101488.
- Coppi, Alida, Consuelo Pinzon-Ortiz, Christina Hutter, and Photini Sinnis. 2005. “The Plasmodium Circumsporozoite Protein Is Proteolytically Processed during Cell Invasion.” *The Journal of Experimental Medicine* 201 (1): 27–33. doi:10.1084/jem.20040989.
- Coppi, Alida, Rita Tewari, Joseph R. Bishop, Brandy L. Bennett, Roger Lawrence, Jeffrey D. Esko, Oliver Billker, and Photini Sinnis. 2007. “Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to Plasmodium Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Host Cells.” *Cell Host & Microbe* 2 (5): 316–27. doi:10.1016/j.chom.2007.10.002.
- Counihan, Natalie A., Ming Kalanon, Ross L. Coppel, and Tania F. de Koning-Ward. 2013. “Plasmodium Rhoptry Proteins: Why Order Is Important.” *Trends in Parasitology* 29 (5): 228–36. doi:10.1016/j.pt.2013.03.003.
- Cowman, Alan F., and Brendan S. Crabb. 2006. “Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites.” *Cell* 124 (4): 755–66. doi:10.1016/j.cell.2006.02.006.
- Crawford, Joanna, Erika Lamb, James Wasmuth, Ognjen Grujic, Michael E. Grigg, and Martin J. Boulanger. 2010. “Structural and Functional Characterization of SporSAG: A SAG2-Related Surface Antigen from Toxoplasma Gondii.” *The Journal of Biological Chemistry* 285 (16): 12063–70. doi:10.1074/jbc.M109.054866.
- Crawford, Joanna, Michelle L. Tonkin, Ognjen Grujic, and Martin J. Boulanger. 2010. “Structural Characterization of Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) from

- Toxoplasma Gondii.” *The Journal of Biological Chemistry* 285 (20): 15644–52. doi:10.1074/jbc.M109.092619.
- Crosnier, Cécile, Leyla Y. Bustamante, S. Josefin Bartholdson, Amy K. Bei, Michel Theron, Makoto Uchikawa, Souleymane Mboup, et al. 2011. “Basigin Is a Receptor Essential for Erythrocyte Invasion by Plasmodium Falciparum.” *Nature* 480 (7378): 534–37. doi:10.1038/nature10606.
- Crosnier, Cécile, Madushi Wanaguru, Brian McDade, Faith H. Osier, Kevin Marsh, Julian C. Rayner, and Gavin J. Wright. 2013. “A Library of Functional Recombinant Cell-Surface and Secreted P. Falciparum Merozoite Proteins.” *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 12 (12): 3976–86. doi:10.1074/mcp.O113.028357.
- de Koning-Ward, T. F., D. A. Fidock, V. Thathy, R. Menard, R. M. van Spaendonk, A. P. Waters, and C. J. Janse. 2000. “The Selectable Marker Human Dihydrofolate Reductase Enables Sequential Genetic Manipulation of the Plasmodium Berghei Genome.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 106 (2): 199–212.
- Deligianni, Elena, Rhiannon N. Morgan, Lucia Bertuccini, Christine C. Wirth, Natalie C. Silmon de Monerri, Lefteris Spanos, Michael J. Blackman, Christos Louis, Gabriele Pradel, and Inga Siden-Kiamos. 2013. “A Perforin-like Protein Mediates Disruption of the Erythrocyte Membrane during Egress of Plasmodium Berghei Male Gametocytes.” *Cellular Microbiology* 15 (8): 1438–55. doi:10.1111/cmi.12131.
- Dicko, Alassane, David J. Diemert, Issaka Sagara, Moussa Sogoba, Mohamed B. Niambele, Mahamadoun H. Assadou, Ousmane Guindo, et al. 2007. “Impact of a Plasmodium Falciparum AMA1 Vaccine on Antibody Responses in Adult Malians.” *PloS One* 2 (10): e1045. doi:10.1371/journal.pone.0001045.
- Dobrowolski, J. M., and L. D. Sibley. 1996. “Toxoplasma Invasion of Mammalian Cells Is Powered by the Actin Cytoskeleton of the Parasite.” *Cell* 84 (6): 933–39.
- Dondorp, Arjen M., François Nosten, Poravuth Yi, Debashish Das, Aung Phae Phy, Joel Tarning, Khin Maung Lwin, et al. 2009. “Artemisinin Resistance in Plasmodium Falciparum Malaria.” *The New England Journal of Medicine* 361 (5): 455–67. doi:10.1056/NEJMoa0808859.
- Doolan, Denise L., Carlota Dobaño, and J. Kevin Baird. 2009. “Acquired Immunity to Malaria.” *Clinical Microbiology Reviews* 22 (1): 13–36. doi:10.1128/CMR.00025-08.
- Draper, Simon J., Evelina Angov, Toshihiro Horii, Louis H. Miller, Prakash Srinivasan, Michael Theisen, and Sumi Biswas. 2015. “Recent Advances in Recombinant Protein-Based Malaria Vaccines.” *Vaccine, Malaria Vaccines* 2015, 33 (52): 7433–43. doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.093.
- Druilhe, Pierre, François Spertini, Daw Soesoe, Giampietro Corradin, Pedro Mejia, Subhash Singh, Regine Audran, Ahmed Bouzidi, Claude Oeuvray, and Christian Roussilhon. 2005. “A Malaria Vaccine That Elicits in Humans Antibodies Able to Kill Plasmodium Falciparum.” *PLoS Medicine* 2 (11): e344. doi:10.1371/journal.pmed.0020344.
- Duffy, P. E., and M. Fried. 2005. “Malaria in the Pregnant Woman.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 295: 169–200.
- Ejigiri, Ijeoma, Daniel R. T. Ragheb, Paco Pino, Alida Coppi, Brandy Lee Bennett, Dominique Soldati-Favre, and Photini Sennis. 2012. “Shedding of TRAP by a Rhomboid Protease from the Malaria Sporozoite Surface Is Essential for Gliding Motility and Sporozoite Infectivity.” *PLoS Pathog* 8 (7): e1002725. doi:10.1371/journal.ppat.1002725.
- Eksi, Saliha, Beata Czesny, Geert-Jan van Gemert, Robert W. Sauerwein, Wijnand Eling, and Kim C. Williamson. 2006. “Malaria Transmission-Blocking Antigen, Pfs230, Mediates Human Red Blood Cell Binding to Exflagellating Male Parasites and

- Oocyst Production.” *Molecular Microbiology* 61 (4): 991–98. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05284.x.
- Ellis, Ruth D., Gregory E. D. Mullen, Mark Pierce, Laura B. Martin, Kazutoyo Miura, Michael P. Fay, Carole A. Long, et al. 2009. “A Phase 1 Study of the Blood-Stage Malaria Vaccine Candidate AMA1-C1/Alhydrogel with CPG 7909, Using Two Different Formulations and Dosing Intervals.” *Vaccine* 27 (31): 4104–9. doi:10.1016/j.vaccine.2009.04.077.
- Erxleben, C., N. Klauke, M. Flötenmeyer, M. P. Blanchard, C. Braun, and H. Plattner. 1997. “Microdomain Ca<sup>2+</sup> Activation during Exocytosis in Paramecium Cells. Superposition of Local Subplasmalemmal Calcium Store Activation by Local Ca<sup>2+</sup> Influx.” *The Journal of Cell Biology* 136 (3): 597–607.
- Felgner, Philip L., Meta Roestenberg, Li Liang, Christopher Hung, Aarti Jain, Jozelyn Pablo, Rie Nakajima-Sasaki, et al. 2013. “Pre-Erythrocytic Antibody Profiles Induced by Controlled Human Malaria Infections in Healthy Volunteers under Chloroquine Prophylaxis.” *Scientific Reports* 3: 3549. doi:10.1038/srep03549.
- Foquet, Lander, Cornelius C. Hermsen, Lieven Verhoye, Geert-Jan van Gemert, Riccardo Cortese, Alfredo Nicosia, Robert W. Sauerwein, Geert Leroux-Roels, and Philip Meuleman. 2015. “Anti-CD81 but Not Anti-SR-BI Blocks Plasmodium Falciparum Liver Infection in a Humanized Mouse Model.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (6): 1784–87. doi:10.1093/jac/dkv019.
- Forni, Diego, Chiara Pontremoli, Rachele Cagliani, Uberto Pozzoli, Mario Clerici, and Manuela Sironi. 2015. “Positive Selection Underlies the Species-Specific Binding of Plasmodium Falciparum RH5 to Human Basigin.” *Molecular Ecology* 24 (18): 4711–22. doi:10.1111/mec.13354.
- Foth, Bernardo J., and Geoffrey I. McFadden. 2003. “The Apicoplast: A Plastid in Plasmodium Falciparum and Other Apicomplexan Parasites.” *International Review of Cytology* 224: 57–110.
- Franke-Fayard, Blandine, Chris J. Janse, Margarida Cunha-Rodrigues, Jai Ramesar, Philippe Büscher, Ivo Que, Clemens Löwik, et al. 2005. “Murine Malaria Parasite Sequestration: CD36 Is the Major Receptor, but Cerebral Pathology Is Unlinked to Sequestration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (32): 11468–73. doi:10.1073/pnas.0503386102.
- Franke-Fayard, Blandine, Holly Trueman, Jai Ramesar, Jacqui Mendoza, Maarten van der Keur, Reinier van der Linden, Robert E. Sinden, Andrew P. Waters, and Chris J. Janse. 2004. “A Plasmodium Berghei Reference Line That Constitutively Expresses GFP at a High Level throughout the Complete Life Cycle.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 137 (1): 23–33. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.04.007.
- Frénil, Karine, Valérie Polonais, Jean-Baptiste Marq, Rolf Stratmann, Julien Limenitakis, and Dominique Soldati-Favre. 2010. “Functional Dissection of the Apicomplexan Glideosome Molecular Architecture.” *Cell Host & Microbe* 8 (4): 343–57. doi:10.1016/j.chom.2010.09.002.
- Frevert, U., P. Sinnis, C. Cerami, W. Shreffler, B. Takacs, and V. Nussenzweig. 1993. “Malaria Circumsporozoite Protein Binds to Heparan Sulfate Proteoglycans Associated with the Surface Membrane of Hepatocytes.” *The Journal of Experimental Medicine* 177 (5): 1287–98.
- Frevert, Ute, Sabine Engelmann, Sergine Zougbedé, Jörg Stange, Bruce Ng, Kai Matuschewski, Leonard Liebes, and Herman Yee. 2005. “Intravital Observation of Plasmodium Berghei Sporozoite Infection of the Liver.” *PLoS Biology* 3 (6): e192. doi:10.1371/journal.pbio.0030192.
- Fried, M., and P. E. Duffy. 1996. “Adherence of Plasmodium Falciparum to Chondroitin Sulfate A in the Human Placenta.” *Science (New York, N.Y.)* 272 (5267): 1502–4.

- Frischknecht, Friedrich, Patricia Baldacci, Béatrice Martin, Christophe Zimmer, Sabine Thiberge, Jean-Christophe Olivo-Marin, Spencer L. Shorte, and Robert Ménard. 2004. "Imaging Movement of Malaria Parasites during Transmission by Anopheles Mosquitoes." *Cellular Microbiology* 6 (7): 687–94. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00395.x.
- Fu, Jun, Fabián E. Sáenz, Michael B. Reed, Bharath Balu, Naresh Singh, Peter L. Blair, Alan F. Cowman, and John H. Adams. 2005. "Targeted Disruption of Maebl in Plasmodium Falciparum." *Molecular and Biochemical Parasitology* 141 (1): 113–17. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.12.017.
- Gantt, S., C. Persson, K. Rose, A. J. Birkett, R. Abagyan, and V. Nussenzweig. 2000. "Antibodies against Thrombospondin-Related Anonymous Protein Do Not Inhibit Plasmodium Sporozoite Infectivity in Vivo." *Infection and Immunity* 68 (6): 3667–73.
- Gao, Xiaohong, Karthigayan Gunalan, Sally Shu Lin Yap, and Peter R. Preiser. 2013. "Triggers of Key Calcium Signals during Erythrocyte Invasion by Plasmodium Falciparum." *Nature Communications* 4 (November): 2862. doi:10.1038/ncomms3862.
- Garcia, Javier E., Alvaro Puentes, and Manuel E. Patarroyo. 2006. "Developmental Biology of Sporozoite-Host Interactions in Plasmodium Falciparum Malaria: Implications for Vaccine Design." *Clinical Microbiology Reviews* 19 (4): 686–707. doi:10.1128/CMR.00063-05.
- Gardner, Malcolm J., Neil Hall, Eula Fung, Owen White, Matthew Berriman, Richard W. Hyman, Jane M. Carlton, et al. 2002. "Genome Sequence of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Nature* 419 (6906): 498–511. doi:10.1038/nature01097.
- Garg, Swati, Shalini Agarwal, Saravanan Kumar, Syed Shams Yazdani, Chetan E. Chitnis, and Shailja Singh. 2013. "Calcium-Dependent Permeabilization of Erythrocytes by a Perforin-like Protein during Egress of Malaria Parasites." *Nature Communications* 4: 1736. doi:10.1038/ncomms2725.
- Gaur, Deepak, Jill R. Storry, Marion E. Reid, John W. Barnwell, and Louis H. Miller. 2003. "Plasmodium Falciparum Is Able To Invade Erythrocytes through a Trypsin-Resistant Pathway Independent of Glycophorin B." *Infection and Immunity* 71 (12): 6742–46. doi:10.1128/IAI.71.12.6742-6746.2003.
- Genton, Blaise, Inoni Betuela, Ingrid Felger, Fadwa Al-Yaman, Robin F. Anders, Allan Saul, Lawrence Rare, et al. 2002. "A Recombinant Blood-Stage Malaria Vaccine Reduces Plasmodium Falciparum Density and Exerts Selective Pressure on Parasite Populations in a Phase 1-2b Trial in Papua New Guinea." *The Journal of Infectious Diseases* 185 (6): 820–27. doi:10.1086/339342.
- Gerloff, Dietlind L., Alison Creasey, Siarhei Maslau, and Richard Carter. 2005. "Structural Models for the Protein Family Characterized by Gamete Surface Protein Pfs230 of Plasmodium Falciparum." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (38): 13598–603. doi:10.1073/pnas.0502378102.
- Ghai, Mala, Sheetij Dutta, Ted Hall, Daniel Freilich, and Christian F. Ockenhouse. 2002. "Identification, Expression, and Functional Characterization of MAEBL, a Sporozoite and Asexual Blood Stage Chimeric Erythrocyte-Binding Protein of Plasmodium Falciparum." *Molecular and Biochemical Parasitology* 123 (1): 35–45.
- Ghorbal, Mehdi, Molly Gorman, Cameron Ross Macpherson, Rafael Miyazawa Martins, Artur Scherf, and Jose-Juan Lopez-Rubio. 2014. "Genome Editing in the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum Using the CRISPR-Cas9 System." *Nature Biotechnology* 32 (8): 819–21. doi:10.1038/nbt.2925.



- Ghosh, Anil K., Martin Devenport, Deepa Jethwaney, Dario E. Kalume, Akhilesh Pandey, Vernon E. Anderson, Ali A. Sultan, Nirbhay Kumar, and Marcelo Jacobs-Lorena. 2009. "Malaria Parasite Invasion of the Mosquito Salivary Gland Requires Interaction between the Plasmodium TRAP and the Anopheles Saglin Proteins." *PLoS Pathogens* 5 (1): e1000265. doi:10.1371/journal.ppat.1000265.
- Gilberger, Tim-Wolf, Jennifer K. Thompson, Michael B. Reed, Robert T. Good, and Alan F. Cowman. 2003. "The Cytoplasmic Domain of the Plasmodium Falciparum Ligand EBA-175 Is Essential for Invasion but Not Protein Trafficking." *The Journal of Cell Biology* 162 (2): 317–27. doi:10.1083/jcb.200301046.
- Gilson, Paul R., Thomas Nebl, Damjan Vukcevic, Robert L. Moritz, Tobias Sargeant, Terence P. Speed, Louis Schofield, and Brendan S. Crabb. 2006. "Identification and Stoichiometry of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 5 (7): 1286–99. doi:10.1074/mcp.M600035-MCP200.
- Giovannini, Donatella, Stephan Späth, Céline Lacroix, Audrey Perazzi, Daniel Bargieri, Vanessa Lagal, Camille Lebugle, et al. 2011. "Independent Roles of Apical Membrane Antigen 1 and Rhoptry Neck Proteins during Host Cell Invasion by Apicomplexa." *Cell Host & Microbe* 10 (6): 591–602. doi:10.1016/j.chom.2011.10.012.
- Godson, G. N., J. Ellis, P. Svec, D. H. Schlesinger, and V. Nussenzweig. 1983. "Identification and Chemical Synthesis of a Tandemly Repeated Immunogenic Region of Plasmodium Knowlesi Circumsporozoite Protein." *Nature* 305 (5929): 29–33.
- Goldszmid, Romina S., Isabelle Coppens, Avital Lev, Pat Caspar, Ira Mellman, and Alan Sher. 2009. "Host ER-Parasitophorous Vacuole Interaction Provides a Route of Entry for Antigen Cross-Presentation in Toxoplasma Gondii-Infected Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (2): 399–410. doi:10.1084/jem.20082108.
- Goodman, A. L., and S. J. Draper. 2010. "Blood-Stage Malaria Vaccines - Recent Progress and Future Challenges." *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 104 (3): 189–211. doi:10.1179/136485910X12647085215534.
- Gueirard, Pascale, Joana Tavares, Sabine Thiberge, Florence Bernex, Tomoko Ishino, Genevieve Milon, Blandine Franke-Fayard, Chris J. Janse, Robert Ménard, and Rogerio Amino. 2010. "Development of the Malaria Parasite in the Skin of the Mammalian Host." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (43): 18640–45. doi:10.1073/pnas.1009346107.
- Guthmiller, Jenna J., Ryan A. Zander, and Noah S. Butler. 2015. "Measurement of the T Cell Response to Preerythrocytic Vaccination in Mice." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1325: 19–37. doi:10.1007/978-1-4939-2815-6\_2.
- Guyatt, Helen L., and Robert W. Snow. 2004. "Impact of Malaria during Pregnancy on Low Birth Weight in Sub-Saharan Africa." *Clinical Microbiology Reviews* 17 (4): 760–69, table of contents. doi:10.1128/CMR.17.4.760-769.2004.
- Guyatt, H. L., and R. W. Snow. 2001. "Malaria in Pregnancy as an Indirect Cause of Infant Mortality in Sub-Saharan Africa." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95 (6): 569–76.
- Han, Y. S., J. Thompson, F. C. Kafatos, and C. Barillas-Mury. 2000. "Molecular Interactions between Anopheles Stephensi Midgut Cells and Plasmodium Berghei: The Time Bomb Theory of Ookinete Invasion of Mosquitoes." *The EMBO Journal* 19 (22): 6030–40. doi:10.1093/emboj/19.22.6030.
- Harris, Karen S., Joanne L. Casey, Andrew M. Coley, John A. Karas, Jennifer K. Sabo, Yen Yee Tan, Olan Dolezal, et al. 2009. "Rapid Optimization of a Peptide Inhibitor

- of Malaria Parasite Invasion by Comprehensive N-Methyl Scanning.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (14): 9361–71. doi:10.1074/jbc.M808762200.
- Hayton, Karen, Deepak Gaur, Anna Liu, Jonathan Takahashi, Bruce Henschen, Subhash Singh, Lynn Lambert, et al. 2008. “Erythrocyte Binding Protein PfRH5 Polymorphisms Determine Species-Specific Pathways of Plasmodium Falciparum Invasion.” *Cell Host & Microbe* 4 (1): 40–51. doi:10.1016/j.chom.2008.06.001.
- Heintzelman, M. B., and J. D. Schwartzman. 1997. “A Novel Class of Unconventional Myosins from Toxoplasma Gondii.” *Journal of Molecular Biology* 271 (1): 139–46. doi:10.1006/jmbi.1997.1167.
- . 1999. “Characterization of Myosin-A and Myosin-C: Two Class XIV Unconventional Myosins from Toxoplasma Gondii.” *Cell Motility and the Cytoskeleton* 44 (1): 58–67. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(199909)44:1<58::AID-CM5>3.0.CO;2-R.
- Henderson, Kylie A., Victor A. Streltsov, Andrew M. Coley, Olan Dolezal, Peter J. Hudson, Adrian H. Batchelor, Aditi Gupta, et al. 2007. “Structure of an IgNAR-AMA1 Complex: Targeting a Conserved Hydrophobic Cleft Broadens Malarial Strain Recognition.” *Structure (London, England: 1993)* 15 (11): 1452–66. doi:10.1016/j.str.2007.09.011.
- Herrera, Raul, Charles Anderson, Krishan Kumar, Alvaro Molina-Cruz, Vu Nguyen, Martin Burkhardt, Karine Reiter, et al. 2015. “Reversible Conformational Change in the Plasmodium Falciparum Circumsporozoite Protein Masks Its Adhesion Domains.” *Infection and Immunity* 83 (10): 3771–80. doi:10.1128/IAI.02676-14.
- Hien, Tran Tinh, Nguyen Thanh Thuy-Nhien, Nguyen Hoan Phu, Maciej F. Boni, Ngo Viet Thanh, Nguyen Thuy Nha-Ca, Le Hong Thai, et al. 2012. “In Vivo Susceptibility of Plasmodium Falciparum to Artesunate in Binh Phuoc Province, Vietnam.” *Malaria Journal* 11: 355. doi:10.1186/1475-2875-11-355.
- Hirai, Makoto, Meiji Arai, Toshiyuki Mori, Shin-Ya Miyagishima, Satoru Kawai, Kiyoshi Kita, Tsuneyoshi Kuroiwa, Olle Terenius, and Hiroyuki Matsuoka. 2008. “Male Fertility of Malaria Parasites Is Determined by GCS1, a Plant-Type Reproduction Factor.” *Current Biology: CB* 18 (8): 607–13. doi:10.1016/j.cub.2008.03.045.
- Hirai, Makoto, and Toshiyuki Mori. 2010. “Fertilization Is a Novel Attacking Site for the Transmission Blocking of Malaria Parasites.” *Acta Tropica* 114 (3): 157–61. doi:10.1016/j.actatropica.2009.08.005.
- Hodder, A. N., P. E. Crewther, M. L. Matthew, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson, and R. F. Anders. 1996. “The Disulfide Bond Structure of Plasmodium Apical Membrane Antigen-1.” *The Journal of Biological Chemistry* 271 (46): 29446–52.
- Hoffman, Stephen L., Lucy M. L. Goh, Thomas C. Luke, Imogene Schneider, Thong P. Le, Denise L. Doolan, John Sacci, et al. 2002. “Protection of Humans against Malaria by Immunization with Radiation-Attenuated Plasmodium Falciparum Sporozoites.” *The Journal of Infectious Diseases* 185 (8): 1155–64. doi:10.1086/339409.
- Holt, G. D., M. K. Pangburn, and V. Ginsburg. 1990. “Properdin Binds to Sulfatide [Gal(3-SO<sub>4</sub>)beta 1-1 Cer] and Has a Sequence Homology with Other Proteins That Bind Sulfated Glycoconjugates.” *The Journal of Biological Chemistry* 265 (5): 2852–55.
- Hossain, Mohammad E., Shikha Dhawan, and Asif Mohammed. 2012. “The Cysteine-Rich Regions of Plasmodium Falciparum RON2 Bind with Host Erythrocyte and AMA1 during Merozoite Invasion.” *Parasitology Research* 110 (5): 1711–21. doi:10.1007/s00436-011-2690-z.
- Hsu, Patrick D., Eric S. Lander, and Feng Zhang. 2014. “Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering.” *Cell* 157 (6): 1262–78. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.

- Ishino, Tomoko, Yasuo Chinzei, and Masao Yuda. 2005a. "A Plasmodium Sporozoite Protein with a Membrane Attack Complex Domain Is Required for Breaching the Liver Sinusoidal Cell Layer prior to Hepatocyte Infection." *Cellular Microbiology* 7 (2): 199–208. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00447.x.
- . 2005b. "Two Proteins with 6-Cys Motifs Are Required for Malarial Parasites to Commit to Infection of the Hepatocyte." *Molecular Microbiology* 58 (5): 1264–75. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04801.x.
- . 2005c. "Two Proteins with 6-Cys Motifs Are Required for Malarial Parasites to Commit to Infection of the Hepatocyte." *Molecular Microbiology* 58 (5): 1264–75. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04801.x.
- Ishino, Tomoko, Kazuhiko Yano, Yasuo Chinzei, and Masao Yuda. 2004. "Cell-Passage Activity Is Required for the Malarial Parasite to Cross the Liver Sinusoidal Cell Layer." *PLoS Biology* 2 (1): E4. doi:10.1371/journal.pbio.0020004.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata. 1987. "Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia Coli*, and Identification of the Gene Product." *Journal of Bacteriology* 169 (12): 5429–33.
- Iwanaga, Shiroh, Shahid M. Khan, Izumi Kaneko, Zoe Christodoulou, Chris Newbold, Masao Yuda, Chris J. Janse, and Andrew P. Waters. 2010. "Functional Identification of the Plasmodium Centromere and Generation of a Plasmodium Artificial Chromosome." *Cell Host & Microbe* 7 (3): 245–55. doi:10.1016/j.chom.2010.02.010.
- Jansen, Ruud, Jan D. A. van Embden, Wim Gaastra, and Leo M. Schouls. 2002. "Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes." *Molecular Microbiology* 43 (6): 1565–75.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096): 816–21. doi:10.1126/science.1225829.
- Kafsack, Björn F. C., Janethe D. O. Pena, Isabelle Coppens, Sandeep Ravindran, John C. Boothroyd, and Vern B. Carruthers. 2009. "Rapid Membrane Disruption by a Perforin-like Protein Facilitates Parasite Exit from Host Cells." *Science (New York, N.Y.)* 323 (5913): 530–33. doi:10.1126/science.1165740.
- Kaiser, Karine, Nelly Camargo, Isabelle Coppens, Joanne M. Morrissey, Akhil B. Vaidya, and Stefan H. I. Kappe. 2004. "A Member of a Conserved Plasmodium Protein Family with Membrane-Attack Complex/perforin (MACPF)-like Domains Localizes to the Micronemes of Sporozoites." *Molecular and Biochemical Parasitology* 133 (1): 15–26.
- Kappe, S. H., A. R. Noe, T. S. Fraser, P. L. Blair, and J. H. Adams. 1998. "A Family of Chimeric Erythrocyte Binding Proteins of Malaria Parasites." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (3): 1230–35.
- Kappe, Stefan, Thomas Bruderer, Soren Gantt, Hisashi Fujioka, Victor Nussenzweig, and Robert Ménard. 1999. "Conservation of a Gliding Motility and Cell Invasion Machinery in Apicomplexan Parasites." *The Journal of Cell Biology* 147 (5): 937–44.
- Kappe, Stefan H. I., Carlos A. Buscaglia, and Victor Nussenzweig. 2004. "Plasmodium Sporozoite Molecular Cell Biology." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 29–59. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.011603.150935.
- Kariu, Tohru, Tomoko Ishino, Kazuhiko Yano, Yasuo Chinzei, and Masao Yuda. 2006. "CelTOS, a Novel Malarial Protein That Mediates Transmission to Mosquito and Vertebrate Hosts." *Molecular Microbiology* 59 (5): 1369–79. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05024.x.

- Kariu, Tohru, Masao Yuda, Kazuhiko Yano, and Yasuo Chinzei. 2002. "MAEBL Is Essential for Malarial Sporozoite Infection of the Mosquito Salivary Gland." *The Journal of Experimental Medicine* 195 (10): 1317–23.
- Kaushansky, Alexis, Alyse N. Douglass, Nadia Arang, Vladimir Vigdorovich, Nicholas Dambrauskas, Heather S. Kain, Laura S. Austin, D. Noah Sather, and Stefan H. I. Kappe. 2015. "Malaria Parasites Target the Hepatocyte Receptor EphA2 for Successful Host Infection." *Science* 350 (6264): 1089–92. doi:10.1126/science.aad3318.
- Kennedy, Michael C., Jin Wang, Yanling Zhang, Aaron P. Miles, Farideh Chitsaz, Allan Saul, Carole A. Long, Louis H. Miller, and Anthony W. Stowers. 2002. "In Vitro Studies with Recombinant Plasmodium Falciparum Apical Membrane Antigen 1 (AMA1): Production and Activity of an AMA1 Vaccine and Generation of a Multiallelic Response." *Infection and Immunity* 70 (12): 6948–60.
- Khan, Shahid M., Blandine Franke-Fayard, Gunnar R. Mair, Edwin Lasonder, Chris J. Janse, Matthias Mann, and Andrew P. Waters. 2005. "Proteome Analysis of Separated Male and Female Gametocytes Reveals Novel Sex-Specific Plasmodium Biology." *Cell* 121 (5): 675–87. doi:10.1016/j.cell.2005.03.027.
- Kumar, Kota Arun, Celia R. S. Garcia, Vandana R. Chandran, N. Van Rooijen, Yingyao Zhou, Elizabeth Winzeler, and Victor Nussenzweig. 2007. "Exposure of Plasmodium Sporozoites to the Intracellular Concentration of Potassium Enhances Infectivity and Reduces Cell Passage Activity." *Molecular and Biochemical Parasitology* 156 (1): 32–40. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.07.004.
- Kumar, N. 1987. "Target Antigens of Malaria Transmission Blocking Immunity Exist as a Stable Membrane Bound Complex." *Parasite Immunology* 9 (3): 321–35.
- Kusi, Kwadwo A., Samuel Bosomprah, Daniel Dodoo, Eric Kyei-Baafour, Emmanuel K. Dickson, Daniel Mensah, Evelina Angov, Sheetij Dutta, Martha Sedegah, and Kwadwo A. Koram. 2014. "Anti-Sporozoite Antibodies as Alternative Markers for Malaria Transmission Intensity Estimation." *Malaria Journal* 13: 103. doi:10.1186/1475-2875-13-103.
- Kyaw, Myat P., Myat H. Nyunt, Khin Chit, Moe M. Aye, Kyin H. Aye, Moe M. Aye, Niklas Lindegardh, et al. 2013. "Reduced Susceptibility of Plasmodium Falciparum to Artesunate in Southern Myanmar." *PLoS One* 8 (3): e57689. doi:10.1371/journal.pone.0057689.
- Labaied, Mehdi, Anke Harupa, Ronald F. Dumpit, Isabelle Coppens, Sebastian A. Mikolajczak, and Stefan H. I. Kappe. 2007. "Plasmodium Yoelii Sporozoites with Simultaneous Deletion of P52 and P36 Are Completely Attenuated and Confer Sterile Immunity against Infection." *Infection and Immunity* 75 (8): 3758–68. doi:10.1128/IAI.00225-07.
- Laliberté, J., and V. B. Carruthers. 2008. "Host Cell Manipulation by the Human Pathogen Toxoplasma Gondii." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65 (12): 1900–1915. doi:10.1007/s00018-008-7556-x.
- Lamarque, Mauld, Sébastien Besteiro, Julien Papoin, Magali Roques, Brigitte Vulliez-Le Normand, Juliette Morlon-Guyot, Jean-François Dubremetz, et al. 2011a. "The RON2-AMA1 Interaction Is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites." *PLoS Pathogens* 7 (2): e1001276. doi:10.1371/journal.ppat.1001276.
- . 2011b. "The RON2-AMA1 Interaction Is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites." *PLoS Pathogens* 7 (2): e1001276. doi:10.1371/journal.ppat.1001276.
- Lamarque, Mauld H., Magali Roques, Marie Kong-Hap, Michelle L. Tonkin, George Rugarabamu, Jean-Baptiste Marq, Diana M. Penarete-Vargas, Martin J. Boulanger, Dominique Soldati-Favre, and Maryse Lebrun. 2014. "Plasticity and Redundancy

- among AMA-RON Pairs Ensure Host Cell Entry of Toxoplasma Parasites.” *Nature Communications* 5: 4098. doi:10.1038/ncomms5098.
- Lebrun, Maryse, Adeline Michelin, Hiba El Hajj, Joël Poncet, Peter J. Bradley, Henri Vial, and Jean François Dubremetz. 2005. “The Rhoptry Neck Protein RON4 Re-Localizes at the Moving Junction during Toxoplasma Gondii Invasion.” *Cellular Microbiology* 7 (12): 1823–33. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00646.x.
- Leite, Juliana A., Daniel Y. Bargieri, Bruna O. Carvalho, Letusa Albrecht, Stefanie C. P. Lopes, Ana Carolina A. V. Kayano, Alessandro S. Farias, et al. 2015. “Immunization with the MAEBL M2 Domain Protects against Lethal Plasmodium Yoelii Infection.” *Infection and Immunity*, July. doi:10.1128/IAI.00262-15.
- Le Roch, Karine G., Yingyao Zhou, Peter L. Blair, Muni Grainger, J. Kathleen Moch, J. David Haynes, Patricia De La Vega, et al. 2003. “Discovery of Gene Function by Expression Profiling of the Malaria Parasite Life Cycle.” *Science (New York, N.Y.)* 301 (5639): 1503–8. doi:10.1126/science.1087025.
- Lim, San Sui, Wei Yang, Bankala Krishnarjuna, Komagal Kannan Sivaraman, Indu R. Chandrashekar, Itamar Kass, Christopher A. MacRaid, et al. 2014. “Structure and Dynamics of Apical Membrane Antigen 1 from Plasmodium Falciparum FVO.” *Biochemistry* 53 (46): 7310–20. doi:10.1021/bi5012089.
- Lisabeth, Erika M., Giulia Falivelli, and Elena B. Pasquale. 2013. “Eph Receptor Signaling and Ephrins.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (9). doi:10.1101/cshperspect.a009159.
- Lovett, Jennie L., and L. David Sibley. 2003. “Intracellular Calcium Stores in Toxoplasma Gondii Govern Invasion of Host Cells.” *Journal of Cell Science* 116 (Pt 14): 3009–16. doi:10.1242/jcs.00596.
- Lyon, M., J. A. Deakin, K. Mizuno, T. Nakamura, and J. T. Gallagher. 1994. “Interaction of Hepatocyte Growth Factor with Heparan Sulfate. Elucidation of the Major Heparan Sulfate Structural Determinants.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (15): 11216–23.
- Maier, Alexander G., Manoj T. Duraisingh, John C. Reeder, Sheral S. Patel, James W. Kazura, Peter A. Zimmerman, and Alan F. Cowman. 2003. “Plasmodium Falciparum Erythrocyte Invasion through Glycophorin C and Selection for Gerbich Negativity in Human Populations.” *Nature Medicine* 9 (1): 87–92. doi:10.1038/nm807.
- Mali, Prashant, Kevin M. Esvelt, and George M. Church. 2013. “Cas9 as a Versatile Tool for Engineering Biology.” *Nature Methods* 10 (10): 957–63. doi:10.1038/nmeth.2649.
- Manzoni, Giulia, Sylvie Briquet, Veronica Risco-Castillo, Charlotte Gaultier, Selma Topçu, Maria Larisa Ivănescu, Jean-François Franetich, Bénédicte Hoareau-Coudert, Dominique Mazier, and Olivier Silvie. 2014. “A Rapid and Robust Selection Procedure for Generating Drug-Selectable Marker-Free Recombinant Malaria Parasites.” *Scientific Reports* 4: 4760. doi:10.1038/srep04760.
- Marsh, K. 1992. “Malaria--a Neglected Disease?” *Parasitology* 104 Suppl: S53–69.
- Matuschewski, Kai, Jessica Ross, Stuart M. Brown, Karine Kaiser, Victor Nussenzweig, and Stefan H. I. Kappe. 2002. “Infectivity-Associated Changes in the Transcriptional Repertoire of the Malaria Parasite Sporozoite Stage.” *The Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 41948–53. doi:10.1074/jbc.M207315200.
- Matuschewski, K., M. M. Mota, J. C. Pinder, V. Nussenzweig, and S. H. Kappe. 2001. “Identification of the Class XIV Myosins Pb-MyoA and Py-MyoA and Expression in Plasmodium Sporozoites.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 112 (1): 157–61.
- McCarthy, James S., Joanne Marjason, Suzanne Elliott, Paul Fahey, Gilles Bang, Elissa Malkin, Eveline Tierney, et al. 2011. “A Phase 1 Trial of MSP2-C1, a Blood-Stage

- Malaria Vaccine Containing 2 Isoforms of MSP2 Formulated with Montanide® ISA 720.” *PloS One* 6 (9): e24413. doi:10.1371/journal.pone.0024413.
- McCutchan, T. F., J. C. Kissinger, M. G. Touray, M. J. Rogers, J. Li, M. Sullivan, E. M. Braga, A. U. Krettli, and L. H. Miller. 1996. “Comparison of Circumsporozoite Proteins from Avian and Mammalian Malaria: Biological and Phylogenetic Implications.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (21): 11889–94.
- McGregor, I. A. 1984. “Epidemiology, Malaria and Pregnancy.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33 (4): 517–25.
- Meissner, Markus, Dirk Schlüter, and Dominique Soldati. 2002. “Role of Toxoplasma Gondii Myosin A in Powering Parasite Gliding and Host Cell Invasion.” *Science (New York, N.Y.)* 298 (5594): 837–40. doi:10.1126/science.1074553.
- Ménard, R., and V. Nussenzweig. 2000. “Structure-Function Analysis of Malaria Proteins by Gene Targeting.” *Parasitology Today (Personal Ed.)* 16 (6): 222–24.
- Ménard, Robert, Joana Tavares, Ian Cockburn, Miles Markus, Fidel Zavala, and Rogerio Amino. 2013. “Looking under the Skin: The First Steps in Malarial Infection and Immunity.” *Nature Reviews. Microbiology* 11 (10): 701–12. doi:10.1038/nrmicro3111.
- Ménard, R., A. A. Sultan, C. Cortes, R. Altszuler, M. R. van Dijk, C. J. Janse, A. P. Waters, R. S. Nussenzweig, and V. Nussenzweig. 1997. “Circumsporozoite Protein Is Required for Development of Malaria Sporozoites in Mosquitoes.” *Nature* 385 (6614): 336–40. doi:10.1038/385336a0.
- Mikolajczak, Sebastian A., Vanessa Jacobs-Lorena, Drew C. MacKellar, Nelly Camargo, and Stefan H. I. Kappe. 2007. “L-FABP Is a Critical Host Factor for Successful Malaria Liver Stage Development.” *International Journal for Parasitology* 37 (5): 483–89. doi:10.1016/j.ijpara.2007.01.002.
- Mikolajczak, Sebastian A., Viswanathan Lakshmanan, Matthew Fishbaugher, Nelly Camargo, Anke Harupa, Alexis Kaushansky, Alyse N. Douglass, et al. 2014. “A next-Generation Genetically Attenuated Plasmodium Falciparum Parasite Created by Triple Gene Deletion.” *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 22 (9): 1707–15. doi:10.1038/mt.2014.85.
- Mohan, K, and KK Stevenson. 1998, ASM Press, pp. 467-493 edition.
- Mojica, F. J., C. Díez-Villaseñor, E. Soria, and G. Juez. 2000. “Biological Significance of a Family of Regularly Spaced Repeats in the Genomes of Archaea, Bacteria and Mitochondria.” *Molecular Microbiology* 36 (1): 244–46.
- Mok, Sachel, Mallika Imwong, Margaret J. Mackinnon, Joan Sim, Ramya Ramadoss, Poravuth Yi, Mayfong Mayxay, et al. 2011. “Artemisinin Resistance in Plasmodium Falciparum Is Associated with an Altered Temporal Pattern of Transcription.” *BMC Genomics* 12: 391. doi:10.1186/1471-2164-12-391.
- Molina-Cruz, Alvaro, Lindsey S. Garver, Amy Alabaster, Lois Bangiolo, Ashley Haile, Jared Winikor, Corrie Ortega, et al. 2013. “The Human Malaria Parasite Pfs47 Gene Mediates Evasion of the Mosquito Immune System.” *Science (New York, N.Y.)* 340 (6135): 984–87. doi:10.1126/science.1235264.
- Mordue, D. G., N. Desai, M. Dustin, and L. D. Sibley. 1999. “Invasion by Toxoplasma Gondii Establishes a Moving Junction That Selectively Excludes Host Cell Plasma Membrane Proteins on the Basis of Their Membrane Anchoring.” *The Journal of Experimental Medicine* 190 (12): 1783–92.
- Moreira, Cristina K., Thomas J. Templeton, Catherine Lavazec, Rhian E. Hayward, Charlotte V. Hobbs, Hans Kroeze, Chris J. Janse, Andrew P. Waters, Photini Sinnis, and Alida Coppi. 2008. “The Plasmodium TRAP/MIC2 Family Member, TRAP-Like Protein (TLP), Is Involved in Tissue Traversal by Sporozoites.” *Cellular Microbiology* 10 (7): 1505–16. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01143.x.

- Morrisette, Naomi S., and L. David Sibley. 2002. "Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 66 (1): 21–38; table of contents.
- Mota, Maria M., Julius C. R. Hafalla, and Ana Rodriguez. 2002. "Migration through Host Cells Activates Plasmodium Sporozoites for Infection." *Nature Medicine* 8 (11): 1318–22. doi:10.1038/nm785.
- Mota, M. M., G. Pradel, J. P. Vanderberg, J. C. Hafalla, U. Frevert, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, and A. Rodríguez. 2001. "Migration of Plasmodium Sporozoites through Cells before Infection." *Science (New York, N.Y.)* 291 (5501): 141–44. doi:10.1126/science.291.5501.141.
- Mota, M. M., V. Thathy, R. S. Nussenzweig, and V. Nussenzweig. 2001. "Gene Targeting in the Rodent Malaria Parasite Plasmodium Yoelii." *Molecular and Biochemical Parasitology* 113 (2): 271–78.
- Mueller, Ann-Kristin, Nelly Camargo, Karine Kaiser, Cathy Andorfer, Ute Frevert, Kai Matuschewski, and Stefan H. I. Kappe. 2005. "Plasmodium Liver Stage Developmental Arrest by Depletion of a Protein at the Parasite-Host Interface." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (8): 3022–27. doi:10.1073/pnas.0408442102.
- Mueller, Ann-Kristin, Mehdi Labaied, Stefan H. I. Kappe, and Kai Matuschewski. 2005. "Genetically Modified Plasmodium Parasites as a Protective Experimental Malaria Vaccine." *Nature* 433 (7022): 164–67. doi:10.1038/nature03188.
- Mullard, Asher. 2012. "Protein-Protein Interaction Inhibitors Get into the Groove." *Nature Reviews. Drug Discovery* 11 (3): 173–75. doi:10.1038/nrd3680.
- Nahrendorf, Wiebke, Anja Scholzen, Else M. Bijker, Anne C. Teirlinck, Guido J. H. Bastiaens, Remko Schats, Cornelus C. Hermsen, Leo G. Visser, Jean Langhorne, and Robert W. Sauerwein. 2014. "Memory B-Cell and Antibody Responses Induced by Plasmodium Falciparum Sporozoite Immunization." *The Journal of Infectious Diseases* 210 (12): 1981–90. doi:10.1093/infdis/jiu354.
- Nair, Margie, Mark G. Hinds, Andrew M. Coley, Anthony N. Hodder, Michael Foley, Robin F. Anders, and Raymond S. Norton. 2002. "Structure of Domain III of the Blood-Stage Malaria Vaccine Candidate, Plasmodium Falciparum Apical Membrane Antigen 1 (AMA1)." *Journal of Molecular Biology* 322 (4): 741–53.
- Narum, David L., Vu Nguyen, Yanling Zhang, Jacqueline Glen, Richard L. Shimp, Lynn Lambert, Irene T. Ling, et al. 2008. "Identification and Characterization of the Plasmodium Yoelii PyP140/RON4 Protein, an Orthologue of Toxoplasma Gondii RON4, Whose Cysteine-Rich Domain Does Not Protect against Lethal Parasite Challenge Infection." *Infection and Immunity* 76 (11): 4876–82. doi:10.1128/IAI.01717-07.
- Natarajan, R., V. Thathy, M. M. Mota, J. C. Hafalla, R. Ménard, and K. D. Vernick. 2001. "Fluorescent Plasmodium Berghei Sporozoites and Pre-Erythrocytic Stages: A New Tool to Study Mosquito and Mammalian Host Interactions with Malaria Parasites." *Cellular Microbiology* 3 (6): 371–79.
- Newbold, Chris, Alister Craig, Sue Kyes, Alex Rowe, Delmiro Fernandez-Reyes, and Toby Fagan. 1999. "Cytoadherence, Pathogenesis and the Infected Red Cell Surface in Plasmodium Falciparum." *International Journal for Parasitology* 29 (6): 927–37. doi:10.1016/S0020-7519(99)00049-1.
- Noedl, Harald, Youry Se, Kurt Schaefer, Bryan L. Smith, Duong Socheat, Mark M. Fukuda, and Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. 2008. "Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia." *The New England Journal of Medicine* 359 (24): 2619–20. doi:10.1056/NEJMc0805011.
- Nosten, François, Stephen J. Rogerson, James G. Beeson, Rose McGready, Theonest K. Mutabingwa, and Bernard Brabin. 2004. "Malaria in Pregnancy and the Endemicity

- Spectrum: What Can We Learn?" *Trends in Parasitology* 20 (9): 425–32. doi:10.1016/j.pt.2004.06.007.
- Orito, Yuki, Tomoko Ishino, Shiroh Iwanaga, Izumi Kaneko, Tomomi Kato, Robert Menard, Yasuo Chinzei, and Masao Yuda. 2013. "Liver-Specific Protein 2: A Plasmodium Protein Exported to the Hepatocyte Cytoplasm and Required for Merozoite Formation." *Molecular Microbiology* 87 (1): 66–79. doi:10.1111/mmi.12083.
- Orlandi, P. A., B. K. Sim, J. D. Chulay, and J. D. Haynes. 1990. "Characterization of the 175-Kilodalton Erythrocyte Binding Antigen of Plasmodium Falciparum." *Molecular and Biochemical Parasitology* 40 (2): 285–94.
- Outchkourov, Nikolay S., Will Roeffen, Anita Kaan, Josephine Jansen, Adrian Luty, Danielle Schuiffel, Geert Jan van Gemert, Marga van de Vegte-Bolmer, Robert W. Sauerwein, and Hendrik G. Stunnenberg. 2008. "Correctly Folded Pfs48/45 Protein of Plasmodium Falciparum Elicits Malaria Transmission-Blocking Immunity in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (11): 4301–5. doi:10.1073/pnas.0800459105.
- Pandey, Kailash C., Sanjay Singh, Priyabrata Pattnaik, C. R. Pillai, Usha Pillai, Andrew Lynn, S. K. Jain, and Chetan E. Chitnis. 2002. "Bacterially Expressed and Refolded Receptor Binding Domain of Plasmodium Falciparum EBA-175 Elicits Invasion Inhibitory Antibodies." *Molecular and Biochemical Parasitology* 123 (1): 23–33.
- Parker, Michelle L., Diana M. Penarete-Vargas, Phineas T. Hamilton, Amandine Guérin, Jitender P. Dubey, Steve J. Perlman, Furio Spano, Maryse Lebrun, and Martin J. Boulanger. 2015. "Dissecting the Interface between Apicomplexan Parasite and Host Cell: Insights from a Divergent AMA-RON2 Pair." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, December. doi:10.1073/pnas.1515898113.
- Peitsch, M. C., P. Amiguet, R. Guy, J. Brunner, J. V. Maizel, and J. Tschopp. 1990. "Localization and Molecular Modelling of the Membrane-Inserted Domain of the Ninth Component of Human Complement and Perforin." *Molecular Immunology* 27 (7): 589–602.
- Phyo, Aung Pyae, Standwell Nkhoma, Kasia Stepniewska, Elizabeth A. Ashley, Shalini Nair, Rose McGready, Carit ler Moo, et al. 2012. "Emergence of Artemisinin-Resistant Malaria on the Western Border of Thailand: A Longitudinal Study." *Lancet (London, England)* 379 (9830): 1960–66. doi:10.1016/S0140-6736(12)60484-X.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, et al. 1998. "Binding of Hepatitis C Virus to CD81." *Science (New York, N.Y.)* 282 (5390): 938–41.
- Pinder, J. C., R. E. Fowler, A. R. Dlugowski, L. H. Bannister, F. M. Lavin, G. H. Mitchell, R. J. Wilson, and W. B. Gratzer. 1998. "Actomyosin Motor in the Merozoite of the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum: Implications for Red Cell Invasion." *Journal of Cell Science* 111 ( Pt 13) (July): 1831–39.
- Pinzon-Ortiz, C., J. Friedman, J. Esko, and P. Sinnis. 2001. "The Binding of the Circumsporozoite Protein to Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Is Required for Plasmodium Sporozoite Attachment to Target Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (29): 26784–91. doi:10.1074/jbc.M104038200.
- Pizarro, Juan Carlos, Brigitte Vulliez-Le Normand, Marie-Laure Chesne-Seck, Christine R. Collins, Chrislaine Withers-Martinez, Fiona Hackett, Michael J. Blackman, et al. 2005. "Crystal Structure of the Malaria Vaccine Candidate Apical Membrane Antigen 1." *Science (New York, N.Y.)* 308 (5720): 408–11. doi:10.1126/science.1107449.



- Poukchanski, Anna, Heather M. Fritz, Michelle L. Tonkin, Moritz Treeck, Martin J. Boulanger, and John C. Boothroyd. 2013. "Toxoplasma Gondii Sporozoites Invade Host Cells Using Two Novel Paralogues of RON2 and AMA1." *PloS One* 8 (8): e70637. doi:10.1371/journal.pone.0070637.
- Pradel, Gabriele, Shivani Garapaty, and Ute Frevert. 2002. "Proteoglycans Mediate Malaria Sporozoite Targeting to the Liver." *Molecular Microbiology* 45 (3): 637–51.
- Preiser, Peter, Laurent Rénia, Naresh Singh, Bharath Balu, William Jarra, Tatiana Voza, Osamu Kaneko, et al. 2004. "Antibodies against MAEBL Ligand Domains M1 and M2 Inhibit Sporozoite Development in Vitro." *Infection and Immunity* 72 (6): 3604–8. doi:10.1128/IAI.72.6.3604-3608.2004.
- Prudêncio, Miguel, Cristina D. Rodrigues, Ricardo Ataíde, and Maria M. Mota. 2008. "Dissecting in Vitro Host Cell Infection by Plasmodium Sporozoites Using Flow Cytometry." *Cellular Microbiology* 10 (1): 218–24. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01032.x.
- Quakyi, I. A., R. Carter, J. Rener, N. Kumar, M. F. Good, and L. H. Miller. 1987. "The 230-kDa Gamete Surface Protein of Plasmodium Falciparum Is Also a Target for Transmission-Blocking Antibodies." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 139 (12): 4213–17.
- Ramphul, Urvashi N., Lindsey S. Garver, Alvaro Molina-Cruz, Gaspar E. Canepa, and Carolina Barillas-Mury. 2015. "Plasmodium Falciparum Evades Mosquito Immunity by Disrupting JNK-Mediated Apoptosis of Invaded Midgut Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (5): 1273–80. doi:10.1073/pnas.1423586112.
- Rathore, Dharmendar, John B. Sacci, Patricia de la Vega, and Thomas F. McCutchan. 2002. "Binding and Invasion of Liver Cells by Plasmodium Falciparum Sporozoites. Essential Involvement of the Amino Terminus of Circumsporozoite Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (9): 7092–98. doi:10.1074/jbc.M106862200.
- Reddy, K. Sony, Emmanuel Amlabu, Alok K. Pandey, Pallabi Mitra, Virander S. Chauhan, and Deepak Gaur. 2015. "Multiprotein Complex between the GPI-Anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr Is Crucial for Plasmodium Falciparum Erythrocyte Invasion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (4): 1179–84. doi:10.1073/pnas.1415466112.
- Rener, J., P. M. Graves, R. Carter, J. L. Williams, and T. R. Burkot. 1983. "Target Antigens of Transmission-Blocking Immunity on Gametes of Plasmodium Falciparum." *The Journal of Experimental Medicine* 158 (3): 976–81.
- Richard, Dave, Christopher A. MacRaid, David T. Riglar, Jo-Anne Chan, Michael Foley, Jake Baum, Stuart A. Ralph, Raymond S. Norton, and Alan F. Cowman. 2010. "Interaction between Plasmodium Falciparum Apical Membrane Antigen 1 and the Rhoptry Neck Protein Complex Defines a Key Step in the Erythrocyte Invasion Process of Malaria Parasites." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (19): 14815–22. doi:10.1074/jbc.M109.080770.
- Riglar, David T., Dave Richard, Danny W. Wilson, Michelle J. Boyle, Chaitali Dekiwadia, Lynne Turnbull, Fiona Angrisano, et al. 2011. "Super-Resolution Dissection of Coordinated Events during Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte." *Cell Host & Microbe* 9 (1): 9–20. doi:10.1016/j.chom.2010.12.003.
- Risco-Castillo, Veronica, Selma Topçu, Carine Marinach, Giulia Manzoni, Amélie E. Bigorgne, Sylvie Briquet, Xavier Baudin, Maryse Lebrun, Jean-François Dubremetz, and Olivier Silvie. 2015. "Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles." *Cell Host & Microbe*, October. doi:10.1016/j.chom.2015.10.006.

- Risco-Castillo, Veronica, Selma Topçu, Olivia Son, Sylvie Briquet, Giulia Manzoni, and Olivier Silvie. 2014. "CD81 Is Required for Rhoptry Discharge during Host Cell Invasion by Plasmodium Yoelii Sporozoites." *Cellular Microbiology* 16 (10): 1533–48. doi:10.1111/cmi.12309.
- Robson, K. J., U. Frevert, I. Reckmann, G. Cowan, J. Beier, I. G. Scragg, K. Takehara, D. H. Bishop, G. Pradel, and R. Sinden. 1995. "Thrombospondin-Related Adhesive Protein (TRAP) of Plasmodium Falciparum: Expression during Sporozoite Ontogeny and Binding to Human Hepatocytes." *The EMBO Journal* 14 (16): 3883–94.
- Rodriguez, Marilis, Sara Lustigman, Estrella Montero, Yelena Oksov, and Cheryl A. Lobo. 2008. "PfRH5: A Novel Reticulocyte-Binding Family Homolog of Plasmodium Falciparum That Binds to the Erythrocyte, and an Investigation of Its Receptor." *PloS One* 3 (10): e3300. doi:10.1371/journal.pone.0003300.
- Roeffen, W., T. Lensen, B. Mulder, K. Teelen, R. Sauerwein, J. Van Druten, W. Eling, J. H. Meuwissen, and P. J. Beckers. 1995. "A Comparison of Transmission-Blocking Activity with Reactivity in a Plasmodium Falciparum 48/45-kD Molecule-Specific Competition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 52 (1): 60–65.
- Roestenberg, Meta, Matthew McCall, Joost Hopman, Jorien Wiersma, Adrian J. F. Luty, Geert Jan van Gemert, Marga van de Vegte-Bolmer, et al. 2009. "Protection against a Malaria Challenge by Sporozoite Inoculation." *The New England Journal of Medicine* 361 (5): 468–77. doi:10.1056/NEJMoa0805832.
- Roestenberg, Meta, Anne C. Teirlinck, Matthew B. B. McCall, Karina Teelen, Krystelle Nganou Makamdop, Jorien Wiersma, Theo Arens, et al. 2011. "Long-Term Protection against Malaria after Experimental Sporozoite Inoculation: An Open-Label Follow-up Study." *Lancet (London, England)* 377 (9779): 1770–76. doi:10.1016/S0140-6736(11)60360-7.
- Rogers, W. O., A. Malik, S. Mellouk, K. Nakamura, M. D. Rogers, A. Szarfman, D. M. Gordon, A. K. Nussler, M. Aikawa, and S. L. Hoffman. 1992. "Characterization of Plasmodium Falciparum Sporozoite Surface Protein 2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (19): 9176–80.
- Rosenthal, Philip J. 2008. "Artesunate for the Treatment of Severe Falciparum Malaria." *The New England Journal of Medicine* 358 (17): 1829–36. doi:10.1056/NEJMct0709050.
- RTS,S Clinical Trials Partnership. 2015. "Efficacy and Safety of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine with or without a Booster Dose in Infants and Children in Africa: Final Results of a Phase 3, Individually Randomised, Controlled Trial." *Lancet (London, England)* 386 (9988): 31–45. doi:10.1016/S0140-6736(15)60721-8.
- Saenz, Fabian E., Bharath Balu, Jonah Smith, Sarita R. Mendonca, and John H. Adams. 2008. "The Transmembrane Isoform of Plasmodium Falciparum MAEBL Is Essential for the Invasion of Anopheles Salivary Glands." *PloS One* 3 (5): e2287. doi:10.1371/journal.pone.0002287.
- Salanti, Ali, Trine Staalsoe, Thomas Lavstsen, Anja T. R. Jensen, M. P. Kordai Sowa, David E. Arnot, Lars Hviid, and Thor G. Theander. 2003. "Selective Upregulation of a Single Distinctly Structured Var Gene in Chondroitin Sulphate A-Adhering Plasmodium Falciparum Involved in Pregnancy-Associated Malaria." *Molecular Microbiology* 49 (1): 179–91.
- Sanders, Paul R., Paul R. Gilson, Greg T. Cantin, Doron C. Greenbaum, Thomas Nebl, Daniel J. Carucci, Malcolm J. McConville, et al. 2005. "Distinct Protein Classes Including Novel Merozoite Surface Antigens in Raft-like Membranes of Plasmodium Falciparum." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (48): 40169–76. doi:10.1074/jbc.M509631200.

- Santos, Joana M., Maryse Lebrun, Wassim Daher, Dominique Soldati, and Jean-Francois Dubremetz. 2009. "Apicomplexan Cytoskeleton and Motors: Key Regulators in Morphogenesis, Cell Division, Transport and Motility." *International Journal for Parasitology* 39 (2): 153–62. doi:10.1016/j.ijpara.2008.10.007.
- Saralamba, Sompob, Wirichada Pan-Ngum, Richard J. Maude, Sue J. Lee, Joel Tarning, Niklas Lindegårdh, Kesinee Chotivanich, et al. 2011. "Intrahost Modeling of Artemisinin Resistance in Plasmodium Falciparum." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (1): 397–402. doi:10.1073/pnas.1006113108.
- Schussek, Sophie, Angela Trieu, Simon H. Apte, John Sidney, Alessandro Sette, and Denise L. Doolan. 2013. "Immunization with Apical Membrane Antigen 1 Confers Sterile Infection-Blocking Immunity against Plasmodium Sporozoite Challenge in a Rodent Model." *Infection and Immunity* 81 (10): 3586–99. doi:10.1128/IAI.00544-13.
- Schwarzmann, G., H. Wiegandt, B. Rose, A. Zimmerman, D. Ben-Haim, and W. R. Loewenstein. 1981. "Diameter of the Cell-to-Cell Junctional Membrane Channels as Probed with Neutral Molecules." *Science (New York, N.Y.)* 213 (4507): 551–53.
- Seder, Robert A., Lee-Jah Chang, Mary E. Enama, Kathryn L. Zephir, Uzma N. Sarwar, Ingelise J. Gordon, LaSonji A. Holman, et al. 2013. "Protection against Malaria by Intravenous Immunization with a Nonreplicating Sporozoite Vaccine." *Science (New York, N.Y.)* 341 (6152): 1359–65. doi:10.1126/science.1241800.
- Severini, C., F. Silvestrini, A. Sannella, S. Barca, L. Gradoni, and P. Alano. 1999. "The Production of the Osmiophilic Body Protein Pfg377 Is Associated with Stage of Maturation and Sex in Plasmodium Falciparum Gametocytes." *Molecular and Biochemical Parasitology* 100 (2): 247–52.
- Shen, Bang, and L. David Sibley. 2012. "The Moving Junction, a Key Portal to Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites." *Current Opinion in Microbiology* 15 (4): 449–55. doi:10.1016/j.mib.2012.02.007.
- Shulman, Caroline E., and Edgar K. Dorman. 2003. "Importance and Prevention of Malaria in Pregnancy." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97 (1): 30–35.
- Sidjanski, S. P., J. P. Vanderberg, and P. Sinnis. 1997. "Anopheles Stephensi Salivary Glands Bear Receptors for Region I of the Circumsporozoite Protein of Plasmodium Falciparum." *Molecular and Biochemical Parasitology* 90 (1): 33–41.
- Silvie, Olivier, Jean-François Franetich, Claude Boucheix, Eric Rubinstein, and Dominique Mazier. 2007. "Alternative Invasion Pathways for Plasmodium Berghei Sporozoites." *International Journal for Parasitology* 37 (2): 173–82. doi:10.1016/j.ijpara.2006.10.005.
- Silvie, Olivier, Jean-François Franetich, Stéphanie Charrin, Markus S. Mueller, Anthony Siau, Myriam Bodescot, Eric Rubinstein, et al. 2004. "A Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by Plasmodium Falciparum Sporozoites." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (10): 9490–96. doi:10.1074/jbc.M311331200.
- Silvie, Olivier, Kristin Goetz, and Kai Matuschewski. 2008. "A Sporozoite Asparagine-Rich Protein Controls Initiation of Plasmodium Liver Stage Development." *PLoS Pathogens* 4 (6). doi:10.1371/journal.ppat.1000086.
- Silvie, Olivier, Céline Greco, Jean-François Franetich, Anne Dubart-Kupperschmitt, Laurent Hannoun, Geert-Jan van Gemert, Robert W. Sauerwein, et al. 2006. "Expression of Human CD81 Differently Affects Host Cell Susceptibility to Malaria Sporozoites Depending on the Plasmodium Species." *Cellular Microbiology* 8 (7): 1134–46. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00697.x.

- Silvie, Olivier, Eric Rubinstein, Jean-François Franetich, Michel Prenant, Elodie Belnoue, Laurent Rénia, Laurent Hannoun, et al. 2003. "Hepatocyte CD81 Is Required for Plasmodium Falciparum and Plasmodium Yoelii Sporozoite Infectivity." *Nature Medicine* 9 (1): 93–96. doi:10.1038/nm808.
- Sim, B. K., C. E. Chitnis, K. Wasniowska, T. J. Hadley, and L. H. Miller. 1994. "Receptor and Ligand Domains for Invasion of Erythrocytes by Plasmodium Falciparum." *Science (New York, N.Y.)* 264 (5167): 1941–44.
- Singh, Shailja, M. Mahmood Alam, Ipsita Pal-Bhowmick, Joseph A. Brzostowski, and Chetan E. Chitnis. 2010. "Distinct External Signals Trigger Sequential Release of Apical Organelles during Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites." *PLoS Pathogens* 6 (2): e1000746. doi:10.1371/journal.ppat.1000746.
- Sinnis, P., P. Clavijo, D. Fenyö, B. T. Chait, C. Cerami, and V. Nussenzweig. 1994. "Structural and Functional Properties of Region II-plus of the Malaria Circumsporozoite Protein." *The Journal of Experimental Medicine* 180 (1): 297–306.
- Sinnis, Photini, and Alida Coppi. 2007. "A Long and Winding Road: The Plasmodium Sporozoite's Journey in the Mammalian Host." *Parasitology International* 56 (3): 171–78. doi:10.1016/j.parint.2007.04.002.
- Sinnis, Photini, and Elizabeth Nardin. 2002. "Sporozoite Antigens: Biology and Immunology of the Circumsporozoite Protein and Thrombospondin-Related Anonymous Protein." *Chemical Immunology* 80: 70–96.
- Smith, J. D., C. E. Chitnis, A. G. Craig, D. J. Roberts, D. E. Hudson-Taylor, D. S. Peterson, R. Pinches, C. I. Newbold, and L. H. Miller. 1995. "Switches in Expression of Plasmodium Falciparum Var Genes Correlate with Changes in Antigenic and Cytoadherent Phenotypes of Infected Erythrocytes." *Cell* 82 (1): 101–10.
- Snow, R. W., J. F. Trape, and K. Marsh. 2001. "The Past, Present and Future of Childhood Malaria Mortality in Africa." *Trends in Parasitology* 17 (12): 593–97.
- Spaccapelo, R., S. Naitza, K. J. Robson, and A. Crisanti. 1997. "Thrombospondin-Related Adhesive Protein (TRAP) of Plasmodium Berghei and Parasite Motility." *Lancet (London, England)* 350 (9074): 335. doi:10.1016/S0140-6736(97)24031-6.
- Spring, Michele D., James F. Cummings, Christian F. Ockenhouse, Sheetij Dutta, Randall Reidler, Evelina Angov, Elke Bergmann-Leitner, et al. 2009. "Phase 1/2a Study of the Malaria Vaccine Candidate Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) Administered in Adjuvant System AS01B or AS02A." *PloS One* 4 (4): e5254. doi:10.1371/journal.pone.0005254.
- Spring, Michele, Jittawadee Murphy, Robin Nielsen, Megan Dowler, Jason W. Bennett, Stasya Zarling, Jack Williams, et al. 2013. "First-in-Human Evaluation of Genetically Attenuated Plasmodium Falciparum Sporozoites Administered by Bite of Anopheles Mosquitoes to Adult Volunteers." *Vaccine* 31 (43): 4975–83. doi:10.1016/j.vaccine.2013.08.007.
- Srinivasan, Prakash, Eappen G. Abraham, Anil K. Ghosh, Jesus Valenzuela, Jose M. C. Ribeiro, George Dimopoulos, Fotis C. Kafatos, John H. Adams, Hisashi Fujioka, and Marcelo Jacobs-Lorena. 2004. "Analysis of the Plasmodium and Anopheles Transcriptomes during Oocyst Differentiation." *Journal of Biological Chemistry* 279 (7): 5581–87. doi:10.1074/jbc.M307587200.
- Srinivasan, Prakash, Wandy L. Beatty, Ababacar Diouf, Raul Herrera, Xavier Ambroggio, J. Kathleen Moch, Jessica S. Tyler, et al. 2011. "Binding of Plasmodium Merozoite Proteins RON2 and AMA1 Triggers Commitment to Invasion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (32): 13275–80. doi:10.1073/pnas.1110303108.

- Srinivasan, Prakash, Emmanuel Ekanem, Ababacar Diouf, Michelle L. Tonkin, Kazutoyo Miura, Martin J. Boulanger, Carole A. Long, David L. Narum, and Louis H. Miller. 2014. "Immunization with a Functional Protein Complex Required for Erythrocyte Invasion Protects against Lethal Malaria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (28): 10311–16. doi:10.1073/pnas.1409928111.
- Srinivasan, Prakash, Adam Yasgar, Diane K. Luci, Wandy L. Beatty, Xin Hu, John Andersen, David L. Narum, et al. 2013. "Disrupting Malaria Parasite AMA1-RON2 Interaction with a Small Molecule Prevents Erythrocyte Invasion." *Nature Communications* 4: 2261. doi:10.1038/ncomms3261.
- Sultan, Ali A, Vandana Thathy, Ute Frevert, Kathryn J. H Robson, Andrea Crisanti, Victor Nussenzweig, Ruth S Nussenzweig, and Robert Ménard. 1997. "TRAP Is Necessary for Gliding Motility and Infectivity of Plasmodium Sporozoites." *Cell* 90 (3): 511–22. doi:10.1016/S0092-8674(00)80511-5.
- Su, X. Z., V. M. Heatwole, S. P. Wertheimer, F. Guinet, J. A. Herrfeldt, D. S. Peterson, J. A. Ravetch, and T. E. Wellems. 1995. "The Large Diverse Gene Family Var Encodes Proteins Involved in Cytoadherence and Antigenic Variation of Plasmodium Falciparum-Infected Erythrocytes." *Cell* 82 (1): 89–100.
- Taechalerpaisarn, Tana, Cecile Crosnier, S. Josefin Bartholdson, Anthony N. Hodder, Jenny Thompson, Leyla Y. Bustamante, Danny W. Wilson, et al. 2012. "Biochemical and Functional Analysis of Two Plasmodium Falciparum Blood-Stage 6-Cys Proteins: P12 and P41." *PloS One* 7 (7): e41937. doi:10.1371/journal.pone.0041937.
- Takemae, Hitoshi, Tatsuki Sugi, Kyousuke Kobayashi, Haiyan Gong, Akiko Ishiwa, Frances C. Recuenco, Fumi Murakoshi, et al. 2013. "Characterization of the Interaction between Toxoplasma Gondii Rhoptry Neck Protein 4 and Host Cellular  $\beta$ -Tubulin." *Scientific Reports* 3: 3199. doi:10.1038/srep03199.
- Talman, Arthur M., Andrew M. Blagborough, and Robert E. Sinden. 2010. "A Plasmodium Falciparum Strain Expressing GFP throughout the Parasite's Life-Cycle." *PloS One* 5 (2): e9156. doi:10.1371/journal.pone.0009156.
- Talman, Arthur M., Céline Lacroix, Sara R. Marques, Andrew M. Blagborough, Raffaella Carzaniga, Robert Ménard, and Robert E. Sinden. 2011. "PbGEST Mediates Malaria Transmission to Both Mosquito and Vertebrate Host." *Molecular Microbiology* 82 (2): 462–74. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07823.x.
- Tarun, Alice S., Ronald F. Dumpit, Nelly Camargo, Mehdi Labaied, Pu Liu, Akihide Takagi, Ruobing Wang, and Stefan H. I. Kappe. 2007. "Protracted Sterile Protection with Plasmodium Yoelii Pre-Erythrocytic Genetically Attenuated Parasite Malaria Vaccines Is Independent of Significant Liver-Stage Persistence and Is Mediated by CD8+ T Cells." *The Journal of Infectious Diseases* 196 (4): 608–16. doi:10.1086/519742.
- Tavares, Joana, Pauline Formaglio, Sabine Thiberge, Elodie Mordélet, Nico Van Rooijen, Alexander Medvinsky, Robert Ménard, and Rogerio Amino. 2013. "Role of Host Cell Traversal by the Malaria Sporozoite during Liver Infection." *The Journal of Experimental Medicine* 210 (5): 905–15. doi:10.1084/jem.20121130.
- Teirlinck, Anne C., Matthew B. B. McCall, Meta Roestenberg, Anja Scholzen, Rob Woestenenk, Quirijn de Mast, Andre J. A. M. van der Ven, Cornelus C. Hermsen, Adrian J. F. Luty, and Robert W. Sauerwein. 2011. "Longevity and Composition of Cellular Immune Responses Following Experimental Plasmodium Falciparum Malaria Infection in Humans." *PLoS Pathogens* 7 (12): e1002389. doi:10.1371/journal.ppat.1002389.
- Tewari, Rita, Dharmendar Rathore, and Andrea Crisanti. 2005a. "Motility and Infectivity of Plasmodium Berghei Sporozoites Expressing Avian Plasmodium Gallinaceum

- Circumsporozoite Protein.” *Cellular Microbiology* 7 (5): 699–707. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00503.x.
- . 2005b. “Motility and Infectivity of Plasmodium Berghei Sporozoites Expressing Avian Plasmodium Gallinaceum Circumsporozoite Protein.” *Cellular Microbiology* 7 (5): 699–707. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00503.x.
- Tewari, Rita, Roberta Spaccapelo, Francesco Bistoni, Anthony A. Holder, and Andrea Crisanti. 2002. “Function of Region I and II Adhesive Motifs of Plasmodium Falciparum Circumsporozoite Protein in Sporozoite Motility and Infectivity.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (49): 47613–18. doi:10.1074/jbc.M208453200.
- Tham, Wai-Hong, Julie Healer, and Alan F. Cowman. 2012. “Erythrocyte and Reticulocyte Binding-like Proteins of Plasmodium Falciparum.” *Trends in Parasitology* 28 (1): 23–30. doi:10.1016/j.pt.2011.10.002.
- Thompson, Fiona M., David W. Porter, Shinji L. Okitsu, Nicole Westerfeld, Denise Vogel, Stephen Todryk, Ian Poulton, et al. 2008. “Evidence of Blood Stage Efficacy with a Virosomal Malaria Vaccine in a Phase IIa Clinical Trial.” *PloS One* 3 (1): e1493. doi:10.1371/journal.pone.0001493.
- Tonkin, Michelle L., Silvia A. Arredondo, Bianca C. Loveless, Jason J. Serpa, Karl A. T. Makepeace, Natarajan Sundar, Evgeniy V. Petrotchenko, Louis H. Miller, Michael E. Grigg, and Martin J. Boulanger. 2013. “Structural and Biochemical Characterization of Plasmodium Falciparum 12 (Pf12) Reveals a Unique Interdomain Organization and the Potential for an Antiparallel Arrangement with Pf41.” *The Journal of Biological Chemistry* 288 (18): 12805–17. doi:10.1074/jbc.M113.455667.
- Tonkin, Michelle L., Magali Roques, Mauld H. Lamarque, Martine Pugnière, Dominique Douguet, Joanna Crawford, Maryse Lebrun, and Martin J. Boulanger. 2011. “Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites: Insights from the Co-Structure of AMA1 with a RON2 Peptide.” *Science (New York, N.Y.)* 333 (6041): 463–67. doi:10.1126/science.1204988.
- Torgler, Ralph, Silayuv E. Bongfen, Jackeline C. Romero, Aubry Tardivel, Margot Thome, and Giampietro Corradin. 2008. “Sporozoite-Mediated Hepatocyte Wounding Limits Plasmodium Parasite Development via MyD88-Mediated NF-Kappa B Activation and Inducible NO Synthase Expression.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (6): 3990–99.
- Trape, J. F., C. Rogier, L. Konate, N. Diagne, H. Bouganali, B. Canque, F. Legros, A. Badji, G. Ndiaye, and P. Ndiaye. 1994. “The Dielmo Project: A Longitudinal Study of Natural Malaria Infection and the Mechanisms of Protective Immunity in a Community Living in a Holoendemic Area of Senegal.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51 (2): 123–37.
- Triglia, T., J. Healer, S. R. Caruana, A. N. Hodder, R. F. Anders, B. S. Crabb, and A. F. Cowman. 2000. “Apical Membrane Antigen 1 Plays a Central Role in Erythrocyte Invasion by Plasmodium Species.” *Molecular Microbiology* 38 (4): 706–18.
- Tufet-Bayona, Marta, Chris J. Janse, Shahid M. Khan, Andrew P. Waters, Robert E. Sinden, and Blandine Franke-Fayard. 2009. “Localisation and Timing of Expression of Putative Plasmodium Berghei Rhoptry Proteins in Merozoites and Sporozoites.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 166 (1): 22–31. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.02.009.
- Tuikue Ndam, Nicaise G., Nadine Fievet, Gwladys Bertin, Gilles Cottrell, Alioune Gaye, and Philippe Deloron. 2004. “Variable Adhesion Abilities and Overlapping Antigenic Properties in Placental Plasmodium Falciparum Isolates.” *The Journal of Infectious Diseases* 190 (11): 2001–9. doi:10.1086/425521.

- Tu, Youyou. 2011. "The Discovery of Artemisinin (qinghaosu) and Gifts from Chinese Medicine." *Nature Medicine* 17 (10): 1217–20. doi:10.1038/nm.2471.
- Tyler, Jessica S., and John C. Boothroyd. 2011. "The C-Terminus of Toxoplasma RON2 Provides the Crucial Link between AMA1 and the Host-Associated Invasion Complex." *PLoS Pathogens* 7 (2): e1001282. doi:10.1371/journal.ppat.1001282.
- Urnov, Fyodor D., Jeffrey C. Miller, Ya-Li Lee, Christian M. Beausejour, Jeremy M. Rock, Sheldon Augustus, Andrew C. Jamieson, Matthew H. Porteus, Philip D. Gregory, and Michael C. Holmes. 2005. "Highly Efficient Endogenous Human Gene Correction Using Designed Zinc-Finger Nucleases." *Nature* 435 (7042): 646–51. doi:10.1038/nature03556.
- VanBuskirk, Kelley M., Matthew T. O'Neill, Patricia De La Vega, Alexander G. Maier, Urszula Krzych, Jack Williams, Megan G. Dowler, et al. 2009. "Preerythrocytic, Live-Attenuated Plasmodium Falciparum Vaccine Candidates by Design." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 13004–9. doi:10.1073/pnas.0906387106.
- Vanderberg, Jerome P., and Ute Frevert. 2004. "Intravital Microscopy Demonstrating Antibody-Mediated Immobilisation of Plasmodium Berghei Sporozoites Injected into Skin by Mosquitoes." *International Journal for Parasitology* 34 (9): 991–96. doi:10.1016/j.ijpara.2004.05.005.
- Vanderberg, J. P. 1974. "Studies on the Motility of Plasmodium Sporozoites." *The Journal of Protozoology* 21 (4): 527–37.
- Vanderberg, J. P., S. Chew, and M. J. Stewart. 1990. "Plasmodium Sporozoite Interactions with Macrophages in Vitro: A Videomicroscopic Analysis." *The Journal of Protozoology* 37 (6): 528–36.
- van der Oost, John, Edze R. Westra, Ryan N. Jackson, and Blake Wiedenheft. 2014. "Unravelling the Structural and Mechanistic Basis of CRISPR-Cas Systems." *Nature Reviews. Microbiology* 12 (7): 479–92. doi:10.1038/nrmicro3279.
- van Dijk, Melissa R., Bruno Douradina, Blandine Franke-Fayard, Volker Heussler, Maaïke W. van Dooren, Ben van Schaijk, Geert-Jan van Gemert, et al. 2005. "Genetically Attenuated, P36p-Deficient Malarial Sporozoites Induce Protective Immunity and Apoptosis of Infected Liver Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (34): 12194–99. doi:10.1073/pnas.0500925102.
- van Dijk, Melissa R., Ben C. L. van Schaijk, Shahid M. Khan, Maaïke W. van Dooren, Jai Ramesar, Szymon Kaczanowski, Geert-Jan van Gemert, et al. 2010. "Three Members of the 6-Cys Protein Family of Plasmodium Play a Role in Gamete Fertility." *PLoS Pathogens* 6 (4): e1000853. doi:10.1371/journal.ppat.1000853.
- van Dijk, M. R., C. J. Janse, J. Thompson, A. P. Waters, J. A. Braks, H. J. Dodemont, H. G. Stunnenberg, G. J. van Gemert, R. W. Sauerwein, and W. Eling. 2001. "A Central Role for P48/45 in Malaria Parasite Male Gamete Fertility." *Cell* 104 (1): 153–64.
- van Schaijk, Ben C. L., Chris J. Janse, Geert-Jan van Gemert, Melissa R. van Dijk, Audrey Gego, Jean-Francois Franetich, Marga van de Vegte-Bolmer, et al. 2008. "Gene Disruption of Plasmodium Falciparum p52 Results in Attenuation of Malaria Liver Stage Development in Cultured Primary Human Hepatocytes." *PloS One* 3 (10): e3549. doi:10.1371/journal.pone.0003549.
- van Schaijk, Ben C. L., Ivo H. J. Ploemen, Takeshi Annoura, Martijn W. Vos, Lander Foquet, Geert-Jan van Gemert, Severine Chevalley-Maurel, et al. 2014. "A Genetically Attenuated Malaria Vaccine Candidate Based on P. Falciparum b9/slarp Gene-Deficient Sporozoites." *eLife* 3. doi:10.7554/eLife.03582.
- van Schaijk, Ben C. L., Melissa R. van Dijk, Marga van de Vegte-Bolmer, Geert-Jan van Gemert, Maaïke W. van Dooren, Saliha Eksi, Will F. G. Roeffen, Chris J. Janse,

- Andrew P. Waters, and Robert W. Sauerwein. 2006. "Pfs47, Paralog of the Male Fertility Factor Pfs48/45, Is a Female Specific Surface Protein in Plasmodium Falciparum." *Molecular and Biochemical Parasitology* 149 (2): 216–22. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.05.015.
- Vaughan, Ashley M., Ahmed S. I. Aly, and Stefan H. I. Kappe. 2008. "Malaria Parasite Pre-Erythrocytic Stage Infection: Gliding and Hiding." *Cell Host & Microbe* 4 (3): 209–18. doi:10.1016/j.chom.2008.08.010.
- Vermeulen, A. N., T. Ponnudurai, P. J. Beckers, J. P. Verhave, M. A. Smits, and J. H. Meuwissen. 1985. "Sequential Expression of Antigens on Sexual Stages of Plasmodium Falciparum Accessible to Transmission-Blocking Antibodies in the Mosquito." *The Journal of Experimental Medicine* 162 (5): 1460–76.
- Vlachou, Dina, Timo Zimmermann, Rafael Cantera, Chris J. Janse, Andrew P. Waters, and Fotis C. Kafatos. 2004. "Real-Time, in Vivo Analysis of Malaria Ookinete Locomotion and Mosquito Midgut Invasion." *Cellular Microbiology* 6 (7): 671–85. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00394.x.
- Voza, Tatiana, Jessica L. Miller, Stefan H. I. Kappe, and Photini Sinnis. 2012. "Extrahepatic Exoerythrocytic Forms of Rodent Malaria Parasites at the Site of Inoculation: Clearance after Immunization, Susceptibility to Primaquine, and Contribution to Blood-Stage Infection." *Infection and Immunity* 80 (6): 2158–64. doi:10.1128/IAI.00246-12.
- Vulliez-Le Normand, Brigitte, Michelle L. Tonkin, Mauld H. Lamarque, Susann Langer, Sylviane Hoos, Magali Roques, Frederick A. Saul, et al. 2012. "Structural and Functional Insights into the Malaria Parasite Moving Junction Complex." *PLoS Pathogens* 8 (6): e1002755. doi:10.1371/journal.ppat.1002755.
- Wanaguru, Madushi, Weimin Liu, Beatrice H. Hahn, Julian C. Rayner, and Gavin J. Wright. 2013. "RH5-Basigin Interaction Plays a Major Role in the Host Tropism of Plasmodium Falciparum." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (51): 20735–40. doi:10.1073/pnas.1320771110.
- Wang, Xinhua, Jianbing Mu, Guoqiao Li, Peiquan Chen, Xingbo Guo, Linchun Fu, Lin Chen, Xinzhuan Su, and Thomas E. Wellems. 2005. "Decreased Prevalence of the Plasmodium Falciparum Chloroquine Resistance Transporter 76T Marker Associated with Cessation of Chloroquine Use against P. Falciparum Malaria in Hainan, People's Republic of China." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72 (4): 410–14.
- Waters, A. P., A. W. Thomas, J. A. Deans, G. H. Mitchell, D. E. Hudson, L. H. Miller, T. F. McCutchan, and S. Cohen. 1990. "A Merozoite Receptor Protein from Plasmodium Knowlesi Is Highly Conserved and Distributed throughout Plasmodium." *The Journal of Biological Chemistry* 265 (29): 17974–79.
- Weiss, Greta E., Paul R. Gilson, Tana Taechalertpaisarn, Wai-Hong Tham, Nienke W. M. de Jong, Katherine L. Harvey, Freya J. I. Fowkes, et al. 2015. "Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during Plasmodium Falciparum Invasion of Erythrocytes." *PLoS Pathogens* 11 (2): e1004670. doi:10.1371/journal.ppat.1004670.
- Wetzel, D. M., S. Håkansson, K. Hu, D. Roos, and L. D. Sibley. 2003. "Actin Filament Polymerization Regulates Gliding Motility by Apicomplexan Parasites." *Molecular Biology of the Cell* 14 (2): 396–406. doi:10.1091/mbc.E02-08-0458.
- Wirth, Christine C., Svetlana Glushakova, Matthias Scheuermayer, Urska Repnik, Swati Garg, Dominik Schaack, Marika M. Kachman, et al. 2014. "Perforin-like Protein PPLP2 Permeabilizes the Red Blood Cell Membrane during Egress of Plasmodium Falciparum Gametocytes." *Cellular Microbiology* 16 (5): 709–33. doi:10.1111/cmi.12288.



- Witkowski, Benoit, Chanaki Amaratunga, Nimol Khim, Sokunthea Sreng, Pheaktra Chim, Saorin Kim, Pharath Lim, et al. 2013. "Novel Phenotypic Assays for the Detection of Artemisinin-Resistant Plasmodium Falciparum Malaria in Cambodia: In-Vitro and Ex-Vivo Drug-Response Studies." *The Lancet. Infectious Diseases* 13 (12): 1043–49. doi:10.1016/S1473-3099(13)70252-4.
- Witkowski, Benoit, Nimol Khim, Pheaktra Chim, Saorin Kim, Sopheakvatey Ke, Nimol Kloeung, Sophy Chy, et al. 2013. "Reduced Artemisinin Susceptibility of Plasmodium Falciparum Ring Stages in Western Cambodia." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (2): 914–23. doi:10.1128/AAC.01868-12.
- Woodrow, C. J., R. K. Haynes, and S. Krishna. 2005. "Artemisinins." *Postgraduate Medical Journal* 81 (952): 71–78. doi:10.1136/pgmj.2004.028399.
- Yalaoui, Samir, Thierry Huby, Jean-François Franetich, Audrey Gego, Armelle Rametti, Martine Moreau, Xavier Collet, et al. 2008. "Scavenger Receptor BI Boosts Hepatocyte Permissiveness to Plasmodium Infection." *Cell Host & Microbe* 4 (3): 283–92. doi:10.1016/j.chom.2008.07.013.
- Yamauchi, Lucy Megumi, Alida Coppi, Georges Snounou, and Photini Sinnis. 2007. "Plasmodium Sporozoites Trickle out of the Injection Site." *Cellular Microbiology* 9 (5): 1215–22. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00861.x.
- Yap, Alan, Mauro F. Azevedo, Paul R. Gilson, Greta E. Weiss, Matthew T. O'Neill, Danny W. Wilson, Brendan S. Crabb, and Alan F. Cowman. 2014. "Conditional Expression of Apical Membrane Antigen 1 in Plasmodium Falciparum Shows It Is Required for Erythrocyte Invasion by Merozoites." *Cellular Microbiology* 16 (5): 642–56. doi:10.1111/cmi.12287.
- Yu, Min, T. R. Santha Kumar, Louis J. Nkrumah, Alida Coppi, Silke Retzlaff, Celeste D. Li, Brendan J. Kelly, et al. 2008. "The Fatty Acid Biosynthesis Enzyme FabI Plays a Key Role in the Development of Liver-Stage Malarial Parasites." *Cell Host & Microbe* 4 (6): 567–78. doi:10.1016/j.chom.2008.11.001.
- Zhang, Cui, Bo Xiao, Yuanyuan Jiang, Yihua Zhao, Zhenkui Li, Han Gao, Yuan Ling, et al. 2014. "Efficient Editing of Malaria Parasite Genome Using the CRISPR/Cas9 System." *mBio* 5 (4): e01414–14. doi:10.1128/mBio.01414-14.