



HAL
open science

Etude fonctionnelle et structurale de protéines impliquées dans l'invasion des cellules hépatocytaires par les sporozoïtes de Plasmodium

Marion Gransagne

► **To cite this version:**

Marion Gransagne. Etude fonctionnelle et structurale de protéines impliquées dans l'invasion des cellules hépatocytaires par les sporozoïtes de Plasmodium. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066616 . tel-01956593v2

HAL Id: tel-01956593

<https://theses.hal.science/tel-01956593v2>

Submitted on 1 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

École Doctorale Complexité du Vivant

Marion GRANSAGNE

**Étude fonctionnelle et structurale de protéines
impliquées dans l'invasion des cellules
hépatocytaires par les sporozoïtes de
*Plasmodium***

Sous la direction de Olivier SILVIE & Solange MORERA

Thèse soutenue le 14 décembre 2017
à la Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie (site Pitié-Salpêtrière)

Jury

M. BARALE, Jean-Christophe	Directeur de recherche	Rapporteur
M. CLAIN, Jérôme	Maître de conférences	Examinateur
M. GAMAIN, Benoit	Directeur de recherche	Rapporteur
Mme MAZIER, Dominique	Professeur	Présidente
Mme MORERA, Solange	Directeur de recherche	Co-directrice de thèse
Mme PIERROT, Christine	Chargé de recherche	Examinatrice
M. SILVIE, Olivier	Chargé de recherche	Co-directeur de thèse

Étude fonctionnelle et structurale de protéines impliquées dans
l'invasion des cellules hépatocytaires par les sporozoïtes de
Plasmodium

Marion GRANSAGNE

2014–2017

RÉSUMÉ

Étude fonctionnelle et structurale de protéines impliquées dans l'invasion des cellules hépatocytaires par les sporozoïtes de Plasmodium

L'infection par *Plasmodium*, le parasite responsable du paludisme, débute par l'inoculation de sporozoïtes par un moustique anophèle femelle. Les sporozoïtes infectent le foie, où le parasite se développe avant l'initiation d'une phase d'infection érythrocytaire responsable des signes cliniques et des complications du paludisme. Dans le foie, les sporozoïtes pénètrent activement les hépatocytes en formant une vacuole parasitophore, mais les mécanismes mobilisés lors de l'invasion restent très mal caractérisés. Des récepteurs cellulaires sont mis en jeu, tels que CD81 et SR-B1, mais les facteurs parasitaires impliqués étaient jusqu'alors inconnus. Lors de mes travaux de thèse, je me suis intéressée à l'invasion des hépatocytes par le parasite *Plasmodium*, et en particulier à certaines protéines des sporozoïtes impliquées dans l'utilisation des récepteurs cellulaires.

Dans un premier temps, pour analyser le rôle de protéines de la famille TSR (thrombospondin repeats) ou de la famille à domaines six cystéines (6-cys) chez les parasites *P. yoelii* et *P. berghei*, j'ai utilisé une approche de complémentation génétique inter-espèces et des tests fonctionnels dans des lignées HepG2 et HepG2/CD81. Suite à l'identification de la protéine 6-cys P36 comme déterminant du choix de la voie d'entrée dans les hépatocytes, j'ai étudié les déterminants structuraux de cette protéine qui sont mis en jeu dans la détermination de la voie d'entrée. J'ai produit un modèle de structure de P36 de différentes espèces de *Plasmodium*, et par une approche génétique j'ai pu analyser le rôle des différents domaines. Pour cela j'ai complété des parasites délétés pour cette protéine avec des protéines chimériques constituées des domaines de P36 de *P. berghei*, pouvant utiliser à la fois les récepteurs CD81 et SR-B1, ou de *P. yoelii*, qui n'utilise que la voie CD81. J'ai ainsi pu montrer que le second domaine 6-cys de la protéine P36 est déterminant lors du choix de la voie d'invasion. En parallèle, j'ai étudié la variabilité génétique des protéines P36 de parasites infectant l'homme, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*, à partir de données de séquençage disponibles.

Enfin, afin de pouvoir étudier les interactions de P36 avec d'éventuels récepteurs cellulaires, j'ai mis au point un protocole de production de cette protéine en système bactérien. J'ai pu produire chez *E. coli* la protéine P36 de quatre espèces plasmodiales, et réaliser des tests d'interactions (ELISA et SPR) avec des récepteurs d'intérêt. Ces protéines recombinantes nous serviront également à produire des anticorps, à tester s'ils sont capables de bloquer l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium*.

Au total, ces travaux contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'infection des hépatocytes, et pourraient permettre à plus long terme d'identifier de nouvelles cibles pour un vaccin antipaludique ciblant l'étape initiale d'entrée dans le foie.

ABSTRACT

Functional and structural study of proteins involved in the hepatocyte invasion by the sporozoites of Plasmodium.

The infection by *Plasmodium*, the parasite responsible for malaria, begins with the inoculation of sporozoites by a female *Anopheles* mosquito. Sporozoites infect the liver, where the parasite can develop before initiating the erythrocyte infection, which is responsible for the clinical signs and malaria complications. In the liver, sporozoites enter actively into the hepatocytes forming a parasitophorous vacuole, but the mechanisms involved during the invasion remain poorly characterized. Several cellular receptors are involved, such as CD81 and SR-B1, but the parasitic factors required were until now unknown. During my thesis, I was interested in the study of the hepatocyte invasion by *Plasmodium*, and especially the sporozoite proteins involved in the use of host receptors.

In order to study the role of TSR (thrombospondin repeats) family proteins or 6-cysteine (6-cys) family proteins in *P. yoelii* and *P. berghei*, I first used an inter-species genetic complementation approach using functional tests in HepG2 and HepG2/CD81 cell lines. Following the identification of the 6-cys P36 protein as a determinant of the entry pathway in the hepatocytes, I studied the structural determinants of this protein, which are involved in the hepatocytes' entry pathway. I produced a structural modelisation of P36 for different *Plasmodium* species, and thanks to a genetic approach I was able to analyse the role of different domains. To this end, I complemented parasites knock-out for P36 with chimeric proteins constituted of P36 domains of *P. berghei*, which can use both receptors CD81 and SR-B1, or *P. yoelii*, which uses only the CD81 pathway. Hence I showed that the second 6-cys domain of the P36 protein is decisive in the entry pathway choice. In the same time, I also studied the genetic variability of the P36 proteins of *P. falciparum* and *P. vivax* from available genome sequencing data.

Last, in order to study the P36 interactions with potential cellular receptors, I developed a production protocol of this protein in bacteria. I was able to produce the P36 protein of four species of *Plasmodium* in *E. coli*. I used them to test the interactions with potential receptors by ELISA and SPR. These recombinant proteins will be later used to produce antibodies and test their ability to block hepatocyte invasion by *Plasmodium*.

In conclusion, this work contributes to better understand the molecular mechanisms at play during hepatocyte infection, and could allow in the longer term to identify new targets for a malaria vaccine targeting the initial step of entry in the liver.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

abréviation	nom complet
5-FC	5-fluorocytosine
6-cys	domaine à 6 cystéines
6His	6 histidines
<i>γ</i> -yte	gamétocyte
ACP	<i>acyl carrier protein</i>
ACT	combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine
ADN	acide désoxyribonucléique
ALAD	<i>γ-aminolevulinic acid dehydratase</i>
AMA1	<i>apical membrane antigen 1</i>
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
CD	cluster de différenciation
CeITOS	<i>cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites</i>
CIDR	<i>cystein rich interdomain region</i>
CLDN1	claudine-1
CSA	<i>chondroïtine sulfate A</i>
CSP	<i>circumsporozoïte protein</i>
CTRP	<i>circumsporozoïte-and TRAP-related protein</i>
Cys	cystéine
DBL	<i>duffy binding like</i>
DHFR	<i>dihydrofolate réductase</i>
DHPS	<i>dihydropteroate syntase</i>
DOXP	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
DTT	dichloro-diphényl-trichloroéthane
EBA	<i>erythrocyte binding antigen</i>
ECP1	<i>egress cysteine protease 1</i>
EEF	<i>exo-erythrocytic form</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EphA2	récepteur d'éphrine A2
FabH	<i>β-ketoacyl-ACP synthase III</i>
FabZ	<i>β-hydroxyacyl-ACP dehydratase</i>
FACS	<i>fluorescent-activated cell sorting</i>

FAT	<i>fatty acid translocase</i>
GAC	<i>glideosome-associated connector</i>
GAP	<i>gliding associated protein</i>
GAP	<i>genetically attenuated parasite</i>
GAG	<i>glycosaminoglycane</i>
GEST	<i>gamete egress and sporozoite traversal</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLURP	<i>glutamate-rich protein</i>
GPI	<i>glycosylphosphatidylinositol</i>
GST	<i>glutathion S-transférase</i>
HCV	<i>hepatitis C virus</i>
HDL	<i>lipoprotéine de haute densité</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HRP ₂	<i>histidine rich protein 2</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
HSPG	<i>protéoglycane de sulfate d'héparane</i>
ICAM ₁	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFA	<i>immunofluorescence indirecte</i>
IMC	<i>complexe membranaire interne</i>
IPTG	<i>isopropyl-1-thiol-β-d-galactopyranoside</i>
LDH	<i>lactate déshydrogénase</i>
LIMP ₂	<i>lysosome membrane protein 2</i>
LISP ₂	<i>liver stage specific protein 2</i>
MACPF	<i>membrane attack complexe/perforine</i>
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MBP	<i>maltose binding protein</i>
MIC ₂	<i>microneme protein 2</i>
MILD	<i>moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée d'action</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MSP	<i>merozoite surface protein</i>
MTRAP	<i>merozoite-TRAP</i>
MyoA	<i>myosine A</i>
NADH	<i>nicotinamide adénine dinucléotide</i>
OCN	<i>occludine</i>
OMS	<i>organisation mondiale de la santé</i>
ORD	<i>open reading frame</i>
PBGD	<i>porphobilinogen deaminase</i>
PCR	<i>réaction en chaîne par polymérase</i>
PfEMP ₁	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
pH	<i>potentiel hydrogène</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PLP ₁	<i>perforin-like protein 1</i>
PSOP	<i>secreted ookinete protein</i>
RAS	<i>radiation-attenuated sporozoites</i>
RBC	<i>red blood cell</i>
RON	<i>rhoptry neck protein</i>
SDS	<i>dodécylsulfate de sodium</i>
SERA ₅	<i>serine repeat antigen 5</i>

SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i>
SPATR	<i>secreted protein with altered thrombospondin repeat domain</i>
SPECT	<i>sporozoite microneme protein essential for cell traversal</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
spz	<i>sporozoïtes</i>
SR-B1	<i>scavenger receptor, class B, member 1</i>
SSP	<i>surface sporozoite protein</i>
TDR	<i>test de diagnostic rapide</i>
TEP1	<i>thioester-containing protein 1</i>
TLP	<i>TRAP-like protein</i>
TRAMP	<i>thrombospondin-related apical membrane protein</i>
TRAP	<i>thrombospondin-related adhesion protein</i>
TREP	<i>TRAP-related protein</i>
TRP1	<i>thrombospondin-related protein 1</i>
TRSP	<i>thrombospondin- related sporozoite protein</i>
TSP1	<i>thrombin-sensitive protein 1</i>
TSR	<i>thrombospondin repeat</i>
UIS	<i>upregulated in infective sporozoites gene</i>
UROD	<i>uroporphyrinogen III decarboxylase</i>
UROS	<i>uroporphyrinogen III synthase</i>
UTR	<i>untranslated regions</i>
VAR2CSA	<i>variant surface antigen 2-CSA</i>
VIH	<i>virus de l'immunodéficience humaine</i>
VLP	<i>virus-like particles</i>
vWA	<i>von Willebrand factor type A</i>

SOMMAIRE

Résumé	iii
Abstract	v
Liste des abréviations	vii
Sommaire	xi
I Introduction	1
1 <i>Plasmodium</i> : parasite responsable du paludisme	3
2 Sporozoïtes et invasion hépatique	35
3 Objectifs	95
II Résultats	97
4 Criblage génétique à la recherche de facteurs parasitaires	99
5 Étude de l'implication des différents domaines de P36	111
6 Production de la protéine P36 et tests d'interactions	123
7 Étude des variations génétiques de la protéine P36	139
III Discussion	145
8 Discussion	147
Annexes	155
A Article publié	157

B Clonage : construction de plasmides	183
C Biologie cellulaire et parasitologie	191
D Biochimie : production de protéines recombinantes, analyses et tests d'interactions	209
E Amorces	233
F Gènes optimisés pour l'expression de la protéine P36	237
Bibliographie	245
Liste des tableaux	268
Table des figures	272
Table des matières	278

PREMIÈRE PARTIE

Introduction

1

PLASMODIUM : PARASITE RESPONSABLE DU PALUDISME

1.1 Généralités

Le paludisme est une parasitose aiguë ou chronique qui peut être mortelle. Elle est due à un eucaryote unicellulaire transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle infecté du genre *Anopheles*. Le protozoaire responsable de cette infection est *Plasmodium*. Le terme paludisme dérive du latin *palus* qui signifie marais, écosystème très propice à la prolifération du moustique vecteur du paludisme. C'est la maladie parasitaire la plus répandue au monde. Malgré des efforts internationaux mis en œuvre, le paludisme reste un problème de santé publique majeur dans de nombreux pays.

1.1.1 Le paludisme : histoire ancienne et avancées majeures

L'histoire débute plus de 3 200 ans av. J-C, avec la présence d'antigènes de *Plasmodium* identifiés dans la peau de momies égyptiennes [Miller *et al.*, 1994] ; on sait notamment que le roi Toutânkhamon en était infecté Hawass *et al.* [2010]. Les premiers écrits sur le paludisme datent de 2700 av. J-C : Nei Chin y décrit à l'Empereur chinois Huang Ti des fièvres tierces et quartes caractéristiques de la maladie Debacker [2000]. Il faut attendre 200 av. J-C pour qu'une première cure à base de feuilles d'armoise (*Artemisia annua*) soit découverte par les chinois. En 1972, Youyou Tu et son équipe isolent à partir de ces feuilles une molécule ayant une activité antipaludique : l'artémisine [Tu, 2011]. Une seconde thérapie à base d'écorce de quinquina (*Cinchona ledgeriana*) est identifiée lors de la conquête de l'Amérique. Deux pharmaciens français Joseph Pelletier et Joseph Caventou en isolent le principe actif en 1820 qu'ils nomment quinine « nous avons cru devoir la nommer quinine, pour la distinguer de la cinchonine par un nom qui indique également son origine » [Pelletier et Caventou, 1820]. En 1880, à l'hôpital militaire de Constantine, le médecin français Alphonse Laveran examine le sang d'un soldat impaludé et y découvre « sur le bord de corps sphériques pigmentés, [...] des flagelles s'agitant avec une grande vivacité » (voir figure 1.1). Il en déduit que ce parasite est à l'origine du paludisme Laveran [1907]. En 1897, le médecin anglais Ronald Ross confirme l'hypothèse de Laveran en découvrant des parasites dans l'estomac de moustiques qu'il appelle *peculiar pigmented cells*. Il montre que seuls les moustiques nourris sur des patients infectés contiennent les croissants caractéristiques de *Plasmodium* et démontre ainsi que la transmission du paludisme se fait via le moustique [Ross, 1897].

S'ensuit alors de nombreuses études sur *Plasmodium* ainsi que sur les moyens de lutte contre le paludisme qui aboutissent notamment à cinq prix Nobel :

- 1902 : Sir Ronald Ross pour l'identification du moustique comme vecteur du paludisme [Nobel-prize.org, 1902] ;

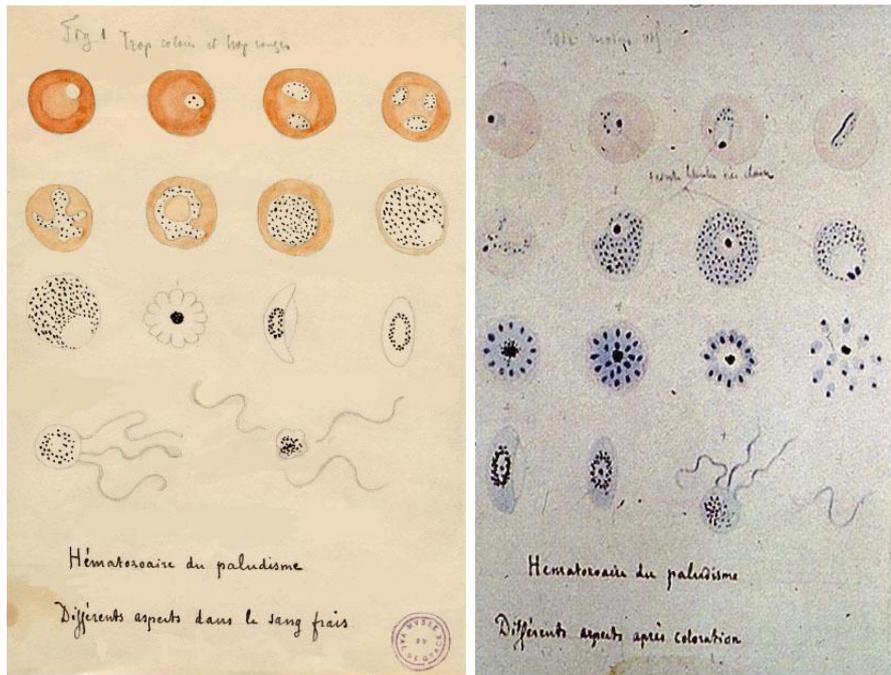


FIGURE 1.1 | Dessins d'observation de *Plasmodium* réalisés par Alphonse Laveran [Laveran, 1907].

- 1907 : Charles Louis Alphonse Laveran en reconnaissance de son travail sur le rôle joué par le protozoaire [Nobelprize.org, 1907];
- 1927 : Julius Wagner-Jauregg pour sa découverte de la valeur thérapeutique de l'inoculation de la malaria dans le traitement de la paralysie générale causée par la syphilis [Nobelprize.org, 1927];
- 1948 : Paul Hermann Müller pour sa découverte de la haute efficacité du DDT comme poison de contact contre plusieurs arthropodes [Nobelprize.org, 1948];
- 2015 : Youyou Tu pour ses découvertes concernant une nouvelle thérapie contre le paludisme (l'artémisine) [Nobelprize.org, 2015].

1.1.2 Le phylum des *Apicomplexa*

Plasmodium appartient au phylum des *Apicomplexa*. Les *Apicomplexa* sont des parasites unicellulaires et obligatoires d'une grande variété d'hôtes, allant du mollusque au mammifère. Ils descendent d'un ancêtre non-obligatoire (*Chromerids*) et capable de réaliser la photosynthèse [Šlapeta et Morin-Adeline, 2011] (voir figure 1.2).

Le phylum comporte d'autres agents pathogènes tels que *Toxoplasma*, l'agent responsable de la toxoplasmose, qui infecte un tiers de la population et qui est bénigne chez les individus sains, mais qui est responsable de malformations sévères chez le fœtus et d'encéphalites chez les patients immunodéprimés; ou *Cryptosporidium*, un pathogène transmis par l'eau qui est responsable de diarrhées. Certains *Apicomplexa* sont responsables de pathologies animales tels que : *Neospora*, responsable d'avortements chez les bovins; *Theileria*, qui cause de la fièvre, de l'anémie et des arrêts cardiaques chez les bovins, ovins et caprins; *Babesia*, qui provoque des anémies chez les mammifères sauvages; *Eimeria*, responsable de diarrhée chez le bétail et la volaille. Le groupe des *Apicomplexa* présente une grande variété de formes en fonction de leur genre et du stade du cycle de vie (figure 1.3).

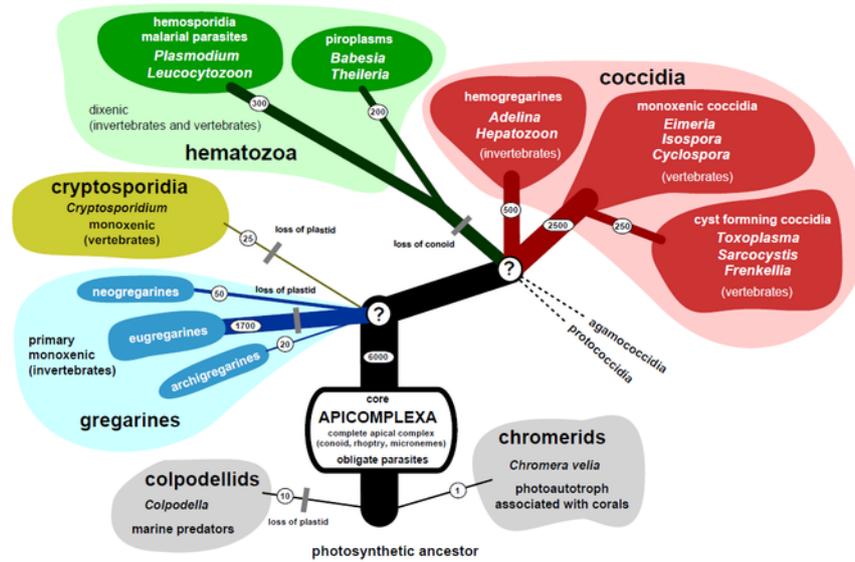


FIGURE 1.2 | Arbre phylogénétique hypothétique des *Apicomplexa*. Le nombre de branches et leur épaisseur représente la diversité c'est à dire le nombre d'espèces par embranchement [Šlapeta et Morin-Adeline, 2011].

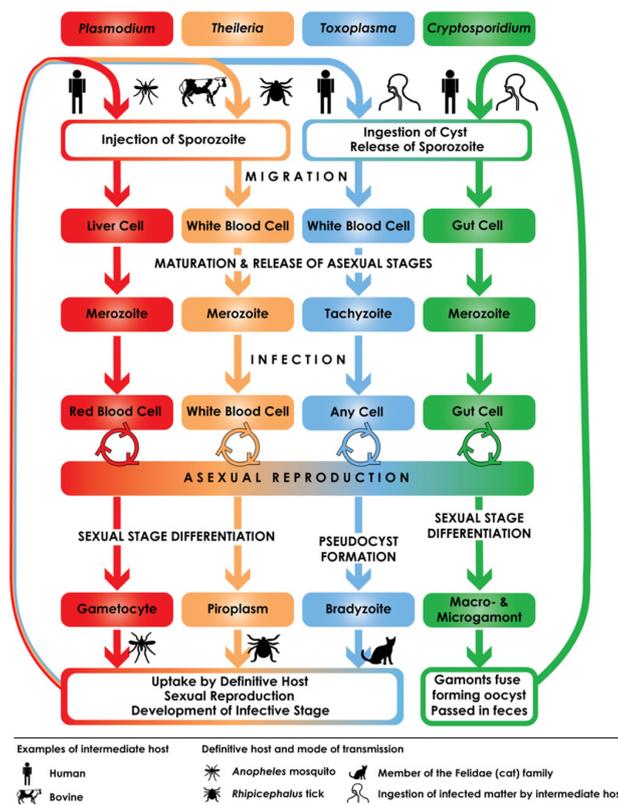


FIGURE 1.3 | Cycles de vie de différents *Apicomplexa*. Les *Apicomplexa* partagent un cycle de vie complexe, impliquant la transmission entre différents hôtes via des cellules d'invasion spécialisées appelées zoïtes. Ainsi, *Plasmodium* et *Theileria* sont transmis à des insectes où a lieu la reproduction sexuée, *Toxoplasma* est transmis à un félin ce qui déclenche la gamétogenèse et la transmission de *Cryptosporidium* se fait via les déjections après développement du zygote en oocyste [Wasmuth *et al.*, 2009].

1.1.3 Caractéristiques structurales du phylum des *Apicomplexa*

Le phylum est caractérisé par la présence d'un complexe apical et d'un apicoplaste. Le complexe apical est composé d'éléments structuraux : un conoïde et un anneau polaire qui servent de centre organisateur des microtubules, ainsi que des organites sécrétoires : les rhoptries, les micronèmes et les granules denses qui libèrent leur contenu lors de l'invasion des cellules hôtes (figure 1.4).

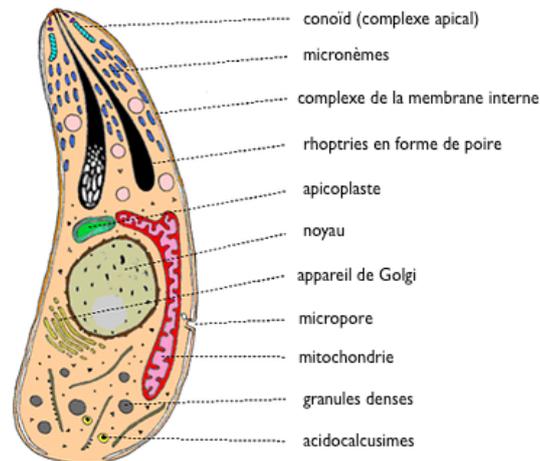


FIGURE 1.4 | Schéma d'un parasite Apicomplexe typique, regroupant les différents organites caractéristiques de l'embranchement : apicoplaste, conoïde, rhoptries, micronèmes et granules denses [Šlapeta et Morin-Adeline, 2011] .

Il a été montré chez *Toxoplasma gondii* que le conoïde est fait de fibres de tubulines formant un nouveau type de polymère [Hu *et al.*, 2002]. Ces tubulines peuvent s'allonger ou se raccourcir de façon calcium dépendante, ces modifications sont à l'origine de mouvements. En plus d'être impliqué dans l'invasion des cellules hôtes, le conoïde semble avoir un rôle vital dans l'orientation du parasite et ses mouvements avant et après l'invasion.

Les rhoptries sont des organites en forme de lettre « ρ » d'où ils tirent leur nom. Ces organites jouent un rôle dans la formation de la vacuole parasitophore. Leur nombre est variable en fonction de l'espèce et du stade du cycle de vie. Les rhoptries peuvent être de taille variable, chez *Babesia* elles sont petites en forme de flasque, tandis que chez *Plasmodium* et *Toxoplasma*, elles sont allongées. Quand elles relarguent leur contenu, les rhoptries changent de forme en se collapsant.

Les micronèmes sont fusiformes ou en forme de flasque. Leur taille est inférieure à celle des rhoptries, mais on les trouve en plus grand nombre. Les micronèmes sécrètent leurs protéines à la surface du zoïte. Celles-ci jouent un rôle dans la reconnaissance, l'adhésion et la motilité du zoïte.

Les granules denses sont des vésicules présentes au pôle postérieur du parasite. Elles exportent leur protéines dans le cytoplasme ou la membrane de la cellule hôte.

L'apicoplaste est un plaste apparenté au chloroplaste, issue d'une double endosymbiose. Une première endosymbiose, dite endosymbiose primaire, a eu lieu entre une cellule eucaryote bicilllée et une cyanobactérie réalisant la photosynthèse. Une endosymbiose dite secondaire a permis l'intégration d'une algue rouge issue d'endosymbiose primaire chez un protiste. Ces événements ont abouti à l'apparition des *Chromalveolates* dont fait partie *Plasmodium* (figure 1.5). Le bénéfice apporté par cette symbiose a permis son maintien. Des liens métaboliques ont été établis qui font que cette association est devenue indissociable. Les structures redondantes ont peu à peu disparu et les régions importantes de l'ADN du noyau et du plaste de l'algue ont migré vers le noyau de l'hôte secondaire. Il ne reste aujourd'hui qu'un plaste réduit incapable de photosynthèse. Il est impliqué dans d'autres voies métaboliques et est devenu

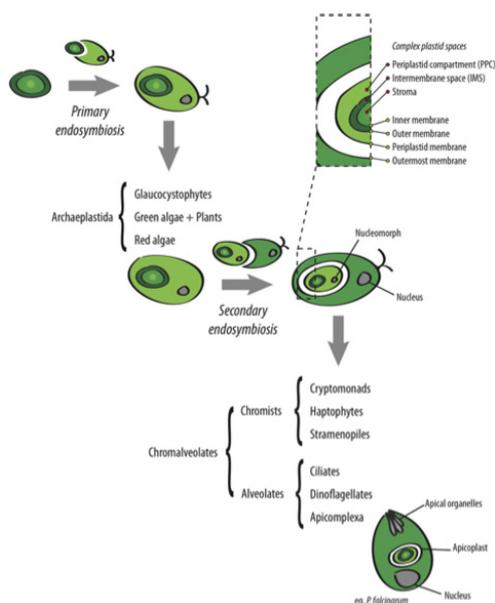


FIGURE 1.5 | Origine endosymbiotique de l'apicoplaste [Kalanon et McFadden, 2010].

essentiel aux *Apicomplexa* [He *et al.*, 2001]. Il est à noter que *Cryptosporidium* est le seul *Apicomplexa* à avoir perdu son apicoplaste.

1.2 Un parasite aux multiples visages : cycle de vie de *Plasmodium*

1.2.1 *Plasmodium*

Parmi plus de 100 espèces plasmodiales, cinq seulement sont capables d'infecter l'homme [CDC, 2015] :

- *Plasmodium falciparum* : il provoque les formes les plus graves de paludisme et est responsable de la majorité des décès liés au paludisme. Il se multiplie rapidement dans le sang et est ainsi responsable de fortes anémies. Il obstrue également les petits vaisseaux sanguins, ce qui peut provoquer un paludisme cérébral si cette obstruction a lieu au niveau du cerveau. Les complications peuvent être létales. L'espèce est présente dans les régions tropicales et subtropicales du monde entier (figure 1.6).
- *Plasmodium vivax* : il possède des formes dormantes dans les hépatocytes, les hyponozoïtes, qui peuvent se réactiver et envahir la circulation sanguine plusieurs mois ou années après la pique du moustique infecté. Il n'est pas capable d'infecter les individus négatifs pour la protéine Duffy (protéine de surface des globules rouges). Il est moins virulent que *Plasmodium falciparum*, mais le nombre de décès liés à *Plasmodium vivax* semble augmenter ces dernières années. Il sévit essentiellement en Asie et en Amérique latine, ainsi que dans quelques régions d'Afrique de l'est (figure 1.6).
- *Plasmodium ovale* : il forme également des hypnozoïtes. Il est biologiquement très proche de *Plasmodium vivax*, mais contrairement à ce dernier, il est capable d'infecter des individus qui sont négatifs pour la protéine Duffy. Les symptômes qu'il provoque sont généralement modérés. On le trouve essentiellement en Afrique (notamment en Afrique de l'ouest où la majorité des résidents sont Duffy négatifs) et dans les îles pacifiques.

- *Plasmodium malariae* : il cause des fièvres quatre (avec des recrudescence tous les trois jours). Il est présent dans les régions tropicales et tempérées du monde entier, mais est peu fréquemment rencontré.
- *Plasmodium knowlesi* : il touchait initialement le singe, mais a récemment été identifié chez l'homme. Il a un cycle de réplication court et progresse rapidement vers des complications paludiques qui peuvent entraîner le décès de l'individu. Il est présent en Asie du sud est, où il est responsable de nombreux cas.

Les principales espèces infectant l'homme sont *Plasmodium falciparum* essentiellement présent en Afrique et *Plasmodium vivax* principalement présent en Asie et en Amérique. D'autres *Plasmodium* sont capables d'infecter des singes, c'est le cas notamment de *Plasmodium cynomolgi* et *Plasmodium simium* ou les rongeurs tels que *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* et *Plasmodium chabaudi*. Ces espèces sont notamment utilisées comme modèles d'étude dans les laboratoires.

Des études phylogénétiques ont montré que les parasites primates, à l'exception de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium reichenowi* sont groupés dans l'arbre phylogénétique [Escalante *et al.*, 1998; Zilversmit et Perkins, 2008; Arisue et Hashimoto, 2015] (figure 1.7). Contrairement à ce qui était supposé au début, les parasites ayant un hôte humain ne sont pas étroitement liés au sein de ce groupe phylogénétique. Ils forment un groupe polyphylétique [Leclerc *et al.*, 2004]. Les relations relativement éloignées des pathogènes humains suggèrent que le paludisme est une maladie qui n'a pas évolué spécifiquement chez les humains, mais au sein des primates en général. D'un point de vue phylogénétique, *Plasmodium falciparum* est plus proche des espèces aviaires de *Plasmodium* : *Plasmodium lophurae* et *Plasmodium gallinaceum* (figure 1.7). Mais il est maintenant sûr que *Plasmodium falciparum* a co-évolué avec son hôte humain et n'est pas, comme il a été imaginé initialement [Waters *et al.*, 1991], un passage récent de l'oiseau à l'homme [White, 2014].

1.2.2 Une maladie parasitaire essentiellement transmise par le moustique

La transmission du paludisme aux mammifères, oiseaux ou reptiles se fait via des insectes de l'ordre des diptères : les moustiques (*Culicidae*). Il existe plus de 3 500 espèces de moustiques réparties en 41 genres, parmi ceux-ci, seuls les moustiques *Anopheles* peuvent être infectés par *Plasmodium*. Le paludisme n'est transmis que dans certaines conditions : des températures comprises entre 16 et 33 °C et des altitudes inférieures à 2000 mètres. Si ces conditions ne sont pas réunies, le développement chez le moustique (sporogonie) ne pourra pas avoir lieu. Il est à noter, que les pluies fournissent un environnement favorable à la prolifération des moustiques, mais des pluies excessives sont susceptibles d'éliminer les larves et pupes et ainsi de nuire au développement des moustiques.

Parmi les moustiques du genre *Anopheles*, seule une quarantaine d'espèces sont capables de transmettre le parasite, notamment [Sinka *et al.*, 2010] (figure 1.8) :

- *Anopheles gambiae s. str.* est le principal vecteur du paludisme ; il se développe principalement dans de petites flaques d'eau claire, ensoleillées à moins de 1 000 mètres d'altitude (Afrique sub-saharienne) ;
- *Anopheles albimanus* présent près des eaux claires et ensoleillées, mais également capable de vivre dans les mangroves (Amérique latine) ;
- *Anopheles arabiensis* est un des principaux vecteurs du paludisme ; il peuple les zones plus sèches telles que les savanes et les bois épars (Afrique sub-saharienne) ;
- *Anopheles darlingi* vit dans les zones de basses altitudes, dans de grandes étendues d'eau sans courant et dans les forêts (Amérique latine) ;

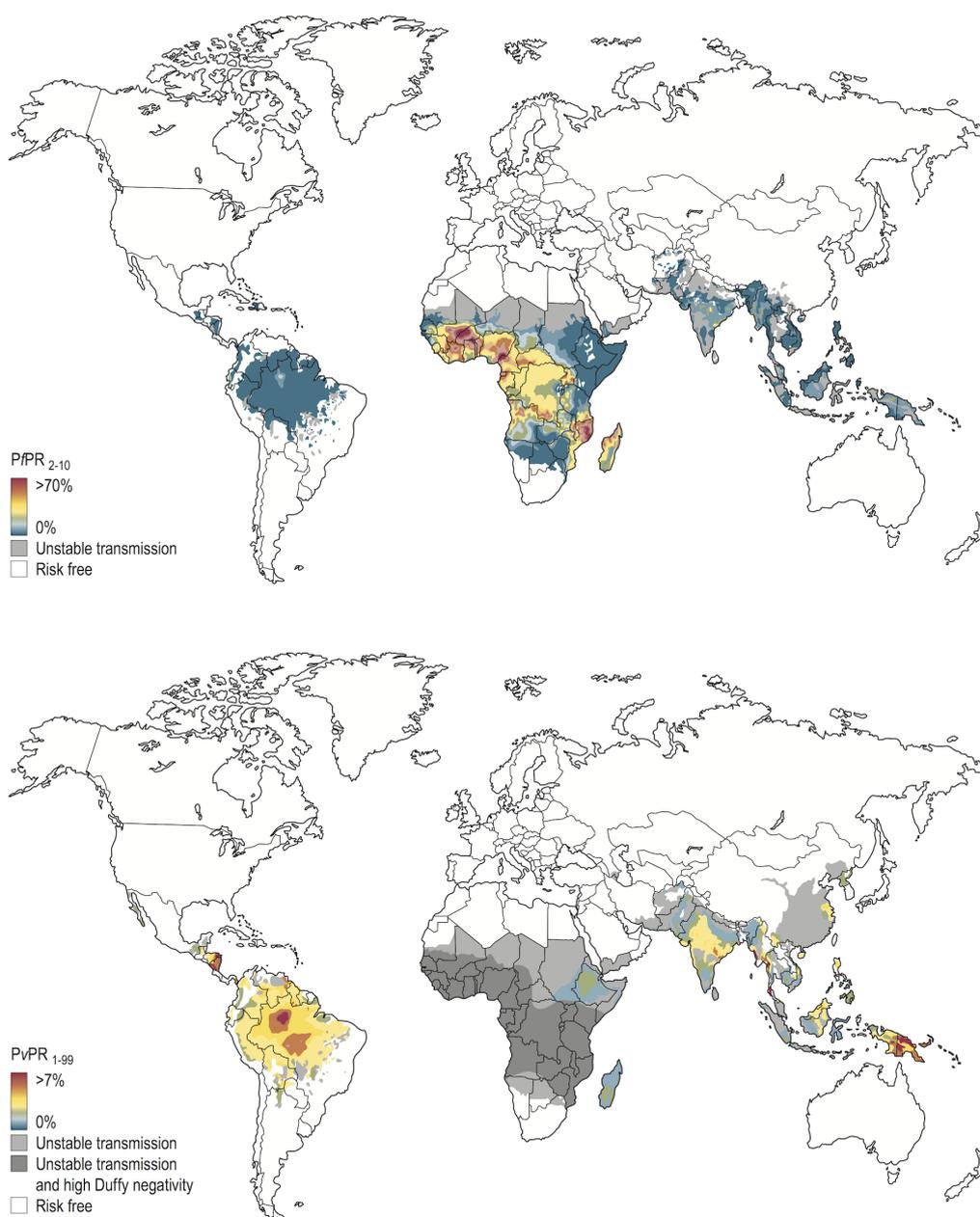


FIGURE 1.6 | Répartition mondiale de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* en 2014. (A) Parasitémie moyenne annuelle à *Plasmodium falciparum* estimée à partir d'un modèle basé sur des géostatistiques. (B) Parasitémie moyenne annuelle à *Plasmodium vivax* estimée à partir d'un modèle basé sur des géostatistiques. *Plasmodium falciparum* est majoritairement présent en Afrique, tandis que *Plasmodium vivax* est largement présent en Asie du sud et Amérique latine. *Plasmodium vivax* est rare dans les régions à forte prévalence de personnes Duffy négatives [White, 2014]

- *Anopheles funestus* a une longévité importante, ce qui fait de lui vecteur très efficace (Afrique sub-saharienne);
- *Anopheles sinensis* vit dans les plaines, dans les cultures telles que les rizicultures ainsi que dans les eaux stagnantes en milieu citadin (Asie).
- *Anopheles stephensi* est la forme prédominante en Asie; il est présent dans les zones stagnantes en ville et en campagne, ainsi que dans les canaux (Asie du sud-est);

Comme tous les moustiques, les *Anopheles* ont un cycle de vie en quatre étapes : un stade zygotique, un stade larvaire, un stade nymphal et un stade imagal (figure 1.9). Les trois premiers stades sont

Étude fonctionnelle et structurale des protéines d'invasion de *Plasmodium*

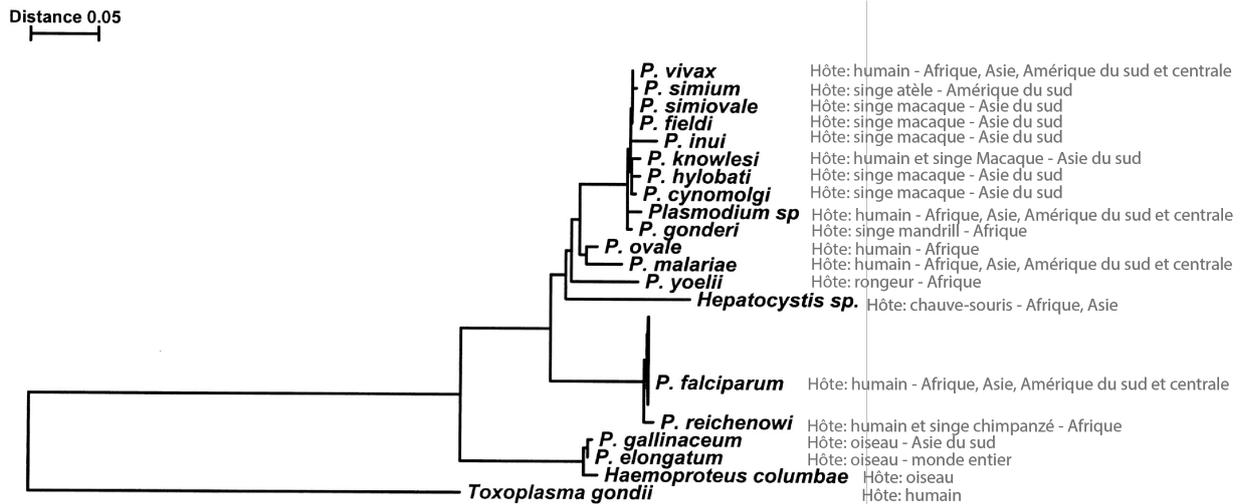


FIGURE 1.7 | Arbre phylogénétique de *Plasmodium* utilisant *Toxoplasma gondii* comme groupe externe. L'arbre a été construit en utilisant la méthode de *Neighbour Joining* qui se base sur les distances génétiques et tient compte des différences de vitesse d'évolution entre les différentes branches de l'arbre phylogénétique. Les hôtes pour chaque espèce sont mentionnés en gris. (Arbre phylogénétique adapté à partir de [Escalante *et al.*, 1998]).

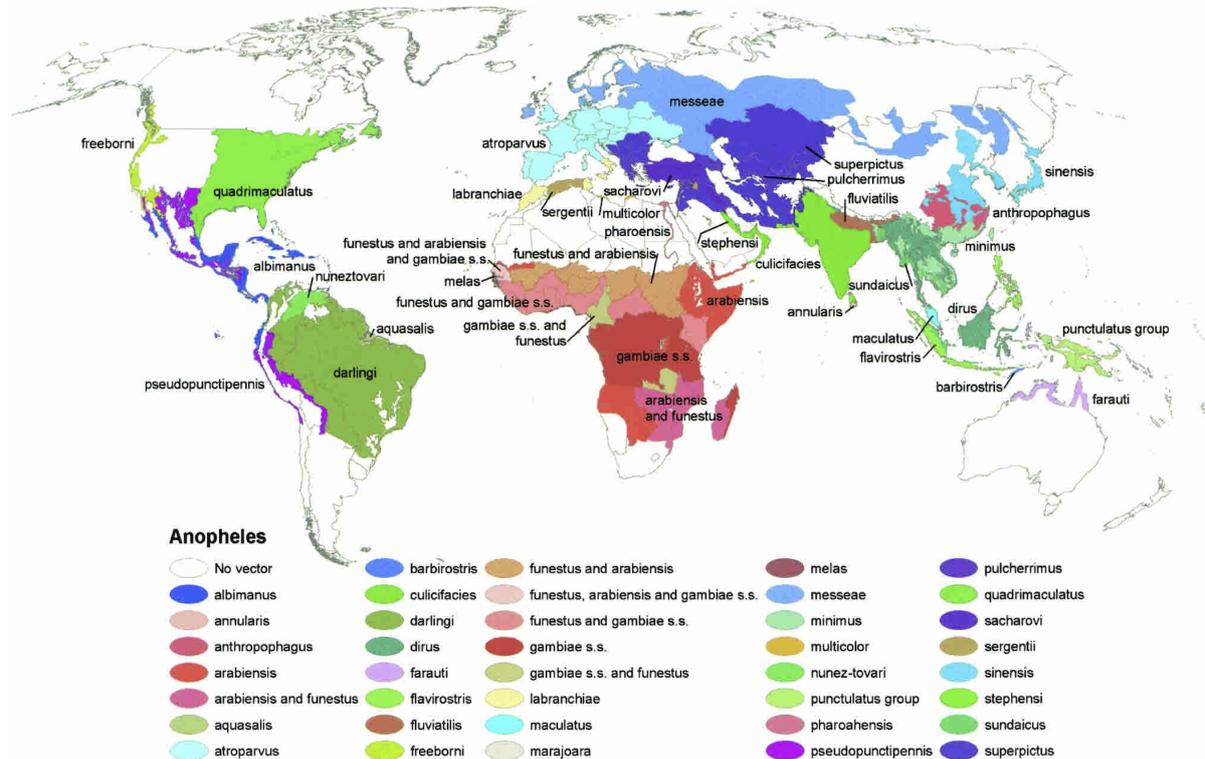


FIGURE 1.8 | Répartition géographique des *Anopheles* en fonction des espèces dominantes ou potentiellement importantes pour la transmission du paludisme. Les espèces *gambiae*, *arabiensis* et *funestus* sont prédominantes en Afrique, tandis que *stephensi* et *sinensis* sont présentes en Asie et *albanus* et *darlingi* sont présentes en Asie [Kiszewski *et al.*, 2004].

aquatiques et durent entre cinq et quatorze jours en fonction de l'espèce et de la température. Le stade adulte dure de quinze jours à un mois (voir plus en captivité).

Les mâles se nourrissent de nectar de fleurs et de suc de fruits, tandis que les femelles sont hémaphages. Elles doivent absorber un repas sanguin avant chaque ponte. Les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois au cours de leur vie. Elles stockent les spermatozoïdes dans une spermathèque, ce qui

leur permet de féconder leurs œufs tout au long de leur vie.

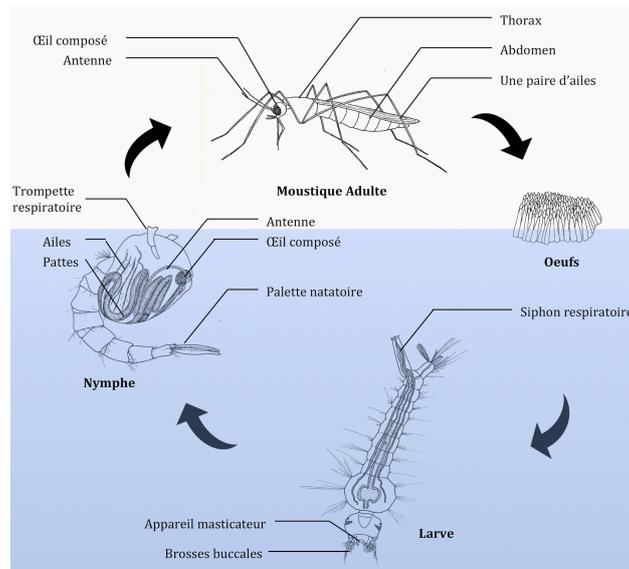


FIGURE 1.9 | Cycle de vie du moustique. Au cours de sa vie le moustique passe par quatre états : œuf, larve, puppe et adulte. Seul l'adulte n'a pas un mode de vie aquatique. Adapté de [Association, 2014].

1.2.3 Cycle de vie et variété de formes adoptées par *Plasmodium*

Le cycle biologique de transmission de *Plasmodium* est un processus complexe nécessitant l'interaction entre : le parasite, un hôte vertébré, un moustique vecteur et un environnement propice. L'hôte vertébré héberge la schizogonie qui est la reproduction asexuée, c'est donc un hôte intermédiaire. Tandis que la sporogonie, reproduction sexuée, a lieu chez le moustique qui est considéré comme l'hôte définitif (figure 1.10).

1. Un moustique *Anopheles* femelle infecté transmet le parasite sous forme de sporozoïtes lors d'un repas sanguin. Ces sporozoïtes sont injectés dans le derme et utilisent la circulation sanguine pour migrer en moins d'une heure jusqu'au foie.
2. Les sporozoïtes envahissent les cellules hépatocytaires où ils se différencient en schizontes hépatiques. Ces schizontes sont le siège d'une multiplication intense qui aboutit en quelques jours à des dizaines de milliers de mérozoïtes. Il est à noter que certaines espèces de *Plasmodium*, telles que *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*, produisent des hypnozoïtes qui sont des formes dormantes responsables d'accès de reviviscence plusieurs semaines ou mois après l'infection initiale.
3. À maturité, les schizontes hépatiques se rompent et libèrent leurs mérozoïtes. Ces derniers passent dans le sang et pénètrent dans les globules rouges où ils se multiplient pour former de nouveaux schizontes. Ces schizontes érythrocytaires libèrent à maturité des mérozoïtes capables de coloniser d'autres globules rouges. Le cycle asexué est ainsi entretenu. Ce cycle érythrocytaire dure 48 heures chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* et 72 heures chez *Plasmodium malariae*. La lyse concomitante des hématies est responsable de l'accès palustre.
4. Une partie des mérozoïtes (moins de 10%) ne se développe pas en schizontes. Ils quittent le cycle asexué pour former des gamétocytes mâles ou femelles. Le développement des gamétocytes se fait en cinq stades et dure entre 10 et 12 jours.

- Lorsqu'un moustique pique l'hôte infecté, il absorbe le sang contenant les différentes formes de parasites. Seuls les gamétocytes vont être capables de coloniser le moustique. Dans l'intestin les gamétocytes vont sortir des globules rouges. Ils se retrouvent alors soumis à une variation de pH et de température ainsi qu'à la présence de métabolites du moustique tels que l'acide xanthurénique, ce qui déclenche leur activation. Ils poursuivent alors leur développement et forment des gamètes. Les gamétocytes mâles produisent huit microgamètes tandis que les gamétocytes femelles forment un macrogamète femelle. Un microgamète mâle fusionne avec un macrogamète femelle pour produire un zygote diploïde. Ce zygote évolue ensuite en ookinète motile. La motilité de l'ookinète lui permet de franchir l'épithélium stomacal. Il se transforme sur la surface externe de l'estomac en oocyste.
- L'oocyste se multiplie pour aboutir à la formation de milliers de parasites haploïdes et motiles : les sporozoïtes. Ces derniers sont libérés dans l'hémocœle du moustique au bout de 8 à 15 jours. Ils migrent alors jusqu'aux glandes salivaires qu'ils envahissent. Ils seront ensuite transmis lors du prochain repas sanguin.

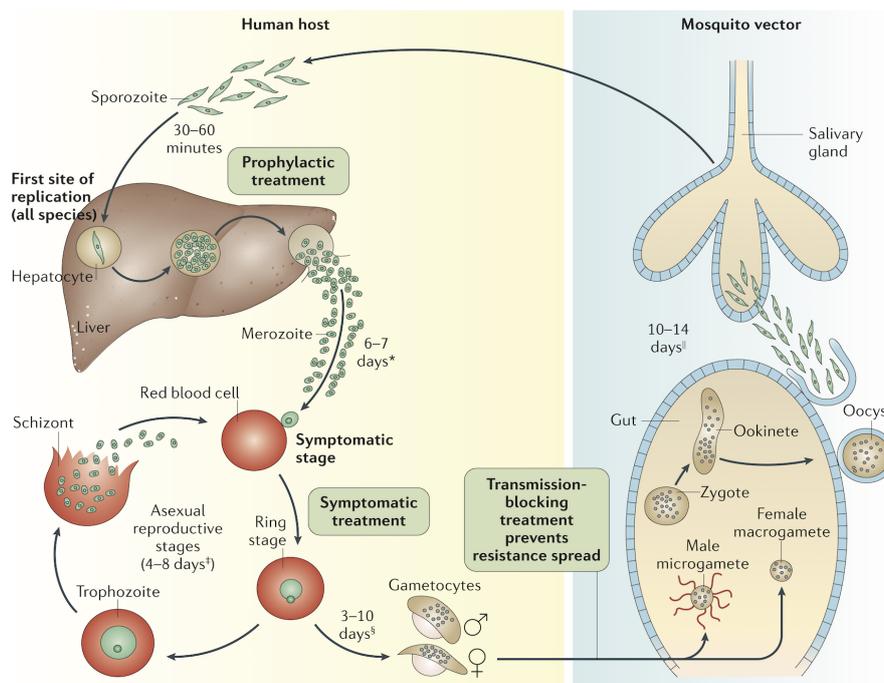


FIGURE 1.10 | Cycle de vie de *Plasmodium* [Phillips *et al.*, 2017].

La phase hépatique, également appelée phase pré-érythrocytaire, est une phase asymptomatique, qui dure environ une semaine dans le cas de *Plasmodium falciparum*. L'apparition des signes cliniques débute lorsque les mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine. Leur accumulation dans les globules rouges est responsable des symptômes du paludisme. La majorité des médicaments actuellement sur le marché cible cette seconde phase.

Le nombre de parasites varie au cours du cycle de vie de *Plasmodium*. La population parasitaire est maximale dans la circulation sanguine où elle peut atteindre jusqu'à 10^{11} parasites. Tandis qu'elle n'est que de centaines ou dizaines d'individus lors des stades d'invasion tels que les sporozoïtes et ookinètes (figure 1.11). Ce qui fait de ces stades d'invasion de bonnes cibles médicales.

Tableau 1.1 | Spécificités de cycles des espèces plasmodiales infectant les humains [White, 2014] :

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>
Durée de la phase hépatocytaire (jours)	5.5	8	9	15	(7)?
Durée de la phase érythrocytaire (jours)	2	2	2	3	1
Rechutes dues aux hypnozoïtes	non	oui	oui	non	non
Nombre de mérozoïtes par schizonte hépatique	30 000	10 000	15 000	2 000	?
Préférence érythrocytaire	plutôt jeunes	réticulocytes	réticulocytes	anciens	tous
Durée maximale de l'infection si non-traitée	2	4	4	40	?

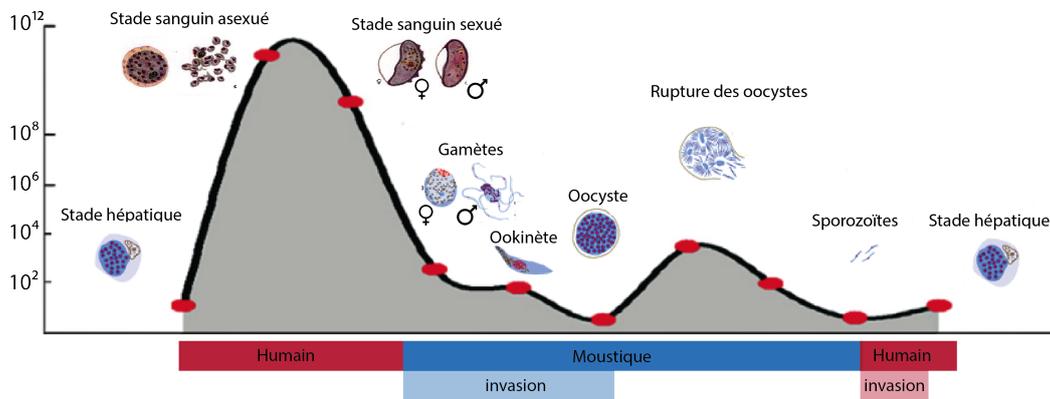


FIGURE 1.11 | Taille relative de la population de *Plasmodium falciparum* au cours de son cycle de vie (adapté à partir de [Sinden, 2010]). Il peut y avoir jusqu'à 10^{11} parasites dans la circulation sanguine. Mais il existe 2 goulets d'étranglement où la population parasitaire est réduite : seules quelques centaines de sporozoïtes atteignent le foie ; il n'y a formation que d'une dizaine d'oocystes chez le moustiques.

1.3 Épidémiologie : une maladie tropicale en régression

Environ 3.2 milliards de personnes, soit près de la moitié de la population mondiale, vivent dans des zones endémiques pour le paludisme. En 2000, 108 pays étaient considérés endémiques, mais grâce aux efforts de préventions, en 2016 seuls 91 pays le sont encore (figure 1.12).

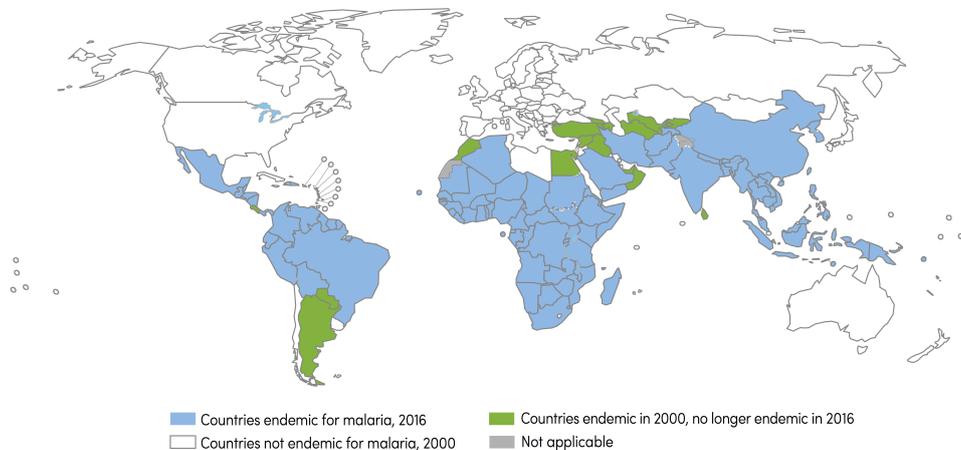


FIGURE 1.12 | Pays endémiques pour le paludisme en 2000 et 2016. Les pays dans lesquels aucun cas indigène n'a été reporté durant trois années consécutives sont considérés comme ayant éliminé le paludisme [WHO, 2016].

1.3.1 Répartition géographique inégale du paludisme

La répartition mondiale du paludisme est très hétérogène. La plupart des cas de paludisme, soit 90%, ont été enregistrés en Afrique, tandis que l'Asie du Sud-Est représente 7% des cas (figure 1.13) [WHO, 2016].

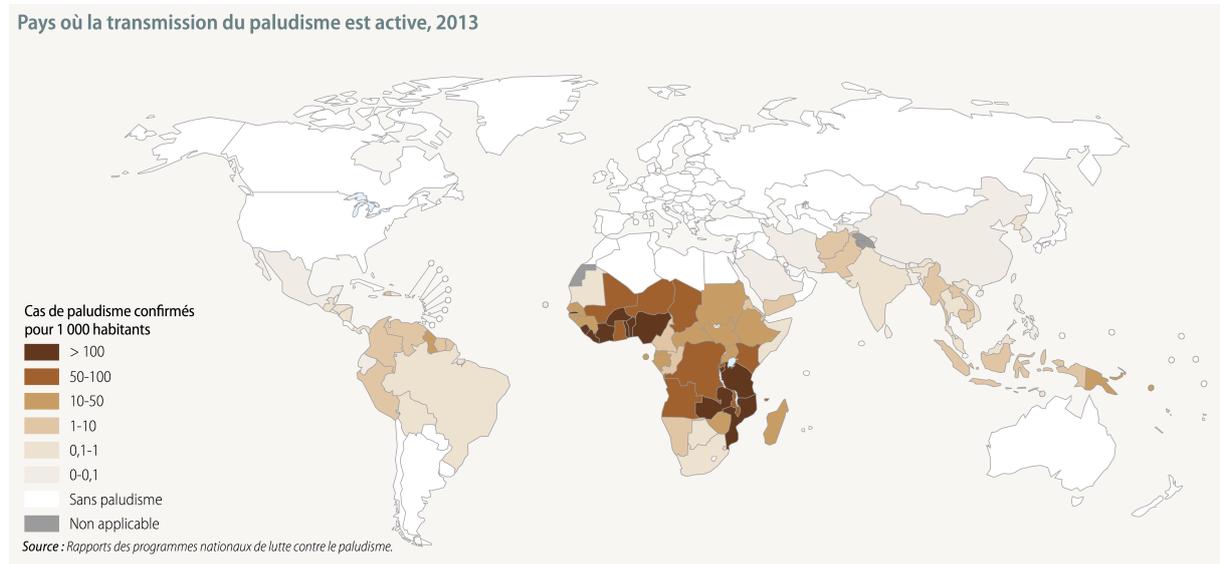


FIGURE 1.13 | Pays où la transmission du paludisme est active en 2013.

La répartition mondiale des parasites est également hétérogène. *Plasmodium falciparum* est présent dans toutes les zones impaludées, et plus massivement en Afrique, tandis que *Plasmodium vivax* niche majoritairement en Asie du Sud-Est (figure 1.6). Dans le monde *Plasmodium vivax* serait à l'origine de 4% des cas de paludisme, hors Afrique, cette proportion atteint 41% ; 99% des décès sont dus au paludisme à *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium vivax* serait responsable de 3 100 décès en 2015 (incertitude 1 800–4 900), dont 86% hors Afrique [WHO, 2016].

Afrique : L'Afrique est le continent le plus touché par le paludisme, notamment l'Afrique sub-saharienne où *Plasmodium falciparum* est prédominant, mais où sont également présents *Plasmodium ovale* et *Plasmodium malariae*. *Plasmodium vivax* est peu présent hormis en Afrique de l'est (figure 1.6).

Asie : En Asie sont présents à la fois *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium knowlesi*. Contrairement au continent africain, la transmission en Asie se fait sous forme de foyers disséminés en milieu rural et les grandes villes sont indemnes (excepté les villes indiennes).

Amérique : Le paludisme a été éradiqué en Amérique du Nord, mais est présent en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. La transmission de *Plasmodium vivax* se poursuit en Amérique Centrale mais les Caraïbes (à l'exception d'Haïti et de la République Dominicaine) en sont exemptes. En Amérique du Sud, la transmission est principalement due à *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*.

Océanie : La transmission est hétérogène en Océanie où certaines îles sont atteintes (Nouvelle Guinée, Îles Salomon, Vanuatu) et d'autres en sont totalement dépourvues (Australie, Nouvelle Zélande, Polynésie Française, Nouvelle-Calédonie, Wallis et Futuna).

Europe : Le paludisme vient d'être éradiqué pour la seconde fois en Europe, où il persistait notamment en Europe du sud. Il y a cependant eu des résurgences en Grèce et en Turquie du fait de l'importation depuis des pays endémiques pour le paludisme (notamment l'Afghanistan et le Pakistan).

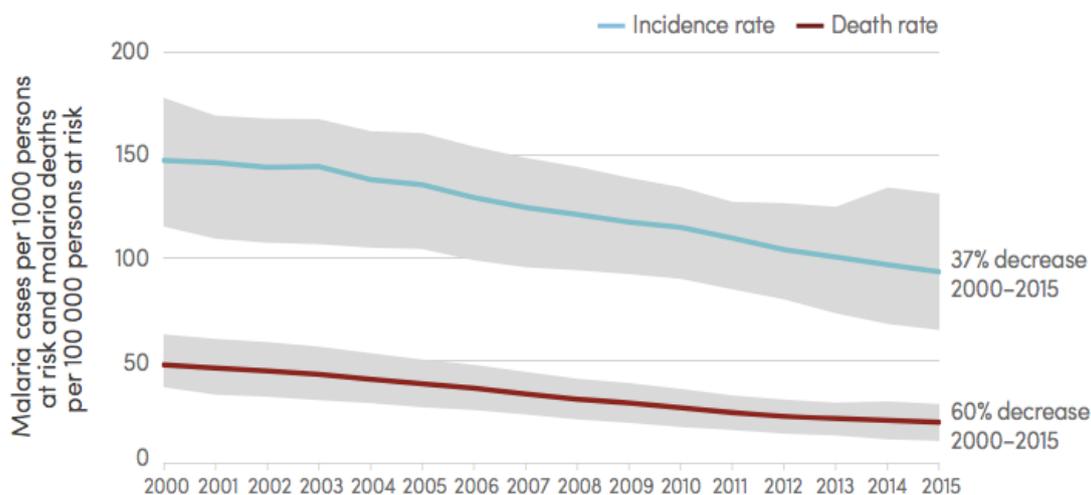
1.3.2 Régression de la morbidité du paludisme depuis 15 ans et émergence de résistances aux insecticides et antipaludiques

Régression du paludisme depuis 15 ans

Depuis 2000 la morbidité et la mortalité liées au paludisme ont fortement régressé. Le nombre de cas de paludisme a baissé de 37% en 15 ans. Il était estimé à 262 millions (205 à 306 millions) en 2000 tandis qu'en 2015 il est estimé à 214 millions (149 à 303 millions). De plus, la mortalité associée a diminué de 60%. Elle passe de 839 000 (653 000 à 1.1 million) décès en 2000 à 438 000 (236 000 à 635 000) en 2015 [WHO, 2015] (figure 1.14). L'OMS estime que 6.8 millions de décès dus au paludisme ont été évités dans le monde depuis 2001. Malgré ces résultats encourageants, il reste de gros efforts à faire car deux types de résistances ont émergé.

Morbidité = nombre de personnes souffrant d'une maladie pendant un temps donné (s'exprime soit en prévalence, soit en incidence)
 Prévalence = nombre de cas de maladie sur une période donnée
 Incidence = nombre de nouveaux cas sur une période donnée

$$\text{Taux d'incidence} = \frac{\text{incidence}}{\text{taille population}}$$



Source: WHO estimates

FIGURE 1.14 | Estimation de l'incidence et de la mortalité du paludisme entre 2000 et 2015 [WHO, 2015]. Entre 2000 et 2015, l'incidence du paludisme a baissé de 37% à l'échelle mondiale tandis que le taux de mortalité a reculé de 60% toutes tranches d'âge confondues et de 65% chez les enfants de moins de 5 ans [WHO, 2015].

Émergence de résistances des *Anopheles* aux insecticides

Parmi les 73 pays suivis par l'OMS, 60 ont rapporté la présence de résistance des *Anopheles* à au moins une classe d'insecticides utilisés pour protéger les maisons ou présent dans les moustiquaires et 50 pays ont rapporté une résistance à au moins deux classes d'insecticides. La résistance aux pyréthroides qui est la classe d'insecticides la plus utilisée dans les moustiquaires imprégnées est le plus fréquemment observée [WHO, 2016] (figure 1.15).

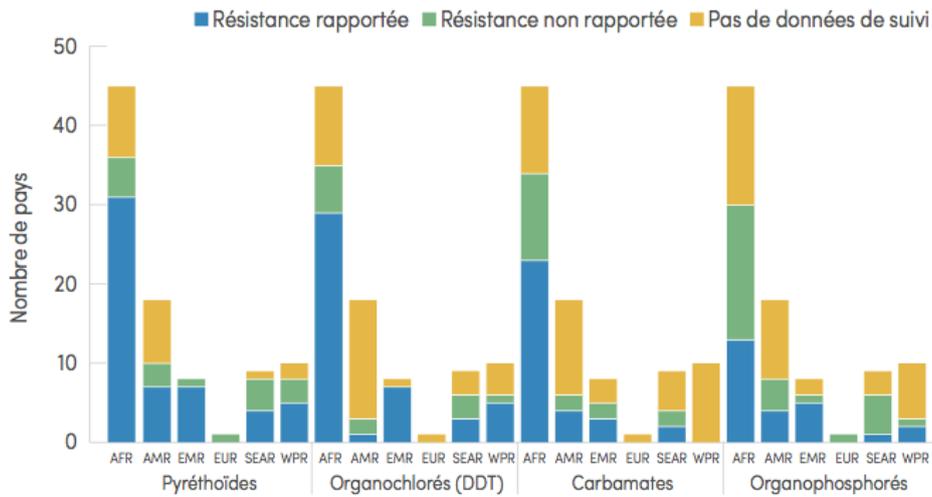


FIGURE 1.15 | Résistance aux insecticides [WHO, 2016]. (AFR : Afrique; AMR : Amérique; EMR : Région de méditerranée est; EUR : Europe; SEAR : Asie du sud-est; WPR : Région pacifique ouest; DDT : dichloro-diphényl-trichloroéthane.)

Émergence de résistances chez *Plasmodium* aux anti-paludiques

L'augmentation des programmes de lutte contre le paludisme a permis de développer l'accès aux soins antipaludiques. Cependant cette amélioration a également exercé une pression de sélection sur le parasite qui a évolué et développé des mécanismes d'échappement à certains antipaludiques.

Pendant les années 1950 les parasites ont développé une première résistance à la chloroquine tout d'abord en Colombie, au Venezuela et à la frontière entre le Cambodge et la Thaïlande. Celle-ci s'est ensuite répandue au reste du monde [Payne, 1987]. Les pays se tournent alors vers la combinaison médicamenteuse sulfadoxine-pyriméthamine, mais très vite des résistances émergent également. Ce sont alors les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) qui deviennent le choix de traitement recommandé par l'OMS. Depuis 2008 une résistance à l'artémisinine a été identifiée dans la région du Grand-Mékong (Cambodge, Myanmar, République démocratique populaire lao, Thaïlande et Viet Nam) [WHO, 2016] – voir figure 1.16. La propagation de la résistance de l'artémisinine à d'autres régions pourrait déclencher une situation d'urgence majeure pour la santé publique.

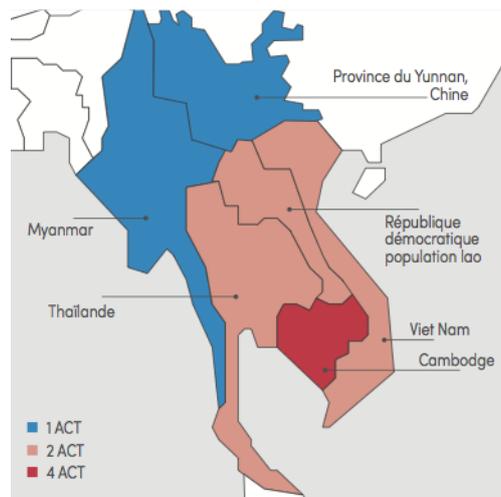


FIGURE 1.16 | Répartition de la résistance multiple aux antipaludiques dans la région du Grand Mékong en 2016 [WHO, 2016]. ACT : combinaison thérapeutique à base d'artémisinine.

1.4 Signes cliniques : des symptômes non spécifiques au risque vital

1.4.1 Des populations plus à risque

Tous les individus n'ont pas la même sensibilité à *Plasmodium*. Une partie de la population court un risque plus élevé d'attraper le paludisme et d'être atteint de la forme sévère de la maladie. Ainsi les groupes de population les plus à risque de tomber malade sont les nourrissons, les enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes, les patients atteints de VIH et les voyageurs non immunisés.

Le paludisme chez les nourrissons. Les nourrissons dont les mères vivent dans des zones endémiques sont protégés par les anticorps maternels après leur naissance. Cependant à l'âge de trois mois environ cette immunité disparaît et le nourrisson devient particulièrement vulnérable à l'infection par *Plasmodium*.

Les enfants de moins de cinq ans. Dans les zones de forte transmission, les jeunes enfants n'ont pas encore développé une immunité les protégeant contre les formes sévères de la maladie. Ce sont avec les nourrissons les personnes les plus vulnérables. Ils représentent plus de 85% des décès liés au paludisme dans le monde.

Les femmes enceintes. Les femmes atteintes de paludisme pendant la grossesse ont un taux plus élevé de fausses couches (jusqu'à 60%) et un taux de décès maternels atteignant 10 à 50%. Le paludisme pendant la grossesse augmente également le risque d'anémie maternelle et foétale, de faible poids de naissance, de mortalité néonatale.

Les patients infectés par le VIH. L'infection à VIH augmente le risque d'infection par *Plasmodium* et notamment d'infection palustre sévère et de décès. Le paludisme peut également aggraver un cas de sida clinique.

Les voyageurs non immunisés. Les voyageurs qui n'ont jamais été en contact avec le paludisme y sont particulièrement sensibles. Mais les personnes vivant dans des zones exemptes de paludisme et ayant vécu dans des zones d'endémie, sont également très exposées au paludisme lorsqu'elles retournent dans des régions endémiques, car leur immunité a diminué ou disparu.

1.4.2 Paludisme simple

Période d'incubation

Après la piqûre infestante d'un anophèle femelle, les sporozoïtes migrent du derme au foie où ils se multiplient. Cette première phase dure de 7 à 12 jours pour *Plasmodium falciparum* et peut durer jusqu'à 20 jours pour d'autres espèces. Elle est asymptomatique. Les symptômes commencent à apparaître pendant la phase érythrocytaire lorsque les parasites envahissent les hématies et s'y multiplient.

Primo-Infection

Le premier symptôme à apparaître est une fièvre brutale et continue qui s'accompagne souvent de céphalées, de myalgies et parfois de troubles digestifs tels que des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et des diarrhées. En l'absence de traitement, la fièvre persiste avec des rémissions pendant 1 à 2 semaines, mais le risque d'évolution en neuropaludisme est toujours présent dans le cas d'une infection par *Plasmodium falciparum*.

Accès palustre à fièvre périodique

Dans le cas où la primo-infection n'a pas été traitée correctement, des accès palustres peuvent survenir à la suite de cette primo-infection ou plusieurs mois à années après. Ils sont dus soit au réveil des hypnozoïtes intrahépatiques, soit à une recrudescence de la schizogonie érythrocytaire.

L'accès palustre est caractérisé par trois phases symptomatiques :

1. Phase de frissons : elle dure environ une heure, durant laquelle le patient a de violents frissons correspondant à une élévation de la température à 39 °C. Ces frissons s'accompagnent d'une sensation de froid intense, de splénomégalie et d'hypotension artérielle.
2. Phase de chaleur : elle dure deux à quatre heures où le patient est en hyperthermie, pouvant atteindre 41 °C. Sa peau est sèche et brûlante, il y a une diminution de la splénomégalie, le malade est également atteint de céphalées et de douleurs abdominales.
3. Phase de sueurs : elle dure entre deux et quatre heures et se caractérise par des sueurs qui abaissent la température corporelle. Il y a alors normalisation de la température, de la tension, de la splénomégalie, associée à un état de bien-être.

Le cycle érythrocytaire détermine le rythme des accès palustres. Ainsi, une schizogonie de 48 heures correspond aux fièvres tierces de *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* qui surviennent tous les deux jours. Tandis que les fièvres quartes de *P. malariae* résultent de schizogonie de 72 heures induisant des accès palustres tous les trois jours.

1.4.3 Paludisme grave

Le paludisme simple peut évoluer en paludisme grave en l'absence de traitement ou dans le cas d'un traitement trop tardif. Il est principalement dû à une infection par *Plasmodium falciparum*, bien que *Plasmodium vivax* et *Plasmodium knowlesi* puissent aussi causer des accès sévères. Le diagnostic et le traitement rapides du paludisme simple sont donc d'une importance cruciale.

Le paludisme grave correspond au dysfonctionnement d'un ou plusieurs organes vitaux. Parmi les signes cliniques du paludisme grave, on retrouve : des troubles de la conscience pouvant aller jusqu'au coma, une prostration du malade associée à une faiblesse générale avec des difficultés à s'asseoir et tenir debout, des convulsions répétées, une détresse respiratoire, des lésions rénales aiguës, un ictère, des anomalies hémorragiques, une tachycardie et une hypertonie. Un paludisme grave peut donc prendre différentes formes cliniques dont la plus importante est l'atteinte cérébrale. L'anémie et l'hypoglycémie seront plus fréquentes chez les enfants, tandis que les œdèmes pulmonaires, les lésions rénales aiguës et l'ictère sont plus courants chez les adultes. Le paludisme cérébral est très présent peu importe l'âge du patient (figure 1.17). Dans les formes létales, le décès survient généralement des suites de défaillances multiviscérales.

Neuropaludisme

Le neuropaludisme résulte d'atteintes cérébrales au cours de l'accès palustre. Il implique la séquestration de globules rouges parasités dans les capillaires cérébraux, ainsi qu'une réponse immunitaire de l'hôte. Les symptômes du neuropaludisme sont une fièvre très élevée, des troubles de la conscience constants mais d'intensité variable, allant de la simple obnubilation au coma profond, des convulsions qui peuvent être généralisées ou localisées et des troubles du tonus telle que de l'hypotonie.

Non traité, le neuropaludisme est mortel en deux ou trois jours. En cas de survie, il peut entraîner des séquelles neurologiques. Même dans le cas d'une prise en charge adaptée, la mortalité reste élevée entre 10 et 30%.

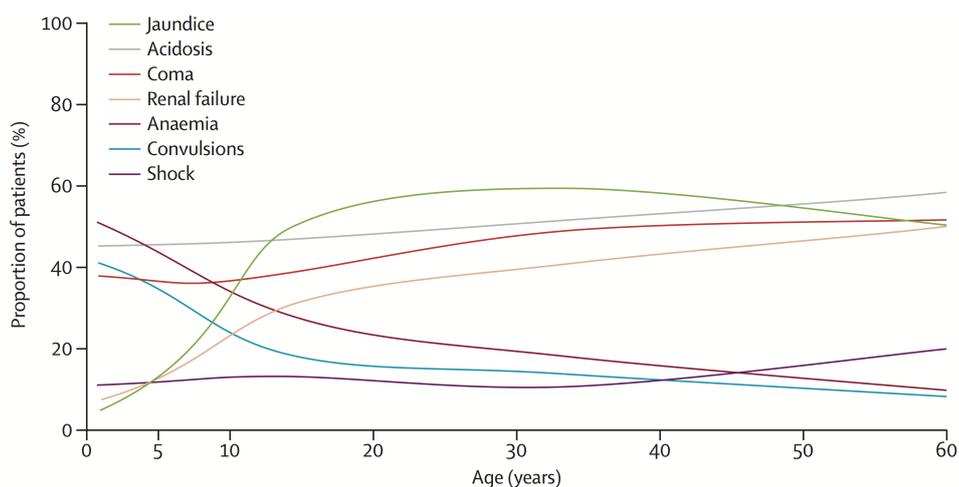


FIGURE 1.17 | Manifestations du paludisme grave en fonction de l'âge [White *et al.*, 2014].

Anémie

L'anémie sévère est un signe d'infection à *Plasmodium falciparum* ou *Plasmodium vivax*. Elle se développe rapidement lorsque la densité parasitaire est importante. La destruction massive des hématies parasitées et la réduction de la production d'érythrocytes durant l'infection sont responsables de l'anémie. L'anémie peut être due à des infections répétées, auquel cas la parasitémie asexuée est généralement faible, mais on retrouve en abondance le pigment paludéen dans les monocytes et les autres phagocytes, attestant d'une infection récente.

L'anémie sévère est la principale cause de mortalité palustre chez l'enfant. Elle peut également avoir un impact important sur les femmes enceintes, car l'anémie peut causer une diminution du poids de naissance, un accouchement prématuré et l'anémie chez le nourrisson.

Lésions rénales aiguës

L'insuffisance rénale est multi-factorielle. Comme pour le paludisme cérébrale, l'adhésion des érythrocytes infectés entre-eux et aux vaisseaux sanguins résulte en une obstruction des capillaires irriguant les reins. L'insuffisance rénale aiguë est une pathologie rare chez l'enfant.

Détresse respiratoire et acidose

La détresse respiratoire est liée à un œdème respiratoire (présence de liquide dans les poumons) ou à une acidose métabolique. L'œdème pulmonaire est dû à une surcharge hydrique qui résulte d'une ré-hydratation intempestive ou d'un œdème lésionnel et d'une augmentation de la perméabilité capillaire sous l'effet d'entotoxines et de cytokines. L'acidose accompagne souvent un neuropaludisme ou une anémie sévère qui se traduit par une réduction de la distribution en oxygène et une insuffisance de perfusion tissulaire.

Hypoglycémie

L'hypoglycémie est courante dans le cas de paludisme grave. Elle touche tout particulièrement les enfants et les femmes enceintes. L'hypoglycémie résulte notamment de l'augmentation en besoins métaboliques. Elle peut ne pas être détectée car ses caractéristiques cliniques sont communes à celles du paludisme grave : troubles de la conscience, convulsions, tachycardie, coma... Sa cause est probablement

multi-factorielle : épuisement des réserves de glucose suite à de la malnutrition, surconsommation énergétique par le parasite, mauvaise absorption du glucose en raison d'une diminution du flot sanguin et d'un dysfonctionnement hépatique, une altération de la néoglucogenèse hépatique et de l'hyperinsulinémie due à une thérapie par la quinine.

Ictère

L'ictère résulte de la combinaison d'hémolyse, de lésions hépatiques et de cholestase. Il est plus présent chez les adultes que les enfants et s'accompagne souvent de problèmes rénaux.

1.4.4 Paludisme chez les femmes enceintes

Les femmes enceintes sont plus sensibles aux infections par *Plasmodium*, notamment lorsqu'il s'agit de leur première grossesse [Desai *et al.*, 2007]. Cette susceptibilité accrue résulte d'une part de la suppression immunitaire qui accompagne la grossesse afin d'éviter le rejet du fœtus et d'autre part par l'accumulation importante de parasites au niveau du placenta [Ataide *et al.*, 2014]. Cette accumulation de parasites au niveau du placenta peut ne pas être détectée au niveau sanguin et met en jeu à la fois la vie de la mère et celle du fœtus.

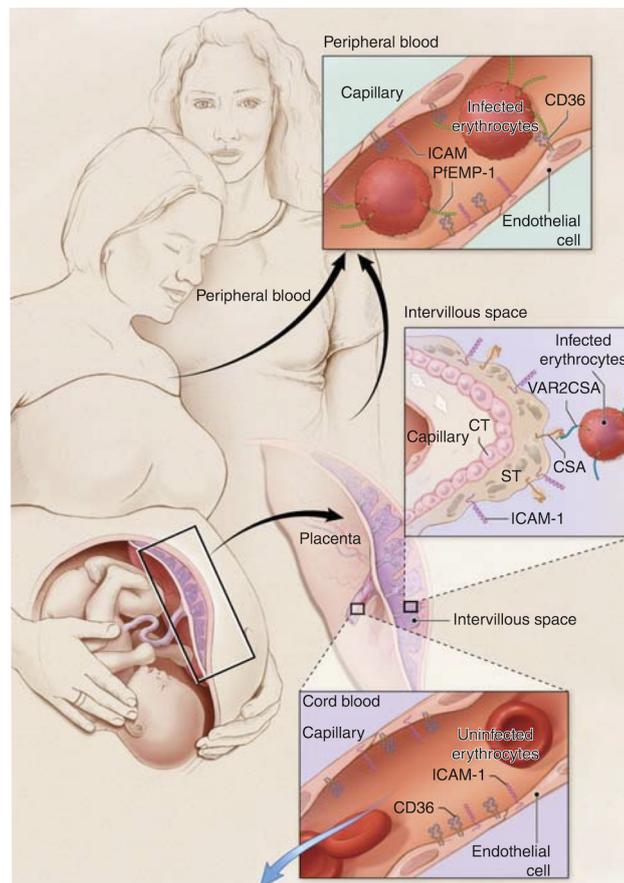


FIGURE 1.18 | Paludisme chez la femme enceinte [Fried et Duffy, 2017].

Dans le placenta, les globules rouges infectés expriment le variant de la protéine PfEMP1 : VAR2CSA (*Va-riant Surface antigen 2-CSA*). Cet antigène est capable de se lier aux sulfates de chondroïtine A qui sont des protéoglycanes de placenta [Fried et Duffy, 1996; Buffet *et al.*, 1999; Ataide *et al.*, 2014] (figure 1.18). Ce variant de PfEMP1 est incapable de se lier aux récepteurs usuels de PfEMP1 qui sont CD36 et ICAM-1 [Fried et Duffy, 1996, 2017]. Les femmes primipares n'ont jamais été en contact avec le variant

VAR2CSA et sont très sensibles au parasite. À la suite de plusieurs grossesses, les femmes développent une immunité contre ce variant de PfEMP1 et deviennent résistantes au paludisme placentaire.

Le paludisme est responsable de complications lors de la grossesse telles que des contractions prématurées, l'avortement spontané ou la mortalité au moment de l'accouchement. De plus, l'infection du placenta par *Plasmodium* peut provoquer un poids de naissance faible, une mortinatalité ou un décès néonatal précoce [Blacklock et Gordon, 1925].

Le paludisme congénital fait suite à la transmission transplacentaire du *Plasmodium*. Il touche environ 5% des nouveaux-nés de mères infectées et est en relation directe avec la quantité de parasites présents dans le placenta. Le paludisme congénital est caractérisé par la présence de formes asexuées du parasite dans le sang du nouveau-né dans les sept premiers jours de sa vie [Loke, 1982]. Il peut s'agir d'un paludisme congénital d'infestation, *Plasmodium* est présent dans le sang de cordon ombilical ou chez le nouveau-né mais il est asymptomatique ou d'un paludisme congénital maladie où le nouveau-né est symptomatique.

1.5 Moyens de lutte et aspects thérapeutiques

La lutte contre le paludisme consiste en grande partie à lutter contre le moustique vecteur afin de limiter la transmission. Ces actions peuvent se faire à l'échelle collective en s'attaquant notamment aux larves, mais également à l'échelle individuelle en se protégeant des piqûres. Lorsque le paludisme est tout de même contracté et que la détection se fait rapidement, la maladie peut être traitée efficacement. Les traitements utilisés permettent d'une part d'éliminer rapidement les plasmodies présentes dans le sang du patient et ainsi d'éviter une évolution vers un paludisme grave ou vers une infection chronique provoquant une anémie. Et d'autre part, les traitements ont également pour but de prévenir la transmission en diminuant le réservoir infectieux.

Malheureusement, l'extrême variabilité de *Plasmodium* complique la mise en route d'une stratégie vaccinale. Actuellement il n'existe pas de vaccin commercialisé contre le paludisme. Une large variété de vaccins est à l'étude avec notamment le vaccin RTS,S qui est le plus avancé mais qui ne confère qu'une faible protection. Le vaccin idéal devrait protéger à la fois contre *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* avec une protection pérenne d'au moins 75% [Phillips *et al.*, 2017].

De plus, les moustiques développent des résistances aux insecticides et les parasites aux médicaments. Il est donc probable que pour contrôler cette maladie, la solution ne soit pas unique mais réside en une combinaison de différentes approches, qu'elles soient thérapeutiques ou prophylactiques.

1.5.1 La prévention : un outil indispensable pour la maîtrise de la transmission du paludisme

Lutte antivectorielle

La lutte anti-vectorielle permet de réduire la transmission. Dans une région donnée, si les actions de lutte anti-vectorielle sont suffisamment développées l'ensemble de la communauté sera protégée. L'OMS recommande d'assurer une lutte antivectorielle efficace pour protéger toutes les populations exposées au risque de contracter le paludisme.

- **Lutte contre les larves**
 - Assainissement des zones humides :
Pour réduire l'aire de reproduction du vecteur *Anopheles*, la modification de l'environnement peut s'avérer utile. Le drainage, l'aplanissement des terrains pour éliminer les fossés, la

rectification des berges pour faciliter l'écoulement des cours d'eau sont autant de moyens permettant de limiter la présence d'eau stagnante, qui est le lieu de développement des larves de moustiques. Cependant ces travaux nécessitent un investissement initial important, ainsi qu'une maintenance régulière, car un système de drainage mal entretenu peut au final faciliter la multiplication du vecteur. Ces systèmes ont fait leurs preuves, notamment en France, Henri IV ordonna l'assèchement des marais poitevins, ce qui contribua à l'éradication des moustiques de cette zone. Il est également important de vidanger régulièrement les réservoirs d'eau (bidons et bassines) proches des habitations.

- Introduction de poissons insectivores :
Une autre contribution à l'assainissement des zones humides consiste à introduire dans des étangs des poissons insectivores tels que des gambusies, des carpes et des vairons.

La lutte antilarvaire permet de faire diminuer la population de vecteurs. Néanmoins, les lieux de pontes sont très dispersés ce qui rend leur identification difficile ou incomplète. La protection offre l'avantage d'être large, de niveau régional, mais présente aussi l'inconvénient d'être lourde à mettre en œuvre.

- **Lutte contre les moustiques adultes**

- Vêtements longs et imprégnés :
Les moustiques piquent préférentiellement la nuit, il est donc conseillé de porter des vêtements longs dès le coucher du soleil. Ces vêtements forment une barrière physique qui peut être complétée par une barrière chimique, grâce à l'imprégnation d'insecticides (de type perméthrine) sur les vêtements.
- Répulsifs cutanés :
L'utilisation de répulsifs cutanés, permet également d'éloigner les moustiques.
- Moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée d'action (MIILD) :
Une MIILD est une moustiquaire dont le tissu a été directement imprégné d'insecticide (Deltaméthrine, Lambdacyhalothrine, Alphacyperméthrine, Cyfluthrine, Etofenprox ou Permethrine) (figure 1.19). Les molécules d'insecticides confèrent à la moustiquaire un effet répulsif qui permet l'éloignement des moustiques et un effet irritant sur les moustiques qui entrent en contact avec la moustiquaire. Ces moustiquaires ont une durée de vie d'environ 3 ans ou 20 lavages. Une fois ce délai passé, la moustiquaire doit être réimprégnée. L'efficacité des MIILDs a été démontrée dès les années 90 [Review Cachran , Lengeler C.], avec une étude publiée en 1998 qui conclut que l'utilisation de moustiquaires imprégnées abaisse la mortalité générale d'environ 20% en Afrique et réduit de 50% les épisodes de paludisme simple.

Les moustiquaires imprégnées présentent l'avantage d'offrir une très bonne protection pour un moindre coût, mais elles nécessitent un peu d'entretien pour la réimprégnation et la réparation des déchirures.

- Pulvérisation d'insecticides à l'intérieur des habitations :
La pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations est un moyen très efficace de réduire rapidement la transmission du paludisme (figure 1.19). Pour obtenir un résultat optimal, il faut pulvériser des insecticides dans 80% au moins des habitations dans les zones ciblées. Cette pulvérisation est efficace pendant 3 à 6 mois en fonction de la formulation de l'insecticide utilisé et du type de surface pulvérisée. À certains endroits, il faut pulvériser plusieurs fois les mêmes habitations pour protéger la population pendant



FIGURE 1.19 | Moyens de lutte contre le paludisme [WHO, 2016]. De gauche à droite : utilisation de moustiquaire imprégnée, utilisation d'insecticides et test de diagnostic rapide.

toute la saison de transmission du paludisme. Le DTT a été fortement utilisé, mais il est aujourd'hui interdit à cause de ses propriétés toxiques sur l'organisme.

La lutte ciblant les moustiques au stade adulte permet de diminuer la transmission. Les lieux de traitements sont faciles à identifier, ce sont essentiellement les maisons. La protection est ponctuelle, ce qui permet une mise en œuvre plus souple que dans le cas de lutte anti-larves. Néanmoins, des résistances aux insecticides ont émergé, notamment aux pyréthroïdes [Ojuka *et al.*, 2015].

- Remplacement des populations de vecteurs :

Il existe actuellement deux approches principales : la suppression de la population de vecteurs, avec la modification des *Anopheles* qui confère une stérilité à sa descendance ; et l'altération de la population, avec des moustiques modifiés pour que leur descendance soit réfractaire aux infections par *Plasmodium* [Burt, 2015].

Il est possible de libérer des mâles irradiés dont la descendance sera stérile, mais la dose d'irradiation nécessaire rend les moustiques moins compétitifs que les sauvages [Helinski *et al.*, 2009].

La bactérie *Wolbachia* est une bactérie intracellulaire commune chez les arthropodes et les nématodes. Elle est notamment responsable d'une forte réduction du nombre de descendants viables résultant du croisement d'un mâle infecté avec une femelle non infectée. Ce phénomène est appelé incompatibilité cytoplasmique unidirectionnelle et permet de diminuer la capacité de reproduction [Werren *et al.*, 2008].

La modification génétique notamment grâce au système CRISPR-Cas9 permet de réaliser un forçage génétique ("*gene drive*"). Le forçage génétique permet de transmettre un gène à 100% de sa descendance ce qui est contraire aux lois de Mendel. Ainsi l'utilisation d'une endonucléase coupant le gène non désiré et forçant la cellule à réparer les dommages causés en recopiant la séquence du gène porté par le chromosome de forçage permet de générer deux copies identiques du chromosome. Il est donc possible de rapidement augmenter la fréquence d'un gène désiré dans la population de moustiques [Windbichler *et al.*, 2011; Esvelt *et al.*, 2014]. Ce système a été utilisé pour réduire la taille de la population de moustiques [Hammond *et al.*, 2016] et pour réduire la transmission du paludisme par le moustique [Gantz *et al.*, 2015].

Prophylaxie

La maladie peut également être prévenue au moyen d'antipaludiques. Les voyageurs peuvent se protéger grâce à une chimioprophylaxie qui supprime le stade sanguin de l'infection palustre, ce qui évite que la maladie ne se déclare. Actuellement trois traitements sont utilisés en prévention : la prise quotidienne d'atovaquone-proguanil ou de doxycycline et la prise hebdomadaire de méfloquine. Cependant la méfloquine est responsable d'effets secondaires psychiatriques.

L'OMS recommande en outre le traitement préventif intermittent par la sulfadoxine-pyriméthamine pour les femmes enceintes vivant dans des zones où la transmission est modérée à forte, à chaque visite prénatale programmée après le premier trimestre. De même, pour les nourrissons vivants dans des zones de forte transmission d'Afrique, 3 doses de sulfadoxine-pyriméthamine en traitement préventif intermittent sont recommandées en même temps que les vaccinations systématiques.

1.5.2 Tests de diagnostic

La rapidité et la précision d'un diagnostic de paludisme, est une composante essentielle de la lutte antipaludique. Le diagnostic est indispensable pour la mise en route d'une prise en charge adaptée du patient et conditionne fortement le pronostic de la maladie [Roe et Pasvol, 2009].

Diagnostic par microscopie

Cette technique est la méthode de référence pour diagnostiquer le paludisme. Elle permet d'établir un diagnostic d'espèce et d'avancement de la maladie, tout en ne nécessitant qu'un microscope optique et des colorants d'un coût modéré. Cependant la qualité du résultat dépend beaucoup de l'expérience de la personne qui réalise cet examen. Le sang est collecté au bout du doigt lors d'un accès de fièvre, quand les parasites circulant sont nombreux. Il peut être utilisé pour deux types d'analyses :

- une goutte épaisse : une goutte de sang est déposée sur la lame et laissée sécher. La superposition de plusieurs couches permet d'analyser une large quantité d'érythrocytes.
- un frottis mince : une fine couche de sang est étalée et séchée. Il va en résulter une monocouche de cellules, ce qui permettra l'identification de l'espèce de *Plasmodium* si nécessaire.

Les frottis minces sont fixés grâce à un bain de méthanol. Ils sont ensuite colorés au Giemsa 10% pendant 20 minutes puis rincés à l'eau avant d'être observés au microscope optique au grossissement $\times 100$ (objectif à immersion). L'identification de l'espèce ou du stade se fait en se basant sur (figure 1.20) :

- la couleur du cytoplasme très basophile est bleu pour la majorité des stades, excepté le gamétocyte mâle qui est mauve ;
- la forme du parasite, un anneau dans le cas des trophozoïtes, puis une masse importe dans les schizontes et une forme ovale pour les gamétocytes ;
- le noyau de couleur grenat, peut être unique dans la majorité des cas ou multiple chez les schizontes ;
- les inclusions pigmentaires, hémozoïne, provenant du catabolisme de l'hémoglobine sont plus nombreuses dans les formes matures et les gamétocytes.

Cette technique a l'avantage d'être peu coûteuse, tout en ayant une très bonne sensibilité, jusqu'à 10 parasites par microlitre de sang. Elle permet également de déterminer la parasitémie et l'espèce de *Plasmodium*, ce qui est essentiel pour choisir un traitement adapté.

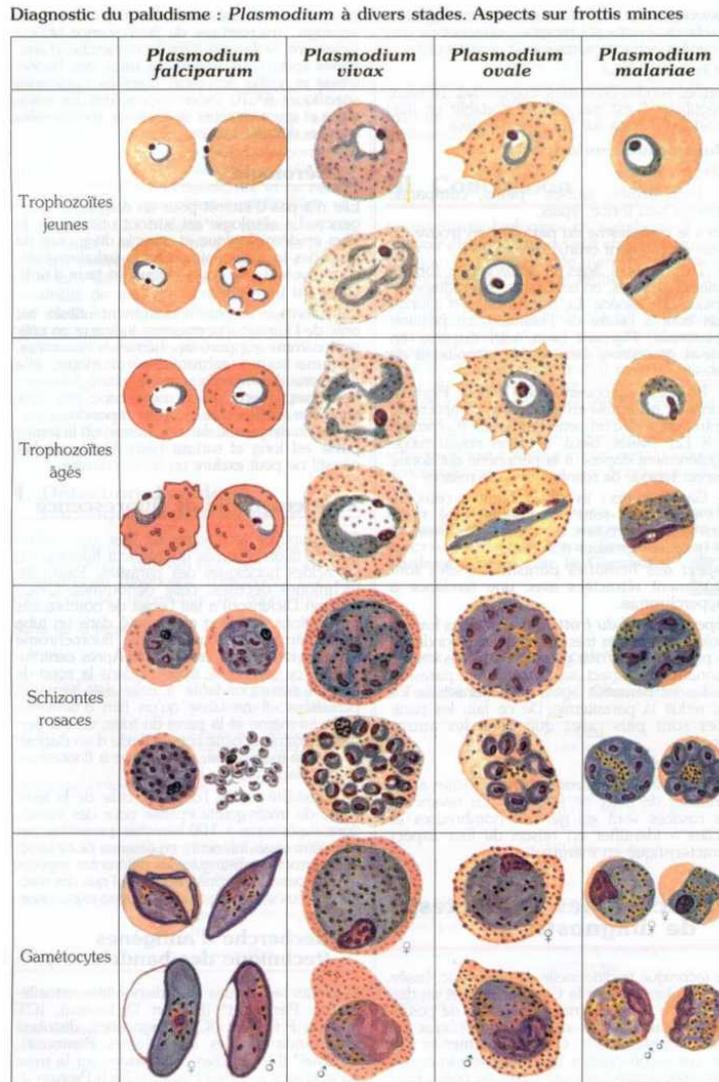


FIGURE 1.20 | Identification des différents stades et différentes espèces par microscopie [Deluol *et al.*, 1998].

Malgré ces avantages, la technique ne peut pas être utilisée dans tous les cas, car elle nécessite des installations électriques, des réactifs de bonne qualité, ainsi que du personnel expérimenté. De plus, le test dure au moins une heure entre le prélèvement sanguin et le résultat.

Test de diagnostic rapide (TDR)

Des tests de diagnostic rapide ont été développés afin de faciliter le diagnostic. Ils sont basés sur un principe d'immunochromatographie sur membrane. Ils détectent des antigènes spécifiques produits par *Plasmodium*. Une goutte de sang est prélevée et déposée à l'une des extrémités d'une membrane de nitrocellulose. L'échantillon va se retrouver dans un tampon qui permet à la fois la lyse des cellules et la migration des molécules libérées. Si l'antigène recherché est présent il va se lier aux anticorps. Les anticorps sont usuellement marqués à l'or colloïdal pour suivre leur migration. Les complexes antigènes-anticorps migrent par capillarité et sont arrêtés par des anticorps de capture fixés sur la membrane. Ces anticorps de captures sont spécifiques de l'espèce détectée. Leur fixation entraîne l'apparition d'une bande colorée. L'excès de complexe continue à migrer et est immobilisé en haut de la ligne de migration. En cas de réaction négative seule cette dernière bande est visible, elle constitue un contrôle de fonctionnement du test. Les bandes apparaissent au bout de 15 à 20 minutes.

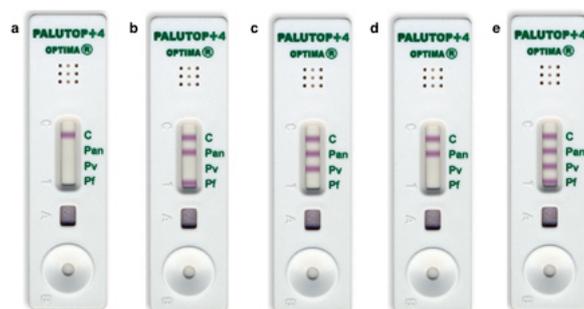


FIGURE 1.21 | Palutop +4 tests de détection rapide de paludisme. a) Contrôle, négatif pour les 4 espèces; b) Positif pour l'infection par *Plasmodium falciparum*; c) Positif pour l'infection par *Plasmodium vivax*; d) Positif pour les autres espèces; e) Infection mixte par *Plasmodium falciparum* *vivax* et potentiellement d'autres espèces.[...]

Il existe différents types de tests : des tests monospécifiques qui ne détecteront qu'une espèce *P. falciparum* ou *P. vivax* et des tests qui détectent des infections pouvant avoir pour origine plusieurs espèces. Les tests monospécifiques utilisent généralement des anticorps monoclonaux ciblant soit l'Histidine Rich Protein 2 (HRP2), soit la Lactate Déshydrogénase (LDH). Les tests à détection d'infections multiples ciblent usuellement la Lactate Déshydrogénase. L'enzyme Lactate Déshydrogénase n'est présente que chez les parasites vivants, son utilisation permet donc un suivi de la parasitémie.

La sensibilité de ces tests est comparable à celle du test par microscopie. Ce test a en plus l'avantage d'être rapide, réalisable par du personnel non qualifié et il ne nécessite que peu de matériel. Il est donc facile à mettre en place dans des zones reculées ayant un accès limité à des laboratoires. Cependant son coût et ses exigences de stockage sont un obstacle à son développement.

Diagnostic de biologie moléculaire

L'utilisation de Réaction en Chaîne par polymérase (PCR), permet de détecter différentes séquences d'acides nucléiques de *Plasmodium*. Les différentes espèces peuvent ainsi être identifiées. Bien que cette technique soit la plus sensible, détection entre un et cinq parasites par μL de sang, elle ne peut pas être utilisée en routine pour des diagnostics d'urgence car elle est très coûteuse, elle nécessite un équipement et des compétences particulières et le résultat n'est pas disponible rapidement. Cette technique est utilisée généralement pour confirmer un diagnostic d'espèce, après un premier test par microscopie ou par TDR ou dans le cas d'études de mutations et de gènes impliqués dans les résistances.

Test de sérologie

La détection de la sérologie n'a pas d'intérêt pour un diagnostic d'urgence, mais est utilisée notamment dans le cas d'études épidémiologiques, car elle ne détecte pas les infections en cours mais plutôt les infections auxquelles a été exposé le patient. Les anticorps peuvent être détectés soit par immunofluorescence indirecte (IFA), soit par méthode immuno-enzymatique (ELISA *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

1.5.3 Traitements médicamenteux

Les premiers traitements antipaludiques sont apparus vers 2 000 av. J-C. Nous avons aujourd'hui à notre disposition plusieurs molécules pour nous aider à lutter contre *Plasmodium*. Il est important de rappeler que le médicament parfait n'existe pas et qu'il faut prendre en compte le bénéfice/risque apporté par chacun d'eux. Chaque molécule possède ses limites (figure 1.22). Ainsi, un traitement prophylactique sur une courte période par exemple à la doxycycline sera bénéfique, mais sur une longue période la

toxicité engendrée pour le foie et la photosensibilité en résultant feront courir plus de risques que le bénéfice qu'en retirera l'individu.

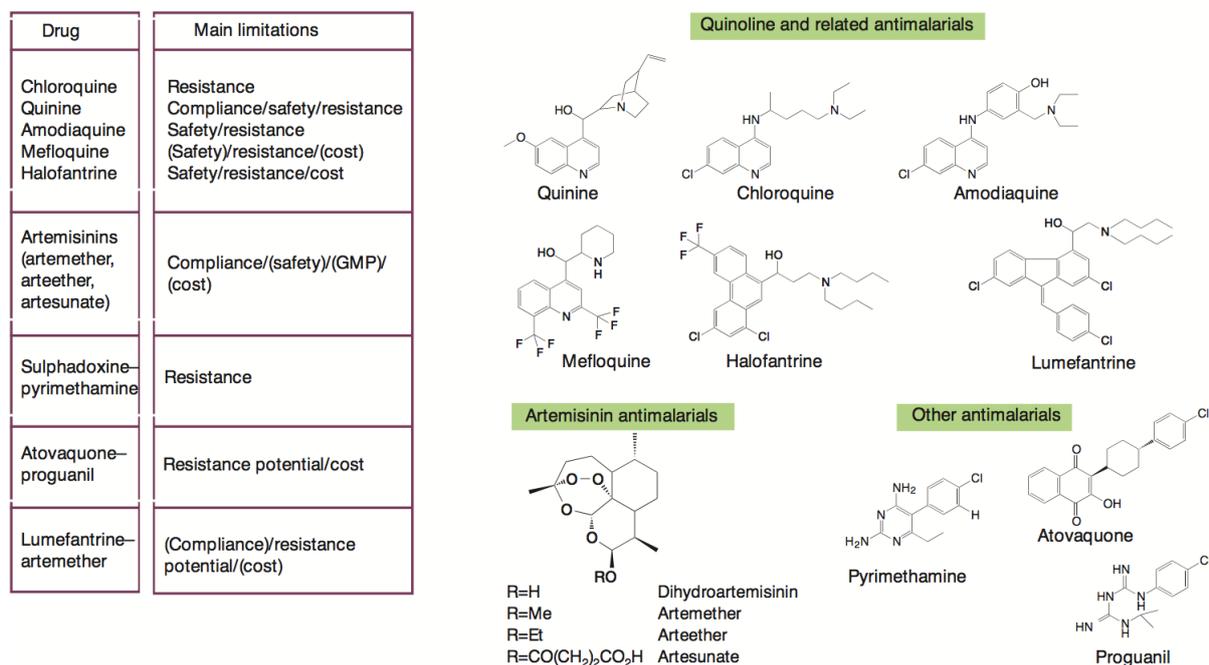


FIGURE 1.22 | Traitements antipaludiques actuellement sur le marché [Phillips *et al.*, 2017]. Représentation des molécules actives classées par grandes familles. Les limites de chaque médicament sont rapportées dans l'encart, les moins importantes sont indiquées entre parenthèses.

Antipaludiques de type quinoléine

Les antipaludiques de base quinoléine sont des hétérocycles aromatiques organiques appartenant à la famille des amino-4-quinoléines.

Pour se développer dans les globules rouges, *Plasmodium* utilise l'énergie et les métabolites que lui fournit la dégradation de l'hémoglobine. Mais cette digestion libère les hèmes ferreux qui sont toxiques. Le parasite les évacue en les couplant entre eux pour former une molécule d'hémozoïne qui est chassée dans la vacuole digestive. Les hémozoïnes circulent dans l'organisme et finissent par atteindre l'hypothalamus dont elle perturbe le fonctionnement. Les hémozoïnes sont également responsables de fortes fièvres.

Quinine : La quinine est extraite d'un arbuste originaire d'Amérique du Sud : le quinquina. C'est un alcaloïde dont l'action cible les formes intra-érythrocytaires du parasite.

La quinine est un antipaludique efficace, mais ayant des effets secondaires non négligeables : céphalées, bourdonnements, trouble de la vision, diminution du nombre de plaquettes et des irrégularités du rythme cardiaque. La toxicité de la quinine fait qu'il lui est désormais préféré des analogues tels que la chloroquine ou la méfloquine.

Chloroquine : La chloroquine est un antipaludique de synthèse dérivé de la quinine. Elle exerce une action schizontocide sur les formes érythrocytaires.

La chloroquine agit en entrant par diffusion dans la vacuole digestive de *Plasmodium*, où le pH de 4.7 lui fait adopter une forme protonée qui ne peut plus quitter la vacuole. Elle s'associe aux hèmes pour former un complexe qui est hautement toxique et qui aboutit à la destruction du parasite.

Méfloquine : La méfloquine est un aromatique de synthèse. Son action cible les schizontes érythrocytaires.

Amodiaquine : L'amodiaquine est un antipaludique de synthèse apparenté à la chloroquine mais dont la demi-vie plasmatique est plus longue.

Lumefantrine : La lumefantrine est obtenue par synthèse. Elle est toujours utilisée en association avec l'artéméther dans un ration artéméther/luméfántrine de 1:6.

Halofantrine : L'halofantrine est un composé de synthèse utilisé notamment contre des parasites résistants à la chloroquine.

Artémisinine et ses dérivés

L'artémisinine est isolée à partir de l'armoise, une herbe médicamenteuse chinoise. Cette molécule est utilisée pour traiter à la fois le paludisme simple et le paludisme grave, mais n'est pas utilisée comme prophylaxie du fait de son temps de vie trop faible. Elle est la base des médicaments antipaludiques les plus récents et actuellement les plus efficaces : les ACT (thérapies combinées à l'artémisinine). La biodisponibilité de l'artémisinine est faible, c'est pourquoi il lui est généralement préféré ses dérivés semi-synthétiques qui conservent la liaison peroxyde importante pour l'activité médicamenteuse : dihydroartémisinine, artésunate, artéether et artéméther (figure 1.22). L'artémisinine et ses dérivés causent peu d'effets secondaires, c'est pourquoi leur utilisation est appréciée.

Le mécanisme d'action de l'artémisinine n'a pas été élucidé pour le moment. Il est probable que sa liaison peroxyde réagisse avec l'hème et l'oxyde de fer pour former des radicaux. Ces radicaux libres altéreraient le système membranaire du parasite. Ils seraient notamment impliqués dans : l'interférence avec le transport des électrons mitochondriaux et l'interférence avec les protéines de transport du parasite.

Artémisinine : L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique possédant un groupe peroxyde qui semble être la clé de son efficacité. L'artémisinine est moins efficace que ses composés dérivés.

Arténimol : La dihydroartémisinine ou arténimol est le métabolite secondaire de tous les dérivés semi-synthétiques de l'artémisinine mais pas de l'artémisinine. C'est un métabolite secondaire actif.

Artésunate : L'artésunate est hydrosoluble ce qui permet son injection par voie intramusculaire ou intraveineuse. Il est utilisé comme première ligne de traitement en cas de paludisme sévère.

Artéether : L'artéether est un dérivé semi-synthétique de l'artémisinine.

Artéméther : L'artéméther est liposoluble et peut être injecté en intramusculaire.

Antifolates

Les antifolates ne sont pas des dérivés de plantes, mais ont été synthétisés à partir des connaissances de biologie et chimie. Ils ciblent le métabolisme de la vitamine B9 également appelée acide folique qui est impliquée dans la synthèse des bases nucléiques de type purines et la thymidine. Son action se répercute donc sur la synthèse d'ADN.

Pyriméthamine : La pyriméthamine est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR).

Sulphadoxine : La sulphadoxine est un sulphonamide qui interfère avec l'action de la dihydroptéroate syntase (DHPS).

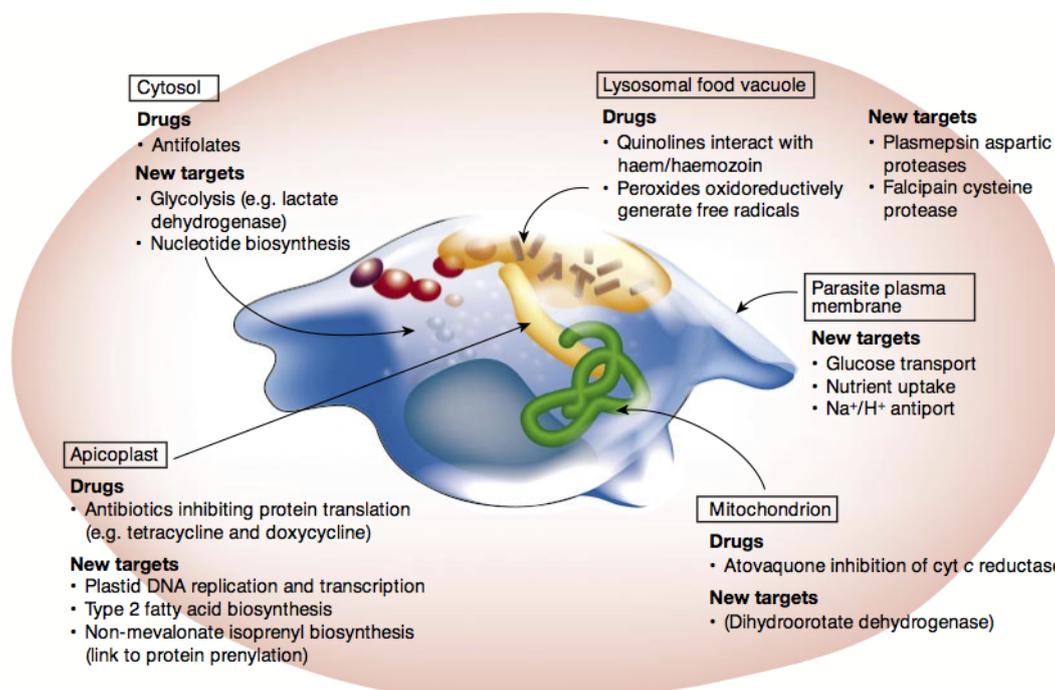


FIGURE 1.23 | Actions des antipaludiques au niveau d'un trophozoïte intra-érythrocytaire [Ridley, 2002]. Les organites impliqués sont mis en évidence ainsi que les médicaments déjà sur le marché ou en développement.

Atovaquone/Proguanil

Les molécules d'atovaquone et de proguanil sont toujours administrées ensemble. En effet la résistance à l'atovaquone est rapide à apparaître due à une mutation dans la réductase du cytochrome c, l'association avec le proguanil permet de limiter le développement de cette résistance. De nos jours ces molécules sont essentiellement utilisées en traitement prophylactique sous la dénomination *Malarone*.

Atovaquone : L'atovaquone interfère avec les transporteurs d'électrons mitochondriaux. Elle cible spécifiquement le complexe du cytochrome bc₁.

Proguanil : Le proguanil produit un métabolite actif le cycloguanil qui fonctionne comme inhibiteur de la dihydrofolate réductase et agit ainsi sur la synthèse des purines et de la thymidine.

Antibiotiques

Les antibiotiques utilisés pour stopper le développement de *Plasmodium* sont des molécules inhibant la traduction chez les procaryotes. Il est donc supposé que son action ait lieu au niveau de la traduction des protéines dans l'apicoplaste.

Tétracycline : La tétracycline est un antibiotique bactériostatique produit par une bactérie du genre *Streptomyces*. Elle appartient à la famille des cyclines qui est caractérisée par la présence de 4 cycles accolés.

Doxycycline : La doxycycline appartient à la famille des cyclines. Elle a été synthétisée au début des années 1960 à partir de la tétracycline. Elle peut cependant provoquer une toxicité hépatique ainsi qu'une photosensibilité et ne peut donc pas être prise sur une trop longue période.

Clindamycine : La clindamycine fait partie de la famille des lincosamides. C'est un dérivé semi-synthétique de la lincomycine. Elle peut provoquer des effets secondaires dont des crampes, une photosensibilité, des maux d'estomac et des nausées.

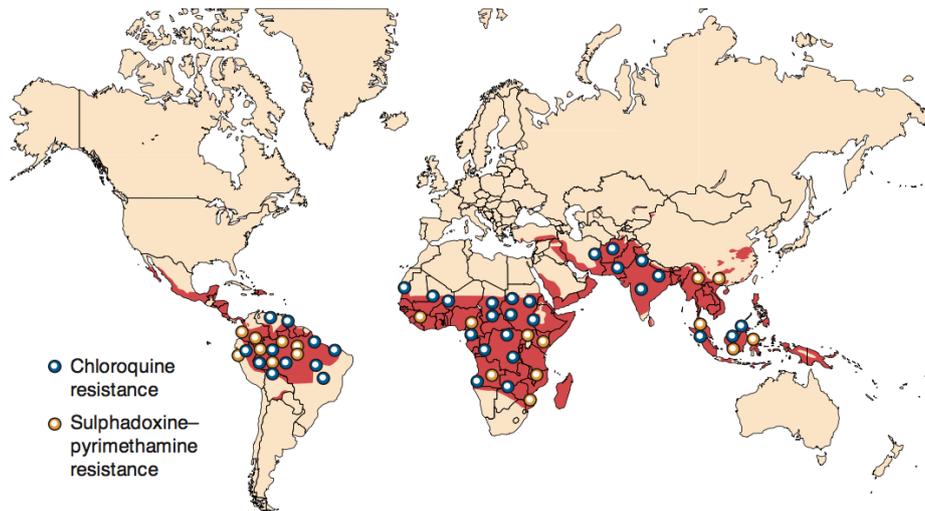


FIGURE 1.24 | Répartition mondiale de la résistance à la chloroquine et à la sulphadoxine/pyriméthamine [Ridley, 2002]. Les données proviennent de l'OMS.

Bien que nous ayons à notre disposition un certain nombre de molécules prêtes à éliminer *Plasmodium*, le parasite évolue et développe des résistances qui se répandent dans le monde (figure 1.24). Ainsi l'utilisation de la chloroquine seule ou de l'association sulphadoxine/pyriméthamine ne sont plus efficaces aujourd'hui pour lutter contre le paludisme.

1.5.4 Lents progrès vers une protection vaccinale efficace

Il n'existe actuellement aucun vaccin homologué contre le paludisme ou aucun autre parasite de l'homme. Malgré les importants efforts développés depuis environ 70 ans, seul le vaccin RTS,S est en phase clinique terminale bien qu'il n'offre qu'une faible protection. La production d'un vaccin pouvant remplacer les outils de contrôle du paludisme semble peu probable à court terme, car cela supposerait une immunité complète difficile à obtenir. Cependant ce vaccin serait une partie intégrée aux moyens de lutte déjà accessibles et qui ont fait leurs preuves ces dix dernières années.

Il existe quatre cibles principales que peut avoir un vaccin contre le paludisme. La première cible est le sporozoïte. En ciblant le sporozoïte et ainsi en bloquant l'invasion des hépatocytes on cible une population de parasites peu nombreuse (figure 1.11) et un stade asymptomatique. Il est également possible de cibler les hépatocytes infectés qui présentent les mêmes avantages que les sporozoïtes. Le stade sanguin peut quant à lui être ciblé au niveau des formes asexuées qui sont plus nombreuses ou au niveau des formes sexuées ce qui permettrait de limiter la transmission du parasite au moustique et ainsi à de nouveaux individus. Il existe également différentes formes possibles de vaccins : des vaccins à base de parasites entiers atténués ou inactivés et des vaccins sous-unitaires qui permettent la présentation de certains antigènes spécifiques (figure 1.25).

Vaccins sous-unitaires

Stade hépatique

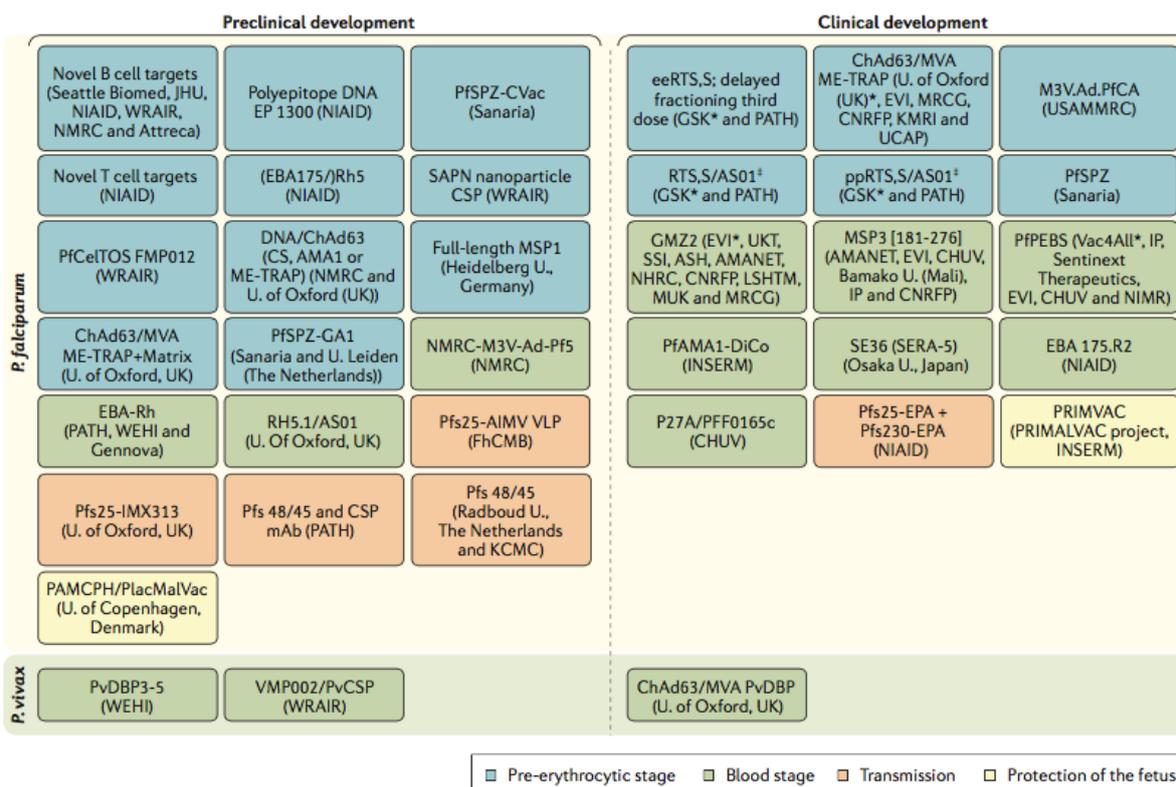


FIGURE 1.25 | Les principaux vaccins en développement en 2017 [Phillips *et al.*, 2017]. AIMV VLP : *Alfalfa mosaic virus virus-like particle*; AMA₁ : *apical membrane antigen*; AMANET : *African Malaria Network Trust*; ASH : *Albert Schweitzer Hospital* (Gabon); ChAd63 : *chimpanzee adenovirus 63*; CHUV : *Centre hospitalier universitaire vaudois* (Suisse); CNRFP : *Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme* (Burkina Faso); CS ou CSP : *circumsporozoite protein*; EBA : *erythrocyte-binding antigen*; ee : *élimination éradication*; EP : *électroporation*; EPA : *Pseudomonas aeruginosa exoprotein A*; EVI : *European Vaccine Initiative*; CVac : *chemoprophylaxis vaccine*; FhCMB : *Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology* (USA); GSK : *GlaxoSmithKline*; IP : *Institut Pasteur* (France); INSERM : *Institut national de la santé et de la recherche médicale* (France); JHU : *Johns Hopkins University* (USA); KCMC : *Kilimanjaro Christian Medical College* (Tanzanie); KMRI : *Kenyan Medical Research Institute*; LSHTM : *London School of Hygiene and Tropical Medicine* (UK); M₃V.Ad.PfCA : *multi-antigen, multistage, adenovirus-vectored vaccine expressing Plasmodium falciparum CSP and AMA₁ antigens*, mAb : *anticorps monoclonal*; ME-TRAP : *multiple epitope thrombospondin-related adhesion protein*; MRCC : *Medical Research Council* (Gambie); MSP : *merozoite surface protein*; MVA : *modified vaccinia virus Ankara*; MUK : *Makerere University Kampala* (Uganda); NHRC : *Navrongo Health Research Centre* (Ghana); NIAID : *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (USA); NIMR : *National Institute for Medical Research* (UK); NMRC : *Naval Medical Research Center* (USA); PAMCPH : *pregnancy-associated malaria Copenhagen*; PATH : *Program for Appropriate Technology in Health*; PfAMA₁-DiCo : *diversity-covering Plasmodium falciparum AMA₁*; PfCelTOS : *Plasmodium falciparum cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites*; PfPEBS : *Plasmodium falciparum pre-erythrocytic and blood stage*; PfSPZ : *Plasmodium falciparum sporozoite*; PfSPZ-GA₁ : *genetically attenuated PfSPZ*; pp : *prévention pédiatrique*; PRIMALVAC : *projet PRIMVAC* (INSERM); PRIMVAC, protéine recombinante var2CSA comme candidat vaccinal pour le paludisme placentaire; Pfs25 : *Plasmodium falciparum 25 kDa ookinete surface antigen*; PvCSP : *Plasmodium vivax circumsporozoite protein*; PvDBP : *Plasmodium vivax Duffy-binding protein*; RhorRH : *reticulocyte-binding protein homologue*; SAPN : *self-assembling protein nanoparticle*; SSI : *Statens Serum Institut* (Danemark); UCAP : *Université Cheikh Anta Diop* (Sénégal); UKT : *Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen* (Allemagne); USAMMRC : *US Army Medical Research and Materiel Command*; WEHI : *Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research* (Australie); WRAIR : *Walter Reed Army Institute of Research* (USA).

- Le RTS,S/AS01 est le vaccin expérimental le plus avancé. Il cible la partie C-terminale, des acides aminés 207 à 395, de la protéine CSP (*circumsporozoite protein* voir section 2.3.1) de *Plasmodium falciparum*. Le vaccin est produit en système de levure avec une coproduction à la fois de la partie RTS qui est une protéine chimérique de la CSP (région RT) et d'une protéine de surface du virus de l'hépatite B (région S) avec la protéine de surface S seule. Leur co-expression permet d'obtenir un assemblage spontané en particule pseudo-virale (VLP *virus-like particles*) [Cohen *et al.*, 2010].

Ce vaccin a été évalué dans le cadre d'un vaste essai clinique dans 7 pays d'Afrique et l'Agence

européenne des médicaments a donné un avis favorable en juillet 2015. En octobre 2015, deux groupes consultatifs de l'OMS ont recommandé la poursuite de l'évaluation avec la mise en œuvre de projets pilotes du vaccin RTS,S/ASo1 dans un nombre limité de pays africains. L'OMS a adopté cette recommandation et soutient sans réserve la nécessité de mettre en œuvre ces projets pilotes, vers l'avènement du premier vaccin antipaludique dans le monde. En novembre 2016, l'OMS a annoncé que le vaccin RTS,S sera déployé dans le cadre de projets pilotes dans trois pays d'Afrique subsaharienne. Le financement de la phase initiale du programme est désormais assuré et les vaccinations doivent commencer en 2018. Ces projets pilotes pourraient ouvrir la voie à un déploiement plus large du vaccin si son innocuité et son efficacité sont jugées acceptables.

- Le vaccin ME-TRAP (*multiple epitope thrombospondin-related adhesion protein*) est composé de particules virales exprimant des épitopes de TRAP. La primo-vaccination se fait avec l'adénovirus de chimpanzé 63 (ChAd63) puis le rappel se fait avec un vaccin modifié du virus Ankara (MVA). Une récente étude menée au Sénégal sur 115 participants ne montre pas d'efficacité pour ce vaccin [Mensah *et al.*, 2016].

Stade sanguin

- Le vaccin GMZ2 cible le stade sanguin. C'est une protéine recombinante qui correspond à la fusion de deux antigènes de *Plasmodium falciparum*, GLURP (*Glutamate-Rich Protein*) et MSP3 (*Merozoite surface protein 3*) [Theisen *et al.*, 2004]. La vaccin GMZ2 est associé à un adjuvant de type hydroxyde d'aluminium. Malheureusement, bien qu'il soit bien toléré, il n'offre qu'une faible protection lors des études cliniques de phase II [Sirima *et al.*, 2016].

Transmission

- L'antigène P25 est étudié afin d'en faire un vaccin bloquant la transmission du paludisme. Le vaccin en développement est composé de la protéine P25 de *Plasmodium falciparum* conjuguée à l'exoprotéine A de *Pseudomonas aeruginosa* (EPA) dans un adjuvant alhydrogel contenant de l'aluminium [Shimp *et al.*, 2013]. Les tests pré-cliniques ont été effectués et les essais vont pouvoir commencer [Zhu *et al.*, 2017].

Paludisme gestationnel

- L'antigène VAR2CSA, un variant de PfEMP1 (voir section 1.4.4), est étudié pour protéger les femmes enceintes. Bien que ce soit une très grande protéine d'environ 350 kDa, il a été montré que le domaine N-terminal, incluant trois domaines DBL (*Duffy binding like*) est suffisant pour lier la CSA au niveau placentaire [Srivastava *et al.*, 2011; Fried et Duffy, 2015].

Vaccins de parasites entiers atténués

Les premiers vaccins à base de parasites atténués ont vu le jour dès 1942. Ils étaient testés sur de la volaille [Russell et Mohan, 1942]. Quelques années plus tard ce modèle d'immunisation grâce à des sporozoïtes inactivés par irradiation a été confirmé chez les souris [Nussenzweig *et al.*, 1967].

- L'utilisation de sporozoïtes atténués par irradiation γ (RAS *radiation-attenuated sporozoites*) offre l'avantage de présenter en même temps plusieurs protéines de *Plasmodium*. Néanmoins des études sur l'homme ont abouti à une protection uniquement dans le cas d'injection de fortes doses de parasites en intraveineuse [Hoffman *et al.*, 2002]. De plus, le développement d'un tel vaccin n'est pas sans poser de problèmes. Il faut dans un premier temps arriver à produire une grande quantité

de sporozoïtes ce qui implique de disséquer un nombre très important de moustiques. Il faut ensuite optimiser un processus de purification de ces sporozoïtes à grande échelle et vérifier qu'ils sont bien inoffensifs. Il faut également assurer la conservation de ces parasites vivants jusqu'à leur injection. Enfin le dernier problème concerne leur injection, car pour une bonne protection les parasites doivent être injectés en intraveineuse [Seder *et al.*, 2013].

- Il est également possible d'inactiver un parasite en délétant des gènes essentiels. Ainsi il a été montré dans un modèle de paludisme murin que les parasites délétés pour la protéine UIS3 (*upregulated in infective sporozoites gene 3*) permettent d'immuniser efficacement les souris [Mueller *et al.*, 2005b]. Aujourd'hui le vaccin le plus avancé à ce sujet est le vaccin GAP3KO qui est un parasite *Plasmodium falciparum* délété pour les gènes P52, P36 et SAP1. Ce vaccin a fait ses preuves chez les rongeurs où il offre une protection complète. Il a également été testé chez 10 volontaires, qui ont été exposés à des moustiques infectés par le parasite GAP3KO (150–200 piqûres). Ceux-ci n'ont pas développé de stade sanguin et ont produit des anticorps anti-sporozoïtes [Kublin *et al.*, 2017].
- Il est également possible d'obtenir une immunisation en copiant les phénomènes qui sont mis en place dans la nature, c'est à dire en infectant les individus puis en les traitant. Des souris infectées par des sporozoïtes puis traitées à la chloroquine pour supprimer les parasites au stade sanguin ont permis d'observer une immunité grâce aux cellules T régulatrices CD4 et CD8 [Belnoue *et al.*, 2004]. Une étude a donc été faite chez l'homme chez qui le protocole a permis d'immuniser quatre des six individus testés [Roestenberg *et al.*, 2011].

Bien d'autres vaccins candidats sont également en phases clinique et pré-clinique (figure 1.25).

2

SPOROZOÏTES ET INVASION HÉPATIQUE

La phase pré-érythrocytaire a été identifiée au début du XX^e siècle, chez un parasite infectant les oiseaux *Plasmodium relictum* [Raffaele, 1936] puis chez les parasites infectant les mammifères *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium vivax* [Shortt et Garnham, 1948] et *Plasmodium falciparum* [Shortt *et al.*, 1951].

Chez les mammifères, l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium* constitue une étape obligatoire dans le cycle de développement du parasite. Cette phase est silencieuse, et permet la libération de milliers de mérozoïtes qui seront responsables de la phase symptomatique de la maladie.

2.1 Biologie du sporozoïte

Plasmodium est injecté sous la forme de sporozoïtes chez l'hôte mammifère. Le sporozoïte mesure entre 10 et 14 μm de long et 0.5 à 1 μm de large. Il a une forme de croissant qui pourrait résulter de la répartition inégale des microtubules attachés au complexe membranaire interne (IMC) [Sinden et Garnham, 1973].

Le sporozoïte est une cellule polarisée. Son pôle antérieur appelé complexe apical contient les organites sécrétoires qui sont les rhoptries et les micronèmes. Ces derniers stockent et sécrètent leur contenu via le pôle antérieur du parasite.

Le matériel génétique des plasmodies est réparti entre l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial et l'ADN contenu dans l'apicoplaste. Le génome est haploïde hormis chez le moustique où il est diploïde après la fécondation jusque chez l'oocyste.

2.1.1 Des organites variés assurant le métabolisme et l'invasion

Plusieurs organites sont présents chez le sporozoïte. Ils remplissent des fonctions variées telles que le fonctionnement de la machinerie cellulaire où sont impliqués le noyau, le réticulum endoplasmique et le Golgi, le métabolisme avec les mitochondries et l'apicoplaste, et l'invasion grâce aux rhoptries et aux micronèmes.

Noyau

Le noyau, de forme ovale, est situé au centre du sporozoïte. Il est composé de 14 chromosomes. La taille des chromosomes de *Plasmodium falciparum* varie de 0,64 à 2,29 mégabases. Son génome est parmi les plus riches en adénines et thymine qui représentent 80% de la composition totale et 90% des introns et régions intergéniques. Au total environ 5 300 gènes codant des protéines ont été identifiés, et 54% d'entre eux possèdent des introns [Gardner *et al.*, 2002].

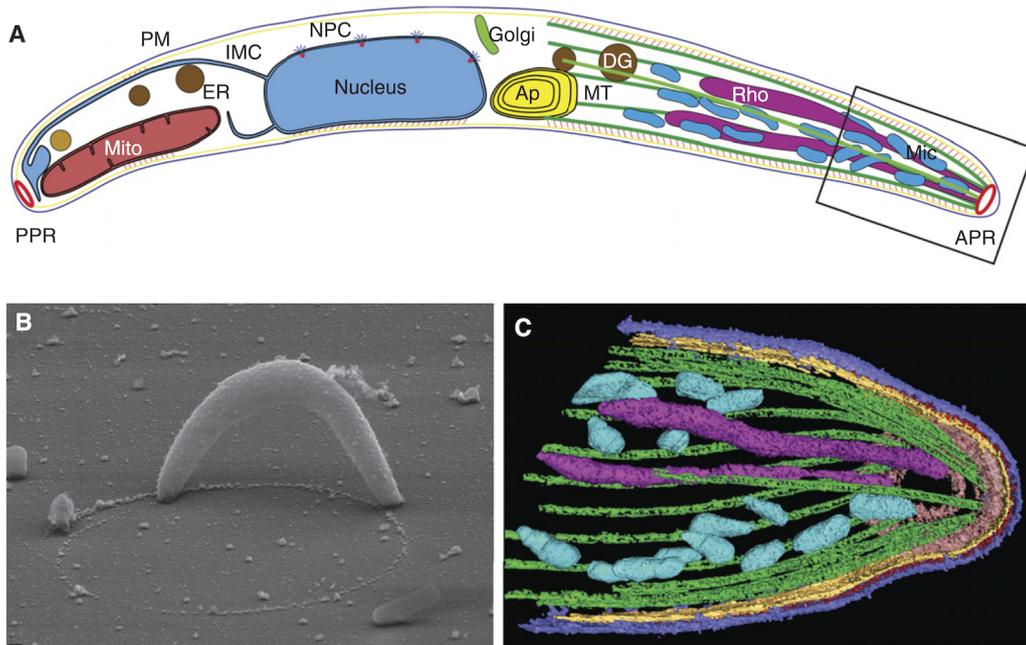


FIGURE 2.1 | Biologie du sporozoïte [Frischknecht et Matuschewski, 2017]. **A.** Schéma représentant la forme et les structures intracellulaires du sporozoïte. PPR : anneau polaire proximal; Mito : mitochondrie; PM : membrane plasmique; ER : réticulum endoplasmique; IMC : complexe membranaire interne; NPC : complexe poreux nucléaire; Ap : apicoplaste; MT : microtubules; DG : granules denses; Rho : rhoptries; Mic : micronèmes; APR : anneau polaire apical. **B.** Sporozoïte de *Plasmodium berghei* observé par microscopie électronique. **C.** Tomographie de la région apicale du sporozoïte. Bleu : membrane plasmique; jaune : complexe membranaire interne; vert : microtubules; magenta : rhoptries; cyan : micronèmes.

Apicoplaste

L'apicoplaste est un plaste, entouré de deux doubles membranes [McFadden *et al.*, 1996; Köhler *et al.*, 1997]. Ce vestige de chloroplaste d'une ancienne algue microscopique symbiote est devenu incapable de photosynthèse (figure 2.2). Il contient un ADN circulaire de 35kb chez *Plasmodium falciparum*. Ce chromosome circulaire ne code que pour une trentaine de protéines, mais il y a environ 500 protéines encodées dans le noyau qui seraient adressées à l'apicoplaste [Zuegge *et al.*, 2001]. L'apicoplaste n'est pas chlorophyllien et la machinerie photosynthétique a été perdue au cours de l'évolution. Cependant il joue un rôle dans différents métabolismes essentiels au parasite (figure 2.2) :

- métabolisme des acides gras : l'apicoplaste possède plusieurs enzymes impliquées dans le complexe de biosynthèse des acide gras de type II. Ces protéines (ACP : *acyl carrier protein*; FabH : β -*ketoacyl-ACP synthase III* ; FabZ : β -*hydroxyacyl-ACP dehydratase*) sont des enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras chez les bactéries et les chloroplastes [Waller *et al.*, 1998] ;
- métabolisme des lipides isoprénoides : l'apicoplaste est capable de synthétiser le DOXP (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate) un précurseur essentiel des isoprénoides. Il utilise une voie métabolique connue chez les plastes et les bactéries [Jomaa *et al.*, 1999] ;
- synthèse de cluster Fer/Souffre : les groupements Fer+Souffre sont essentiels chez certaines protéines telles que les ferrédoxines, la NADH déshydrogénase et les hydrogénases qui jouent un rôle dans les réaction d'oxydoréduction du métabolisme cellulaire [Ellis *et al.*, 2001].
- synthèse d'hèmes : le génome de *Plasmodium* encode toutes les enzymes nécessaires à la voie de synthèse d'hèmes à partir de glycine et de succinyl-CoA. Ces enzymes sont réparties entre le cytoplasme, la mitochondrie et l'apicoplaste. L'apicoplaste possède 4 enzymes : la δ -*aminolevulinic*

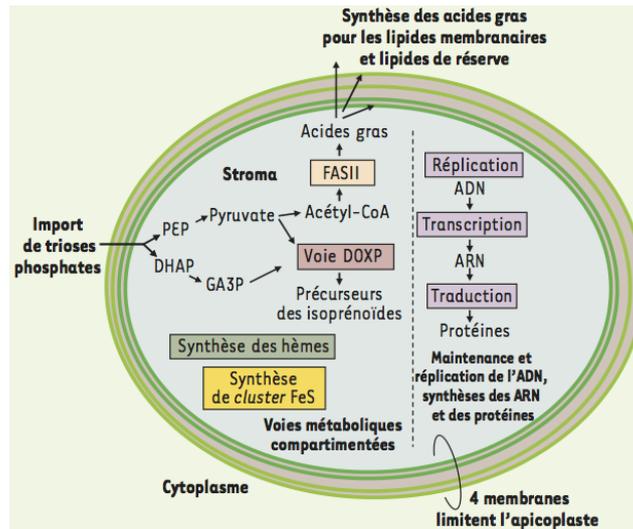


FIGURE 2.2 | Fonctions biologiques de l'apicoplaste [Biot *et al.*, 2012]. FASII : acide gras synthase de type II; DOXP : 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate; FeS : synthèse de clusters fer/souffre; PEP : phosphoénol-pyruvate; DHAP : dihydroxy-actéone-phosphate; GA3P : glycéraldéhyde-3-phosphate.

acid dehydratase (ALAD) [Dhanasekaran *et al.*, 2003], *porphobilinogen deaminase* (PBGD) [Nagaraj *et al.*, 2008], *uroporphyrinogen III synthase* (UROS) [Nagaraj *et al.*, 2008] et *uroporphyrinogen III decarboxylase* (UROD) [Nagaraj *et al.*, 2009].

Rhoptries

Les sporozoïtes de *Plasmodium* possèdent deux rhoptries. Ce sont des organites en forme de poire. Ils mesurent plus de 1 µm de long sur 300 nm pour la partie la plus large. Les rhoptries sont composées de deux parties : le canal qui contient les protéines impliquées dans la formation de la jonction mobile (telles que les RONs *Rhoptry Neck Protein*) et le bulbe qui renferme les protéines et les phospholipides utiles à la mise en place de la vacuole parasitophore. Après avoir libéré leur contenu, les rhoptries se collapsent et changent ainsi de forme. La formation des rhoptries n'est pas complètement élucidée, mais il semblerait qu'elles se forment suite à la fusion de vésicules dérivées de l'appareil de Golgi chez le mérozoïte [Bannister *et al.*, 2000].

Micronèmes

Les micronèmes sont de petites vésicules allongées mesurant 120 sur 40 nm. Elles sont localisées de façon diffuse au pôle apical. Les protéines contenues dans les micronèmes sont impliquées dans la motilité (comme par exemple TRAP la *thrombospondon-related anonymous protein*), la migration du parasite, la reconnaissance et l'adhésion à la cellule hôte (comme par exemple AMA1 *apical membrane antigen 1* et MAEBL *membrane antigen erythrocyte binding like protein*). Les micronèmes sont transloqués via les microtubules d'une citerne du Golgi proche du noyau vers le pôle antérieur du parasite [Bannister *et al.*, 2003].

Granules denses

Les granules denses sont des vésicules de taille similaire aux micronèmes mais de forme arrondie contrairement à ces dernières. Ils sont principalement situés du côté non-apical du parasite. La libération de leurs protéines se fait alors sur le côté du parasite une fois dans la vacuole. Ils seraient impliqués dans la maturation de la vacuole parasitophore où se multiplie le parasite.

Glideosome

Le parasite possède une machinerie lui permettant d'être motile. Cette machinerie est composée du cytosquelette, du complexe membranaire interne (IMC) et d'un moteur d'actine et de myosine (voir section 2.1.2).

D'autres organites non spécifiques à *Plasmodium* sont également présents : mitochondrie, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique et ses ribosomes. De plus il est à noter que le cytoplasme ne contient pas de pigments.

2.1.2 Un moteur d'actine/myosine assure une motilité de glissement chez les sporozoïtes

Le sporozoïte est un parasite motile, mais au contraire de nombreux pathogènes, il ne possède ni cil, ni flagelle pour lui permettre de se déplacer. Il est incapable de nager dans un milieu liquide, mais est doté d'un mouvement de glissement appelé *gliding motility* lorsqu'il est sur une surface solide telle que la surface cellulaire. Ce phénomène est caractérisé par une absence de modification de la forme du parasite. C'est un mouvement rapide pouvant aller jusqu'à $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. La motilité est impliquée dans les phénomènes d'invasion [Ménard, 2001].

La motilité est permise par les interactions entre les adhésines de surface et le cytosquelette parasitaire grâce à un moteur d'actine et de myosine localisé entre la membrane plasmique et le complexe membranaire interne du sporozoïte [King, 1988; Ménard, 2001]. La translocation des protéines d'adhésion du pôle antérieur vers le pôle postérieur permet ce mouvement de glissement [King, 1988]. La motilité des *Apicomplexa* a été essentiellement étudiée chez *Toxoplasma*.

Les myosines convertissent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique. Elles sont composées d'une tête portant le site de liaison à l'actine, d'un cou contenant un motif impliqué dans l'interaction avec des chaînes légères modulant la myosine et une courte région en C-terminale. La myosine mise en jeu chez les *Apicomplexa* est MyoA. Elle appartient à la classe XIV des myosines, un groupe peu commun de petites protéines dont les domaines de régulations sont dégénérés et qui possèdent une petite tête [Heintzelman et Schwartzman, 1997; Meissner *et al.*, 2002].

Pour permettre l'ancrage du moteur aux membranes du complexe interne, les protéines GAPs (*Gliding Associated Proteins*) sont mises en jeu [Gaskins *et al.*, 2004]. Ainsi chez *Toxoplasma*, les protéines GAP50, GAP40 et GAPM font le lien entre la myosine A et le complexe membranaire interne (figure 2.3) [Gaskins *et al.*, 2004; Bullen *et al.*, 2009].

La myosine étant ancrée, les filaments d'actine interagissent avec les protéines parasitaire de surface. Elle interagirait avec un tétramère d'aldolases relié à la région C-terminale de TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*) chez *Plasmodium* voir (section 2.3.1) et MIC2 (*Microneme protein 2*) chez *Toxoplasma* [Buscaglia *et al.*, 2003], mais ce modèle est remis en cause. Le moteur moléculaire tire TRAP vers l'arrière. TRAP étant ancrée fixement dans la membrane plasmique, cela aboutit à un mouvement du parasite vers l'avant.

Cependant le rôle de l'aldolase comme connecteur est actuellement remis en cause. Un nouveau connecteur appelé GAC (*Glideosome-associated connector*) a été identifié. Il se lie à l'actine et à MIC2 pour coordonner la motilité [Jacot *et al.*, 2016].

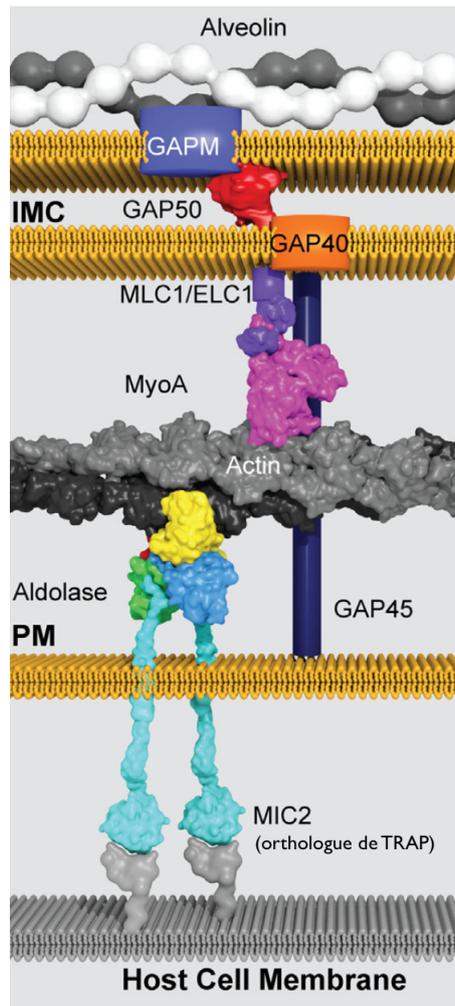


FIGURE 2.3 | Représentation du moteur permettant la motilité de glissement chez les *Apicomplexa* [Boucher et Bosch, 2015]. Les membranes sont représentées en jaune (PM : membrane plasmique; IMC : complexe membranaire interne) et la membrane de la cellule hôte en gris. En cyan MIC2, l'orthologue de TRAP chez *Toxoplasma* lié à l'aldolase en vert permettant son attachement à l'actine en grise. Le moteur met en jeu l'actine avec la myosine A en magenta qui est fixée au complexe de membranes internes grâce aux protéines GAPs.

2.2 Développement des sporozoïtes chez le moustique et invasion d'un nouvel hôte

2.2.1 Sporogonie : de la maturation de l'oocyste à l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes

Le sporozoïte est la forme parasitaire permettant l'infection d'un nouvel hôte. Chez *Plasmodium*, la sporogonie a lieu chez le moustique. C'est une phase de réplication asexuée et extracellulaire.

La sporogonie débute lorsque les ookinètes présents dans l'intestin traversent la barrière intestinale et forment des oocystes (figure 2.4). C'est le seul stade de développement extracellulaire du cycle de *Plasmodium*. Les oocystes se développent dans l'espace entre la lame basale et l'épithélium de l'intestin. La distribution des oocystes le long de la barrière intestinale est variable et dépend de la capacité du moustique à agglutiner le sang. Chez les moustiques capables d'agglutiner les globules rouges, les parasites sont localisés sur la partie inférieure de l'appareil digestif, de par la gravité, tandis que chez ceux qui n'ont pas cette capacité, les oocystes sont répartis tout du long de façon aléatoire [Kan *et al.*, 2014].

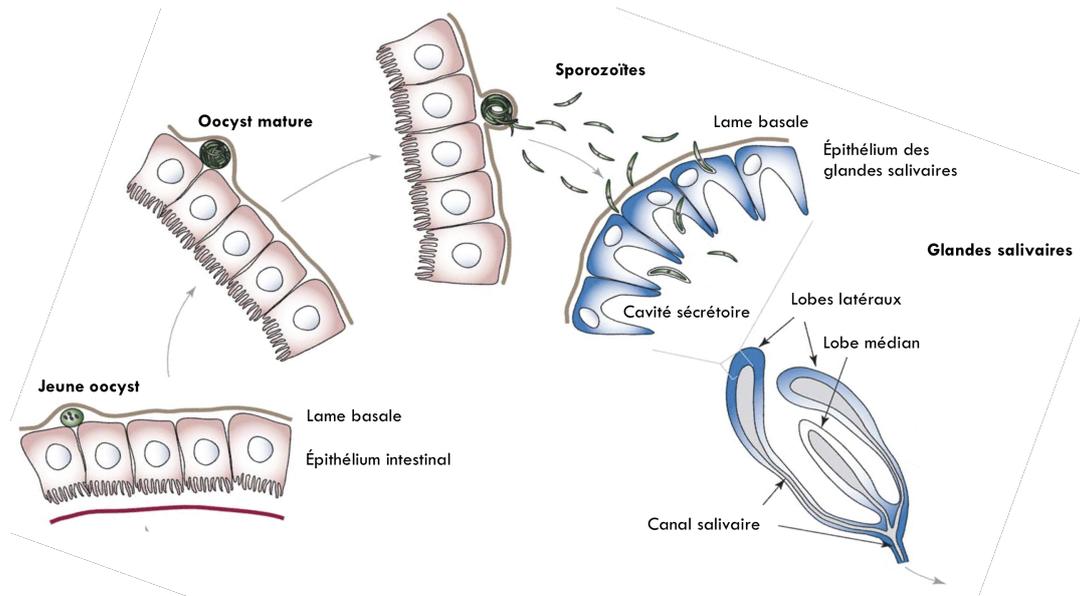


FIGURE 2.4 | De l'œcyste au sporozoïte adapté de [Vlachou *et al.*, 2006]. L'œcyste se développe entre la lame basale et l'épithélium intestinal. De nombreuses divisions nucléaires ont lieu dans l'œcyste et sont suivies du cloisonnement de la membrane et du bourgeonnement de plusieurs milliers de sporozoïtes haploïdes. Lors de la rupture de l'œcyste, ces sporozoïtes sont libérés dans l'hémocœle et peuvent rejoindre les lobes latéraux et médians des glandes salivaires. Le parasite traverse l'épithélium des glandes salivaires en formant une vacuole parasitophore dont il s'échappe pour entrer dans la cavité sécrétoire et rejoindre le canal salivaire.

Une fois l'œcyste formé, de nombreuses divisions mitotiques ont lieu et aboutissent à la formation de 6 000 à 8 000 noyaux. Cependant, ces divisions ne sont pas suivies de cytokinèse, ce qui aboutit à un parasite multinucléé qui grossit jusqu'à atteindre une taille de 50 à 60 μm de diamètre [Vanderberg et Rhodin, 1967]. En parallèle de ces multiplications nucléaires, les citernes du réticulum endoplasmique forment des expansions recouvertes de membrane plasmique [Sinden et Strong, 1978]. L'œcyste est alors divisé en plusieurs lobes nommés sporoblastes où ont lieu les dernières mitoses (figure 2.5) [Vanderberg *et al.*, 1967].

Les centres organisateurs des microtubules sont situés sous la membrane des sporoblastes. Ils orchestrent la formation du complexe apical et positionnent les noyaux pour leur incorporation dans les sporozoïtes naissants. Les sporozoïtes bourgeonnent alors des sporoblastes après avoir intégré un noyau et les organites nécessaires. Ils adoptent leur forme de croissant une fois détachés du sporoblaste. Ce bourgeonnement est asynchrone. La cytokinèse des sporozoïtes aboutit à la formation d'un œcyste mature contenant des milliers de sporozoïtes haploïdes qui attendent d'être libérés dans l'hémocœle [Vanderberg et Rhodin, 1967] (figure 2.5).

Le mécanisme de libération des sporozoïtes est mal déterminé. Initialement, la rupture de l'œcyste était supposée passive. L'hypothèse était que l'expansion de l'œcyste et l'accumulation de milliers de sporozoïtes conduisaient à la rupture de l'œcyste [Sinden, 1974]. Cependant il a été démontré depuis que plusieurs protéines sont impliquées dans la libération des sporozoïtes, dont ECP1 (*Egress Cysteine Protease 1*), CSP (*circumsporozoite protein*) et TRP1 (*Thrombospondin-related protein 1*).

En fonction de l'espèce de *Plasmodium* et de la température, 10 jours à 4 semaines sont nécessaires au développement des œcystes et à la libération des sporozoïtes dans l'hémocœle. Ils sont alors transportés passivement par les mouvements de l'hémolymphe et voyagent à travers le système circulatoire ouvert du moustique. Ils interagissent plus spécifiquement avec les glandes salivaires qu'ils colonisent en traversant la lame basale et les cellules acineuses (figure 2.4). Les sporozoïtes s'accumulent dans les glandes salivaires ainsi que dans le canal salivaire conduisant au proboscis.

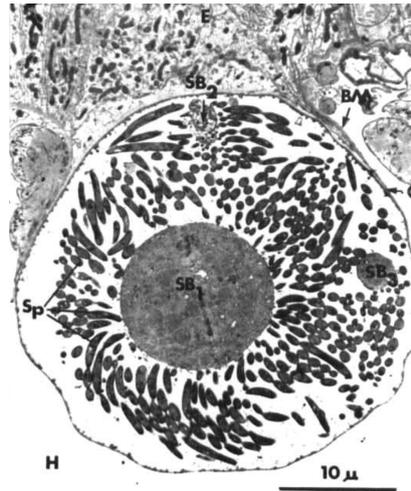


FIGURE 2.5 | Microscopie électronique d'un oocyst de *Plasmodium berghei* (x2500) [Vanderberg *et al.*, 1967]. L'oocyste est entouré d'une capsule (C) qui le sépare d'un côté de la membrane (BM) de l'épithélium intestinal (E) et de l'autre de l'hémocœle (H) du moustique. On observe ici trois sporoblastes (SB1, SB2, SB3) d'où bourgeonnent des sporozoïtes (SPZ). En même temps que les sporozoïtes sont formés, les sporoblastes rétrécissent.

2.2.2 Migration des sporozoïtes du derme au foie

Lorsque le moustique femelle prend un repas sanguin, il perfore la peau grâce à ses maxilles, puis enfonce ses stylets dans l'épiderme jusqu'à un capillaire sanguin. Les stylets délimitent deux canaux : le canal salivaire, formé par l'hypopharynx par lequel est injectée la salive vasodilatatrice et anticoagulante, et le canal alimentaire au niveau du labre, qui permet d'aspirer le sang [Ribeiro et Francischetti, 2003]. Si le moustique est infecté par *Plasmodium*, les sporozoïtes sont injectés dans le derme en même temps que la salive [Ross, 1897].

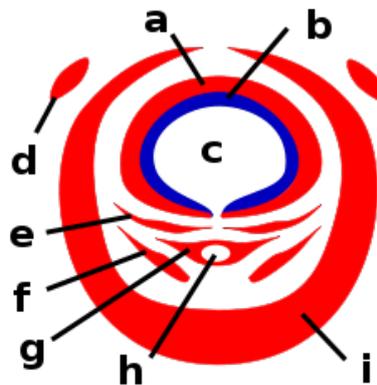


FIGURE 2.6 | Schéma de coupe transversale du proboscis de moustique. Le proboscis est composé par les stylets : maxilles, labre et hypopharynx et est enveloppé par le labium souple qui se replie au moment de la pique. Les stylets délimitent deux canaux : le canal salivaire formé par l'hypopharynx, il permet de libérer la salive anticoagulante et vasodilatatrice et le canal alimentaire au niveau du labre qui permet l'aspiration du sang. a : labre ; b : épipharynx ; c : canal salivaire ; d : palpe maxillaire ; e : mandibule ; f : maxille ; g : hypopharynx ; h : canal salivaire ; i : labium.

La majorité des sporozoïtes sont injectés dans le derme lorsque le moustique recherche un vaisseau sanguin [Amino *et al.*, 2006]. Lorsque le sang est atteint, les sporozoïtes qui continueraient à être éjectés sont ré-ingérés en même temps que le flot sanguin. Les sporozoïtes sont donc déposés dans le derme et non directement dans la circulation sanguine. Lors de la piqûre, le moustique injecte dans le derme en moyenne une centaine de sporozoïtes [Boyd et Kitchen, 1939; Rosenberg *et al.*, 1990; Beier *et al.*, 1991; Sidjanski et Vanderberg, 1997; Matsuoka *et al.*, 2002].

L'analyse à différents temps de la zone de piqûre après infection, montre que les sporozoïtes disparaissent petit à petit. Les sporozoïtes sont présents en grand nombre après 10 minutes, puis commencent à avoir quitté la zone au bout de 60 minutes pour avoir complètement disparu à 120 minutes après l'infection [Ponnudurai *et al.*, 1991; Sinnis et Coppi, 2007].

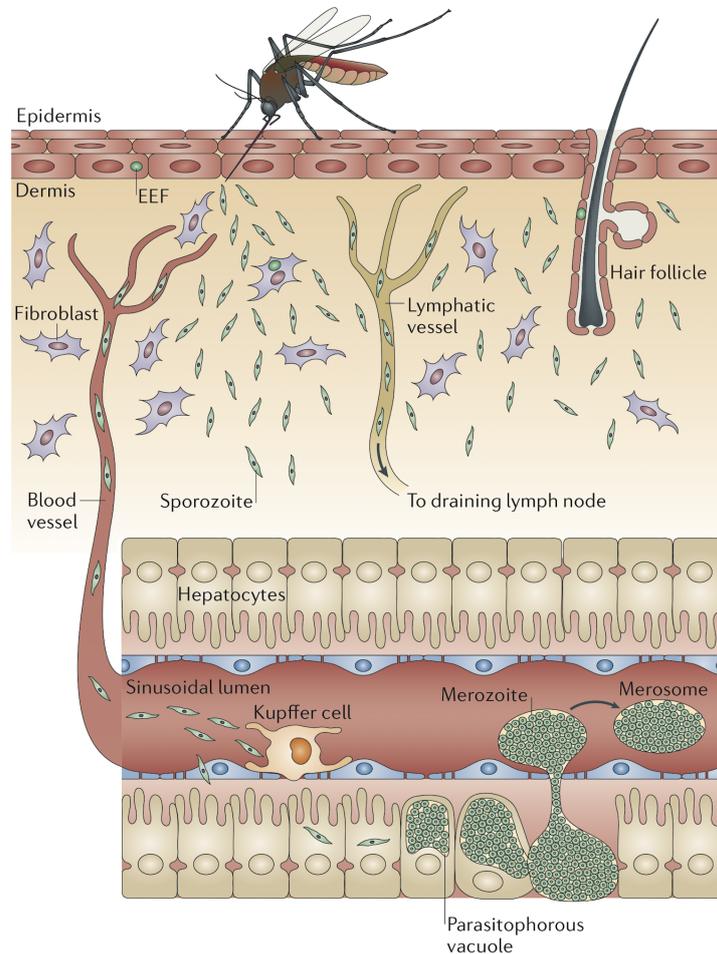


FIGURE 2.7 | Migration des sporozoïtes du derme au foie [Ménard *et al.*, 2013].

Une fois dans le derme, les sporozoïtes migrent activement et rapidement avec une vitesse de 1 à $2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ [Amino *et al.*, 2006], puis au bout de 30 minutes cette vitesse commence à diminuer. La migration des sporozoïtes est aléatoire à travers les cellules dermiques, jusqu'à ce qu'ils entrent en contact avec un vaisseau sanguin [Vanderberg et Frevert, 2004; Amino *et al.*, 2006]. Ils rejoignent alors la circulation sanguine en traversant la barrière endothéliale, ce qui va leur permettre d'atteindre rapidement le foie où ils pourront se développer pour former des mérozoïtes [Shin *et al.*, 1982].

Le devenir des sporozoïtes est variable (figure 2.7) [Boyd et Kitchen, 1939], une étude quantitative montre que 25% des sporozoïtes de l'inoculum rejoignent bien la circulation sanguine, 15% quittent le derme via le réseau lymphatique et 60% restent emprisonnés dans le derme où ils perdent leur motilité [Amino *et al.*, 2006]. Les sporozoïtes ayant rejoint la circulation sanguine vont être transportés jusqu'au foie par l'intermédiaire de l'artère hépatique ou de la veine porte. Au contraire, les sporozoïtes passés dans le système lymphatique se retrouvent piégés dans les ganglions lymphatiques où ils sont dégradés. Ainsi seule une faible proportion des sporozoïtes injectés sous le derme vont réussir à atteindre le foie.

Il a été montré que chez les parasites de rongeurs, ceux qui n'ont pas quitté le derme sont capables d'envahir les cellules épidermiques, dermiques ou associées aux follicules pileux et peuvent se développer

en forme exo-érythrocytaires [Gueirard *et al.*, 2010].

2.2.3 Traversée cellulaire de la barrière sinusoidale et des hépatocytes

Traversée de la barrière endothéliale des sinusoides hépatiques pour accéder aux hépatocytes

Une fois arrivés dans la circulation sanguine les sporozoïtes sont transportés passivement et vont atteindre le foie via l'artère hépatique ou la veine porte et les sinusoides hépatiques. Les sinusoides hépatiques sont des capillaires composés de deux types cellulaires (figure 2.8) :

- Des cellules endothéliales qui sont majoritaires. Ce sont des cellules fenestrées dont la taille des fenestrations varie de 0.1 à 2 μm [Motta et Porter, 1974]. Les cellules filtrent les fluides et permettent les échanges entre le sinusoides et l'espace de Disse grâce aux fenestrations [Wisse *et al.*, 1996].
- Des macrophages résidents : les cellules de Kupffer. Ils captent et phagocytent les particules étrangères qui arriveraient de l'intestin avant qu'elles ne gagnent la circulation générale [Wisse *et al.*, 1996].

Les sporozoïtes se retrouvent quelques minutes après avoir été injectés dans l'hôte mammifère au niveau du foie [Shin *et al.*, 1982]. La sélectivité du parasite pour le foie est très rapide et met en jeu des interactions spécifiques entre les protéines de la surface parasitaire et les protéines de la cellule hôte (figure 2.8). En effet, les protéines CSP (*circumsporozoite protein* voir section 2.3.1) et TRAP (*Thrombospondin Related Anomymous Protein* voir section 2.3.1) sont capables de reconnaître et de se lier aux héparan sulfate protéoglycanes (HSPG) [Cerami *et al.*, 1992a,b; Frevert *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1995; Sinnis *et al.*, 1994].

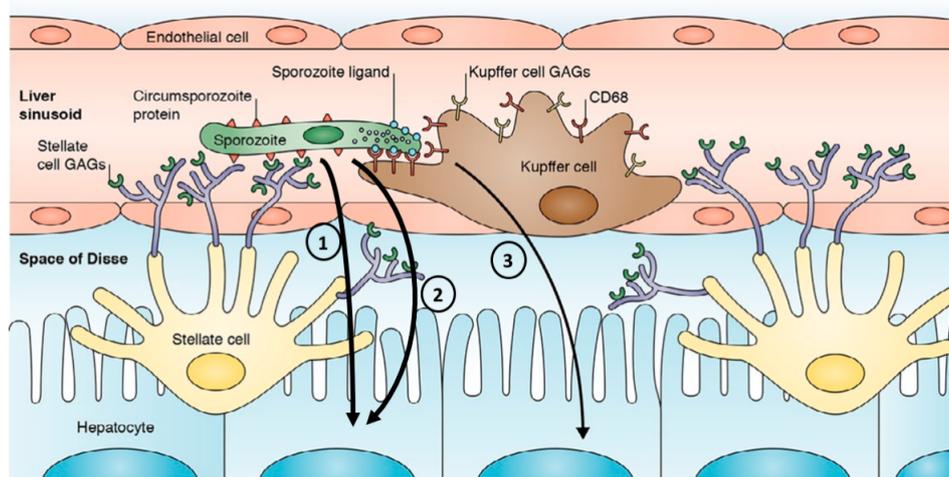


FIGURE 2.8 | Modèle de la traversée de l'épithélium par les sporozoïtes des sinusoides hépatiques adapté de [Sacks et Sacks, 2015]. Les sporozoïtes sont capables de traverser l'épithélium de trois façons différentes : (1) via les fenestrations intercellulaires de l'épithélium; (2) via les cellules endothéliales; (3) via les cellules de Kupffer.

Les sporozoïtes peuvent alors traverser les cellules de Kupffer résidentes [Pradel et Frevert, 2001; Ishino *et al.*, 2004; Frevert *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2013], ou migrer à travers les cellules endothéliales [Tavares *et al.*, 2013]. Il est également possible qu'ils passent entre les cellules épithéliales, car les sinusoides hépatiques constituent un endothélium fenestré (figure 2.8) [Pradel et Frevert, 2001]. Les sporozoïtes accèdent alors au parenchyme hépatique et peuvent infecter les hépatocytes.

Traversée des hépatocytes : préparation de l'invasion productive

Rôle de la traversée cellulaire.

De façon surprenante, les sporozoïtes n'envahissent pas directement les hépatocytes mais commencent par les traverser [Mota *et al.*, 2001]. Cette phase de traversée cellulaire des hépatocytes dure entre 30 et 60 minutes chez *Plasmodium yoelii* [Risco-castillo *et al.*, 2015]. Il existe plusieurs théories pour expliquer ce phénomène.

La première théorie propose que les sporozoïtes s'activent lorsqu'ils traversent les hépatocytes [Mota *et al.*, 2002]. En effet, l'exocytose des molécules contenues dans les organites apicaux est déclenchée par une augmentation de la concentration en ion calcium (Ca^{2+}). De plus, l'incubation des sporozoïtes dans une solution contenant du potassium à la concentration cellulaire (142 mM) augmente fortement le taux d'invasion et réduit le taux de traversée cellulaire [Kumar *et al.*, 2007].

Une seconde explication serait que la traversée cellulaire des hépatocytes par les sporozoïtes permettrait de libérer dans l'environnement des facteurs rendant les hépatocytes voisins plus sensibles à l'infection par *Plasmodium* [Carrolo *et al.*, 2003]. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'incubation d'hépatocytes avec du milieu ayant déjà été au contact d'hépatocytes infectés augmente le taux d'invasion par les sporozoïtes [Carrolo *et al.*, 2003]. Le facteur de croissance des hépatocytes (ou HGF *hepatocyte growth factor*) a été identifié par comparaison entre les milieux classiques et pré-incubés avec des hépatocytes infectés comme étant le médiateur rendant susceptible les hépatocytes voisins [Carrolo *et al.*, 2003].

La dernière hypothèse considère que les sporozoïtes détectent le changement d'environnement et répondent aux conditions présentes dans le parenchyme hépatique en passant du mode de traversée cellulaire au mode d'invasion [Coppi *et al.*, 2007]. Les cellules épithéliales et endothéliales du derme, des vaisseaux sanguins sont pauvres en protéoglycane de sulfate d'héparane (HSPG *heparan sulfate proteoglycans*) tandis que les hépatocytes en sont riches. Ainsi, les cellules pauvres en HSPGs seraient responsables du phénomène de traversée cellulaire et les cellules qui en sont riches induiraient un remodellement du parasite permettant l'invasion telle que le clivage de la protéine CSP [Coppi *et al.*, 2007].

Mécanismes et facteurs mis en jeu lors de la traversée cellulaire.

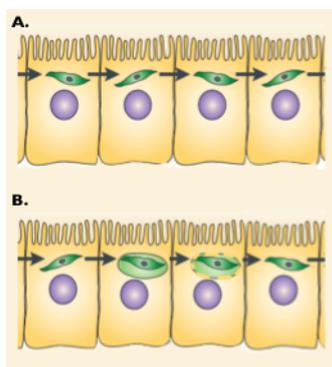


FIGURE 2.9 | Traversée cellulaire des sporozoïtes au niveau des hépatocytes et invasion productive adapté de [Prudêncio *et al.*, 2006]. **A.** Traversée cellulaire avec perforation de la membrane cellulaire pour entrer. **B.** Formation d'une vacuole transitoire pour traverser les cellules.

Lors de la traversée cellulaire, le sporozoïte est capable de mettre en jeu deux types de mécanismes. Un premier où le parasite perce la membrane pour envahir la cellule [Mota *et al.*, 2001], et un second où le parasite forme une vacuole transitoire qui le protège [Risco-castillo *et al.*, 2015]. Le second mécanisme n'a été identifié que récemment grâce au suivi de l'invasion par le dextran, molécule qui colore le

cytoplasme si la cellule a été perforée. Des parasites ont été observés lors de la traversée cellulaire dans des cellules sans dextran, ce qui signifie que le parasite est entré sans percer la membrane de la cellule hôte [Risco-castillo *et al.*, 2015].

Plusieurs facteurs parasitaires sont impliqués dans la traversée cellulaire :

- la phospholipase (initialement appelée UIS₁₀ pour *Up-regulated in Infectious Sporozoites*), qui endommage les membranes cellulaires en hydrolysant les phospholipides pour faciliter le passage des sporozoïtes [Bhanot *et al.*, 2005] ;
- la protéine SPECT (*sporozoite microneme protein essential for cell traversal*), dont la délétion rend les parasites incapables de traverser les cellules [Ishino *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2017] ;
- la protéine CelTOS (*cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites*), impliquée également dans les phénomènes de traversée cellulaire chez le moustique [Kariu *et al.*, 2006] ;
- la protéine TLP (*TRAP-like protein* (voir section 2.3.1) [Moreira *et al.*, 2008] ;
- la protéine GEST (*gamete egress and sporozoite traversal*) [Talman *et al.*, 2011] ;
- la protéine PLP₁ (*Perforin-Like Protein 1*), également appelée SPECT₂ ; cette protéine appartient à la famille des protéines impliquée dans la formation des pores et qui comporte un domaine MACPF (*membrane attack complexe/perforine*) [Kaiser *et al.*, 2004; Ishino *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2017].

Il avait initialement été suggéré que PLP₁ soit impliquée dans l'entrée du parasite lors de la traversée cellulaire en perforant la membrane de la cellule hôte [Ishino *et al.*, 2005]. Mais il a récemment été mis en évidence que PLP₁ est nécessaire pour la sortie du parasite des hépatocytes. Le sporozoïte est sensible à la variation de pH et sort de la vacuole et de la cellule grâce à PLP₁ pour échapper à la dégradation par les lysosomes de la cellule hôte [Risco-castillo *et al.*, 2015].

Néanmoins, la traversée cellulaire n'est pas essentielle pour l'infectiosité des parasites, car des sporozoïtes déficients pour la traversée cellulaire sont capables d'envahir *in vitro* les hépatocytes [Ishino *et al.*, 2004, 2005].

2.2.4 Invasion des hépatocytes et formation de la vacuole parasitophore

Au bout de 30 à 60 minutes de traversée cellulaire, le parasite établit une vacuole parasitophore [Risco-castillo *et al.*, 2015] dans laquelle il va pouvoir se développer en schizonte hépatique qui libérera des mérozoïtes à maturation (figure 2.10). Cette étape est indispensable pour que *Plasmodium* puisse rejoindre la circulation sanguine sous forme de mérozoïte.

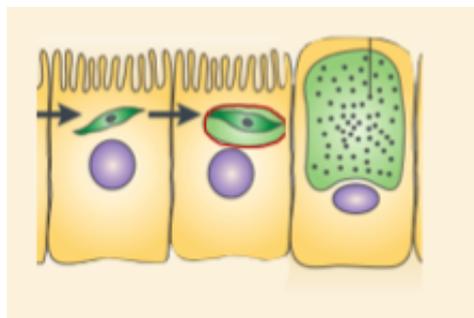


FIGURE 2.10 | Invasion productive des hépatocytes adapté de [Prudêncio *et al.*, 2006]. Il y a formation de la vacuole parasitophore et développement en schizontes hépatique.

L'invasion productive se fait en plusieurs étapes. Il y a tout d'abord une étape de reconnaissance des hépatocytes puis d'attachement et de sécrétion des protéines, suivie par la formation d'une jonction

mobile qui va former un anneau qui s'étire le long du parasite et permet son internalisation dans une vacuole parasitophore (figure 2.11). Ce mécanisme a été très étudié chez *Toxoplasma* et au stade mérozoïte de *Plasmodium*, mais n'a pas été élucidé pour le stade sporozoïte.

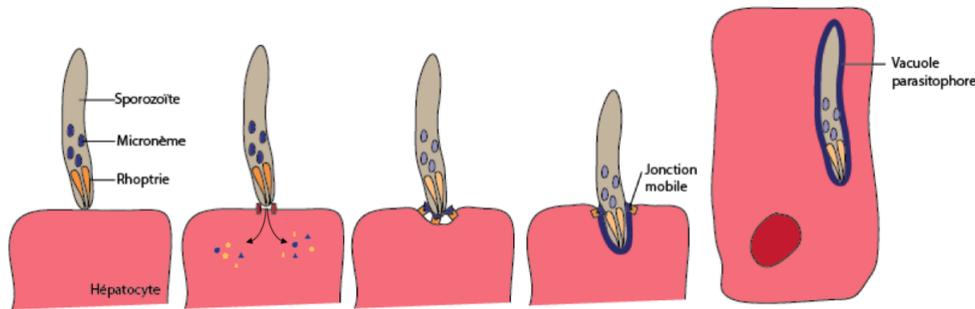


FIGURE 2.11 | Les étapes de l'invasion productive des hépatocytes par *Plasmodium*. La première étape est une étape d'attachement du sporozoïte à la surface de la cellule hôte qui met en jeu les protéines présentes à la surface du parasite. S'ensuit une libération des protéines de rhoptries dans la cellule hôte. La jonction mobile est alors mise en place. Cette jonction permet l'internalisation du sporozoïte à l'intérieur d'une vacuole parasitophore.

Attachement initial et réorientation du parasite

La sélectivité des sporozoïtes pour le foie a été observée dès 1948 [Shortt et Garnham, 1948]. Il est possible que lors de la traversée cellulaire *Plasmodium* sécrète des facteurs permettant de préparer son invasion. Pour initier l'invasion, le parasite adhère à la cellule hôte grâce à des adhésines reconnaissant la surface des hépatocytes. Parmi ces adhésines, on retrouve les protéines CSP *Circumsporozoïte protein* (voir section 2.3.1) et TRAP *Thrombospondin Related Anonymus Protein* (voir section 2.3.1), qui sont capables d'adhérer aux protéoglycanes d'héparane sulfate (HSPGs) [Frevet *et al.*, 1993; Muller *et al.*, 1993; Pradel *et al.*, 2002; Coppi *et al.*, 2007, 2011; Zhao *et al.*, 2016].

Au contact de la cellule hôte un signal calcique est émis. Il déclenche la libération des protéines micronémales [Ono *et al.*, 2008]. La libération du contenu des rhoptries a été observée dès 1985 [Stewart *et al.*, 1985]. Elle semble conditionnée à l'attachement du parasite à la cellule, car en l'absence du récepteur cellulaire CD81, les protéines de rhoptries ne sont plus libérées [Risco-castillo *et al.*, 2014]. La libération du contenu des organites apicaux permet d'établir une jonction mobile, structure clé de l'invasion cellulaire.

Établissement d'une jonction mobile entre le parasite et la surface de l'hépatocyte

La jonction mobile a été découverte par microscopie électronique entre les mérozoïtes et les érythrocytes en 1978 (figure 2.12) [Aikawa *et al.*, 1978]. Elle permet l'internalisation du parasite au sein de la vacuole parasitophore. Elle forme un anneau caractéristique entourant le parasite (figure 2.12). En 2009, Besteiro *et al.* proposent un nouveau modèle pour cette jonction qui met en jeu à la fois des ligands et des récepteurs apportés par le parasite [Besteiro *et al.*, 2009].

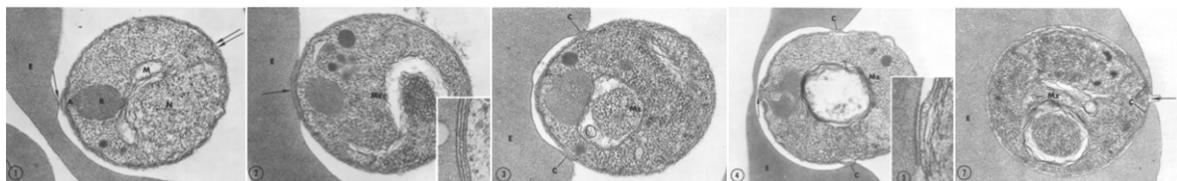


FIGURE 2.12 | Observations par microscopie électronique de la jonction mobile chez un mérozoïte de *Plasmodium knowlesi* [Aikawa *et al.*, 1978]. On observe de gauche à droite l'attachement du mérozoïte et la formation de la jonction mobile, puis l'étalement de cette jonction le long du parasite et enfin l'internalisation complète de *Plasmodium*.

La jonction mobile met en jeu des protéines micronémales présentées à la surface du parasite et des protéines des rhoptries qui ont été sécrétées dans la cellule hôte et présentées à sa surface. La composition moléculaire de cette jonction a été initialement identifiée chez *Toxoplasma* grâce à l'utilisation d'anticorps pour immunoprécipiter ce complexe [Alexander *et al.*, 2005; Lebrun *et al.*, 2005; Besteiro *et al.*, 2009; Lamarque *et al.*, 2014]. Du côté parasitaire, la protéine d'origine micronémale AMA1 et ses homologues sont impliqués. Tandis que du côté de la cellule hôte ce sont les protéines de rhoptries RON2, RON4, RON5 et RON8 qui forment un complexe. RON2 adopte une conformation transmembranaire dont la région C-terminale forme un boucle du côté extracellulaire. Cette boucle extracellulaire interagit avec AMA1 pour former la jonction mobile [Lamarque *et al.*, 2011; Srinivasan *et al.*, 2011; Hossain *et al.*, 2012] (figure 2.13). Les autres protéines RON forment un complexe du côté cytoplasmique, où elles peuvent interagir avec le cytosquelette de la cellule hôte [Riglar *et al.*, 2011; Srinivasan *et al.*, 2011].

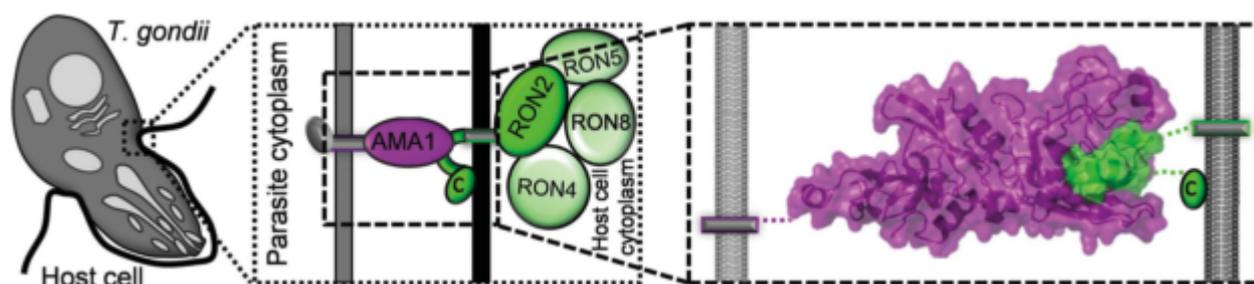


FIGURE 2.13 | Complexe protéique mis en jeu dans la jonction mobile de *Plasmodium* [Tonkin *et al.*, 2011]. En magenta : AMA-1 protéine sécrétées par les micronèmes; en vert : complexe des protéines RONs sécrétées par les rhoptries.

Formation de la vacuole parasitophore grâce à la mobilisation de la jonction mobile le long du parasite

La jonction mobile permet l'ancrage du parasite à la cellule hôte. Elle va s'étaler vers l'arrière du parasite grâce à un moteur d'actine/myosine et ainsi internaliser le parasite (figure 2.14), ce qui aboutit à l'invagination de la membrane plasmique, et ainsi à la formation de la vacuole parasitophore [Besteiro *et al.*, 2011; Riglar *et al.*, 2011].

Cette invagination est permise grâce à l'ancrage du côté parasitaire de la région C-terminale d'AMA1 avec l'aldolase interagissant avec le moteur d'actin/myosine parasitaire [Srinivasan *et al.*, 2011]. Du côté de la cellule hôte, il est supposé que le complexe des protéines RON permet l'interaction avec le cytosquelette cellulaire (figure 2.14) [Besteiro *et al.*, 2011].

Une fois le parasite entré dans la cellule, il y a libération des protéines contenues dans les granules denses [Carruthers et Sibley, 1997]. La membrane de la vacuole parasitophore provient de la membrane plasmique cellulaire. Le parasite initie un remodelage de cette membrane, qui lui permet d'échapper à la fusion et la dégradation par les lysosomes de la cellule hôte [Mordue *et al.*, 1999]. Les protéines UIS3 et UIS4 (*Up-regulated in Infectious Sporozoites*) sont notamment ajoutées à cette membrane. Ces protéines sont essentielles pour le développement du parasite au stade hépatique [Matuschewski *et al.*, 2002b; Mueller *et al.*, 2005a]. La délétion de UIS4 chez *Plasmodium berghei* provoque l'arrêt du développement hépatique 24 heures après l'infection, avec la présence de mutants beaucoup plus petits que les parasites sauvages [Mueller *et al.*, 2005a]. UIS3 interagit avec la protéine hépatocytaire L-FABP (*Liver Fatty Acid Binding Protein*). Cette interaction est impliquée dans le développement du parasite [Mikolajczak *et al.*, 2007].

La membrane de la vacuole parasitophore est ponctuée de canaux qui permettent au parasite d'importer du cytoplasme de la cellule hôte les éléments nutritifs dont il a besoin [Bano *et al.*, 2007]. Ces canaux permettent de laisser passer les molécules de moins de 1 kDa [Bano *et al.*, 2007]. Chez

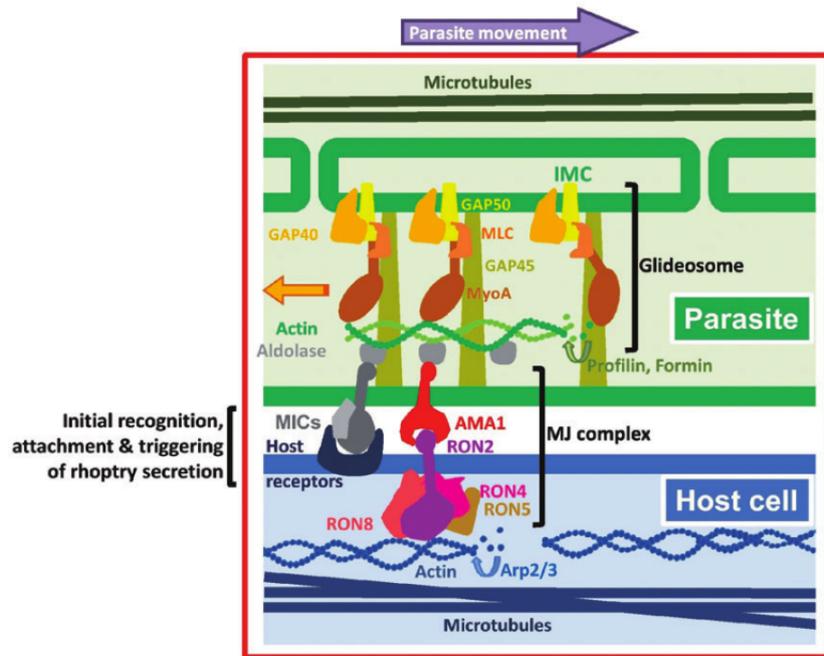


FIGURE 2.14 | Modèle moléculaire de la jonction mobile des Apicomplexa [Besteiro *et al.*, 2011].

Toxoplasma les protéines GRA17 et GRA23 proviennent des granules denses et sont insérées dans la membrane. Ces protéines permettent le transfert de petites molécules à travers la vacuole parasitophore [Gold *et al.*, 2015]. *Plasmodium* possède le même type de protéines, parmi lesquelles EXP2, capable de restaurer le transfert de molécules chez les parasites *Toxoplasma* délétés pour GRA17 [Gold *et al.*, 2015].

En conclusion, pour que le sporozoïte puisse envahir les hépatocytes, il a besoin de pouvoir adhérer à la cellule hôte et d'être motile [King, 1988; Kappe *et al.*, 2004b,a].

2.3 Protéines impliquée dans l'invasion par *Plasmodium*

Plasmodium possède de nombreuses familles de protéines d'adhérence. Celles-ci ont évolué au sein du phylum des *Apicomplexa* depuis leur ancêtre commun ou ont été acquises par les parasites grâce à un transfert de gène. La co-évolution depuis 150 millions d'années de *Plasmodium* avec son hôte [Carter et Mendis, 2002] a permis le transfert horizontal de gènes de l'hôte vers *Plasmodium* [Aravind *et al.*, 2003]. Les domaines dérivent souvent de protéines impliquées dans des interactions extracellulaires et notamment lors de l'adhésion [Templeton *et al.*, 2004]. Certains domaines d'adhésines ont ainsi été transférés d'un hôte animal vers des *Apicomplexa* tels que les domaines thrombospondin 1 (TSP-1), Sushi, Notch et la fibronectine de type 2 [Anantharaman *et al.*, 2007].

Les adhésines sont essentielles pour *Plasmodium*. Elles lui permettent notamment d'initier le passage au travers des barrières cellulaires, de reconnaître les cellules hôtes et d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. De plus, au stade sanguin, les phénomènes d'adhérence sont également impliqués dans la formation de rosettes et la cytoadhérence [Rowe *et al.*, 2009] et au stade sexué l'adhérence permet le regroupement des gamètes mâles et femelles. Ces fonctions sont réalisées grâce à différentes grandes familles d'adhésines présentes chez *Plasmodium* (figure 2.15), telles que les protéines à domaines DBL (*Duffy Binding Like*), les protéines à domaines RVI (*Erythrocyte Binding Like Region VI*), les protéines à domaines CIDR (*Cystein Rich Interdomain Region*), les protéines à domaines EGF (*Epidermal Growth Factor*), les protéines à domaine vWA (*von Willebrand Factor Type A*), les protéines à domaines TSR (*ThromboSpondin Repeat*) et les protéines à domaines 6 cystéines (également appelé domaine p48/45). Ce

sont ces deux dernières familles que je vais détailler ensuite et que j'étudierai au cours de mon sujet de thèse.

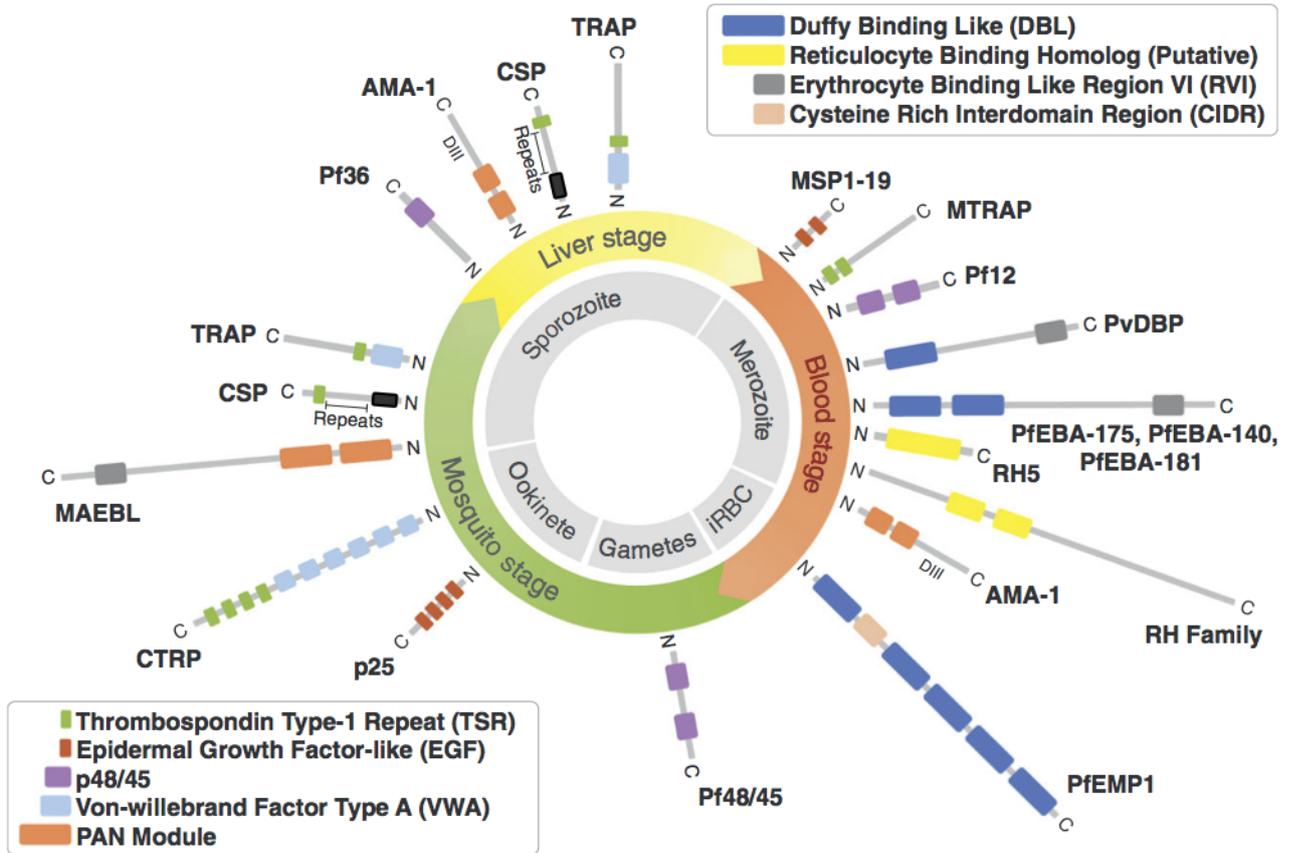


FIGURE 2.15 | Graphique représentant les grandes familles de protéines d'adhérence au cours du cycle de vie de *Plasmodium* [Malpede et Tolia, 2014]. Les principaux domaines sont représentés pour chaque protéine type de la famille. iRBC : globules rouges infectés.

2.3.1 Les protéines à domaine TSR

La famille TSR est une famille variée avec des protéines présentes à la fois dans le règne animal et chez les protozoaires. On retrouve par exemple 87 protéines à domaine TSR dans le génome humain, 45 chez *Drosophila*, 90 chez *Caenorhabditis elegans* et 11 chez *Plasmodium*. Ce sont essentiellement des protéines extracellulaires ou sécrétées. Elles sont notamment impliquées dans des interactions d'adhérence au cours du développement cellulaire, de l'attachement, de la migration et du remodellement tissulaire [Tucker, 2004].

Le domaine TSR a été identifié chez la protéine TSP1 (*Thrombin-sensitive protein 1*) et la properdine, chez qui il permet la liaison avec les sucres sulfatés tels que les glycosaminoglycanes (GAGs) [Lawler et Hynes, 1986; Lawler, 1986; Goundis et Reid, 1988; Holt *et al.*, 1990].

Le domaine TSR est composé d'une soixantaine d'acides aminés dont 18 acides aminés très conservés : Trp-Xxx-Trp-Ser-Pro-Cys-Ser-Val-Thr-Cys-Gly-Xxx-Gly-Xxx-Arg-Xxx-Arg (WXWSPCSVTGCGXRXR) [Robson *et al.*, 1995; Naitza *et al.*, 1998]. La présence des deux tryptophanes dans un domaine n'est pas courant chez *Plasmodium* où le tryptophane est un acide aminé assez rare. La structure du domaine TSR de la protéine humaine TSP-1 a été résolue en 2002 [Tan *et al.*, 2002]. Le domaine est constitué de trois brins antiparallèles : une région peu structurée (brin A), deux brins β (brins B et C) ainsi que de deux boucles (*jar handles*). Sa structure est maintenue grâce à la formation de trois ponts disulfures (fi-

gure 2.16). Les résidus conservés tryptophanes (W) et arginines (R) sont localisés proches des extrémités des deux boucles et forment une poche chargée qui peut être un site de reconnaissance du ligand [Tan *et al.*, 2002; Tucker, 2004].

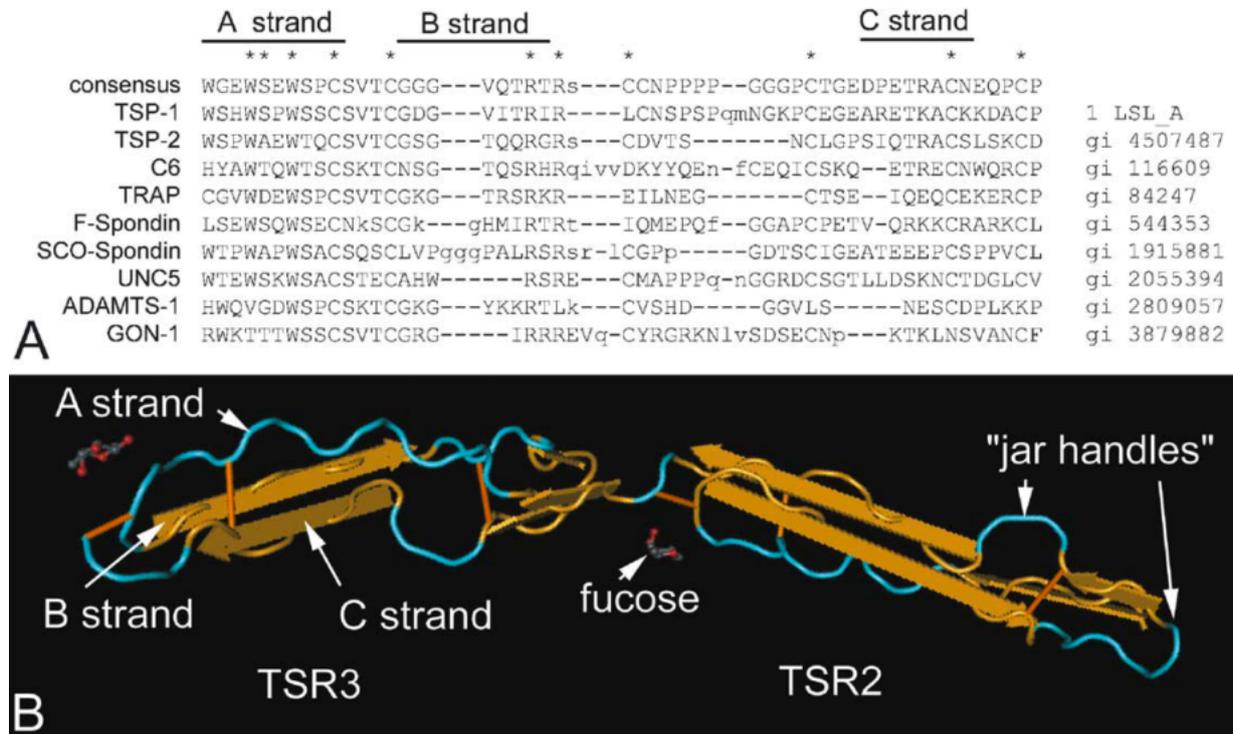


FIGURE 2.16 | Alignement de protéines à domaine TSR et structure du domaine [Tucker, 2004]. **A.** Alignement du domaine TSR de protéines représentatives de la famille, dont la protéine TRAP de *Plasmodium*. L'astérisque marque les résidus conservés. Les brins A, B et C sont également indiqués dans la représentation structurale du domaine. **B.** Modèle des domaines TSR de type 2 et 3 de la TSP-1 humaine. Le domaine est composé de 3 brins antiparallèles : une région peu structurée (brin A) et deux brins β (brins B et C) ainsi que de deux boucles (*jar handles*). Sa structure est maintenue grâce à la formation de trois ponts disulfures. Bleu : régions peu structurées; orange claire : brins β ; orange foncé : ponts disulfures.

La famille des protéines à domaines TSR est une grande famille présente à la fois chez les vertébrés, les invertébrés et les *Apicomplexa*. Certaines protéines sont impliquées dans le système nerveux, telles que F-spondine et Unc-5, impliquées dans la croissance et l'orientation des axones [Klar *et al.*, 1992; Leung-hagesteijn *et al.*, 1992]. D'autres font partie du système immunitaire : properdine, C6, C7, C8 et C9 mises en jeu dans la voie du complément [Holt *et al.*, 1990; Haefliger *et al.*, 1989]. Une partie est impliquée dans des interactions cellules-cellules ou cellules-matrice : TSP-1 et TSP-2 participent à l'agrégation des plaquettes et la M-spondine permet l'attachement des muscles au tégument des arthropodes [Lawler et Hynes, 1986; Bornstein et Departments, 1992; Umemiya *et al.*, 1997]. Enfin chez les parasites, ces protéines sont impliquées dans l'invasion et la motilité. TRAP et CSP sont nécessaires aux sporozoïtes de *Plasmodium* pour envahir les hépatocytes et MIC2 est impliquée dans l'invasion de l'hôte vertébré par *Toxoplasma* [Robson *et al.*, 1995; Sultan *et al.*, 1997; Huynh et Carruthers, 2006] (figure 2.17).

Plasmodium exprime différentes protéines à domaine TSR tout au long de son cycle de vie : CSP (*Circumsporozoïte protéine*), TRAP (*Thrombospondin Related Anonymous Protein*), TRSP (*Thrombospondin-related sporozoïte protein*), TLP (*TRAP-like protein*), TREP (*TRAP-related protein*), SPATR (*Secreted protein with altered thrombospondin repeat domain*), SSP3 (*Surface sporozoïte protein 3*) et TRP1 (*Thrombospondin-related protein 1*) sont présentes chez le sporozoïte. Au stade sanguin le parasite exprime SPATR (*Secreted protein with altered thrombospondin repeat domain*), MTRAP (*Mérozoïte-TRAP*) et TRAMP (*Thrombospondin-related apical membrane protein*). Et chez les ookinètes et oocystes, ce sont les protéines

Table 1. The thrombospondin (TSP) family^a

Protein	Organism	Function	Ligand
Vertebrates			
TSP1 and -2	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i>	Platelet aggregation, cell–matrix interactions	Fibrinogen, fibronectin, CD36, laminin, type V collagen
F-spondin	<i>Rattus norvegicus</i>	Growth and guidance of axons in developing neurons <i>in vitro</i>	Heparin, chondroitin sulphate
Mindin 1 and 2	<i>Brachydanio rerio</i> (zebrafish)	ECM proteins secreted by the floor plate during embryonic development of CNS	Basal lamina proteins
Properdin	<i>H. sapiens</i>	Stabilizes the C3 convertase of the alternative complement pathway	Glycosaminoglycans and bacterial cell wall
C6, C7, C8, C9	<i>H. sapiens</i>	Terminal components of the alternative complement pathway	C5b
Invertebrates			
M-spondin	<i>Drosophila melanogaster</i>	ECM protein: mediates mechanical linkage between muscle cells and apodemes	Muscle attachment site proteins
Unc-5	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Dorsal guidance of pioneering neurons and migrating cells	?
Apicomplexa			
CS protein	<i>Plasmodium</i> spp	Sporozoite formation in the oocysts, gliding motility and invasion of hepatocytes	Heparan sulphate GAGs, LDL receptor-related protein
TRAP	<i>Plasmodium</i> spp	Sporozoite gliding motility, invasion of hepatocytes and mosquito salivary glands (?)	Heparan sulphate GAGs
CTRP	<i>P. falciparum</i>	?	?
Etp100	<i>Eimeria tenella</i>	Invasion of vertebrate cells (?)	?
Em100	<i>E. maxima</i>	?	?
MIC2	<i>Toxoplasma gondii</i>	Invasion of vertebrate cells (?), tachyzoite motility (?)	?
TRAP-C1	<i>Cryptosporidium parvum</i>	?	?

FIGURE 2.17 | Quelques protéines de la famille à domaine TSR [Naitza *et al.*, 1998]. CNS : système nerveux central; CS : *circumsporozoïte protein*; CTRP : *circumsporozoïte-and TRAP-related protein*; ECM : matrice extracellulaire; GAGs : glycosaminoglycane; LDL : lipoprotéine de basse densité; M-spondin : *muscle spondin*; TRAP : *thrombospondin related anonymous protein*; TSP : thrombospondine; spp : espèce; Unc-5 : *uncoordinated-5*; ? : fonction ou ligand inconnus.

CTRP (*Circumsporozoïte-and TRAP-related protein*) et TRP1 (*Thrombospondin-related protein 1*). Ces protéines possèdent toutes un peptide signal et un ou plusieurs domaines TSR (figure 4.4).

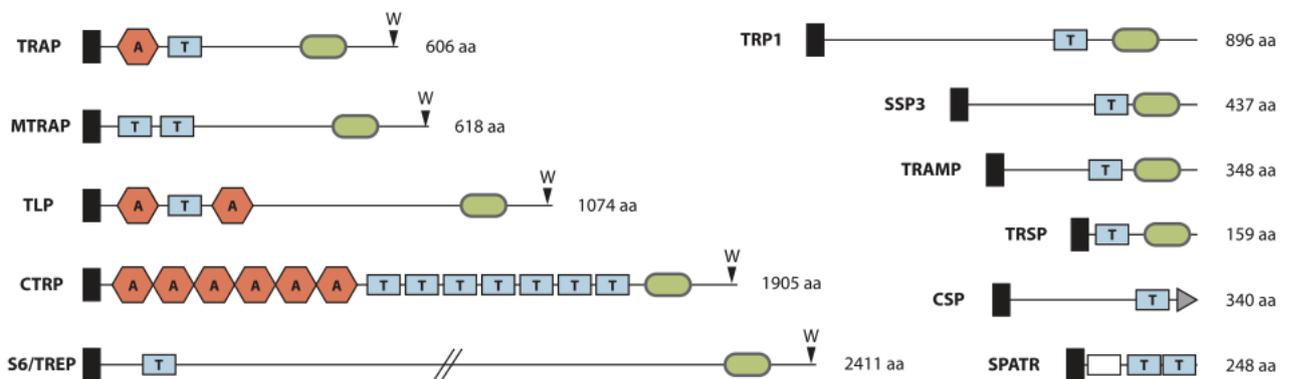


FIGURE 2.18 | Protéines de Plasmodium à domaine TSR [Klug et Frischknecht, 2017]. T : domaine à thrombospondin repeat; A : domaine von Willebrand factor A; noir : signal peptide de sécrétion; vert : domaine transmembranaire; gris : ancre GPI; blanc : domaine EGF; W : tryptophane conservé en position terminale.

CSP : la *Circumsporozoïte protein* est présente à la surface du sporozoïte et joue un rôle dans l'adhérence aux cellules hépatiques

La CSP est initialement identifiée en 1980 à la surface des sporozoïtes grâce à des anticorps produits contre les sporozoïtes [Yoshida *et al.*, 1980]. Elle est présente chez toutes les espèces plasmodiales et, bien que sa séquence protéique soit variable d'une espèce à une autre, sa structure primaire reste conservée. C'est une protéine de 397 acides aminés pour 40 kDa chez *Plasmodium falciparum*. Elle possède un peptide signal de sécrétion, une région de répétitions flanquée de deux domaines appelés RI et RIII, un domaine TSR contenant une région RII-plus ainsi qu'un ancrage GPI en C-terminal (figure 2.19.A) [Dame *et al.*, 1984; McCutchan *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2005; Swearingen *et al.*, 2016]. Les régions I, II-plus et III sont des motifs conservés au sein des CSP. La structure de la région III et du domaine TSR a été résolue en 2012 [Doud *et al.*, 2012]. Elle est proche du domaine TSR classique, mais présente par exemple une poche hydrophobe qui lui est particulière ainsi qu'une boucle reliant les deux brins β (figure 2.19.B).

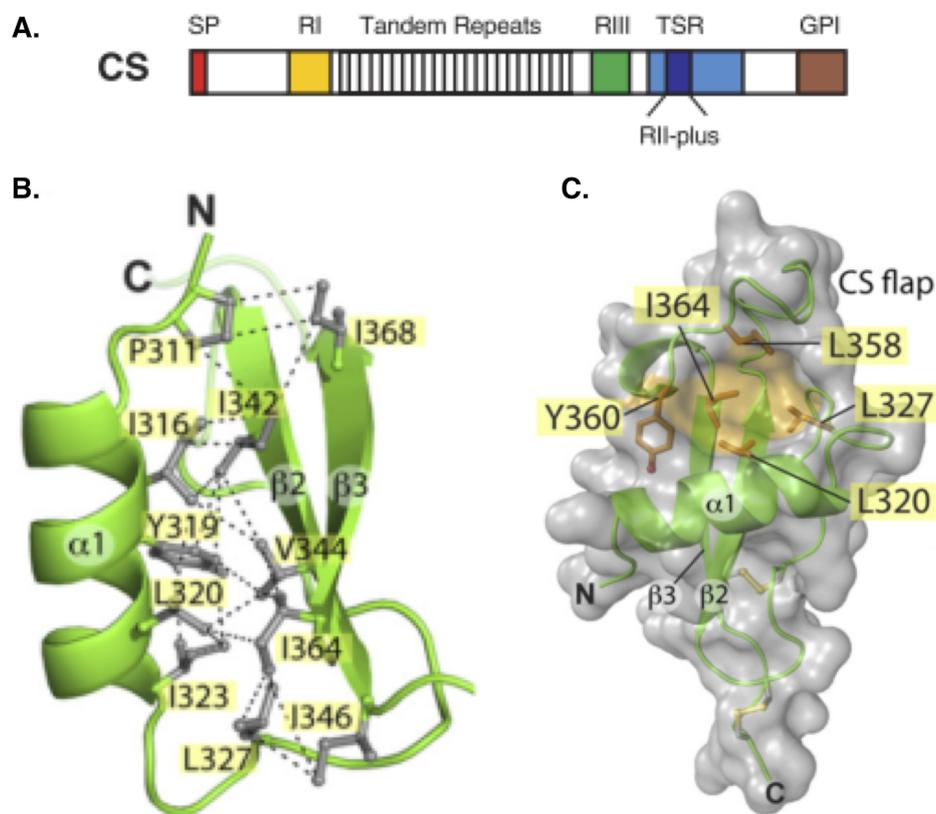


FIGURE 2.19 | Organisation structurale de la protéine CSP [Kappe *et al.*, 2004b; Doud *et al.*, 2012]. A. Organisation des domaines de la protéine CSP. B. Structure du domaine α TSR incluant la région III et le domaine TSR. C. Structure du domaine TSR.

La CSP est présente au niveau des micronèmes des sporozoïtes dès leur formation dans les oocystes. Elle est ensuite sécrétée et présentée à la surface des sporozoïtes [Yoshida *et al.*, 1980; Nagasawa *et al.*, 1987; Posthuma *et al.*, 1989; Aikawa *et al.*, 1990]. C'est la protéine majoritaire exposée à la surface des sporozoïtes. La CSP est essentielle pour assurer la polarité des oocystes et sa délétion provoque un défaut de développement des sporozoïtes [Ménard *et al.*, 1997; Thathy *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2014]. Elle permet également l'adhésion aux hépatocytes [Cerami *et al.*, 1992a].

La région RI est une région d'une quinzaine d'acides aminés incluant un pentapeptide KLKQP conservé. Elle est impliquée dans l'invasion des glandes salivaires chez le moustique en interagissant avec les sulfates d'héparanes recouvrant les glandes salivaires [Sidjanski *et al.*, 1997; Tewari *et al.*, 2002;

Myung *et al.*, 2004; Sinnis *et al.*, 2007]. Le pentapeptide correspond à une zone de clivage par une protéase parasitaire [Coppi *et al.*, 2011].

La région RII-plus est une séquence de 18 acides aminés dans la région proximale du domaine TSR. Elle possède un tryptophane, une paire de cystéines et un groupe de résidus basiques entrecoupés de résidus hydrophobes. Cette région joue un rôle dans l'adhérence des sporozoïtes aux protéoglycanes de sulfates d'héparanes (HSPG) présents au niveau des sinusoides hépatiques et est également impliquée dans l'invasion des glandes salivaires chez le moustique [Rich *et al.*, 1990; Cerami *et al.*, 1992b; Frevet *et al.*, 1993; Sinnis *et al.*, 1994; Gantt *et al.*, 1997; Tewari *et al.*, 2002].

La région III est prédite pour former une hélice α amphipatique qui maintient la structure de la région II-plus [Doud *et al.*, 2012].

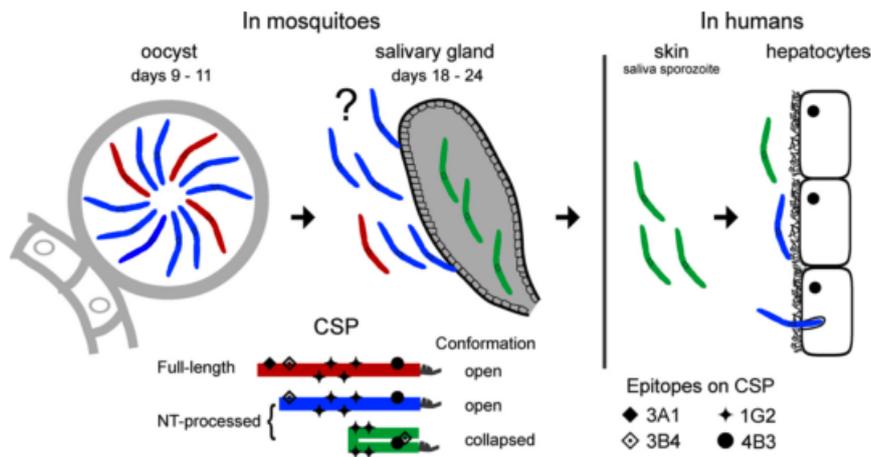


FIGURE 2.20 | Modèle des modifications biochimiques et biophysiques qui ont lieu au niveau de la CSP [Herrera *et al.*, 2015]. La CSP est clivée en N-terminal chez le moustique, puis procède à un changement de conformation permettant de masquer certains épitopes jusqu'à ce que le sporozoïte ait atteint les hépatocytes où les épitopes sont démasqués. En rouge représentation de la CSP sous sa forme non-clivée et ouverte; en bleu la CSP clivée et ouvert; en vert la CSP clivée et repliée. Le point d'interrogation souligne que la forme de la CSP au niveau des glandes salivaires est spéculative et n'a pas été démontrée.

La CSP est produite chez les sporozoïtes en formation dans les oocystes. Elle est ensuite clivée au niveau de la région RI en N-terminal et les sporozoïtes rejoignent les glandes salivaires où la protéine adopte une conformation repliée qui masque certains épitopes. Cette conformation est maintenue pendant la migration jusqu'au foie où la protéine adopte de nouveau une conformation dépliée libérant ses épitopes (figure 2.20)[Herrera *et al.*, 2015].

TRAP : la *Thrombospondin Related Anonymous Protein* est nécessaire à la motilité du sporozoïte

La protéine TRAP a été découverte à la surface des mérozoïtes en 1987 et caractérisée un an plus tard [Charoenvit *et al.*, 1987; Robson *et al.*, 1988]. Elle a également été nommée SSP2 pour Surface Sporozoite Protéine 2 [Rogers *et al.*, 1992b]. C'est une protéine de 574 acides aminés et 65 kDa. Elle est composée d'un peptide signal de sécrétion, d'un domaine vWA (*Von Willebrand factor type A*), d'un domaine TSR incluant une région RII-plus suivi d'une région de répétition riche en prolines et en C-terminal un domaine transmembranaire prolongé par un domaine cytoplasmique possédant de nombreux acides aminés acides et un tryptophane conservé parmi les derniers résidus (figure 2.21.A).

La structure des domaines vWA et TSR a été résolue en 2012 [Song *et al.*, 2012]. Le domaine vWA est composé de plusieurs hélices α et brins β . Il est rigide et peut opter pour une conformation ouverte ou fermée. Tandis que le domaine TSR, composé de deux brins β antiparallèles, est très flexible et les

auteurs supposent qu'il devient structuré lorsqu'il est lié à son récepteur (figure 2.21.B) [Song *et al.*, 2012].

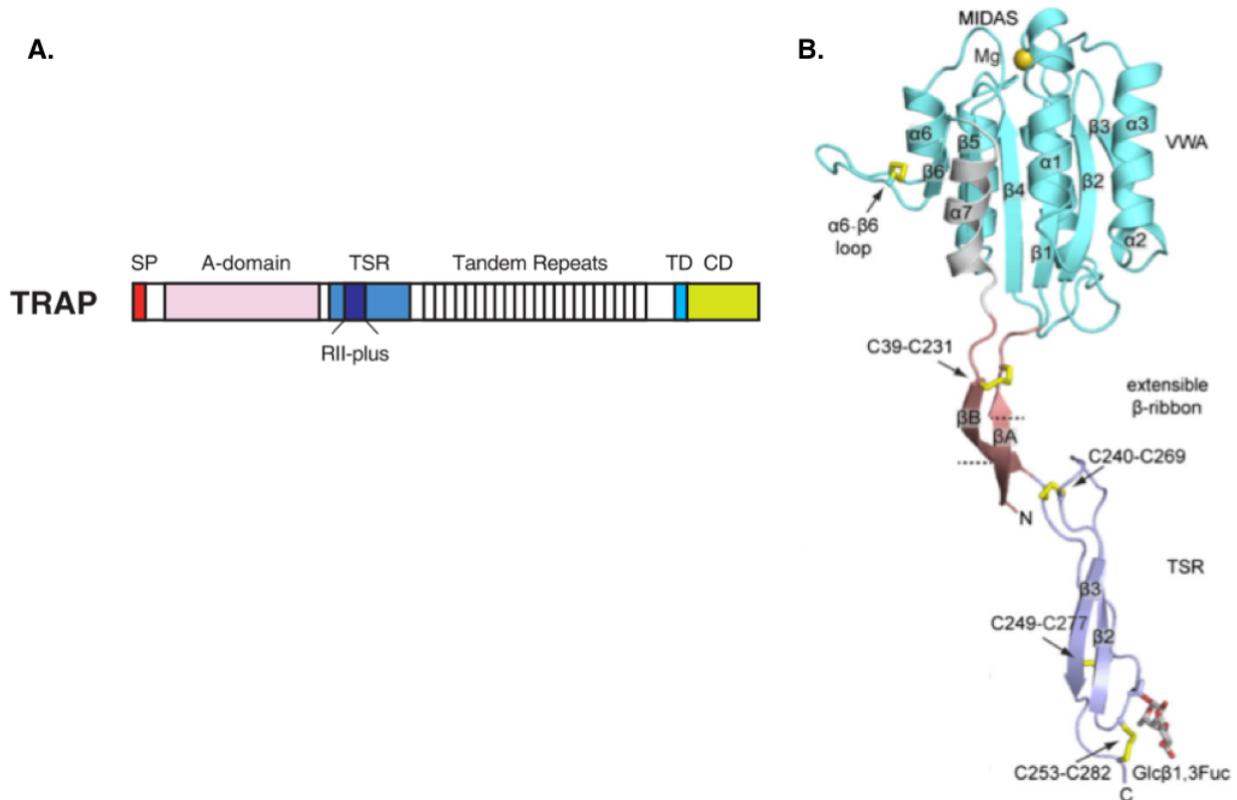


FIGURE 2.21 | Organisation structurale de la protéine TRAP [Kappe *et al.*, 2004b]. SP : signal peptide; A-domain : vWA domaine; TSR : thrombospondine type I repeat domain; R11-plus : région II-plus; TD : transmembrane domaine; CD : cytoplasmique domaine.

TRAP est observée par immunofluorescence et immunoblot dans les micronèmes et à la surface des sporozoïtes y compris lorsqu'ils sont stockés dans les glandes salivaires [Rogers *et al.*, 1992a; Cowan *et al.*, 1992; Robson *et al.*, 1995]. Une étude récente de protéomique confirme sa localisation au niveau membranaire chez le sporozoïte [Swearingen *et al.*, 2016].

La présence de TRAP à la surface des sporozoïtes est nécessaire à la motilité et à l'invasion des glandes salivaires et des hépatocytes [Sultan *et al.*, 1997; Wengelnik *et al.*, 1999; Münter *et al.*, 2009]. En effet la protéine recombinante de TRAP est capable de se fixer du côté basolatéral des hépatocytes dans l'espace de Disse [Muller *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1995]. De plus, l'invasion des hépatocytes est inhibée en présence d'anticorps anti-TRAP [Rogers *et al.*, 1992a; Muller *et al.*, 1993].

La région TSR interagit avec des glycoconjugués sulfatés [Muller *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1995]. Sa délétion conduit à une perte de mouvement, elle est donc impliquée dans la motilité du sporozoïte [Wengelnik *et al.*, 1999].

La région vWA joue un rôle lors de l'invasion des glandes salivaires du moustiques, ainsi chez *Plasmodium berghei* les parasites délétères pour cette région sont motiles mais n'envahissent pas les glandes salivaires [Wengelnik *et al.*, 1999; Matuschewski *et al.*, 2002a]. L'adhérence aux glandes salivaires se fait via la protéine saglin [Ghosh *et al.*, 2009].

La région cytoplasmique de TRAP est liée au moteur à actine via une aldolase ou plus probablement une protéine GAC (*glideosome-associated connector*), comme cela a été montré chez *Toxoplasma* [Jacot *et al.*, 2016], et permet le mouvement (figure 2.3) [Kappe *et al.*, 1999; Buscaglia *et al.*, 2003; Jewett et Sibley, 2003; Bosch *et al.*, 2007; Nemetski *et al.*, 2015].

TRSP : la *Thrombospondin-related sporozoite protein* est impliquée dans l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes

TRSP a été identifiée en 2004 lors d'une étude transcriptomique chez *Plasmodium yoelii* [Kaiser *et al.*, 2004]. La protéine TRSP est encodée par un gène possédant deux introns. Elle est composée de 163 acides aminés pour un poids moléculaire de 20 kDa. TRSP possède un peptide signal de sécrétion, un domaine TSR ainsi qu'un domaine transmembranaire en C-terminal terminé par une petite région cytoplasmique (figure 4.4) [Labaied *et al.*, 2007].

TRSP est exprimée chez les oocystes et les sporozoïtes présents dans les glandes salivaires. La protéine semble localisée au niveau des rhoptries [Kaiser *et al.*, 2004].

La délétion de TRSP chez *Plasmodium berghei* n'a pas d'effet sur la motilité du sporozoïte mais affecte *in vitro* l'invasion des hépatocytes par les parasites. Ce défaut est confirmé *in vivo* par un délai entre l'injection des sporozoïtes et le développement d'une parasitémie plus long chez le parasite mutant que chez le sauvage. Les parasites qui arrivent à entrer dans les hépatocytes sont capables d'établir une vacuole parasitophore et se développent normalement [Labaied *et al.*, 2007].

TLP : la *Trap-like protein* a un rôle controversé chez les sporozoïtes

La séquence de la protéine TLP a été identifiée tardivement grâce à des puces à ADN [Hayward *et al.*, 2000]. C'est une protéine de 1 371 acides aminés pour 160 kDa chez *Plasmodium falciparum*. Elle est composée d'un peptide signal de sécrétion puis un domaine TSR encadré de chaque côté par un domaine vWA (*von Willebrand factor A*) et elle possède en C-terminal un domaine transmembranaire (figure 4.4).

TLP est transcrite essentiellement chez les sporozoïtes des glandes salivaires, mais des traces de transcripts sont également retrouvées au niveau des gamétocytes et des sporozoïtes immatures de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium berghei* [Moreira *et al.*, 2008]. D'après une autre étude de transcriptomique la protéine TLP serait exprimée dès le stade de schizonte [Heiss *et al.*, 2008].

La délétion de TLP chez *Plasmodium berghei* ne présente pas de variation de phénotype comparé aux parasites sauvages [Heiss *et al.*, 2008]. Une seconde étude de la délétion de TLP chez *Plasmodium berghei* présente des résultats différents. La délétion n'a pas d'effet au stade sanguin. Mais *in vivo*, les sporozoïtes délétères pour TLP sont moins infectieux que les parasites sauvages. *In vitro*, leur motilité et leur capacité à infecter les cellules ne sont pas affectées, mais les mutants présentent un défaut lors de la traversée cellulaire. Ainsi TLP jouerait un rôle dans la traversée des barrières cellulaires lors de la migration du sporozoïte vers les hépatocytes [Moreira *et al.*, 2008].

TREP : la *TRAP-related protein* impliquée dans la motilité du sporozoïte et l'invasion des glandes salivaires

La protéine TREP a été identifiée chez *Plasmodium yoelii* lors d'une étude de transcriptomique comparant les transcrits des sporozoïtes présents dans les glandes salivaires à ceux présents chez les parasites au stade sanguin [Kaiser *et al.*, 2004]. Initialement appelée S6 pour *sporozoïte-specific gene 6* elle est aujourd'hui nommée TREP pour *TRAP-related protein*. Son gène possède un intron et code une protéine de 3 543 acides aminés pour 413 kDa chez *Plasmodium falciparum*, tandis qu'elle ne fait que 2 195 acides aminés chez *Plasmodium berghei*. Cette différence est due à des régions de répétitions plus courtes chez le parasite de rongeur. TREP possède un peptide signal de sécrétion ainsi qu'un domaine TSR en N-terminal. Sa séquence est ensuite composée de trois grandes régions de répétitions et se termine par un domaine transmembranaire prolongé par une petite région cytoplasmique (figure 4.4).

Il a été montré par RT-PCR que TREP est essentiellement exprimée chez les sporozoïtes aux stades précoces, avant l'invasion des glandes salivaires [Combe *et al.*, 2009; Steinbuechel et Matuschewski,

2009]. Une étude d'immunofluorescence a permis de localiser la protéine à la surface des sporozoïtes [Steinbuechel et Matuschewski, 2009].

Les parasites délétés pour TREP présentent un défaut d'invasion des glandes salivaires et s'accumulent alors dans l'hémolymphe. Ils présentent également une forte réduction de leur motilité. Bien que l'étude de l'invasion des hépatocytes soit limitée par le nombre de sporozoïtes Δ TREP collectés dans les glandes salivaires, il semble que l'infection des hépatocytes par ces parasites soit réduite [Combe *et al.*, 2009; Steinbuechel et Matuschewski, 2009].

SPATR : la *Secreted protein with altered thrombospondin repeat domain* est exprimée aux stades hépatiques et érythrocytaires

SPATR a été annotée lors du séquençage du chromosome 2 en 1998 [Gardner *et al.*, 1998]. Son gène possède un intron et code une protéine de 250 acides aminés pour 29 kDa. Elle est composée d'un signal peptide de sécrétion, d'un domaine EGF (*Epidermal Growth Factor*) ainsi que de domaines TSR dégénérés (figure 4.4).

La présence de transcrits de SPATR a été détectée chez les sporozoïtes et les parasites présents au stade sanguin de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium knowlesi* [Chattopadhyay *et al.*, 2003; Mahajan *et al.*, 2005]. L'utilisation d'anticorps ciblant SPATR a confirmé l'expression de la protéine à tous ces stades avec notamment une expression plus forte chez le sporozoïte [Chattopadhyay *et al.*, 2003]. Chez le sporozoïte, SPATR est présentée à la surface membranaire et est absente de ses organites, tandis qu'au stade de schizonte érythrocytaire, elle est détectée autour des rhoptries et plus faiblement autour de la membrane du globule rouge infecté [Chattopadhyay *et al.*, 2003].

Les protéines recombinantes de SPATR de *Plasmodium falciparum* ou de *Plasmodium knowlesi* sont capables de se fixer de façon spécifique aux cellules HepG2, et des anticorps anti-SPATR inhibent l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium falciparum*. Les protéines SPATR de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium knowlesi* sont reconnues respectivement par des sérums d'africains naturellement immunisés mais pas par des donneurs non-immuns et par le sérum de singes ou d'hommes infectés par *Plasmodium knowlesi* [Chattopadhyay *et al.*, 2003; Mahajan *et al.*, 2005; Palaeya *et al.*, 2013].

SSP3 : la *Surface sporozoïte protein 3* et la motilité du sporozoïte

Initialement identifiée en 2004 lors d'une étude de transcriptomique des sporozoïtes de *Plasmodium yoelii* [Kaiser *et al.*, 2004], SSP3 est une protéine de 461 acides aminés et 54 kDa. Elle possède un signal peptide de sécrétion et du côté C-terminal, un domaine TSR suivi d'un domaine transmembranaire et d'une région cytoplasmique (figure 4.4). Elle possède 13 cystéines, et bien que Harupa *et al.* suggèrent qu'elle appartienne à la famille des 6 cystéines [Harupa *et al.*, 2014], le domaine typique de la famille n'est pas présent.

L'étude de la protéine SSP3 tagguée avec l'hémagglutinine et myc ainsi que l'analyse par microscopie immunoélectronique montre que SSP3 est localisée à la surface des sporozoïtes et est absente au stade sanguin [Harupa *et al.*, 2014]; ceci est confirmé par des études protéomiques [Lindner *et al.*, 2013; Swearingen *et al.*, 2016].

La délétion de SSP3 n'a pas d'impact sur la sporogonie, la libération des sporozoïtes et la migration jusqu'aux glandes salivaires. Mais la motilité des parasites mutants est affectée. Ce défaut n'a néanmoins pas d'impact sur la capacité du parasite à traverser les cellules et envahir les hépatocytes [Harupa *et al.*, 2014].

TRP1 : la *Thrombospondin-related protein 1* est impliquée dans la libération des sporozoïtes des oocystes

TRP1 est le dernier membre de la famille des protéines à domaine TSR à avoir été identifié chez *Plasmodium* [Klug et Frischknecht, 2017]. C'est une protéine de 924 acides aminés et 111 kDa chez *Plasmodium falciparum*. Elle est conservée parmi les espèces plamodiales et présente une région particulièrement conservée en C-terminal incluant le domaine TSR. TRP1 possède un peptide signal de sécrétion, un domaine TSR et un domaine transmembranaire suivi d'une petite région cytoplasmique qui contrairement aux autres protéines à domaine TSR ne possède pas de tryptophane à la fin de sa séquence (figure 4.4). Le domaine TSR de TRP1 est très conservé parmi les différentes espèces de *Plasmodium*, mais en comparaison aux autres protéines TSR son domaine possède une insertion de 10 acides aminés (figure 2.22) [Klug et Frischknecht, 2017].

Pb TRP1		FSSWSDWSECT-KSCL	X ₁₀	KRTRF
Pb TRAMP		YTEWGEWSOCT-MECN	X ₅	IRERR
Tg MIC2	1st	CSDWSAWSPCS-VSCG	X ₄	IRTRT
Pb TRAP		CGKWEWSECS-TTCD	X ₄	IRKRK
Pb CTRP	1st	CSEWGEWSACPQLSCL	X ₄	KRERK
Pb TLP		CNDWDDWTACT-TTCD	X ₄	YRORT
Pb CSP		DSITTEEWSQCN-VTCG	X ₂	IRVRK
Pb S6		YNDWSDWF----GSCE	X ₀	FRORR

FIGURE 2.22 | Alignement des domaines TSR [Klug et Frischknecht, 2017].

Les oocystes des parasites délétés pour TRP1 se développent normalement mais les sporozoïtes ne sont pas capables de sortir et d'infecter les glandes salivaires. Chez les parasites sauvages, les sporozoïtes deviennent motiles dans l'oocystes avant de se libérer. Ce n'est pas le cas des parasites Δ TRP1 qui ne sont pas motiles dans les oocystes, mais qui sont capables de motilité lorsqu'ils sont isolés. TRP1 joue probablement un rôle dans l'activation de la motilité des sporozoïtes avant leur libération des oocystes [Klug et Frischknecht, 2017].

MTRAP : la protéine *Mérozoïte-TRAP* joue un rôle lors de la libération des gamètes

MTRAP a été identifiée en 2006, lors d'une recherche par alignement de séquences [Baum *et al.*, 2006]. Son gène ne possède pas d'intron et code une protéine de 498 acides aminés pour 58 kDa chez *Plasmodium falciparum*. Elle possède une structure proche de TRAP, avec un peptide signal, un domaine TSR suivi d'un domaine vWA puis du côté C-terminal un domaine transmembranaire et une région cytoplasmique comportant un tryptophane dans la région terminale (figure 4.4).

MTRAP est stockée au niveau des micronèmes des mérozoïtes avant d'être libérée lors de l'invasion des érythrocytes. Elle se retrouve alors à la surface des mérozoïtes et est protéolysée. Elle serait impliquée dans la motilité des parasites et l'invasion des cellules hôtes [Baum *et al.*, 2006]. La région C terminale de MTRAP interagit avec une aldolase et permet la polymérisation de l'actine [Diaz *et al.*, 2014, 2016]. Une étude biochimique a identifié la protéine sémaphorine comme ligand de l'ectodomaine de MTRAP à la surface des érythrocytes. Cette interaction met en jeu deux monomères de MTRAP qui interagissent avec le domaine Sema de la sémaphorine via leurs domaines TSR [Bartholdson *et al.*, 2012].

Une récente étude de la localisation de MTRAP remet en cause toutes ces études et suggère que la protéine ne soit pas impliquée dans l'invasion des mérozoïtes [Riglar *et al.*, 2016]. Ceci est confirmé par l'utilisation de mutants déficients pour MTRAP capables de se développer dans les érythrocytes [Bargieri *et al.*, 2016]. MTRAP semble plutôt impliquée dans la libération des gamètes des globules rouges, et donc dans la transmission au moustique [Bargieri *et al.*, 2016; Kehrer *et al.*, 2016]. En effet, MTRAP est nécessaire à la rupture de la vacuole parasitophore contenant les gamètes [Bargieri *et al.*, 2016].

TRAMP : la *Thrombospondin-related apical membrane protein*, protéine de rhoptries impliquée lors de l'invasion des érythrocytes

TRAMP a été identifiée en 2004 lors d'une recherche de protéines possédant le motif TSR chez *Plasmodium* [Thompson *et al.*, 2004]. C'est une protéine de 352 acides aminés et 41 kDa. Elle se compose d'un peptide signal en N-terminal, d'un domaine TSR côté C-terminal et elle se termine par un domaine transmembranaire et une région cytoplasmique (figure 4.4). TRAMP existe sous forme dimérisée [Siddiqui *et al.*, 2013].

Des transcrits de TRAMP ont été détectés au stade érythrocytaire chez les schizontes et les mérozoïtes [Thompson *et al.*, 2004; Siddiqui *et al.*, 2013]. Il a été montré par immunofluorescence que TRAMP est stockée au niveau du bulbe des rhoptries [Siddiqui *et al.*, 2013]. L'adhérence de la protéine EBA175 à son récepteur érythrocytaire la glycophorine A déclenche la sécrétion de TRAMP [Siddiqui *et al.*, 2013]. TRAMP est alors exposée à la surface des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* lors de l'invasion [Thompson *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2006; Mongui *et al.*, 2010; Siddiqui *et al.*, 2013].

La protéine TRAMP native ou recombinante se lie aux érythrocytes même s'ils ont été traités préalablement à la neuraminidase, la trypsine ou la chymotrypsine. De plus, des anticorps anti-TRAMP bloquent l'invasion des globules rouges par *Plasmodium falciparum*, ce qui suggère un rôle important de TRAMP lors de l'invasion érythrocytaire [Siddiqui *et al.*, 2013]. TRAMP subit un clivage par PfsUB2 entre son site TSR et son domaine transmembranaire une fois l'invasion réalisée [Green *et al.*, 2006].

CTRP : la *Circumsporozoite-and TRAP-related protein* est nécessaire au développement de l'ookinète en oocyste

CTRP a été étudiée pour la première fois en 1995, en tant que protéine partageant des motifs communs avec la CSP et TRAP [Trottein *et al.*, 1995]. C'est une protéine sans intron de 2 114 acides aminés pour un poids moléculaire de 238 kDa. Elle est composée d'un peptide signal, suivi de six domaines vWA et de sept domaines TSR, dont quatre sont conservés et trois dégénérés; enfin la protéine possède en C-terminal un domaine transmembranaire suivi d'une région cytoplasmique contenant un tryptophane (figure 4.4).

La présence de transcrits de CTRP n'est pas détectée aux stades hépatique et érythrocytaire. La transcription débute faiblement 10 heures après l'activation des gamétocytes et augmente progressivement pour atteindre un pic au stade d'ookinète chez *Plasmodium falciparum* [Templeton *et al.*, 2000]. Une étude de microscopie électronique a montré que chez *Plasmodium berghei* la protéine CTRP est localisée dans les micronèmes avant d'être sécrétée à la surface de l'ookinète où elle est abondante au site de contact avec la lame basale [Limviroj *et al.*, 2002]. L'expression de CTRP se fait également au stade ookinète au niveau de la région apicale chez *Plasmodium vivax* et *Plasmodium yoelii* [Kaneko *et al.*, 2006].

Les mutants délétés pour CTRP chez *Plasmodium falciparum* ou *Plasmodium berghei* sont capables de se développer normalement en ookinètes mais présentent un défaut de motilité et ne forment pas d'oocystes [Dessens *et al.*, 1999; Yuda *et al.*, 1999; Templeton *et al.*, 2000]. Ceci suggère un rôle de CTRP dans la transition de l'ookinète vers l'oocyste.

Il a également été montré que la protéine CTRP est capable d'interagir avec la lame basale de l'épithélium intestinal des moustiques via le collagène [Arrighi et Hurd, 2002] et la laminine [Mahairaki *et al.*, 2005].

Les parasites exprimant les domaines TSR mais pas les domaines vWA sont capables de se développer en oocystes, tandis que les parasites n'exprimant pas les domaines TSR mais possédant les domaines vWA ne forment pas d'oocystes, ne sont pas motiles et ne s'associent pas à l'épithélium intestinal

des moustiques [Ramakrishnan *et al.*, 2011]. Ainsi les domaines TSR semblent nécessaires au bon développement du parasite en oocyste.

Récapitulatif sur les protéines à domaine TSR de *Plasmodium*

- Le domaine TSR est composé de trois brins antiparallèles, une région non structurée et deux brins β .
- Tableau récapitulatif des protéines à domaines TSR de *Plasmodium falciparum*

Nom	Taille	Domaines					Stade	Phénotype
		TSR	vWA	SP	TM	GPI		
CSP	40 kDa	1	-	1	-	1	Spz	développement spz et adhérence
TRAP	65 kDa	1	1	1	1	-	Spz	motilité, invasion GS et hépatocytes
TRSP	20 kDa	1	-	1	1	-	Spz	invasion hépatocytes
TLP	160 kDa	1	2	1	1	-	Spz	traversée cellulaire
TREP	413 kDa	1	-	1	1	-	Spz	invasion des glandes salivaires
SPATR	29 kDa	1	-	1	-	-	Spz/Ssang	invasion hépatocytes
SSP3	54 kDa	1	-	1	1	-	Spz	motilité
TRP1	111 kDa	1	-	1	1	-	Ooc/Spz	motilité
MTRAP	58 kDa	1	1	1	1	-	Ssang	libération des gamètes
TRAMP	41 kDa	1	-	1	1	-	Ssang	invasion érythrocytaire
CTRP	238 kDa	7	6	1	1	-	Ook	formation oocyste

Spz: sporozoïte; Ssang: stade sanguin; Ooc: oocyste; Ook: ookinète; GS: glandes salivaires.

2.3.2 Les protéines à domaines 6-cystéines

Le domaine à 6-cystéines (également appelé domaine s48/45) a été identifié il y a une vingtaine d'années à partir des protéines Pfs230, Pf12 et Pfs48/45 [Williamson *et al.*, 1993; Carter *et al.*, 1995]. En 1995, Carter identifie des motifs et associe les cystéines par paire : Cys1-Cys2, Cys3-Cys6, Cys4-Cys5. Le domaine est stabilisé par 3 ponts disulfures (figure 2.23.B).

Initialement, le domaine était prédit pour adopter un repliement similaire à celui du domaine SRS (*Sag1 Related Sequence*) bien qu'il partage moins de 10% d'homologie de séquence [Gerloff *et al.*, 2005]. La famille SRS possède plus de 180 gènes exprimés tout au long du cycle de vie de *Toxoplasma* dont la protéine de surface Sag1. Comme pour les protéines à 6 cystéines, les protéines du domaine SRS sont généralement organisées en tandem [Jung *et al.*, 2004]. La résolution de structure du domaine 2 de Pf12 confirme un repliement proche mais distinct du domaine SRS (figure 2.23.C) [Arredondo *et al.*, 2012]. En effet, les deux domaines adoptent une structure tertiaire de sandwich β composés de brins parallèles et anti-parallèles qui les séparent des immunoglobulines aux brins uniquement anti-parallèles. Néanmoins, on ne peut considérer ce domaine comme un domaine SRS, car l'arrangement des ponts disulfures est différent. Le domaine SRS est caractérisé par des liaisons Cys1-Cys6, Cys2-Cys5 et Cys3-Cys4, tandis que le domaine à 6 cystéines possède un arrangement Cys1-Cys2, Cys3-Cys6, Cys4-Cys5.

La structure du domaine à 6 cystéines de P12 est considérée comme l'archétype de la famille. Elle comprend 3 feuillets β et une courte hélice α (figure 2.23.C). Un premier feuillet est composé de cinq brins ($\beta_2, \beta_1, \beta_4, \beta_9, \beta_8$), le second en comporte quatre ($\beta_3, \beta_{11}, \beta_{10}, \beta_5$) et le dernier n'en contient que deux (β_6, β_7). Le pont disulfure A (Cys1-Cys2) relie les feuillets A et B via les brins β_1 et β_3 . Le pont disulfure B fait également la liaison entre les feuillets A et B cette fois-ci en liant les brins β_4 et β_{10} . Le pont disulfure C quant à lui relie la boucle entre les brins β_5 et β_6 au brin β_{10} du même feuillet B.

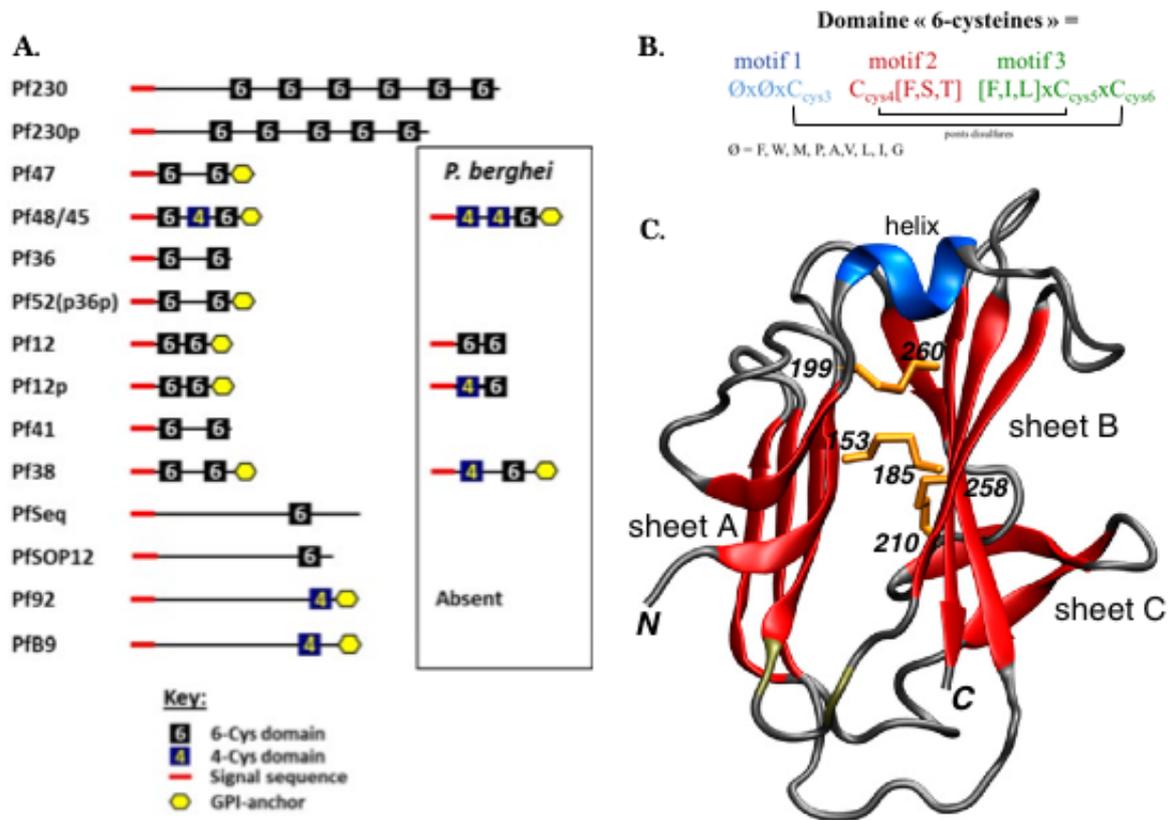


FIGURE 2.23 | Le domaine à 6 cystéines et ses protéines chez *Plasmodium*. A. Représentation schématique des protéines à domaine 6 cystéines de *Plasmodium falciparum* comparées à celles de *Plasmodium berghei*. Les peptides de sécrétion sont indiqués en rouge, les ancres GPI en jaune et les domaines à 6 cystéines en noir, ceux à 4 cystéines en bleu [Annoura *et al.*, 2012]. B. Représentation des motifs impliquant les 4 dernières cystéines du domaine et leurs ponts disulfures. C. Structure du domaine 2 de 12 de *Plasmodium falciparum*. Les brins β sont représentés en rouge, l'hélice α en bleu et les ponts disulfures entre Cys153-Cys185, Cys199-Cys260, and Cys210-Cys258 en jaune [Arredondo *et al.*, 2012].

On retrouve ce repliement pour la structure de Pf12 (figure 2.30) [Tonkin *et al.*, 2013] et Pf41 (figure 2.33) [Parker *et al.*, 2015]. Chez *Plasmodium*, les protéines de la famille 6-cystéines, possèdent un à six domaines à 6-cystéines ainsi qu'un peptide signal et pour la majorité d'entre elles une séquence d'ancrage GPI (figure 2.23.A).

Le domaine à 6 cystéines bien que majoritairement présent chez *Plasmodium* est également présent chez d'autres Apicomplexes. Le domaine est présent dans 1 protéine de *Cytosoon felis*, 1 protéine de *Theileria equi* et pour le genre *Babesia* on retrouve 27 gènes exprimés chez *B. bigemina*, 3 chez *B. bovis* et 1 chez *B. microti* [Finn *et al.*, 2016; Aurrecochea *et al.*, 2017].

Chez *Plasmodium*, la famille des protéines à domaine 6-cystéines (6-Cys) est constituée de 14 membres identifiés à ce jour (figure 2.23.A). Ceux-ci s'expriment tout au long du cycle de vie de *Plasmodium*, avec au stade sporozoïte P36, P52, P12p, B9 et P38, au stade hépatique B9 et LISP2, au stade érythrocytaire P12p, P12, P41, P38, P92 et au stade sexué P48/45, P230, P230p, P47, P38 et PSOP12 (figure 2.24). Ces protéines sont majoritairement localisées à la surface du parasite la plupart via un ancrage par glycosylphosphatidylinositol (GPI). P36 et P52 jouent un rôle dans l'invasion des hépatocytes par le sporozoïte. B9 est impliquée dans le maintien de la vacuole parasitophore et LISP2 dans la schizogonie hépatique. P12, P41 et P38 forment un complexe à la surface des mérozoïtes. P48/45, P230 et P47 sont impliquées dans la fusion des gamètes mâle et femelle aboutissant à la formation du zygote dans l'appareil digestif du moustique. P230 joue aussi un rôle dans l'exflagellation du gamète mâle.

par western blot et immunofluorescence détecte l'expression de P36 dans les sporozoïtes des glandes salivaires mais pas dans les sporozoïtes des oocystes [Ishino *et al.*, 2005].

Les parasites déléétés pour P36 ne présentent aucun défaut de multiplication au stade sanguin ou de développement chez le moustique [Ishino *et al.*, 2005; Labaied *et al.*, 2007; VanBuskirk *et al.*, 2009]. Cependant chez *Plasmodium berghei* la délétion de P36 conduit à de très faibles taux d'infection chez la souris comparés au parasite sauvage [Ishino *et al.*, 2005]. Ces mutants sont en effet incapables d'envahir les hépatocytes de façon productive. Ils sont pour la majorité bloqués avant leur entrée dans l'hépatocyte ou, pour le peu de parasites arrivant dans les hépatocytes, arrêtés dans leur développement [Ishino *et al.*, 2005]. Chez les sporozoïtes n'arrivant pas à envahir les hépatocytes, on remarque une augmentation de l'activité de traversée cellulaire [Ishino *et al.*, 2005]. Chez *Plasmodium falciparum*, l'absence de P36 n'impacte pas l'invasion des hépatocytes mais provoque un arrêt précoce dans leur développement [VanBuskirk *et al.*, 2009].

P52 : une protéine de la surface des sporozoïtes impliquée dans l'invasion des hépatocytes

Également nommée P36p pour paralogue de P36, la protéine P52 a été identifiée en 2001 lors d'une étude transcriptomique [Kappe *et al.*, 2001] et lors d'une étude de génomique comparative [Thompson *et al.*, 2001]. Chez *Plasmodium falciparum*, son gène est situé sur le chromosome 4 en tandem avec P36 et ne possède pas d'intron. Il code une protéine de 478 acides aminés et 56 kDa. Elle se compose en C-terminal d'un peptide signal de sécrétion clivable suivi de deux domaines à 6 cystéines et en C-terminal d'une ancre GPI (figure 2.26).

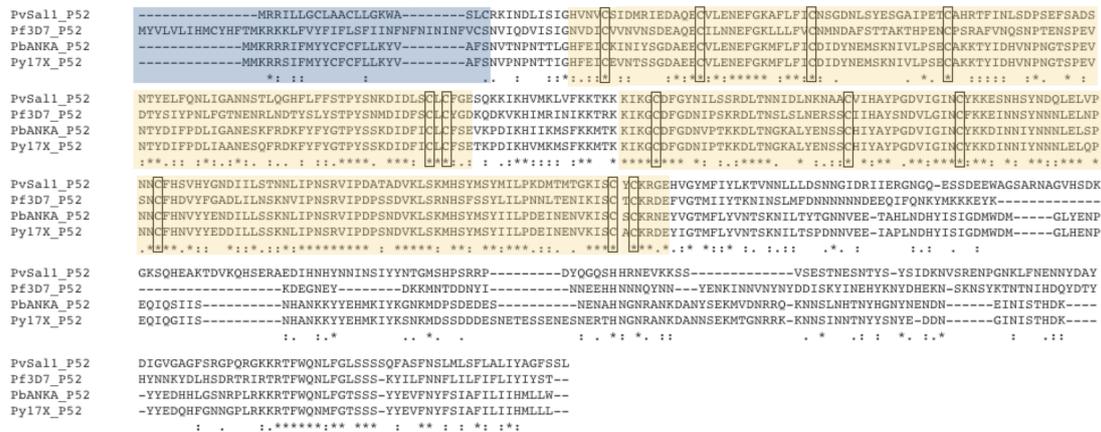


FIGURE 2.26 | Alignement de la protéine P52 chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; encadré en noir : les cystéines conservées.

Les données de transcriptomiques et de protéomiques chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* montrent que P52 est exprimée uniquement au stade sporozoïte [Kappe *et al.*, 2001; Le Roch *et al.*, 2003; Ishino *et al.*, 2005; Van Dijk *et al.*, 2005; Labaied *et al.*, 2007; Lasonder *et al.*, 2008; VanBuskirk *et al.*, 2009; Van Dijk *et al.*, 2010; Lindner *et al.*, 2013]. Alors que, par transcriptomique, Kappe et al. identifient les ARNm de la protéine à la fois chez les sporozoïtes présents dans les oocystes et les glandes salivaires [Kappe *et al.*, 2001], par Western blot, Ishino et al. ne trouvent la protéine exprimée que chez les sporozoïtes des glandes salivaires [Ishino *et al.*, 2005]. Les transcripts ne sont donc probablement traduits que chez les sporozoïtes matures.

L'immunofluorescence et la microscopie immunoélectronique ont mis en évidence la localisation de P52 au niveau des micronèmes [Ishino *et al.*, 2005]. Ainsi P52 serait stockée dans les micronèmes avant d'être sécrétée à la surface de la cellule où elle est insérée grâce à son ancre GPI.

Les mutants délétés pour P52 chez *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium berghei* ont un développement au stade sanguin et chez le moustique semblable aux parasites sauvages [Van Dijk *et al.*, 2005; Ishino *et al.*, 2005; Van Schaijk *et al.*, 2008; VanBuskirk *et al.*, 2009]. Ishino *et al.* identifient chez leurs mutants de *Plasmodium berghei* un défaut *in vivo* d'infectiosité en comparaison au parasite sauvage, et *in vitro* un problème d'invasion des hépatocytes et de développement intra-hépatocytaire [Ishino *et al.*, 2005]. D'autres études ont rapporté que la délétion de P52 est responsable d'un défaut de développement dans les hépatocytes pour *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium berghei* [Van Dijk *et al.*, 2005; Van Schaijk *et al.*, 2008; VanBuskirk *et al.*, 2009].

Les parasites *Plasmodium falciparum* doublement délétés pour P36 et p52 sont capables d'infecter les hépatocytes mais présentent un défaut de développement [VanBuskirk *et al.*, 2009]. Chez *Plasmodium yoelii* et *Plasmodium berghei*, cette double délétion conduit à la perte d'infectiosité chez la souris. Les sporozoïtes ne présentent pas de défaut de traversée cellulaire mais sont incapables d'établir ou de maintenir une vacuole parasitophore [Labaied *et al.*, 2007; Ploemen *et al.*, 2012; Annoura *et al.*, 2012].

En conclusion, le rôle joué par les protéines P36 et P52 n'est pas clairement établi. Ces protéines seraient, soit impliquées dans l'invasion hépatique, car Ishino *et al.* observent une réduction de l'infectiosité des sporozoïtes Pb Δ P36 ou Pb Δ P52 [Ishino *et al.*, 2005], soit nécessaires au développement à l'intérieur des hépatocytes, comme le suggèrent les études de Van Dijk *et al.* et Van Buskirk *et al.* [Van Dijk *et al.*, 2001; VanBuskirk *et al.*, 2009].

B9 : une protéine exprimée lors de l'invasion hépatique et importante pour l'intégrité de la vacuole parasitophore

B9 n'a été identifiée que tardivement grâce à un alignement itératif [Annoura *et al.*, 2014]. Sa séquence génomique possède un intron et code une protéine de 969 acides aminés pour 115 kDa chez *Plasmodium falciparum*. La protéine possède un peptide signal de sécrétion ainsi qu'une ancre GPI. Elle possède un unique domaine en C terminal qui n'est composé que de 4 cystéines (figure 2.27) [Annoura *et al.*, 2014].

L'utilisation de protéines taggées mCherry suggère que B9 est localisée au niveau de la membrane parasitaire lors de l'invasion des hépatocytes. Elle est détectée par IFA seulement cinq heures post-invasion bien que des transcrits soient détectés chez le sporozoïte avant infection [Annoura *et al.*, 2014]. Ces transcrits seraient donc réprimés jusqu'à ce que les sporozoïtes s'activent.

La délétion de B9 chez *Plasmodium berghei* ou *Plasmodium yoelii* induit une forte diminution de l'infectiosité chez la souris, seul 10 à 20% des souris développent un stade sanguin avec des temps d'incubation plus longs de 3 à 4 jours. Les sporozoïtes ne présentent pas de défaut d'invasion des hépatocytes, mais ils sont bloqués dans leur développement [Annoura *et al.*, 2014]. Les parasites de *Plasmodium falciparum* Δ B9 ne présentent pas de défaut de développement au stade sanguin ou chez le moustique. Ils sont capables d'envahir des hépatocytes humains primaires, mais disparaissent après 24 heures. Comme pour les parasites de rongeurs, la suppression de B9 provoque un arrêt dans le développement des parasites hépatocytaires [Annoura *et al.*, 2014]. Que ce soit les parasites interrompus dans leur développement ou ceux capables de former des mérozoïtes, aucun ne présente de vacuole parasitophore [Annoura *et al.*, 2014]. Ainsi B9 joue un rôle critique dans le développement du parasite au sein des hépatocytes et dans la formation ou le maintien de la vacuole parasitophore.

LISP2 est importante pour la schizogonie hépatique

La protéine LISP2 (*Liver Stage Specific Protein 2*) a été identifiée en 1991 à partir d'érythrocytes infectés et initialement nommée séquestrine [Ockenhouse *et al.*, 1991]. C'est une protéine de 1 964 acides aminés pour 234 kDa. Elle possède une large région centrale de répétitions d'environ 1 000 acides

Étude fonctionnelle et structurale des protéines d'invasion de *Plasmodium*



FIGURE 2.27 | Alignement de la protéine B9 chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; encadré en noir : les cystéines conservées.

aminés. Son appartenance à la famille des 6 cystéines n'a été reconnue que récemment [Annoura *et al.*, 2014]. LISP2 possède un peptide signal de sécrétion mais pas d'ancrage GPI. Certains décrivent LISP2 avec deux domaines à 6 cystéines [Arredondo *et al.*, 2012] : un premier domaine composé de 4 cystéines et le second avec 6 cystéines. Cependant il semble plus correct de ne définir qu'un domaine à 6 cystéines [Orito *et al.*, 2013; Annoura *et al.*, 2014]. En effet, la protéine ne comporte le motif Cys5-Cys6 qu'une seule fois dans sa séquence (figure 2.28). Parmi les orthologues de LISP2 chez *Plasmodium* la région la plus conservée contient le domaine à 6 cystéines, ce qui suggère un rôle important de ce domaine pour la fonction de LISP2 [Orito *et al.*, 2013].

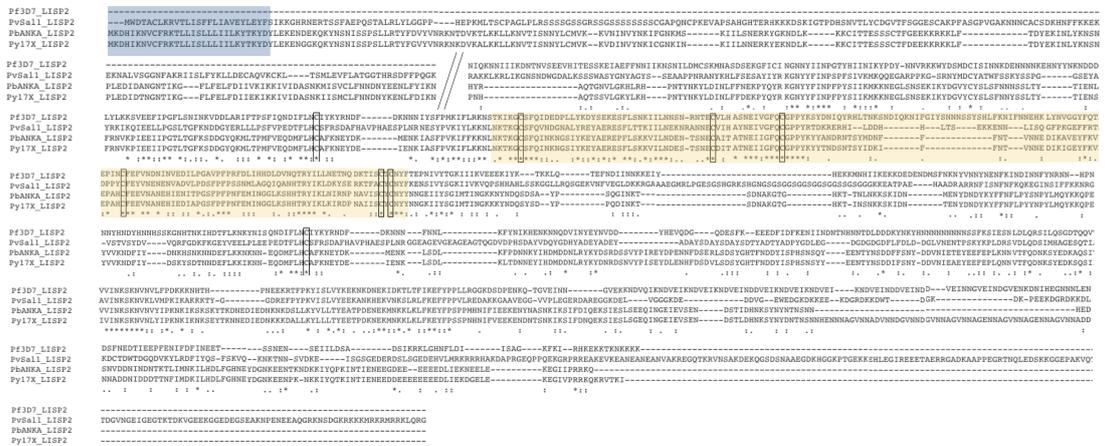


FIGURE 2.28 | Alignement de la protéine LISP2 chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. En bleu : peptide signal; en jaune : le domaine à 6 cystéines; encadré en noir : les cystéines conservées.

Initialement, LISP2 a été décrite présente à la surface des érythrocytes infectés et cytoadhérents, où elle interagit avec CD36 [Ockenhouse *et al.*, 1991]. Mais cette interaction n'a pas été confirmée depuis et le rôle de cette protéine au stade sanguin reste inconnu. Néanmoins des études récentes ont montré que LISP2 est exclusivement exprimée chez les sporozoïtes au stade hépatique [Helm *et al.*, 2010; Orito *et al.*, 2013; De Niz *et al.*, 2015]. Par immunofluorescence, il a été mis en évidence que LISP2 est transportée du réticulum endoplasmique vers la vacuole parasitophore où elle est ensuite exportée vers le cytoplasme et le noyau de la cellule hôte [Orito *et al.*, 2013; Itani *et al.*, 2014].

La délétion de LISP2 chez *Plasmodium berghei* réduit fortement l'infectiosité du parasite. Celui-ci n'induit de parasitémie que chez peu de souris et avec une phase d'incubation plus longue [Orito *et al.*, 2013; Annoura *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016]. Cette réduction est due à un problème lors de la division nucléaire au cours de la mérogonie qui aboutit à un défaut de libération des mérozoïtes [Orito *et al.*, 2013]. De plus, les parasites ΔLISP2 présentent *in vitro* une forte réduction de l'expression de la protéine MSP1 (*Merozoite Surface Protein 1*), qui est normalement exprimée à la fin de la schizogonie hépatique [Annoura *et al.*, 2014]. LISP2 joue un rôle dans la schizogonie des parasites hépatocytaires, mais de par sa sécrétion dans la cellule hôte, celle-ci doit également être impliquée dans des relations hôte-parasite.

P12 : une protéine exprimée à la surface des mérozoïtes

P12 a été découverte en 1990, en utilisant des sérums d'adultes ayant été exposés à *Plasmodium falciparum* pour cribler une banque de protéines de *Plasmodium falciparum* exprimées à la surface de cellules COS [Elliott *et al.*, 1990]. C'est une petite protéine de 347 acides aminés pour 39 kDa chez *Plasmodium falciparum*. Elle est conservée parmi les espèces plasmodiales. Elle possède deux domaines à 6 cystéines, encadrés en N-terminal par un peptide signal de sécrétion et en C-terminal par une ancre GPI (figure 2.29. Elle est considérée comme l'archétype structural de la famille des protéines à 6 cystéines [Williamson *et al.*, 1993; Carter *et al.*, 1995; Gerloff *et al.*, 2005]. Sa structure a été résolue en 2013 (figure 2.30.A) [Tonkin *et al.*, 2013]. Chez *Plasmodium falciparum*, P12 possède peu de polymorphismes, ce qui suggère un rôle important et une forte pression de sélection [Tonkin *et al.*, 2013].

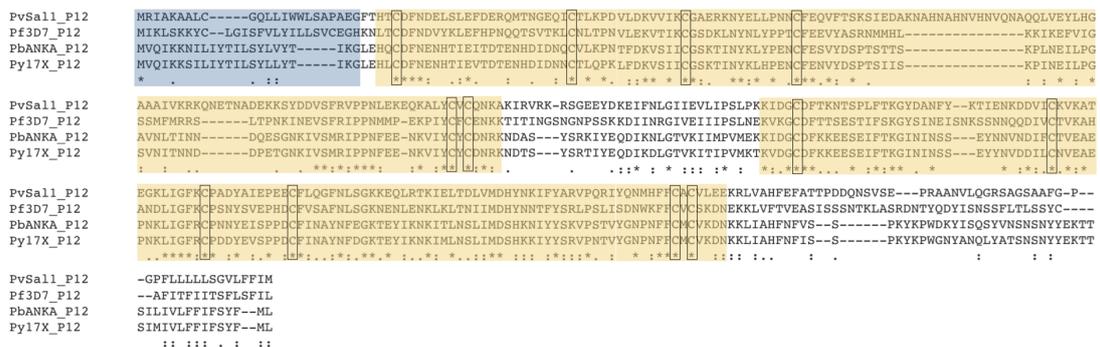


FIGURE 2.29 | Alignement de la protéine P12 chez Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium berghei et Plasmodium yoelii. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; encadré en noir : les cystéines conservées formant les domaines.

Des transcrits ont été détectés chez des schizontes matures, des sporozoïtes et des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium berghei* [Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2005; Gilson *et al.*, 2006; Van Dijk *et al.*, 2010]. L'expression n'a été confirmée par western blot pour les schizontes et mérozoïtes [Taechalerpaisarn *et al.*, 2012; Tonkin *et al.*, 2013]. Par immunofluorescence, P12 a été localisée à la surface des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*, plus particulièrement au niveau des rhoptries comme cela a été précisé par microscopie électronique et immunofluorescence [Sanders *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012; Taechalerpaisarn *et al.*, 2012; Moreno-pérez

et al., 2013; Tonkin *et al.*, 2013; Arredondo et Kappe, 2016]. Elle est également détectée dans le surnageant de culture de mérozoïtes sous une forme clivée, ce qui suggère qu'elle est libérée de la surface parasitaire par clivage protéolytique [Taechalertpaisarn *et al.*, 2012].

Bien que Garcia *et al.* utilisent des peptides synthétiques de P12 qui se fixent sur les érythrocytes et limitent l'invasion [García *et al.*, 2009], Taechalertpaisarn *et al.* ne trouvent pas d'interaction entre la protéine P12 recombinante ou native et les érythrocytes [Taechalertpaisarn *et al.*, 2012]. Des anticorps produits contre la protéine recombinante P12 ne permettent pas d'inhiber l'invasion [Taechalertpaisarn *et al.*, 2012]. Les mutants délétés pour P12 ne présentent pas de défaut d'invasion *in vitro*, et se développent comme les parasites sauvages [Taechalertpaisarn *et al.*, 2012].

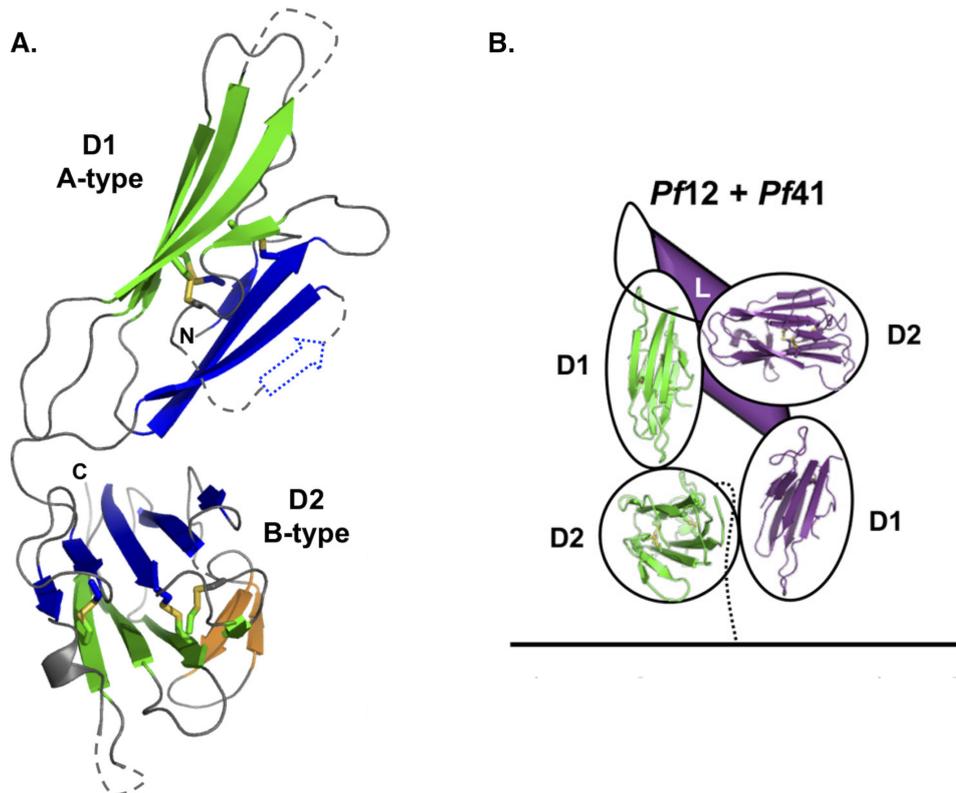


FIGURE 2.30 | Structure de la protéine P12 et représentation schématique de son interaction avec P41 [Tonkin *et al.*, 2013]. **A.** Structure de la protéine P12 de *Plasmodium falciparum*. Les feuillets β sont représentés en vert et en bleu et les ponts disulfures en jaune. Les lignes en pointillés indiquent les régions dont la structure a été modélisée. **B.** Représentation schématique de l'arrangement du complexe P12-P41 déduit à partir de données de co-immunoprécipitation. P12 est représentée en vert. P41 est en violet et sa région de liaison entre les deux domaines est représentée par un losange.

Par co-immunoprécipitation il a été montré chez *Plasmodium falciparum* que P12 interagit avec P41, ce qui a ensuite été confirmé par titrage calorimétrique isotherme [Taechalertpaisarn *et al.*, 2012; Tonkin *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2015]. Ces expériences suggèrent que le complexe P12-P41 suit un arrangement antiparallèle, c'est à dire que le domaine 1 de P12 interagit avec le domaine 2 de P41 et inversement (figure 2.30.B) [Tonkin *et al.*, 2013]. De plus, une troisième protéine, PVX_110945, a été identifiée comme appartenant à ce complexe [Hostetler *et al.*, 2015]. Bien que les structures de P12 et P41 aient été résolues pour *Plasmodium falciparum*, la fonction de ces protéines reste mal définie.

P12p : paralogue de P12 peu caractérisée

P12p est une protéine paralogue à P12 avec laquelle elle forme un tandem sur le chromosome 6 de *Plasmodium falciparum*. Son appartenance à la famille des protéines à 6 cystéines a été rapportée

en 2005 [Gerloff *et al.*, 2005]. C'est une protéine de 371 acides aminés pour 43 kDa. Comme son paralogue, P12p possède 2 domaines à 6 cystéines, ainsi qu'un peptide signal de sécrétion et une ancre GPI (figure 2.31).

Des transcrits de P12p ont été retrouvés au stade sanguin chez *Plasmodium falciparum* par puce à ADN et chez *Plasmodium berghei* par northern blot [Gilson *et al.*, 2006; Van Dijk *et al.*, 2010]. Et des données de spectrométrie de masse indiquent que P12p est également présente dans les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium yoelii* [Lasonder *et al.*, 2008; Lindner *et al.*, 2013].

La délétion de P12p chez *Plasmodium yoelii* ne présente aucun phénotype au cours du cycle de vie du parasite [Arredondo et Kappe, 2016].



FIGURE 2.31 | Alignement de la protéine P12p chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; en rouge : domaine transmembranaire; encadré en noir : les cystéines conservées formant les domaines.

P41 : une protéine associée à P12 à la surface des mérozoïtes

P41 a été identifiée comme membre de la famille des protéines à domaine 6 cystéines en même temps que P36 et P47 [Templeton et Kaslow, 1999]. C'est une protéine sans intron de 378 acides aminés pour 43 kDa chez *Plasmodium falciparum*. Elle possède un peptide signal de sécrétion et deux domaines à 6 cystéines qui sont séparés par une longue région de 125 acides aminés (figure 2.32). P41 ne possède pas d'ancre GPI, mais forme un complexe avec la protéine P12 (figure 2.30 et figure 2.33.C) [Taechalertpaisarn *et al.*, 2012; Tonkin *et al.*, 2013; Hostetler *et al.*, 2015; Parker *et al.*, 2015].



FIGURE 2.32 | Alignement de la protéine P41 chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; encadré en noir : les cystéines conservées formant les domaines.

L'expression et la localisation de P41 sont similaires à celles de P12. Des transcrits de P41 sont identifiés au niveau du stade sanguin chez *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* [Hall *et al.*, 2005; Angel *et al.*, 2008; Van Dijk *et al.*, 2010]. P41 est retrouvée dans le protéome de la surface des mérozoïtes et des anticorps anti-P41 localisent la protéine au niveau des organites apicaux des mérozoïtes libres et

de la membrane des érythrocytes infectés *Plasmodium falciparum* [Sanders *et al.*, 2005]. Cette localisation a été confirmée chez *Plasmodium vivax* avec l'utilisation d'anticorps anti-Pv41 [Angel *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2013].

Bien que Garcia *et al.* utilisent des peptides synthétiques de P41 capables de se fixer sur les érythrocytes et de limiter l'invasion [García *et al.*, 2009], Taechalertpaisarn *et al.* n'identifient pas d'interaction entre la protéine P41 et les érythrocytes [Taechalertpaisarn *et al.*, 2012]. L'utilisation d'anticorps produits contre la protéine P41 recombinante ne permet pas de bloquer l'invasion [Taechalertpaisarn *et al.*, 2012]. Enfin, la délétion de P41 n'a pas d'impact *in vitro* sur le développement du parasite au stade sanguin [Taechalertpaisarn *et al.*, 2012].

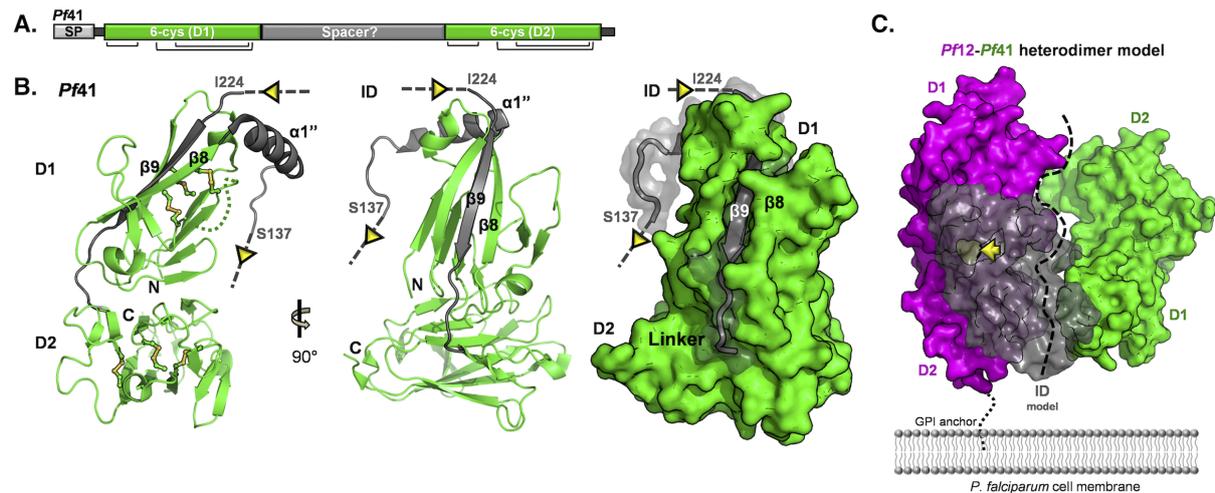


FIGURE 2.33 | Structure de la protéine P41 chez *Plasmodium falciparum* et modélisation de son interaction avec P12 (PDB : 4YS4) [Parker *et al.*, 2015]. A. Représentation de l'organisation des domaines de P41. Le signal peptide (SP) en gris clair, les deux domaines en vert avec les ponts disulfures représentés par des lignes noirs et la région d'interdomaine (ou *spacer*) en gris foncé. **B.** Structure de P41 de *Plasmodium falciparum*. Les domaines sont représentés en vert et les ponts disulfures en jaune. La région en gris foncé correspond à l'interdomaine dont la séquence n'est pas représentée entre les deux flèches jaunes. **C.** Représentation de l'interaction entre P12 en magenta et P41 en vert avec l'interdomaine en gris.

La structure des domaines à 6-cystéines de P41 a été résolue en 2015 et est proche de la conformation de P12 [Parker *et al.*, 2015]. Les domaines adoptent bien un repliement avec deux feuillets β se faisant face et reliés par trois ponts disulfures pour chaque domaine (figure 2.33.B). De plus, P41 possède une large région entre ses deux domaines appelée *spacer* ou ID (*inserted domain-like region*) (figure 2.33.A). D'après la modélisation réalisée par Parker *et al.* à partir de résultats de titration calorimétrique isotherme, cette région ID serait essentielle pour la liaison de P41 à P12 (figure 2.33.C) [Parker *et al.*, 2015].

P38 : protéine des stades sanguins sexués et asexués ainsi que du sporozoïte

P38 a été identifiée en même temps que P52 lors d'une étude de génomique comparative [Thompson *et al.*, 2001]. Situé sur le chromosome 5 de *Plasmodium falciparum*, son gène est sans intron et code une protéine de 349 acides aminés pour 40 kDa. P38 possède un peptide signal de sécrétion, 2 domaines à 6 cystéines dont le premier ne comporte que 4 cystéines et une ancre GPI en C terminal (figure 2.34).

D'après des études de transcriptomique et de protéomique, P38 est exprimée au stade sanguin et chez les sporozoïtes [Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Gilson *et al.*, 2006; Silvestrini *et al.*, 2010; Lindner *et al.*, 2013; Swearingen *et al.*, 2016]. Il a été montré par Northern blot que des transcrits de P38 sont présents au stade sanguin, y compris chez les gamétocytes [Thompson *et al.*, 2001; Van Dijk *et al.*, 2010]. Les protéines P38 de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* sont retrouvées dans les membranes résistantes aux détergents des mérozoïtes et schizontes matures et sont détectées

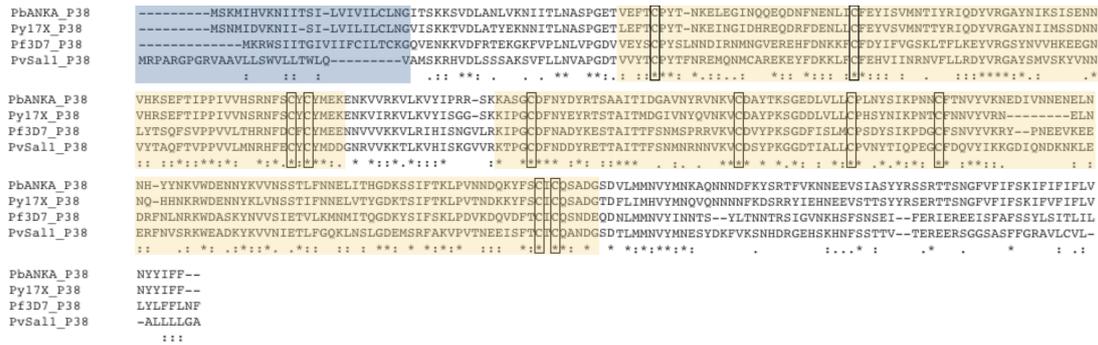


FIGURE 2.34 | Alignement de la protéine P38 chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; encadré en noir : les cystéines conservées formant les domaines.

à la surface des mérozoïtes par immunofluorescence [Sanders *et al.*, 2005, 2007; Gilson *et al.*, 2006; Mongui *et al.*, 2008; Feller *et al.*, 2013; Harupa, 2015]. De plus, P38 a été détectée par immunofluorescence également à la surface des gamétocytes, macrogamètes et zygotes [Feller *et al.*, 2013]. L'utilisation de P38 couplée à la GFP a permis de localiser la protéine au niveau apical des mérozoïtes [Sanders *et al.*, 2005] et le couplage de P38 à l'hémagglutinine a permis de la localiser au niveau des micronèmes des sporozoïtes de *Plasmodium yoelii*[Harupa, 2015]. Une étude protéomique a identifié P38 à la surface des sporozoïtes [Swearingen *et al.*, 2016].

L'utilisation d'anticorps produits à partir de peptides de P38 inhibent l'invasion des érythrocytes par *Plasmodium falciparum* [García *et al.*, 2009]. Les anticorps produits à partir de P38 recombinante limitent le développement de *Plasmodium falciparum* au stade sanguin et au stade zygotique [Feller *et al.*, 2013]. Cependant, les parasites *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* délétés pour P38 n'ont pas de phénotypes différents par rapport aux parasites sauvages [Van Dijk *et al.*, 2010; Harupa, 2015]. Récemment, il a été montré que P38 appartient à un complexe présent à la surface des mérozoïtes et mettant en jeu P38, P41, P12, GLURP, SERA5 et MSP1 (figure 2.35) [Paul *et al.*, 2017]. Ce complexe a été identifié par immunoprécipitation et les interactions ont été confirmées par ELISA, far western ou par résonance plasmon de surface. De plus, ce complexe est capable de se fixer aux globules rouges en interagissant directement avec la glycophorine A (figure 2.35) [Paul *et al.*, 2017].

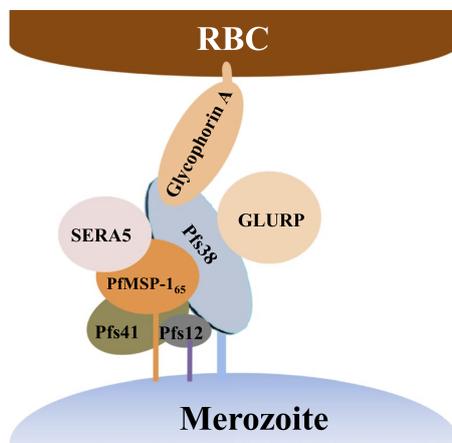


FIGURE 2.35 | Modèle du complexe protéique incluant P38 à la surface des érythrocytes [Paul *et al.*, 2017]. Modélisation basée sur les interactions protéine-protéine et protéine-érythrocyte.

P92 : protéine impliquée dans l'évasion immunitaire

P92 a été identifiée lors d'une étude protéomique sur les parasites du stade sanguin dont les membranes sont résistantes aux détergents [Sanders *et al.*, 2005]. C'est une protéine de 92 acides aminés pour un poids moléculaire de 92 kDa. C'est la seule protéine à domaine 6 cystéines qui ne possède pas d'orthologue chez les parasites de rongeurs (figure 2.36). P92 possède un peptide signal de sécrétion, un seul domaine à 4 cystéines en C terminal suivi d'une ancre GPI (figure 2.37).



FIGURE 2.36 | Alignement de la protéine P92 chez *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*. Les orthologues de P92 sont surlignés en jaune.

Des transcrits de P92 sont retrouvés dans les schizontes au stade sanguin [Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2005; Gilson *et al.*, 2006]. De plus, des études de protéomiques et de western blot ont mis en évidence l'expression de P92 chez les schizontes matures et les mérozoïtes [Sanders *et al.*, 2005, 2007; Gilson *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2016]. Le suivi par immunofluorescence de protéine P92 tagguée GFP a permis de déterminer la localisation de P92 au niveau de la membrane des mérozoïtes [Sanders *et al.*, 2005]. Une étude de protéomique identifie également des peptides de P92 dans les sporozoïtes dérivés des oocystes de *Plasmodium falciparum* [Lasonder *et al.*, 2008].

P92 est impliqué dans l'évasion immunitaire du parasite en interagissant avec le système du complément [Kennedy *et al.*, 2016]. Le système du complément est la première barrière de défense contre les pathogènes. Le facteur H est un régulateur négatif qui se lie aux récepteurs des cellules hôtes et les protège d'éventuelles activations anormales du complément qui provoqueraient une autodestruction. Les mérozoïtes de *Plasmodium* sont capables de recruter le facteur H et ainsi de se protéger du système du

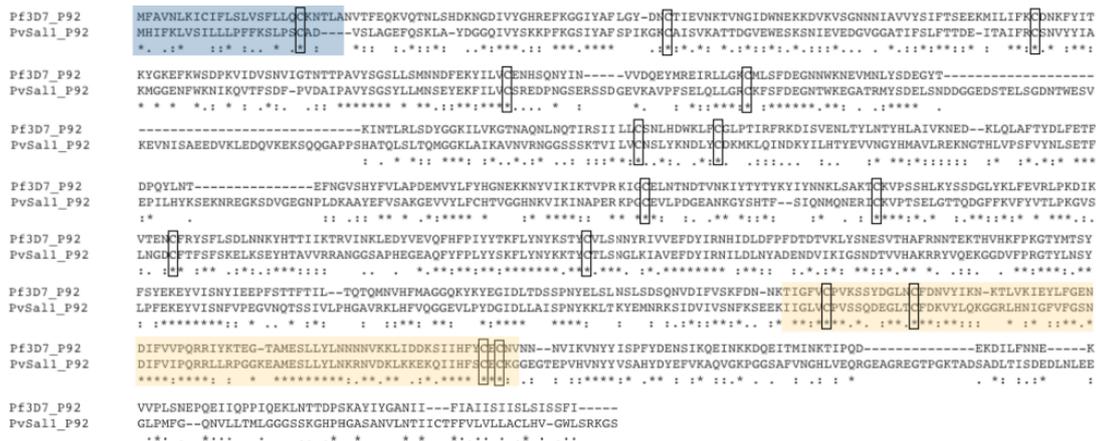


FIGURE 2.37 | Alignement de la protéine P92 chez *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; en rouge : domaine transmembranaire; encadré en noir : les cystéines conservées.

complément [Kennedy *et al.*, 2016]. Grâce à des expériences d’immunoprécipitation, P92 a été identifiée comme protéine de surface des mérozoïtes permettant le recrutement du facteur H [Kennedy *et al.*, 2016]. Ceci a été confirmé par la production de parasites déletés pour P92 qui deviennent alors incapables de fixer le facteur H [Kennedy *et al.*, 2016].

P230 : une protéine jouant un rôle important chez le gamète mâle

P230 a été identifiée chez *Plasmodium falciparum* par immunoprécipitation en utilisant des anticorps bloquant la transmission obtenus à partir de souris immunisées avec des gamètes [Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985]. Dix ans plus tard, son motif est identifié et elle devient le membre fondateur de la famille des protéines à 6 cystéines [Williamson *et al.*, 1993]. Elle est associée en tandem dans le génome avec la protéine P230p également membre de la famille 6 cystéines. C’est une grande protéine dont le gène ne possède pas d’intron et code une séquence de 3 135 acides aminés pour un poids moléculaire de 360 kDa. Lors de la gamétogenèse, P230 est clivée en amont de son premier domaine à 6 cystéines et il en résulte une protéine de 300 ou 307 kDa [Williamson *et al.*, 1996; Brooks et Williamson, 2000]. P230 est composée d’un peptide signal de sécrétion ainsi que de 6 domaines à 6 cystéines (figure 2.38) [Annoura *et al.*, 2014]. Elle a également été décrite comme possédant 14 domaines à 6 cystéines dont certains composés uniquement de deux cystéines et où les motifs ne sont pas clairement identifiables [Pradel, 2007; Arredondo et Kappe, 2016]. P230 possède de nombreux polymorphismes. Il est donc suggéré qu’elle soit soumise à une sélection positive [Williamson et Kaslow, 1993; Niederwieser *et al.*, 2001; Tonkin *et al.*, 2013].

Les premières études sur P230 ainsi que plusieurs études de transcriptomique, protéomique et d’immunofluorescence ont mis en évidence l’expression de P230 chez les gamétocytes mâles et femelles à partir du stade II jusqu’à la fertilisation [Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Williamson *et al.*, 1993, 1996; Florens *et al.*, 2002; Le Roch *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2005; Eksi *et al.*, 2006; Pradel, 2007; Silvestrini *et al.*, 2010; Van Dijk *et al.*, 2010]. Plus précisément, P230 est localisée au niveau de la membrane plasmique des gamétocytes et des gamètes [Williamson *et al.*, 1996]. P230 ne possède pas d’ancre GPI, mais est capable de former un complexe avec P48/45, un autre membre de la famille des protéines à 6 cystéines qui possède une ancre GPI [Kumar, 1987; Kumar et Wizel, 1992]. Lorsque P48/45 est déletée, P230 est absente de la surface des gamètes bien qu’elle soit exprimée [Eksi *et al.*, 2006]. Ce qui confirme la localisation de P230 à la membrane grâce à son interaction avec P48/45.

Les parasites dont la protéine P230 a été déletée présentent un défaut dans la fertilité du gamète mâle et en conséquence une forte réduction de l’infection des moustiques et une faible production

Étude fonctionnelle et structurale des protéines d'invasion de *Plasmodium*

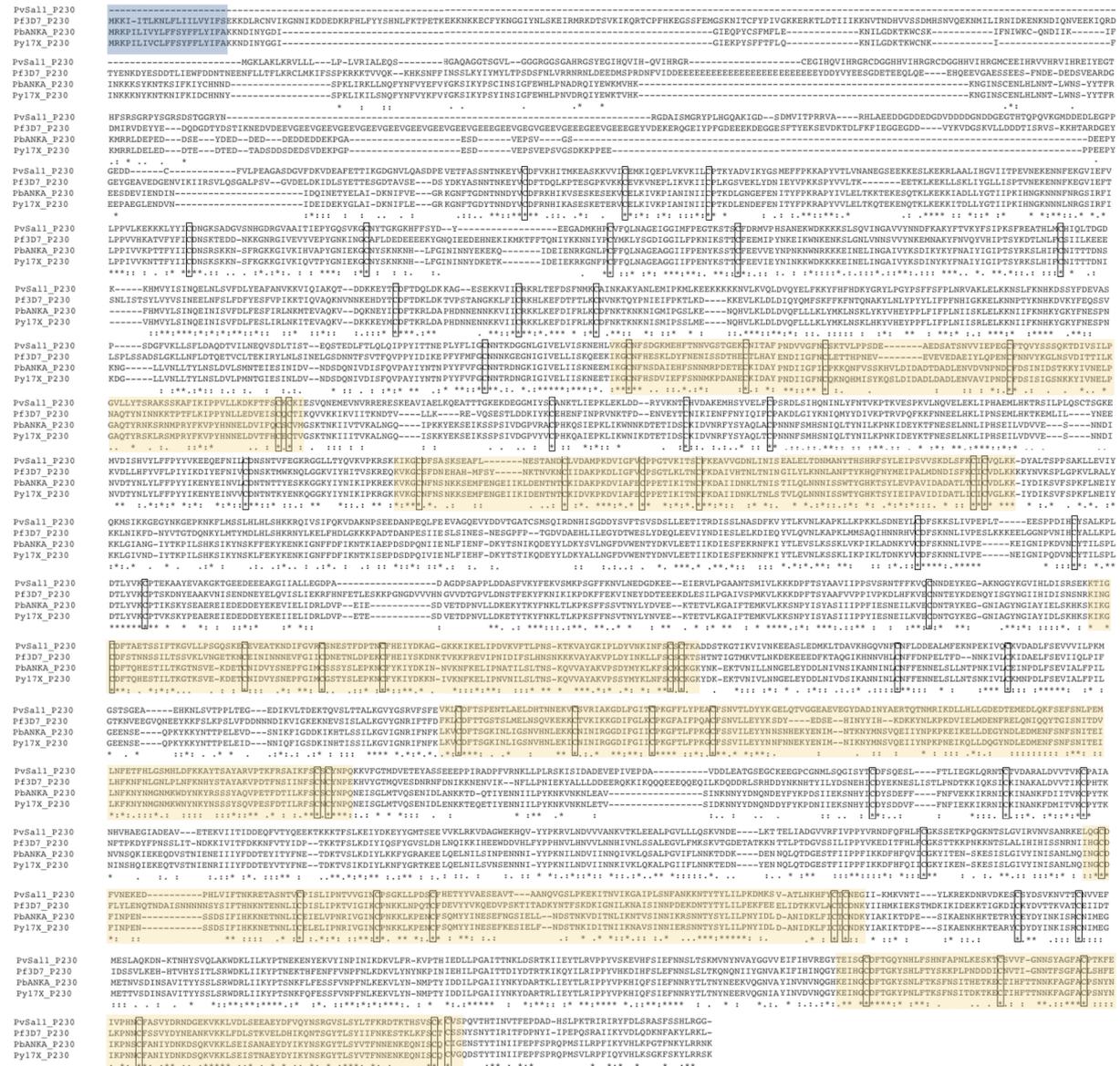


FIGURE 2.38 | Alignement de la protéine P230 chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; encadré en noir : les cystéines conservées.

d'oocystes [Eksi *et al.*, 2006; Van Dijk *et al.*, 2010]. Les parasites $\Delta P230$ ne sont pas capables de s'associer aux érythrocytes pour former un centre d'exflagellation qui joue un rôle important dans la fertiliation [Eksi *et al.*, 2006]. Et leurs gamètes mâles ne sont pas capables de reconnaître les gamètes femelles qui eux ne présentent aucun phénotype [Van Dijk *et al.*, 2010]. Il est intéressant de noter que la délétion de P230 ou P48/45 chez le gamète femelle de *Plasmodium berghei* améliore leur affinité pour le gamète mâle de *Plasmodium yoelii* [Ramiro *et al.*, 2015].

La protéine P230 fait partie d'un large complexe mettant en jeu P48/45, également une protéine à domaine 6 cystéines, les protéines de la familles PfCCP, protéines possédant plusieurs domaines d'adhésion et Pfs25. Ce complexe joue un rôle dans la reproduction sexuée du parasite et son développement chez le moustique [Pradel *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2009, 2016]. Au niveau des gamétocytes, P230 interagit avec P48/45 et PfCCP4, puis lors de la gamétocytogenèse il y a un réarrangement du complexe et P230 interagit alors avec les autres protéines PfCCP. De plus, la délétion ou l'inhibition de P230 provoque la dégradation des protéines de la familles PfCCP [Simon *et al.*, 2016]. P230 se lie aussi à

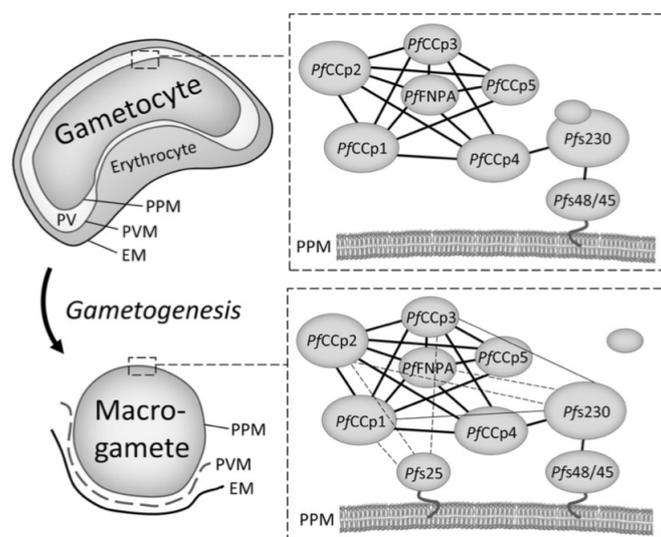


FIGURE 2.39 | Représentation schématique du complexe mettant en jeu P230 et P48/45 chez les gamétocytes et les macrogamètes [Simon *et al.*, 2016]. En lignes épaisses : les interactions du complexe à la surface du gamétocyte; en lignes fines : les nouvelles interactions mises en jeu lors de la gamétogenèse; en lignes pointillées : les interactions qui n'ont pas été démontrées; EM : membrane érythrocytaire; PPM : membrane plasmique du parasite; PV : vacuole parasitophore; PVM : membrane de la vacuole parasitophore.

la protéine PfWL1, une protéine à répétition WD40 qui ferait également partie du complexe et se lierait à la fois à p230 et PfCCp1 [Von Bohl *et al.*, 2015].

P230p : une protéine redondante vis à vis de P230 ?

La protéine P230p est disposée en tandem sur le chromosome 2 de *Plasmodium falciparum* et a été identifiée comme paralogue de P230 lors du séquençage du chromosome [Gardner *et al.*, 1998]. Elle possède un signal peptide de sécrétion et 5 domaines à 6 cystéines ainsi que plusieurs vestiges de domaines à 6 cystéines ne possédant plus que 2 ou 4 cystéines (figure 2.40) [Templeton et Kaslow, 1999]. Comme pour P230, certains considèrent les domaines dégénérés comme des domaines complets et comptabilisent 12 domaines à 6 cystéines [Gerloff *et al.*, 2005]. C'est une protéine sans intron, de 2 508 acides aminés et 295 kDa.

Des études de transcriptomiques ont révélé la présence de P230p uniquement dans les gamétocytes chez *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium berghei* [Thompson *et al.*, 2001; Le Roch *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2005; Van Dijk *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2015]. Bien que des transcrits soient détectés chez les gamétocytes aux stades II à V, l'expression n'est observée par western blot et par suivi de protéine étiquetée GFP uniquement chez les gamétocytes mâles aux stades IV et V [Eksi et Williamson, 2002; Khan *et al.*, 2005; Eksi *et al.*, 2008; Silvestrini *et al.*, 2010]. Il a été montré par immunofluorescence que P230p est localisée dans le cytoplasme des gamétocytes [Eksi et Williamson, 2002].

La délétion de P230p ne semble pas induire un phénotype différent du parasite sauvage, et a été utilisée pour introduire des marqueurs fluorescents chez le parasite [Janse *et al.*, 2006; Van Dijk *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Manzoni *et al.*, 2014].

P48/45 : une protéine impliquée dans la formation du zygote chez le moustique

P48/45 a été identifiée en même temps que P230 lors d'une étude sur les antigènes des gamétocytes reconnus par des anticorps bloquant la transmission aux souris [Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985]. Elle doit son nom aux deux bandes obtenues lorsqu'elle migre sur gel SDS-PAGE en conditions non réductrices. C'est une protéine de 448 acides aminés pour 51 kDa. Elle fait partie des premières

Étude fonctionnelle et structurale des protéines d'invasion de *Plasmodium*

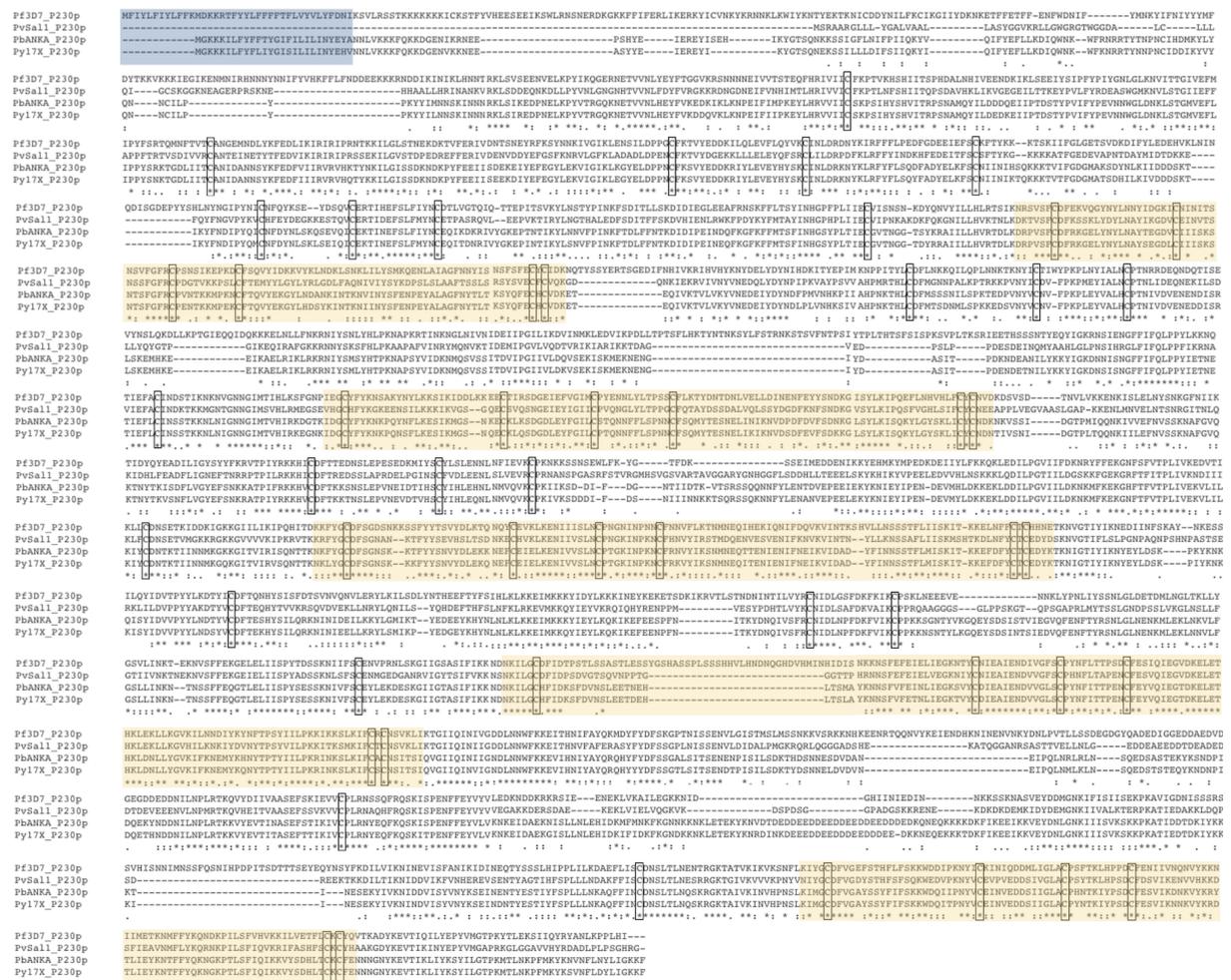


FIGURE 2.40 | Alignement de la protéine P230p chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; encadré en noir : les cystéines conservées.

protéines à domaine 6 cystéines décrites [Carter *et al.*, 1995]. Elle possède un peptide signal de sécrétion, 3 domaines à 6 cystéines et est prédite pour posséder une ancre GPI (figure 2.41).

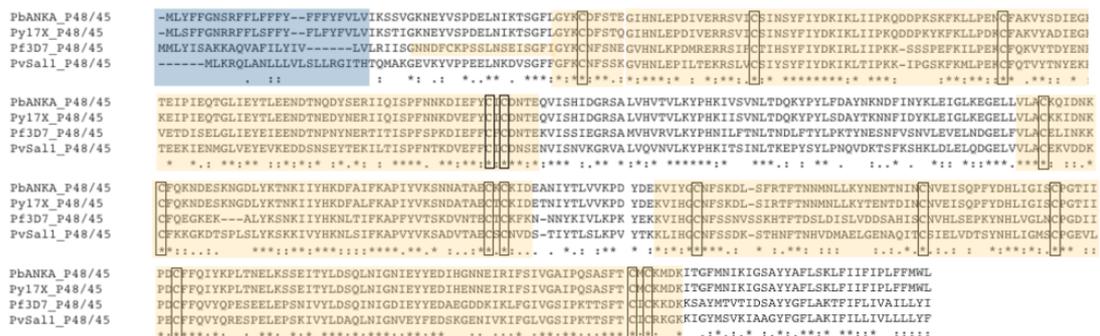


FIGURE 2.41 | Alignement de la protéine P48/45 chez *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; encadré en noir : les cystéines conservées.

Les études de transcriptomiques et du profil d'expression de P48/45 montrent qu'elle suit le même schéma d'expression que P230, et s'exprime chez les gaméocytes et les gamètes [Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Kocken *et al.*, 1993; Van Dijk *et al.*, 2001, 2010; Florens *et al.*, 2002; Le Roch *et al.*,

2003; Khan *et al.*, 2005; Van Schaijk *et al.*, 2006; Pradel, 2007; Silvestrini *et al.*, 2010; Tachibana *et al.*, 2015]. P48/45 interagit avec P230 pour former un complexe mettant en jeu les protéines PfCCp à la surface des gamétocytes et gamètes (figure 2.39) [Kumar, 1987; Kumar et Wize, 1992; Simon *et al.*, 2016].

Les anticorps anti-P48/45 bloquent le développement du zygote et altèrent ainsi la transmission au moustique [Vermeulen *et al.*, 1985]. La délétion de P48/45 chez *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium berghei* n'impacte pas la production de gamétocytes ou de gamètes mais affecte la formation du zygote et la transmission du parasite. Les parasites délétés pour P48/45 produisent des gamètes mâles incapables de se fixer et de pénétrer les gamètes femelles [Van Dijk *et al.*, 2001, 2010]. Cependant nous ne pouvons pas exclure que ce phénotype soit dû à l'absence de P230 qui ne peut pas s'ancrer à la surface membranaire si P48/45 n'est pas présente.

P47 : exprimée lors de la transmission au moustique, elle joue un rôle dans la fertilité et l'évasion immunitaire

P47 est le paralogue de P48/45. Elle est située en tandem avec cette dernière sur le chromosome 13 de *Plasmodium falciparum*. Son appartenance à la famille des 6 cystéines a été reportée lors du BLAST ayant permis d'identifier la majorité des protéines de cette famille [Templeton et Kaslow, 1999]. P47 est une protéine sans intron de 493 acides aminés pour 50 kDa. Elle possède un peptide signal de sécrétion et un ancrage GPI ainsi que deux domaines à 6 cystéines séparés par une région correspondant à un domaine dégénéré ne contenant plus que deux cystéines (figure 2.42).



FIGURE 2.42 | Alignement de la protéine P47 chez Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium berghei et Plasmodium yoelii. En bleu : peptide signal; en jaune : les domaines à 6 cystéines; encadré en noir : les cystéines conservées.

Les études transcriptomiques et protéomiques indiquent une expression de P47 uniquement chez les gamétocytes à partir du stade II et chez les gamètes femelles [Van Dijk *et al.*, 2001; Florens *et al.*, 2002; Lasonder *et al.*, 2008; Le Roch *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005; Van Schaijk *et al.*, 2006; Silvestrini *et al.*, 2010; Van Dijk *et al.*, 2010]. P47 est localisée à la surface des gamétocytes et gamètes comme l'ont montré des expériences d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation [Eksi *et al.*, 2006; Van Schaijk *et al.*, 2006]. P47 est également présente à la surface du zygote et des ookinètes [Ramphul *et al.*, 2015].

En 2006, une équipe montre que les parasites *Plasmodium falciparum* défectueux pour P47 présentent un nombre d'oocystes comparables aux parasites sauvages et l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant P47 ne permet pas d'inhiber le développement des oocystes [Van Schaijk *et al.*, 2006]. Ils concluent alors que P47 ne joue pas un rôle critique lors de la fertilisation. Néanmoins en 2010, ils décrivent que la délétion de P47 chez *Plasmodium berghei* induit une forte réduction de la fertilité des gamètes femelles tandis que les gamètes mâles ne sont pas affectés [Van Dijk *et al.*, 2010].

bloquant la transmission, mais l'immunisation avec cette protéine ne permet qu'une faible réduction de la transmission, avec une réduction de 47% *in vitro* et 10% *in vivo* de la prévalence des oocystes [Sala *et al.*, 2015].

Récapitulatif sur les protéines à domaine 6 cystéines de Plasmodium

- Le domaine 6 cystéines est maintenu par trois ponts disulfures. Il est composé de trois feuillets β dont deux sont parallèles.
- Les gènes codant pour des protéines à 6 cystéines ne possèdent pas ou peu d'introns et sont en partie organisés en tandem (p230/P230p, P47/P48/45, P36/P52 et P12/P12p).
- Ces protéines peuvent être impliqués dans de larges complexes comme par exemple P38, P41, P12 chez le mérozoïte et P230 au niveau des gamétocytes et gamètes.
- *Plasmodium* possède 14 protéines à domaines 6 cystéines:

Nom	Taille	Domaines				Stade	Phénotype
		SP	6cys	TM	GPI		
P36	45 kDa	1	2	-	-	Spz	invasion hépatocytes
P52	56 kDa	1	2	-	1	Spz	invasion hépatocytes
B9	115 kDa	1	1	-	1	Spz	maintien VP
LISP2	234 kDa	1	1	-	-	Spz	schizogonie hépatique
P12	39 kDa	1	1	-	1	Ssang	complexe P12-P41
P12p	43 kDa	1	2	1	1	Spz/Ssang	pas de phénotype
P41	43 kDa	1	2	-	-	Ssang	complexe P12-P41
P38	40 kDa	1	2	-	1	Spz/stade sanguin	pas de phénotype
P92	92 kDa	1	1	1	1	Ssang	évasion immunitaire
P230	360 kDa	1	6	-	-	γ^{ocyte}	fertilité $\gamma \sigma$ /complexeP48/45
P230p	295 kDa	1	6	-	-	γ^{ocyte}	pas de rôle redondance avec P230?
P48/45	51 kDa	1	3	1	1	γ^{ocyte}/γ	formation zygote/complexeP48/45
P47	50 kDa	1	2	1	1	$\gamma^{ocyte}/\gamma \varphi$	fertilité $\gamma \varphi$ /évasion immunitaire
PSOP12	87 kDa	1	1	-	-	$\gamma^{ocyte}/\gamma/Ook$	

SP: signal peptide; 6cys: domaine à 6 cystéines; TM: domaine transmembranaire; GPI: ancre GPI; VP: vacuole parasitophore; Spz: sporozoïte; Ssang: stade sanguin; γ^{ocyte} : gamétocyte; Ook: ookinète.

2.4 Récepteurs hépatocytaires

Du côté de la cellule, les hépatocytes possèdent de nombreux récepteurs. Certains d'entre eux sont impliqués dans l'invasion par *Plasmodium*. C'est notamment le cas du cluster de différenciation 81 (CD81) qui appartient à la famille des tétraspanines [Silvie *et al.*, 2003]. Les récepteurs *scavenger* de type B sont également mis en jeu lors de l'infection par *Plasmodium*, que ce soit SR-B1 au stade hépatique [Yalaoui *et al.*, 2008a; Rodrigues *et al.*, 2008] ou CD36 au stade sanguin [Ockenhouse et Chulay, 1988]. Et récemment le récepteur EphA2 a été rapporté comme jouant un rôle dans l'invasion hépatique par *Plasmodium* [Kaushansky *et al.*, 2015b].

2.4.1 CD81 : un récepteur de la famille des tétraspanines impliqué dans les infections par le virus de l'hépatite C et par *Plasmodium*

Famille des tétraspanines et structure de la protéine CD81

CD81 appartient à la famille des tétraspanines. Ce sont des protéines transmembranaires de 25 à 50 kDa présentes chez tous les eucaryotes pluricellulaires. L'homme possède 33 protéines tétraspanines dont les plus étudiées sont CD81, CD9, CD53, CD82, CD151, CD37 et CD63 [Huang *et al.*, 2005]. Elles sont exprimées à la surface de presque tous les types cellulaires et sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires, tels que l'adhérence, la migration, la transduction de signaux, l'activation, la prolifération et la différenciation [Boucheix et Rubinstein, 2014]. Leurs actions sont liées à leur capacité à interagir avec d'autres protéines telles que les intégrines, les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité et les kinases cytoplasmiques. Les tétraspanines sont considérées comme des molécules médiatrices qui interagissent simultanément avec plusieurs protéines ce qui permet leur rapprochement et leur interaction [Seigneuret, 2006; Hemler, 2003; Levy et Shoham, 2005].

Les tétraspanines sont caractérisées par quatre domaines transmembranaires ainsi qu'un certain nombre de résidus conservés : 4 cystéines dans le domaine extracellulaire 2 (EC2) dont deux font partie d'un motif conservé Cys-Cys-Gly et des acides aminés aux propriétés proches dans les domaines transmembranaires 2 et 3 ainsi que dans la boucle cytosolique les reliant (figure 2.44) [Hemler, 2001]. Les domaines transmembranaires sont maintenus grâce à deux types d'interactions : les interactions de Van Der Waals et les liaisons hydrogènes. Les tétraspanines peuvent avoir deux types de modifications post-traductionnelles : la N-glycosylation du domaine EC2, à l'exception de CD81 [Kitadokoro *et al.*, 2001] et la palmitoylation des cystéines juxtamembranaires [Charrin *et al.*, 2002; Delandre *et al.*, 2009].

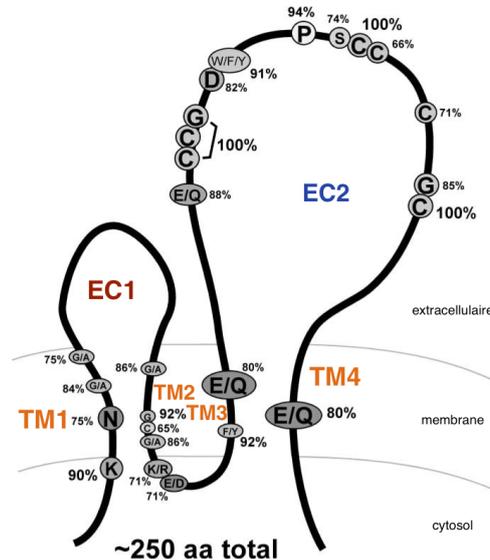


FIGURE 2.44 | Organisation structurale des tétraspanines adapté de [Hemler, 2001]. Le pourcentage de conservation entre les acides aminés indiqués provient de l'alignement de 28 tétraspanines humaines et 37 tétraspanines de drosophile. Les cystéines formant les ponts disulfures de la boucle EC2 sont totalement conservées et deux d'entre elles forment un motif Cys-Cys-Gly également conservé à 100%. Dans les hélices transmembranaires sont conservés des acides aminés polaires (Asn, Gln, Glu) et de petites tailles (Gly, Ala).

CD81 est présent chez les Ostéichthyens, les Amphibiens, les Mammifères et les Oiseaux [Huang *et al.*, 2005]. CD81 est exprimé de façon ubiquitaire, excepté chez les érythrocytes où il est absent. Au niveau du foie, CD81 est exprimé à la fois sur les endothélium sinusoidaux et sur les hépatocytes où il est présent sur la membrane basolatérale [Reynolds *et al.*, 2008].

Également appelée TAPA-1, pour *Target of an AntiProliferative Antibody*, et Tétraspamine28, c'est une protéine de 26 kDa pour 236 acides aminés. Elle forme une protusion de 3.5 nm à la surface membranaire [Kitadokoro *et al.*, 2001]. CD81 possède bien les quatre domaines transmembranaires de 25 acides aminés, les deux boucles extracellulaires de 15 et 85 acides aminés et les trois régions cytosoliques courtes de moins de 10 acides aminés typiques des tétraspanines (figure 2.45). Les cystéines juxtamembranaires du côté cytosolique sont palmitoylées ce qui permet une meilleure insertion dans la membrane et joue un rôle dans l'interaction avec ses protéines partenaires [Delandre *et al.*, 2009].

La grande boucle extracellulaire de CD81 humain partage 90% d'homologie avec la séquence d'acides aminés de CD81 de souris. La grande région extracellulaire (EC2) est la région qui est le plus mise en jeu lors des interactions [Stipp *et al.*, 2003]. Cette région est composée de cinq hélices α stabilisées par deux ponts disulfures mettant en jeu le motif Cys-Cys-Gly. Le domaine EC2 est organisé en deux sous-domaines. Le premier, conservé chez les tétraspanines, est constitué des trois hélices a, b et e (en bleu marine dans la figure 2.45.B). Le second sous-domaine s'insère dans le premier et comporte les hélices c et d (en cyan dans la figure 2.45.B). Ce dernier est extrêmement variable en taille et en structure secondaire parmi les tétraspanines. Il est notamment possible de trouver plus de ponts disulfures. Cependant grâce à la conservation de certains résidus propres aux tétraspanines, la topologie générale de l'ensemble du domaine 2 reste conservée.

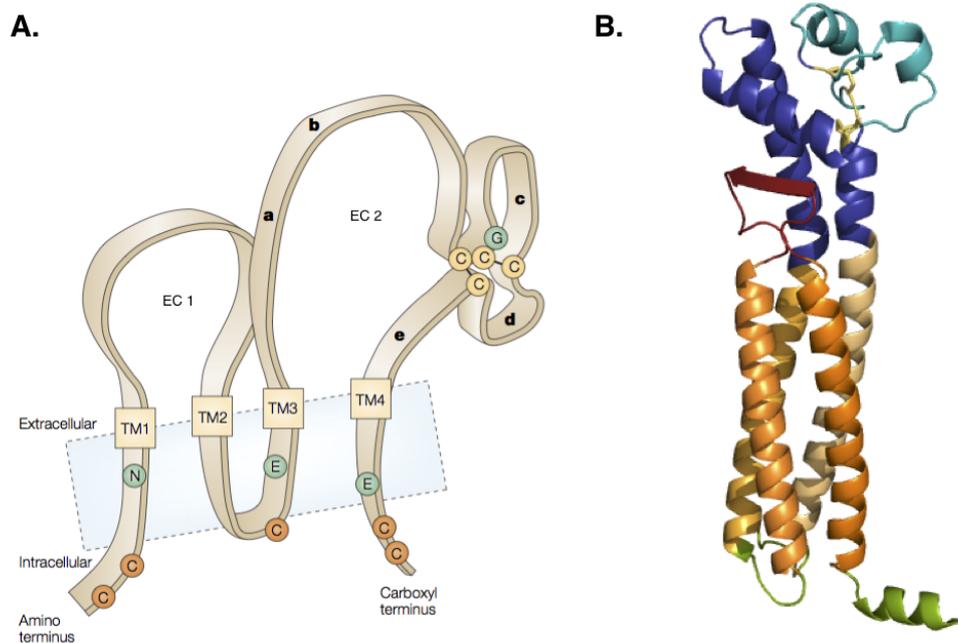


FIGURE 2.45 | Structure du récepteur CD81. A. Organisation schématique de CD81 [Levy et Shoham, 2005]. TM : domaine transmembranaire; EC1 : domaine extracellulaire 1; EC2L : domaine extracellulaire 2; a,b,c,d,e : hélices α ; cercle vert : résidus polaires conservés entre les tétraspanines; cercle orange : site potentiel de palmitoylation sur les cystéines conservées entre les tétraspanines; ligne noire et cercles jaunes : pont disulfure et cystéines. B. Modélisation de CD81 [PDB : 2AVZ [Seigneuret, 2006]]. Cette modélisation a été construite à partir de la résolution du domaine EC2 [Kitadokoro *et al.*, 2001]. En vert les régions cytosoliques, en orange les quatre domaines transmembranaires, en rouge le domaine extracellulaire 1 (EC1), en bleu le domaine extracellulaire 2 (EC2) et en jaune ses 2 ponts disulfures.

CD81 a été identifié en 1990 comme cible cellulaire d'un anticorps limitant la prolifération [Oren *et al.*, 1990]. Il a depuis été démontré que CD81 est impliqué dans différents mécanismes tels que l'adhérence et la migration, la réponse immunitaire et la formation de synapse, la réorganisation membranaire [Levy et Shoham, 2005]. Mais ce récepteur joue également un rôle dans l'invasion de plusieurs pathogènes humains dont le virus de l'hépatite C [Pileri *et al.*, 1998] et le parasite *Plasmodium* [Silvie *et al.*, 2003].

CD81 joue un rôle majeur dans l'invasion des hépatocytes par le virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C, ses protéines et son cycle de vie :

Le virus de l'hépatite C (ou HCV pour *hepatitis C virus*) appartient à la famille Flaviviridae dont font également partie le virus de la dengue et le virus de la fièvre jaune. Il est transmis par le sang et envahit les hépatocytes dans lesquels il se multiplie.

C'est un petit virus enveloppé d'une soixantaine de nanomètres de diamètre. Il possède une capsidie protéique icosaédrique. Son génome est composé d'un ARN monocaténaire linéaire de 9,6 kb et ne possède qu'un seul cadre de lecture ouvert (ou ORF pour *Open Reading Frame*). Ce cadre de lecture ouvert code une unique polyprotéine d'environ 3 000 acides aminés qui est clivée co- et post-traductionnellement en dix protéines. La région N-terminale code les protéines de structure qui sont incorporées dans la particule virale : la protéine de capsidie et les glycoprotéines E1 et E2. Viennent ensuite les protéines non structurales : p7, NS2, NS3, NS4A, NS5A et NS5B.

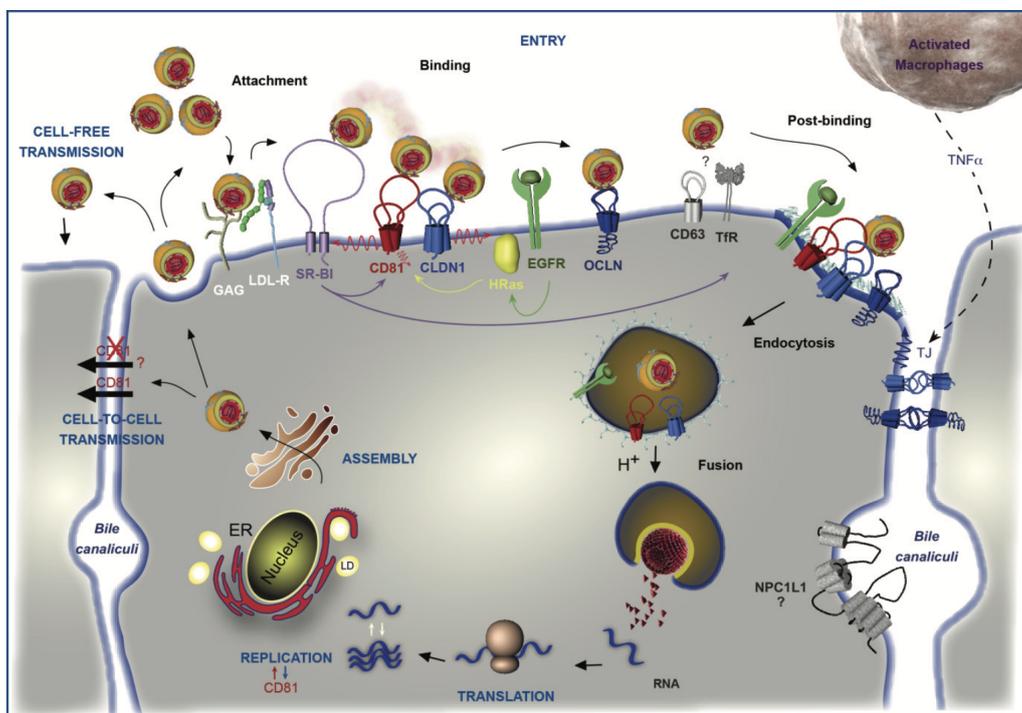


FIGURE 2.46 | Cycle de vie du virus de l'hépatite C [Fénéant *et al.*, 2014].

La première étape de l'infection consiste en l'attachement du virus à la surface des hépatocytes via les glycosaminoglycans (GAG) et les récepteurs aux lipoprotéines de basse densité (LDL-R). Ce premier attachement permet de rapprocher le virus de ses facteurs d'entrée cellulaire : CD81, SRB1 (Scavenger Receptor class B type 1) qui est une glycoprotéine exprimée principalement dans le foie, CLDN-1 (claudine-1) présente au niveau des jonctions serrées et OCLN (occludine). L'adhésion du virus aux facteurs d'entrée déclenche son internalisation par endocytose médiée par les clathrines. Le faible pH induit alors la fusion de la membrane du virus avec celle de l'endosome. L'ARN viral se retrouve libéré dans le cytosol où il est transcrit par la machinerie cellulaire pour former la polyprotéine virale. L'ARN(+) sert de brin matriciel pour la réplique de l'ARN(-) servant de brin support pour la synthèse des nouveaux brins positifs. Les particules virales sont ensuite assemblées puis soit libérées dans la circulation sanguine par exocytose, soit transmises directement de cellule à cellule (figure 2.46).

Implication de CD81 dans l'infection au virus de l'hépatite C :

L'entrée du virus dans la cellule est une étape importante de son cycle cellulaire qui met en jeu à la fois des facteurs viraux et des récepteurs de la cellule hôte.

En 1998, Pileri identifie l'interaction entre la protéine d'enveloppe E2 du virus et la grande boucle extracellulaire (EC2) de CD81 [Pileri *et al.*, 1998]. Depuis il a été démontré que CD81 joue un rôle clé dans l'invasion par le virus de l'hépatite C.

- Les anticorps anti-CD81 sont capables d'inhiber l'entrée du virus *in vitro* [Cormier *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2008] et *in vivo* [Meuleman *et al.*, 2008];
- La réduction de l'expression de CD81 grâce à des petits ARN interférents (siRNA) permet d'abolir l'infection par le virus de l'hépatocyte C [Zhang *et al.*, 2004; Koutsoudakis *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2008];
- L'expression de CD81 sur des cellules ne l'exprimant pas et étant résistantes au virus, telles que les cellules HepG2, permet de rendre susceptibles ces cellules à l'infection [Bartosch *et al.*, 2003; Cormier *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Mckeating *et al.*, 2004];
- Le niveau d'expression de CD81 influence la susceptibilité des cellules à l'infection par le virus [Koutsoudakis *et al.*, 2007; Akazawa *et al.*, 2007];
- Le ratio entre CD81 et SR-B1 exprimés à la surface cellulaire module l'invasion par le HCV [Kapadia *et al.*, 2007];
- Les protéines recombinantes de E2 et de la boucle extracellulaire EC2 de CD81 se lient avec une affinité de l'ordre du nanomolaire [Petracca *et al.*, 2000].

Cependant l'affinité entre la glycoprotéine virale E2 et le récepteur CD81 est variable d'un type viral à l'autre, par exemple le génotype 1a présente une affinité à CD81 plus grande que le génotype 1b [Mckeating *et al.*, 2004; Roccasecca *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2003].

Dès 1998, Pileri *et al.* ont montré que la grande boucle extracellulaire de CD81 est la région de CD81 qui interagit avec le HCV [Pileri *et al.*, 1998]. Un an plus tard Flint *et al.* montrent que la protéine virale E2 n'interagit pas avec CD81 de singe vert (*Chlorocebus aethiops*) qui ne diffère de CD81 humain que de quatre acides aminés. Les acides aminés 163, 186, 188 et 196 ont ainsi été identifiés (figure 2.47) [Flint *et al.*, 1999]. Sur une protéine recombinante du domaine EC2 de CD81, la mutation des résidus 188 (E188K) et 196 (D196E) n'a pas d'impact sur la liaison avec E2 tandis que la mutation de l'acide aminé 186 (F186L) ne permet plus la fixation à la protéine virale. Et contre toute attente, la mutation de l'acide aminé 163 (T163A) améliore la liaison de la protéine E2 à CD81 ce qui suggère un rôle de cet acide aminé dans la structure tertiaire de CD81 impactant la capacité d'interaction avec E2 [Higginbottom *et al.*, 2000]. Les deux ponts disulfures formés entre les cystéines du domaine EC2 de CD81 sont également essentiels pour permettre l'interaction avec E2 [Higginbottom *et al.*, 2000; Petracca *et al.*, 2000]. De même, la mutation des acides aminés Leu162 (L162P), Ile182 (I182F), Leu162 (L162P) et Phe186 (F186S) (figure 2.47) abolit l'interaction avec E2 [Drummer *et al.*, 2002]. La dimérisation de CD81 semble jouer un rôle dans la liaison CD81-E2 [Drummer *et al.*, 2002].

Bien qu'il y ait eu de nombreuses études sur l'interaction entre la tétraspanine CD81 et la protéine virale E2, celle-ci reste mal déterminée. De plus, la plupart des études utilisent des modèles viraux de pseudoparticules ou de virus produits en culture cellulaire qui ne représentent pas forcément la réalité. Car il a été montré que le récepteur CD81 murin ne forme pas d'interaction avec les glycoprotéines du virus [Pileri *et al.*, 1998; Flint *et al.*, 2006], tandis qu'il supporte l'infection des pseudoparticules virales et des virus produits en culture cellulaire [Flint *et al.*, 2006; Bitzegeio *et al.*, 2010].

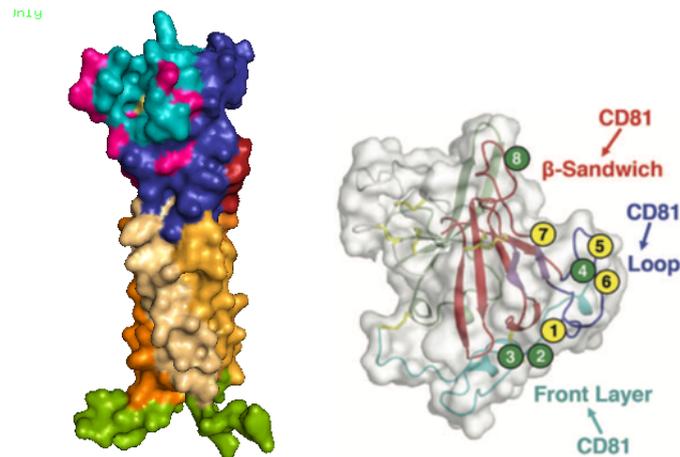


FIGURE 2.47 | Acides aminés du récepteur CD81 et de la protéine virale E2 probablement impliqués dans l'interaction entre le virus et la cellule hôte. À gauche : structure de la protéine CD81 avec représentés en rose les acides aminés impliqués dans l'invasion par le virus de l'hépatite C. À droite : structure de la protéine virale E2 avec 3 sites potentiels d'interaction avec CD81 [Kong *et al.*, 2013]

Du côté de la protéine virale, l'utilisation d'anticorps neutralisants a conduit à l'identification de nombreux acides aminés potentiellement impliqués dans la liaison à CD81 [Wang *et al.*, 2011]. En 2013, la co-cristallisation de E2 avec l'anticorps neutralisant AR3C a montré que la protéine est composée d'un sandwich de feuillettes β central avec de chaque côté des régions de boucles, d'hélices courtes et de feuillettes β . En utilisant de la mutagenèse dirigée et de la microscopie électronique à coloration négative, Kong *et al.* démontrent que CD81 interagit probablement avec les acides aminés présents sur une région latérale de E2 (notamment les acides aminés 427 à 430 et 442 à 444) (figure 2.47) [Kong *et al.*, 2013]. E2 est souvent considérée comme la glycoprotéine impliquée dans l'interaction avec CD81, mais il ne faut pas oublier que sa conformation est influencée par l'hétérodimère qu'elle forme avec la glycoprotéine d'enveloppe E1 [Lavie *et al.*, 2006].

Implication de CD81 dans l'infection par *Plasmodium*

CD81 est un récepteur hépatocytaire mis en jeu lors de l'invasion par les sporozoïtes [Silvie *et al.*, 2003]. Son implication a été démontrée en utilisant le parasite de rongeur *Plasmodium yoelii* dans un modèle *in vivo* d'infection de souris délétées pour CD81 [Silvie *et al.*, 2003]. Dans cette étude le récepteur CD9, un autre récepteur de type tétraspanine exprimé à la surface des hépatocytes, est utilisé comme contrôle [Silvie *et al.*, 2003].

Rôle de CD81 lors de l'infection par *Plasmodium yoelii* : voie CD81-dépendante

- L'inoculation de sporozoïtes de *Plasmodium yoelii* à des souris $cd81^{-/-}$ ne déclenche pas d'infection, contrairement à des souris $cd81^{+/+}$. Tandis que les souris $cd9^{-/-}$ restent susceptibles à l'infection par *Plasmodium yoelii* [Silvie *et al.*, 2003].
- Les souris $CD81^{-/-}$ restent tout de même susceptibles à l'infection par des globules rouges infectés. Ce qui s'explique par l'absence de CD81 à la surface des érythrocytes.
⇒ CD81 joue un rôle lors du stade hépatique.
- L'utilisation d'hépatocytes primaires isolés à partir de souris $cd81^{-/-}$ a permis de montrer que la traversée cellulaire est normale mais qu'il y a un défaut lors de l'invasion productive [Silvie *et al.*, 2003].

- Des anticorps anti-CD81 bloquent l'infection lorsqu'ils sont ajoutés en même temps que les sporozoïtes, ce qui n'est pas le cas des anticorps anti-CD9. L'ajout des anticorps une fois que les parasites sont entrés dans les cellules n'a pas d'effet [Silvie *et al.*, 2003].
- L'infection de la lignée cellulaire d'hépatomes murins Hepa1-6 est inhibée par l'ajout d'anti-corps anti-CD81 ou l'utilisation d'ARN interférence (*siRNA*) ciblant CD81 [Silvie *et al.*, 2006a,b].
⇒ CD81 est nécessaire à l'invasion productive des hépatocytes murins par *Plasmodium yoelii*.
- *Plasmodium yoelii* est capable d'infecter les hépatocytes humains *in vitro* [Silvie *et al.*, 2006b].
- L'expression ectopique de CD81 à la surface des cellules HepG2, n'exprimant pas CD81 naturellement [Flint *et al.*, 1999], permet de rendre les cellules susceptibles à l'infection par *Plasmodium yoelii* [Silvie *et al.*, 2006b]. De plus, le niveau d'infection des cellules est corrélé au niveau d'expression de CD81 à la surface des HepG2 [Silvie *et al.*, 2006b].

Ainsi la tétraspanine CD81 joue un rôle essentiel et spécifique dans l'infection par *Plasmodium yoelii*.

Rôle de CD81 lors de l'infection par *Plasmodium falciparum* : voie CD81-dépendante

- Les anticorps anti-CD81 bloquent de façon dose-dépendante l'infection d'hépatocytes humains primaires par *Plasmodium falciparum* [Silvie *et al.*, 2003].
- L'inhibition de l'expression de CD81 par *siRNA* permet également de stopper l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium falciparum*
⇒ CD81 est donc essentiel lors de l'infection des hépatocytes par *Plasmodium falciparum*.
- Néanmoins l'expression ectopique de CD81 chez les HepG2 ne permet pas contrairement à *Plasmodium yoelii* de restaurer l'infection par *Plasmodium falciparum* [Silvie *et al.*, 2006b].
⇒ CD81 joue un rôle important lors de l'invasion par *Plasmodium falciparum*, mais il semblerait que d'autres facteurs exprimés par les hépatocytes, mais absent chez les cellules HepG2, soient également mis en jeu.

Rôle de CD81 lors de l'infection par *Plasmodium berghei* : voie CD81-dépendante et voie CD81-in-dépendante

- Étonnamment, *Plasmodium berghei* qui est un parasite de rongeur très proche génétiquement de *Plasmodium yoelii* est capable d'infecter à la fois les HepG2 et les HepG2/CD81 [Hollingdale *et al.*, 1983; Silvie *et al.*, 2006a].
- De plus, les hépatocytes de souris CD81^{-/-} sont infectés *in vitro* et *in vivo* par *Plasmodium berghei* [Silvie *et al.*, 2003].
- L'utilisation d'anticorps anti-CD81 ne permet pas d'inhiber l'invasion des cellules hépatocytaires humaines HepG2 et Huh-7 par *Plasmodium berghei* [Silvie *et al.*, 2006a, 2007].
- L'inhibition de CD81 grâce à de l'ARN interférence ne permet pas de bloquer l'infection des hépatocytes des lignées humaines HepG2 et Huh-7 par *Plasmodium berghei* [Silvie *et al.*, 2006a, 2007].
⇒ CD81 ne semble pas impliqué lors de l'infection des hépatocytes humains par *Plasmodium berghei*.
- Néanmoins, dans la lignée d'hépatocytes murins Hepa1-6 l'inhibition de CD81 par anticorps ou par *siRNA* bloque l'invasion des cellules par *Plasmodium berghei* [Silvie *et al.*, 2007].

- L'utilisation d'anticorps ciblant CD81 chez les hépatocytes murins primaires n'induit qu'une réduction partielle de l'infection dont le niveau dépend du fond génétique de la souris [Silvie *et al.*, 2007; Yalaoui *et al.*, 2008b].
⇒ *Plasmodium berghei* est capable d'utiliser à la fois une voie CD81-dépendante ou une voie CD81-indépendante en fonction de la nature des cellules ciblées.

Il n'existe pas de barrière d'espèce pour les parasites de rongeurs qui sont capables d'infecter à la fois les hépatocytes murins et humains, tandis que *Plasmodium falciparum* n'est pas capable d'infecter les hépatocytes de souris [Silvie *et al.*, 2006b]. Cependant, *Plasmodium falciparum* n'est pas capable d'infecter les hépatocytes de souris transgéniques pour hCD81 [Silvie *et al.*, 2006b]. Il semble qu'il y ait d'autres facteurs qui soient également impliqués.

Déterminants moléculaires de CD81 impliqués dans l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium*

Il a été montré que contrairement à CD81, la tétraspanine CD9 n'est pas impliquée dans l'invasion par *Plasmodium* [Silvie *et al.*, 2003]. L'utilisation de protéines chimériques incorporant des régions de CD9 dans la tétraspanine CD81 a permis d'identifier la grande boucle extracellulaire EC2 comme région nécessaire à *Plasmodium* pour envahir les hépatocytes [Yalaoui *et al.*, 2008b]. Cette région est également la région utilisée par le virus de l'hépatite C lors de l'invasion cellulaire.

Les hélices A et B de la région extracellulaire EC2 (figure 2.45.A) jouent un rôle essentiel dans l'infection. L'hélice C de ce domaine n'est pas essentielle mais contribue à la fonction de CD81 lors de l'invasion par *Plasmodium yoelii* [Yalaoui *et al.*, 2008b]. Enfin, l'hélice D de la région EC2 n'est pas mise en jeu lors de l'infection par *Plasmodium* alors qu'elle est nécessaire à l'invasion par le virus de l'hépatite C [Higginbottom *et al.*, 2000]. Plus précisément, il semble que ce soit la région entre les hélices A et B qui soit impliquée dans l'invasion par *Plasmodium*. En effet, le remplacement chez la protéine CD9 des résidus faisant la jonction entre les hélices A et B permet l'invasion des cellules par *Plasmodium* [Yalaoui *et al.*, 2008b].

Co-facteurs cellulaires et microdomaines impliqués dans l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*

Aucune interaction directe entre CD81 et *Plasmodium* n'a pu être identifiée. L'utilisation de protéines recombinantes de la grande boucle extracellulaire de CD81 humain ou murin ne permet pas de stopper l'invasion par *Plasmodium*. De plus, aucune interaction n'a été détectée par immunofluorescence ou *far-western* entre les parasites et une forme recombinante soluble du domaine EC2 de CD81 [Silvie *et al.*, 2003].

CD81 pourrait donc avoir une action indirecte via l'intermédiaire de co-facteurs membranaires. Les tétraspanines sont connues pour interagir avec des protéines à domaines d'immunoglobulines présentant une séquence EWI [Stipp *et al.*, 2001]. Cependant ces protéines ne semblent pas permettre l'invasion par *Plasmodium*. Au contraire, EWI-F joue un rôle négatif lors de l'invasion car son inhibition provoque une augmentation du nombre de cellules infectées [Charrin *et al.*, 2009b]. Cet effet inhibiteur montre néanmoins que l'environnement de CD81 contrôle son activité.

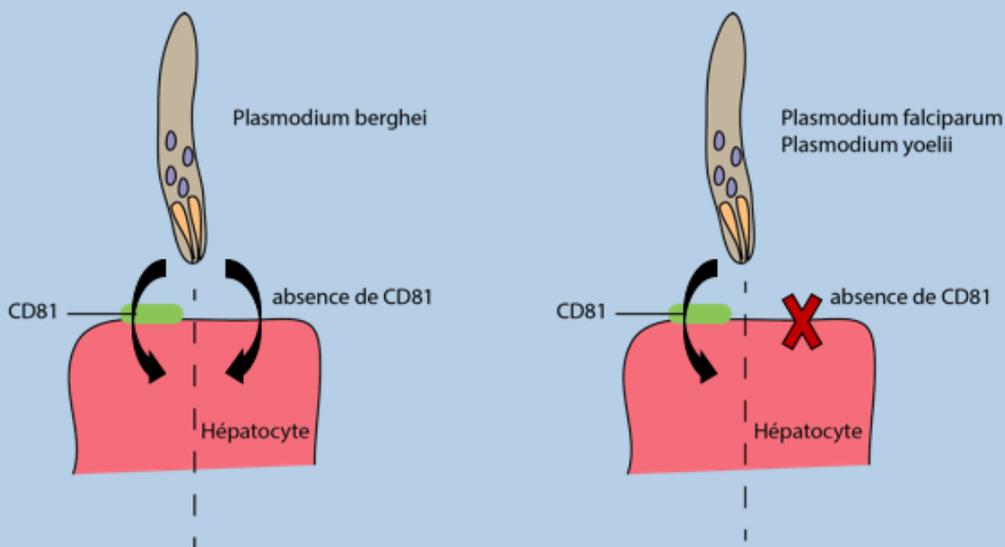
Dans la membrane cellulaire les tétraspanines s'associent entre elles au sein de microdomaines riches en cholestérol et gangliosides [Charrin *et al.*, 2009a]. L'utilisation d'anticorps ciblant les domaines enrichis en tétraspanines (TEM) inhibe partiellement (70%) l'infection des cellules Hepa1-6 par *Plasmodium yoelii* [Silvie *et al.*, 2006a]. Et l'extraction du cholestérol des membranes, réduit d'une part la fixation de l'anticorps ciblant les TEM et d'autre part inhibe l'infection des hépatocytes primaires humains et murins par *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium yoelii* [Silvie *et al.*, 2006a]. Le cholestérol joue donc

un rôle important dans l'organisation des microdomaines membranaires enrichis en tétraspanines. Il est également impliqué lors de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes utilisant la voie CD81-dépendante.

CD81 est également impliqué dans la libération des protéines contenues dans les rhoptries

Le suivi de parasites *Plasmodium yoelii* possédant des protéines RON2, RON4 ou RAP2/3 tagguées mCherry a permis de montrer que la sécrétion des protéines présentes dans les rhoptries ne se fait qu'en présence de CD81 [Risco-castillo *et al.*, 2014]. CD81 joue donc un rôle direct pendant l'invasion productive.

- La tétraspanine CD81 possède 4 domaines transmembranaires permettant son insertion dans la membrane. Elle présente deux domaines extracellulaires, une petite boucle et une grande boucle maintenue par deux ponts disulfures.
- Le virus de l'hépatite C se fixe aux cellules humaines via l'interaction de sa protéine virale E2 avec la tétraspanine CD81 qui est un récepteur exprimé à la surface des cellules hôtes.
- Le récepteur CD81 permet à *Plasmodium* d'infecter les hépatocytes. Néanmoins *Plasmodium berghei* est capable d'utiliser une voie alternative.



2.4.2 Les récepteurs *scavenger* de type B, des protéines de la superfamille de CD36

Les récepteurs *scavenger* (ou récepteur éboueurs) constituent une grande famille de protéines à la fois variables structurellement et fonctionnellement. Ce sont des récepteurs exprimés à la surface cellulaire qui se lient à plusieurs ligands et promeuvent l'élimination de corps étrangers ou altérés. Ils fonctionnent généralement par endocytose, phagocytose, adhérence et signalisation pour aboutir à l'élimination des éléments à dégrader. Le premier récepteur *scavenger* a été identifié à la surface de macrophages impliqués dans l'endocytose et la dégradation des lipoprotéines à faible densité (LDL *low-density lipoprotein*) [Goldstein *et al.*, 1979; Prabhudas *et al.*, 2017].

Ces récepteurs sont aujourd'hui organisés en dix classes de A à L (figure 2.48) [Prabhudas *et al.*, 2017].

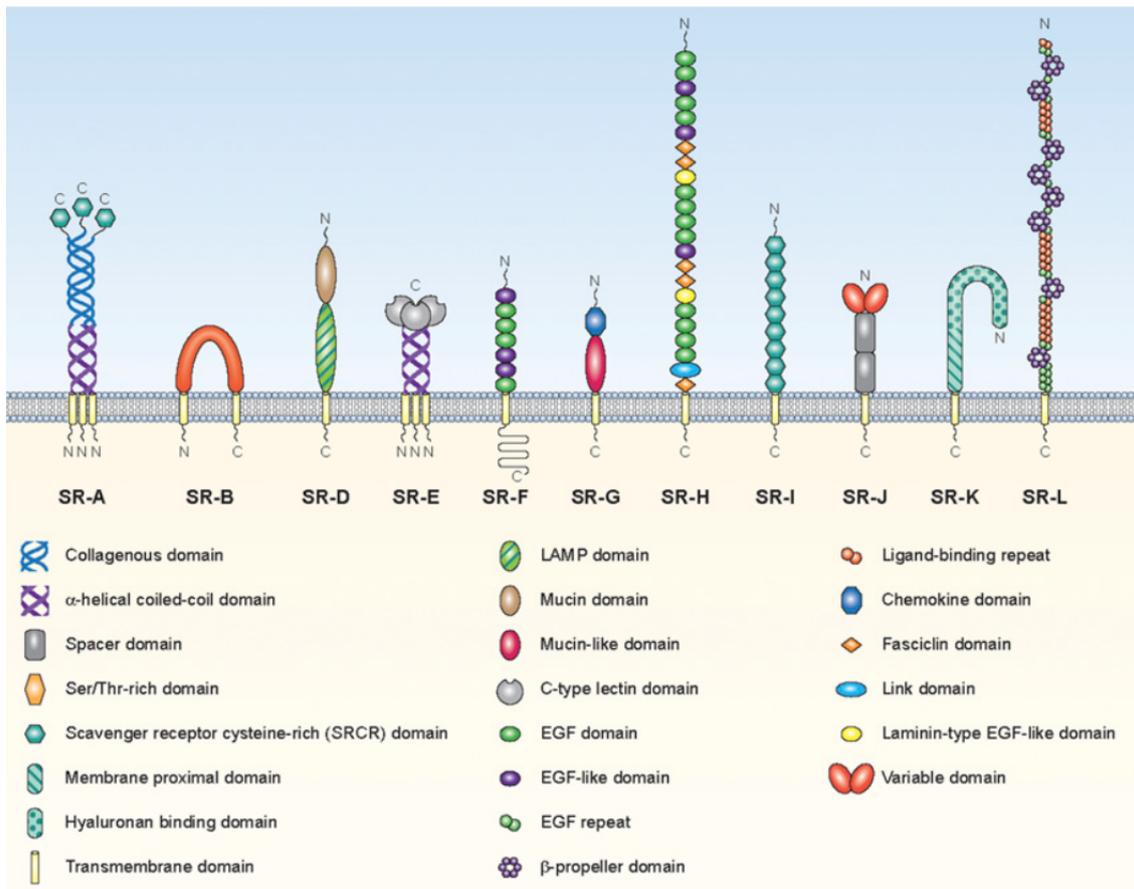


FIGURE 2.48 | Représentation schématique des différentes classes de récepteurs scavenger exprimés chez les mammifères [Prabhudas *et al.*, 2017].

Les protéines SR-B1 (*Scavenger Receptor Class B Type 1*), CD36 (cluster de différenciation 36) et LIMPII (*lysosomal integral membrane protein-2*) appartiennent à la classe B. Cette classe est caractérisée par la présence de deux domaines transmembranaires, permettant l'exposition d'une boucle extracellulaire et la présence des régions N- et C-terminales du côté cytoplasmique. Le domaine extracellulaire est généralement largement N-glycosylé ce qui lui offre une protection contre les protéases des sites inflammatoires (figure 2.48) [Prabhudas *et al.*, 2017].

CD36 : cluster de différenciation 36

CD36 est une protéine multifonctionnelle présente à la surface de différents types cellulaires et qui sert de récepteur à une grande variété de ligands

La protéine CD36 (cluster de différenciation 36) est l'archétype des récepteurs scavenger de type B. Elle est également appelée glycoprotéine plaquettaire 4, translocase des acides gras (FAT *fatty acid translocase*), récepteur scavenger de classe B membre 3 (SCARB3), glycoprotéine 88 (GP88) et glycoprotéine IV (GPIV). Elle a été identifiée initialement comme récepteur de la thrombine [Asch *et al.*, 1987]. Mais l'on sait aujourd'hui qu'elle est capable d'interagir avec les phospholipides et lipoprotéines, les acides gras à longue chaîne, les bactéries, les champignons pathogènes et *Plasmodium* [Silverstein et Febbraio, 2009].

CD36 est une protéine membranaire présente à la surface de nombreux types cellulaires, parmi lesquels : l'endothélium microvasculaire, les macrophages, les cellules dendritiques, l'épithélium pigmentaire de la rétine, les hépatocytes, les adipocytes, les myocytes cardiaques et squelettiques et les

épithéliums spécialisés du sein, des reins et des intestins [Silverstein et Febbraio, 2009]. CD36 est une protéine multifonctionnelle, impliquée lors de :

- l'assimilation des acides gras [Coburn *et al.*, 2000; Drover *et al.*, 2005];
- la phagocytose [Ryeom *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2003]
- l'angiogenèse, CD36 agit comme régulateur négatif au niveau des cellules de l'endothélium microvasculaire. CD36 inhibe les facteurs de croissance qui permettent la prolifération cellulaire des cellules endothéliales [Dawson *et al.*, 1997];
- la reconnaissance des pathogènes, CD36 reconnaît spécifiquement les lipides et lipoprotéines composant la paroi bactérienne [Hoebe *et al.*, 2005; Baranova *et al.*, 2012], les β -glucans des champignons [Means *et al.*, 2009] et les érythrocytes infectés par *Plasmodium* [Ockenhouse et Chulay, 1988; Oquendo *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 2003];
- la maladie d'Alzheimer et l'athérosclérose où CD36 interagit avec les protéines TLR4 et TLR6 pour activer la réponse immunitaire innée [Stewart *et al.*, 2009].

Organisation structurale de CD36 : archétype des récepteurs scavenger de type B

CD36 est une protéine de 472 acides aminés pour une masse prédite de 53 kDa. Néanmoins CD36 est sujette à des modifications post-traductionnelles, N-glycosylations et palmytation, ainsi son poids observé est de 88 kDa. Comme tous les récepteurs *scavenger* de type B, CD36 possède deux domaines transmembranaires. Les régions N- et C-terminales sont très courtes et situées du côté du cytoplasme. Les régions cytoplasmiques possèdent 4 sites de palmytation [Tao *et al.*, 1996]. Elles sont impliquées dans la régulation via des signaux de transduction et la circulation de messagers. La région extracellulaire d'environ 47 kDa comporte 6 cystéines formant 3 ponts disulfures. Elle possède également 7 sites de N-glycosylations répartis sur toute sa longueur et un site de phosphorylation au niveau de son site d'interaction avec la thrombine. Dans cette région extracellulaire se trouve un site d'interaction avec les acides gras et un site d'interaction avec le collagène (figure 2.49).

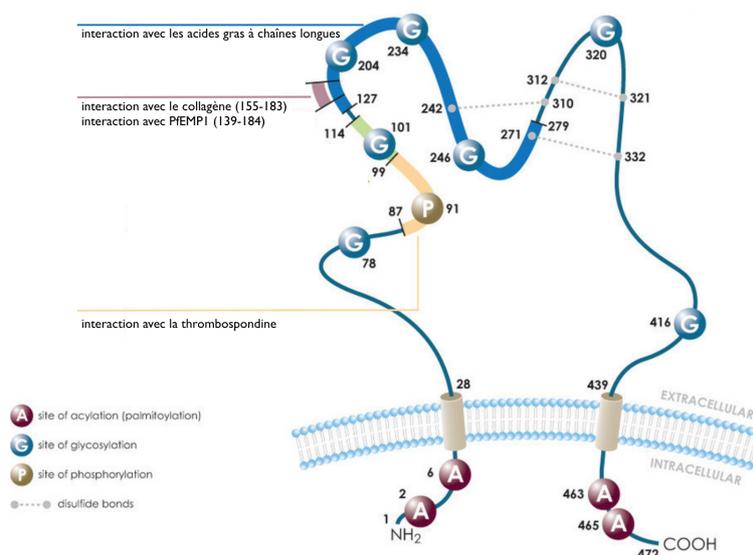


FIGURE 2.49 | Représentation schématique du récepteur CD36 – adapté de [Brock, 2008].

CD36 est impliqué dans l'adhérence des érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*

L'implication de CD36 dans la cytoadhérence des globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum* a été identifiée dès 1988 [Ockenhouse et Chulay, 1988]. CD36 est également impliquée dans l'association

des globules rouges infectés avec d'autres globules rouges infectés ou non ce qui aboutit à la formation de rosettes [Handunnetti *et al.*, 1992]. L'adhérence des érythrocytes infectés par *Plasmodium* aux cellules humaines et la formation de rosettes, joue un rôle clé dans la pathologie du paludisme. La cytoadhérence est responsable de la séquestration des parasites et conduit à l'obstruction des vaisseaux sanguins et peut conduire au développement d'un paludisme cérébral [MacPherson *et al.*, 1985].

L'interaction de CD36 avec les érythrocytes parasités se fait de façon directe [Oquendo *et al.*, 1989] et met en jeu la protéine parasitaire PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) [Baruch *et al.*, 1996]. PfEMP1 est codée par une famille multigénique de *Plasmodium*, elle possède une soixantaine de variants. PfEMP1 interagit avec CD36 via son premier domaine CIDR (*cystein-rich interdomain region*) [Smith *et al.*, 1998]. La région impliquée chez CD36 correspond à la partie de la boucle extracellulaire entre les acides aminés 139 et 184 (figure 2.49) [Baruch *et al.*, 1999].

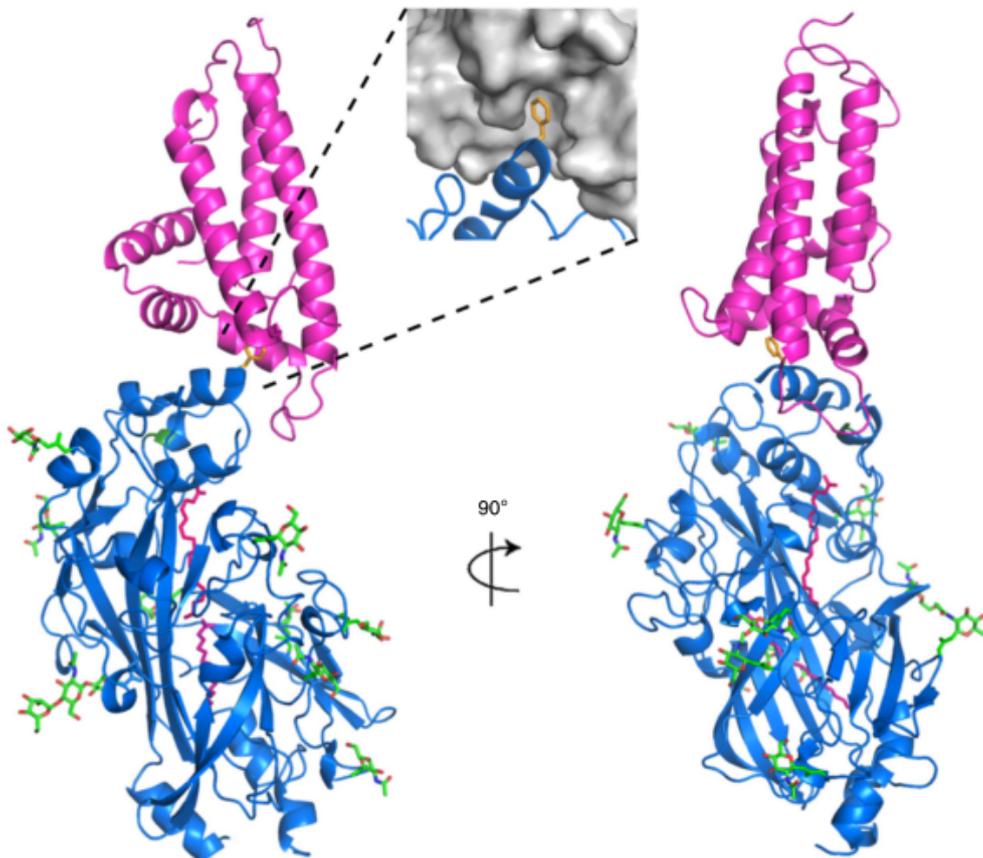


FIGURE 2.50 | Structure de l'interaction mise en jeu entre CD36 et le domaine CIDR α de PfEMP1 [Hsieh *et al.*, 2016]. En bleu : CD36; rose : le domaine CIDR α de PfEMP1; vert : les 9 N-glycosylations; rose sur CD36 : les 2 acides palmitiques; orange : la phénylalanine 153 de CD36.

La structure de CD36 associée au premier domaine CIDR de PfEMP1 a été résolue récemment. Elle met en évidence la présence d'une poche hydrophobe chez PfEMP1 qui permet de lier une phénylalanine présente sur la partie distale de CD36 (figure 2.50) [Hsieh *et al.*, 2016].

Grâce à l'interaction entre PfEMP1 et CD36, les globules rouges infectés sont capables d'adhérer aux vaisseaux sanguins et aux organes rencontrés. Ainsi, ils ne circulent plus avec le flot sanguin et échappent à l'élimination par la rate.

L'interaction des globules rouges infectés avec CD36 active la phagocytose

Cependant, l'adhérence à CD36 favorise l'élimination des érythrocytes infectés par les macrophages et les monocytes [McGilvray *et al.*, 2000]. L'adhérence des globules rouges parasités à CD36 déclenche la phosphorylation de la tyrosine et recrute les protéines ERK et p38 MAPKs appartenant aux cascades de signalisation impliquées dans la phagocytose [McGilvray *et al.*, 2000].

Le récepteur CD36 joue donc deux rôles paradoxaux, de protection ou d'élimination des érythrocytes infectés, en fonction du type cellulaire sur lequel il est présent [Cabrera *et al.*, 2014].

CD36 n'est pas mis en jeu lors de la phase hépatique

Les souris CD36^{-/-} sont susceptibles à l'infection par des sporozoïtes de *Plasmodium yoeli* ou *Plasmodium berghei* [Sinnis et Febbraio, 2002]. De plus, *in vitro* l'utilisation d'anticorps anti-CD36 lors de l'infection de cellules HepG2 par des sporozoïtes ne bloque pas l'invasion [Sinnis et Febbraio, 2002]. CD36 ne semble donc pas impliqué lors de la phase hépatique.

Scavenger Receptor, class B, member 1 (SR-B1)

SR-B1 est un récepteur des HDL impliqué dans de multiples fonctions

Le Scavenger Receptor, class B, member 1 (SR-B1) encodé par le gène *SCARB1* est également appelé CD36-like 1 (CD36L1) ou CD36 and LIMPII analogous 1 (CLA1). Il a été identifié en 1993 dans des cellules HEL (*human erythroleukemia*) [Calvo et Vega, 1993].

SR-B1 est présent dans les tissus jouant un rôle dans le métabolisme du cholestérol, donc essentiellement à la surface membranaire des cellules hépatiques et des cellules productrices de stéroïdes [Landschulz *et al.*, 1996]. Il est également trouvé à de plus faibles concentrations au niveau des macrophages, de l'intestin, des glandes mammaires, des poumons, des muscles lisses, de l'épithélium de la rétine, des kératinocytes et des muscles lisses [Acton *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 1997; Murao *et al.*, 1997].

- SR-B1 est un récepteur des lipoprotéines de haute densité (HDL) [Acton *et al.*, 1996]. Il permet de transférer les cholestérols des lipoprotéines des HDL vers les cellules [Urban *et al.*, 2000]. Il joue également un rôle essentiel au niveau hépatique dans la dégradation des esters de cholestérol en provenance des macrophages. Au niveau des hépatocytes, il est capable de sélectionner et d'assimiler les esters de cholestérol présents dans les HDL afin qu'ils soient hydrolysés [Brundert *et al.*, 2005]. Il est également mis en jeu lors de l'export de cholestérol, ce phénomène est appelé transport inversé du cholestérol (RCT *reverse cholesterol transport*) [Krieger, 1999]. SR-B1 joue donc un rôle bi-directionnel dans le transfert lipidique.
- Au niveau des cellules endothéliales, la fixation à SR-B1 active la production de monoxyde d'azote, ce qui réduit l'adhérence des monocytes [Yuhanna *et al.*, 2001];
- À la surface des cellules adrénocorticales, SR-B1 permet d'assimilation des esters de cholestérol à partir des HDL pour la synthèse des hormones glucocorticoïdes telles que le cortisol [Vergeer *et al.*, 2011];
- La fixation des HDL via SR-B1 à la surface des plaquettes inhibe leur aggrégation [Vergeer *et al.*, 2011];
- SR-B1 se lie aux lipopolysaccharides des bactéries ce qui favorise leur élimination par les macrophages [Baranova *et al.*, 2012];
- SR-B1 est également impliqué dans l'invasion des cellules par le virus de la dengue. Les particules virales sont capables de se lier avec le composé principale des HDL : l'apolipoprotéine A-1.

L'apolipoprotéine A-1 interagit avec SR-B1 ce qui facilite l'entrée du virus dans la cellule [Li *et al.*, 2013];

- SR-B1 est également impliqué dans l'infection d'autres pathogènes tels que le virus de l'hépatite C [Scarselli *et al.*, 2002] et *Plasmodium* [Yalaoui *et al.*, 2008a; Rodrigues *et al.*, 2008].

Organisation structurale de SR-B1

SR-B1 est un récepteur glycoprotéique transmembranaire de 552 acides aminés et de poids moléculaire prédit 57 kDa et observé 82-85 kDa [Acton *et al.*, 1996]. Il contient un grand domaine extracellulaire central, encadré en N- et C-terminal par des domaines transmembranaires.

Le domaine extracellulaire de SR-B1 humain partage 80% d'identité de séquence avec le SRB1 murin. Mais la protéine SR-B1 humaine possède 9 sites N-glycosylés [Viñals *et al.*, 2003] tandis que la protéine SR-B1 murine en possède 11. Le domaine extracellulaire de SR-B1 comporte 6 cystéines dont 5 sont conservées avec CD36 et LIMPII. Ces cystéines sont potentiellement impliquées dans la formation de ponts disulfure (figure 2.51) [Calvo et Vega, 1993].

Du côté intracellulaire, les deux extrémités N- et C-terminales portent des sites potentiels de phosphorylation sur les sérines en positions 4, 481 et 477 [Calvo et Vega, 1993]. SR-B1 est acétylé sur ses cystéines Cys462 et Cys470. Un domaine de type glissière à leucine (*leucine zipper*) est présent à l'interface entre le côté C-terminal de la région extracellulaire et le domaine intramembranaire ainsi qu'une potentielle séquence ciblant le péroxisome (PTS-1 *putative peroxisomal targeting sequence*) en C-terminal (figure 2.51)[Johnson *et al.*, 1998].

Ces motifs suggèrent que la structure et la fonction de SR-B1 peuvent être influencées par phosphorylation de sa région cytoplasmique.

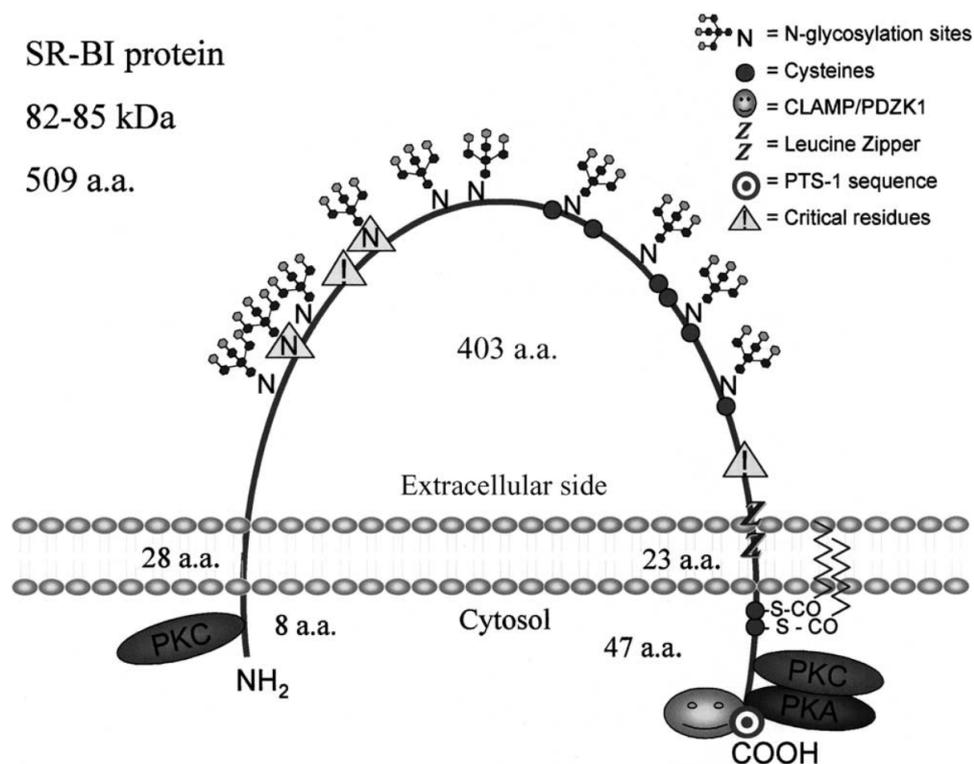


FIGURE 2.51 | Représentation schématique du récepteur SR-B1 – adapté de [Rhainds et Brissette, 2004].

SR-B1 est mis en jeu lors de l'attachement puis de l'invasion des hépatocytes par le virus de l'hépatite C

SR-B1 est un récepteur hépatocytaire qui permet l'entrée du virus de l'hépatite C dans la cellule. En effet, l'utilisation d'anticorps ciblant SR-B1 ou de siRNA réduisant l'expression de SR-B1 à la surface des hépatocytes permet d'inhiber l'infection par HCV [Scarselli *et al.*, 2002; Bartosch *et al.*, 2003; Zeisel *et al.*, 2007].

SR-B1 est tout d'abord mis en jeu lors de l'attachement initial du virus aux hépatocytes [Dao Thi *et al.*, 2012]. Pendant cette étape, l'apolipoprotéine E du virus est mise en jeu [Dao Thi *et al.*, 2012] et non la glycoprotéine virale E2 comme il l'a été initialement pensé [Scarselli *et al.*, 2002]. Suite à ce premier attachement, l'activité de transfert de lipides de SR-B1 permet un réarrangement membranaire de la cellule hôte qui s'enrichit en cholestérol. Du côté de la particule virale les glycoprotéines virales E1 et E2 se retrouvent présentées à la surface. SR-B1 est alors capable de se lier à la protéine virale E2 au niveau de la région hypervariable 1 en position N-terminal sur la protéine, ce qui permet l'internalisation finale du virus [Dao Thi *et al.*, 2012].

SR-B1 est impliqué dans l'invasion par Plasmodium

En 2008, deux études ont mis en évidence un rôle pour SR-B1 lors de l'invasion puis le développement de *Plasmodium* dans les hépatocytes [Yalaoui *et al.*, 2008a; Rodrigues *et al.*, 2008].

- L'inhibition de SR-B1 au niveau des cellules Huh7 réduit l'infection par *Plasmodium berghei*, tandis que la surexpression de SR-B1 aboutit à une augmentation de l'infection [Rodrigues *et al.*, 2008];
- L'inhibition du transfert de lipides via SR-B1 au niveau des hépatocytes primaires grâce au composé BLT-1 provoque une forte diminution de l'infection par *Plasmodium falciparum* [Rodrigues *et al.*, 2008];
- Les hépatocytes primaires de souris SR-B1^{-/-} sont très peu infectés par *Plasmodium yoelii* ou *Plasmodium berghei* comparés aux hépatocytes primaires de souris SR-B1^{+/+} [Yalaoui *et al.*, 2008a];
- Les hépatocytes délétés pour SR-B1 présentent une réduction de leur cholestérol membranaire d'environ 40%. La complémentation de leur membrane pour restaurer un taux de cholestérol semblable aux hépatocytes SR-B1^{+/+} permet de restaurer l'infection par *Plasmodium* [Yalaoui *et al.*, 2008a];
- Il a été montré que les hépatocytes SR-B1^{-/-} en plus de présenter un faible taux de cholestérol sont également pauvres en récepteurs CD81 et notamment en microdomaines enrichis en tétraspanines. Ce qui est partiellement restauré par la complémentation de ces hépatocytes avec du cholestérol [Yalaoui *et al.*, 2008a].
- L'observation à 48 heures post-infection des parasites dans les hépatocytes SR-B1^{+/+} révèle que les parasites ne sont pas capables de se développer et présentent une taille trois fois inférieure à celle des parasites se développant dans des hépatocytes présentant SR-B1 [Yalaoui *et al.*, 2008a].

Ainsi, il a été montré que SR-B1 est impliqué indirectement lors de l'invasion par *Plasmodium*, en régulant le niveau de cholestérol membranaire et l'expression de CD81 au niveau des microdomaines enrichis en tétraspanines [Yalaoui *et al.*, 2008a]. Néanmoins, chez des souris dont le foie a été humanisé, les anticorps anti-SR-B1 ne permettent pas de bloquer l'infection par *Plasmodium falciparum* comme le font ceux ciblant CD81 [Foquet *et al.*, 2015].

LIMP-2 : Lysosome membrane protein 2

LIMP-2 est une protéine lysosomale impliquée dans le transport protéique et les interactions hôte-pathogène

LIMP-2 a été initialement identifiée en 1985 au niveau de la membrane lysosomale [Lewis *et al.*, 1985]. Elle est encodée par le gène *scarb2* et est nommée LIMP-2 en 1988 [Suarez-quian, 1988]. Elle est également appelée SCARB-2, LGP85 ou CD36L2. C'est une protéine de 478 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 54 kDa mais est plutôt détectée à 80-85 kDa de par ses glycosylations.

LIMP-2 est une des protéines les plus abondantes de la membrane des lysosomes [Okazaki *et al.*, 1992]. Les lysosomes sont des compartiments cellulaires acides contenant une soixantaine d'hydrolases permettant de dégrader les macromolécules indésirables en provenance essentiellement du cytoplasme mais également de l'environnement extérieur.

LIMP-2 se lie à la thrombospondine-1 mais l'implication biologique de cette interaction reste inconnue. Elle pourrait être mise en jeu dans l'activation des plaquettes lors de la coagulation et l'inflammation [Crombie et Silverstein, 1998].

Les protéines lysosomales sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique. La majorité d'entre elles sont ensuite transportées jusqu'au lysosome grâce aux récepteurs mannose-6-phosphate (MPRs) auxquels elles se fixent dans le réseau trans-golgi [Settembre *et al.*, 2013]. Néanmoins, l'hydrolase β -glucocerebrosidase ne suit pas ce chemin et est transportée par LIMP-2 [Reczek *et al.*, 2007].

LIMP-2 est aussi impliquée dans des interactions hôtes pathogènes. Cette protéine sert notamment de récepteur à l'entérovirus 71 qui est responsable du syndrome pieds-mains-bouche qui correspond à des lésions cutanées vésiculeuses [Yamayoshi *et al.*, 2009]. LIMP-2 joue également un rôle dans la phagocytose de la bactérie *Listeria monocytogenes*. Elle participe à l'activation des macrophages [Carrasco-marín *et al.*, 2011].

Organisation structurale de LIMP-2

LIMP-2 est le premier récepteur *scavenger* de type B dont la structure a été résolue [Neculai *et al.*, 2013]. Comme tous les récepteurs *scavenger* de type B il est composé de deux domaines transmembranaires, de deux régions courtes en N- et C-terminal qui se retrouvent du côté cytoplasmique et d'une large boucle ici dans le lysosome. Sa région C-terminale possède un motif à base de dileucine qui permet son adressage au lysosome.

La structure de LIMP-2 est atypique. Elle se compose d'un tonneau β dont les brins sont antiparallèles et intercoupés de courtes hélices α . Au niveau de l'apex se trouve une protubérance d'hélices α (figure 2.52). Il a été montré par mutagenèse que cette région est impliquée lors de la liaison avec la β -glucocerebrosidase. LIMP-2 possède une conformation fermée lorsque le pH est neutre. Tandis qu'elle adopte une conformation ouverte lorsque le pH est acide, comme par exemple dans le lysosome (figure 2.53) [Dang *et al.*, 2014]. La conformation ouverte permet de laisser passer les lipides dans une large cavité qui traverse toute la molécule [Neculai *et al.*, 2013].

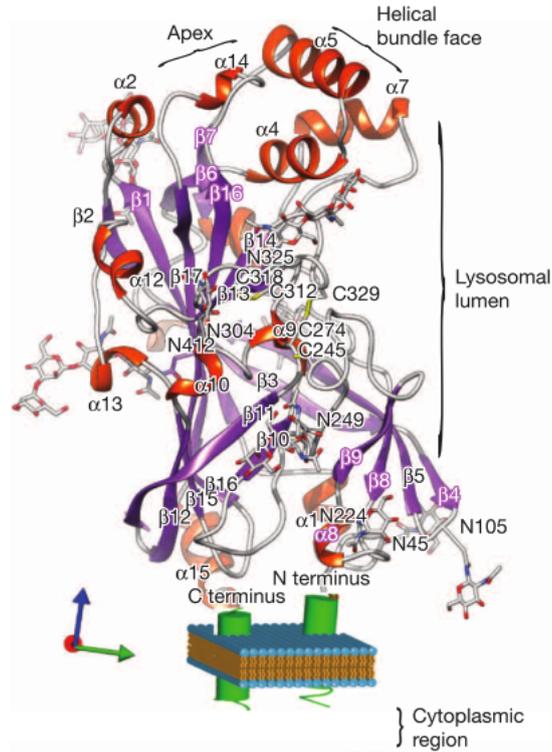


FIGURE 2.52 | Structure de la boucle de hLIMP-2 exposée dans le lysosome [Neculai *et al.*, 2013]. En orange : les hélices α ; en violet : les brins β ; en jaune : les cytéines et leurs ponts disulfures ; en batonnet : les glycosylations ; en vert : les domaines transmembranaires et cytoplasmiques ; en bleu et marron : la membrane.

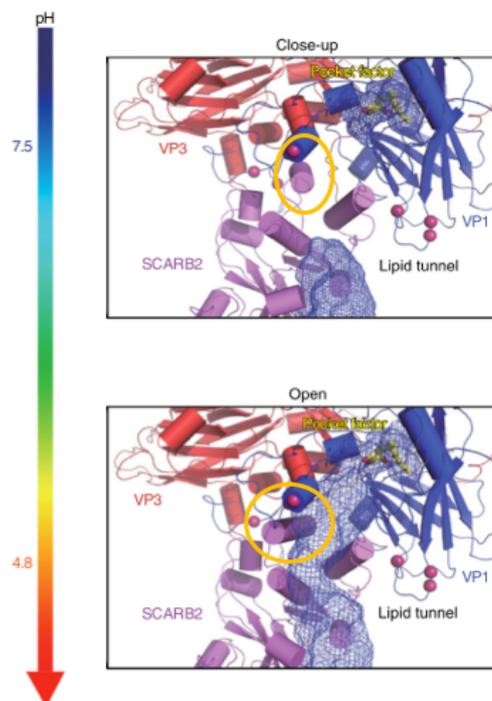


FIGURE 2.53 | Conformations ouverte et fermée de la région apicale de hLIMP-2 [Dang *et al.*, 2014]. Le modèle présenté ici permet d'observer la modification entourée en jaune de la région apicale de LIMP-2 (SCARB2) en violet. LIMP-2 interagit ici avec deux peptides VP1 en bleu et VP3 en rouge. La poche hydrophobe permettant le passage de lipides est représentée en maille bleue.

Le rôle de LIMP-2 lors de l'infection par Plasmodium n'a jamais été étudié.

- Les récepteurs *scavenger* sont ancrés à la membrane via deux domaines transmembranaires. Ils présentent une large boucle extracellulaire et deux petites régions intracellulaires. Ces récepteurs possèdent de nombreuses modifications post-traductionnelles: N-glycosylations, palmitoylations, acylations et ponts disulfures.
- **CD36** est impliqué au stade sanguin de l'infection par *Plasmodium*. Il est impliqué dans l'adhérence des érythrocytes infectés aux cellules endothéliales via PfEMP1.
- **SR-B1** est mis en jeu lors de l'infection par le virus de l'hépatite C où il permet de réorganiser la membrane de la cellule hôte. Il est également utilisé par les sporozoïtes de *Plasmodium* lors de l'invasion des hépatocytes.
- **LIMP2** n'a pas été étudié lors de l'infection par *Plasmodium*.

2.4.3 Le récepteur d'éphrine A2 (EphA2)

Famille des récepteurs à éphrines et structure de la protéine EphA2

Le récepteur Ephrine A2 (EphA2), également appelé Eck, Myk2 ou Sek2, appartient à la famille des récepteurs d'éphrine. Ces récepteurs font partie des récepteurs à activité tyrosine kinase. Les récepteurs d'éphrine sont divisés en deux groupes, le groupe des récepteurs d'éphrine A qui sont des éphrines ancrées à la membrane via une ancre GPI, et les récepteurs d'éphrine B qui sont des éphrines contenant un domaine transmembranaire et une petite région cytoplasmique. Il existe 9 récepteurs d'éphrine A dans le génome humain, qui peuvent se lier à 5 éphrines A, et 5 récepteurs d'éphrine B qui peuvent interagir avec 3 éphrines B [Lisabeth *et al.*, 2013].

Ils sont composés d'une région extracellulaire portant le domaine de liaison à l'éphrine, d'un seul segment transmembranaire et d'une région cytoplasmique contenant un domaine kinase. Le domaine extracellulaire est composé en N-terminal du site de fixation à l'éphrine, d'une région riche en cystéines contenant un domaine sushi et un motif EGF (*epidermal growth factor*) et de deux domaines fibronectine de type III. La région cytoplasmique inclut un segment juxtamembranaire, un domaine à tyrosine kinase un motif SAM (*sterile α -motif*) et se termine par un domaine PDZ permettant l'ancrage au cytosquelette via des interactions protéine-protéine (figure 2.54).

Les récepteurs à éphrine sont impliqués dans la communication contact-dépendante entre les cellules pour contrôler leur morphologie, l'adhérence, le mouvement, la prolifération, la survie ou la différenciation [Pasquale, 2005]. Lors du développement, l'interaction éphrine-récepteur est mise en jeu dans l'organisation spatiale de différentes populations de cellules, l'orientation des axones, la formation des connexions synaptiques et le remodellement des vaisseaux sanguins. Ces interactions sont également mises en jeu dans le remodellement des synapses, la différenciation épithéliale, le système immunitaire, la sécrétion d'insuline et la différenciation des cellules souches.

Le récepteur EphA2 est exprimé lors du développement embryonnaire et dans les cellules épithéliales adultes où il régule l'adhérence cellulaire [Lindberg et Hunter, 1990; Miao *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2003]. EphA2 est aussi un oncogène important et présent dans de nombreuses tumeurs où il permet la vascularisation et la métastase [Zelinski *et al.*, 2001; Kinch et Carles-Kinch, 2003; Lin *et al.*, 2007; Wykosky et Debinski, 2008]. De plus, EphA2 semble impliqué lors de l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium* [Kaushansky *et al.*, 2015b].

Le récepteur forme des dimères lorsqu'il interagit avec les protéines éphrines. Ils sont capables d'interagir dans un arrangement parallèle (figure 2.55.B) notamment lorsque les éphrines ne sont

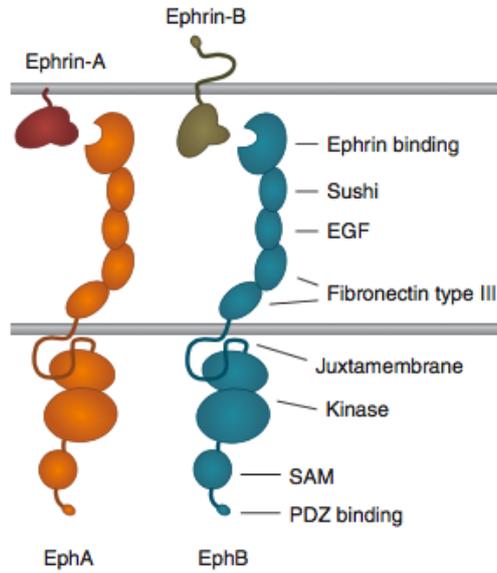


FIGURE 2.54 | Organisation des domaines des récepteurs à éphrine [Lisabeth *et al.*, 2013].

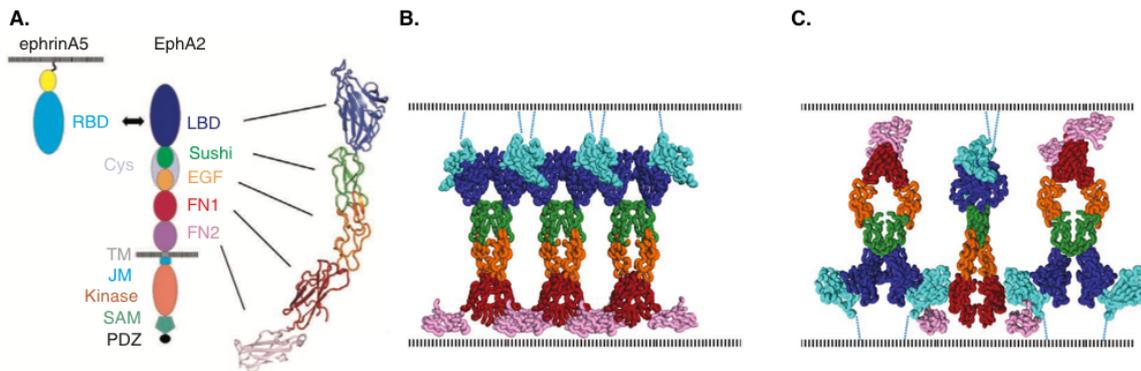


FIGURE 2.55 | Organisation et structure du récepteur EphA2 [Seiradake *et al.*, 2010]. RBD : domaine de liaison au récepteur; LBD : domaine de liaison au ligand; Cys : domaine riche en cystéines; EGF : domaine *epidermal growth factor-like*; FN : domaine fibronectine; TM : région transmembranaire; JM : région juxtamembranaire; SAM : motif α stérile; PDZ : domaine Psd-95, Dlg ou Zo1.

présentes que sur l'une des deux cellules mises en jeu. Mais ils peuvent aussi former des complexes antiparallèles (figure 2.55.C) notamment lorsque les protéines éphrines sont exprimées sur les deux cellules interagissant [Davis *et al.*, 1994].

Les cellules riches en récepteurs EphA2 seraient préférentiellement envahies par *Plasmodium*

Une étude récente montre que les cellules infectées par *Plasmodium* présentent un niveau plus élevé de EphA2 [Kaushansky *et al.*, 2015b]. De plus, les cellules riches en EphA2 semblent être plus infectées [Kaushansky *et al.*, 2015b]. Ces deux résultats montrent que les sporozoïtes envahissent préférentiellement les cellules hépatiques riches en récepteurs EphA2. Les souris délétées pour EphA2 et infectées par *Plasmodium yoelii* possèdent une réduction de l'infection hépatique 42 heures post-infection et un délai de 1 à 3 jours dans le développement du stade sanguin [Kaushansky *et al.*, 2015b]. Ainsi, la susceptibilité à l'infection par *Plasmodium* est fortement réduite en l'absence d'EphA2.

L'utilisation d'anticorps anti-EphA2, réduit l'infection de parasites sauvages, mais pas de parasites délétés pour les protéines P36 et P52 [Kaushansky *et al.*, 2015b]. Ce qui suggère que P52 ou P36 est impliquée dans l'invasion en lien avec EphA2. Il a été montré auparavant que EphrineA1 permet la phosphorylation de EphA2. L'interaction permettant la phosphorylation de EphA2 par EphrineA1 est bloquée par l'ajout de la protéine P36, mais pas P52 [Kaushansky *et al.*, 2015b]. P36 pourrait donc jouer un rôle vis à vis du récepteur EphA2.

2.4.4 Les récepteurs CD74 et CD68 sont également mis en jeu lors de l'invasion du foie par *Plasmodium*

Le récepteur CD68 déterminant de l'entrée des sporozoïtes dans les cellules de Kupffer

CD68 est un récepteur spécifique des macrophages que l'on retrouve à la surface des cellules de Kupffer. Il appartient à la famille Lamp/Igp. C'est une protéine dont le poids moléculaire est prédit à 35 kDa, mais que l'on observe à 87-115 kDa car elle possède de très nombreuses glycosylations [Holness *et al.*, 1993].

L'inhibition de l'expression de CD68 par siRNA, l'expression ectopique de CD68 chez les cellules Cos7, la surexpression de CD68 et l'inhibition de CD68 par des anticorps a permis de mettre en évidence le rôle de déterminant joué par ce récepteur dans l'entrée des sporozoïtes [Cha *et al.*, 2015]. Les souris délétées pour CD68 présentent une réduction de l'infection du foie de 71% comparées aux souris sauvages, concordant avec le rôle de récepteur clé de CD68 [Cha *et al.*, 2015]. Le peptide P39 de *Plasmodium* a été identifié comme ligand de CD68 [Cha *et al.*, 2015].

Les sporozoïtes envahissent préférentiellement les cellules riches en CD74

Il a été montré qu'il existe des différences de susceptibilité en fonction du parasite et des hépatocytes [Kaushansky *et al.*, 2015a]. Les hépatocytes possédant un niveau de récepteurs CD74 élevés sont plus susceptibles d'être infectés par *Plasmodium yoelii* [Kaushansky *et al.*, 2015a]. Ce qui suggère que les sporozoïtes envahissent préférentiellement les hépatocytes riches en CD74.

L'invasion des hépatocytes est l'étape initiale de l'infection d'un nouvel hôte par *Plasmodium*. Cette étape obligatoire et asymptomatique implique un faible nombre de parasites et constitue donc une bonne cible vaccinale. Il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu pendant l'entrée du sporozoïte dans les cellules hépatocytaires. Plusieurs récepteurs hépatocytaires ont été identifiés. CD81 et SR-B1 semblent jouer des rôles majeurs au cours de l'infection. Néanmoins les facteurs parasitaires interagissant avec ces récepteurs restent à identifier.

3.1 Identifier les facteurs parasitaires impliqués dans les voies d'invasion

Le premier objectif de cette thèse consiste à identifier le ou les facteurs parasitaires que les sporozoïtes utilisent lors de l'invasion des hépatocytes.

Les sporozoïtes de *Plasmodium yoelii* et *Plasmodium berghei* utilisent une voie CD81-dépendante. *Plasmodium berghei* est également capable d'utiliser une voie CD81-indépendante. Il existe donc probablement des facteurs parasitaires présents chez *Plasmodium berghei* qui sont impliqués dans la voie CD81-indépendante. Parmi les protéines exprimées par les sporozoïtes, les protéines à domaines TSR et les protéines à domaines 6 cystéines sont des candidats potentiellement mis en jeu dans l'utilisation des différentes voies d'invasion.

L'utilisation d'une approche génétique pour exprimer chez le parasite *Plasmodium yoelii* des protéines de *Plasmodium berghei*, couplée à l'utilisation de deux modèles cellulaires, des cellules HepG2 (dépourvues de récepteurs CD81) et des cellules HepG2/CD81 qui permettent de comparer la présence et l'absence du récepteur CD81 à la surface des hépatocytes, va permettre de tester cette hypothèse.

3.2 Caractériser les déterminants structuraux des facteurs parasitaires

Afin de caractériser le rôle des facteurs parasitaires impliqués dans l'entrée, une étude structure – fonction a été mise en place, reposant sur trois approches complémentaires.

Premièrement, une modélisation de la structure 3D de facteurs parasitaires a été réalisée à partir de structures connues de protéines de la même famille, couplée à une étude comparative des séquences protéiques entre *P. berghei* et *P. yoelii*.

Deuxièmement, une approche génétique a été mise en place, afin de tester la fonction de protéines chimériques mêlant des régions de *P. berghei* et *P. yoelii* afin de déterminer le rôle des différents domaines des facteurs parasitaires.

Troisièmement, une partie de mon travail a visé à produire des protéines de sporozoïtes de *Plasmodium* afin d'essayer d'en résoudre la structure. L'obtention de protéines recombinantes servira également à tester les interactions avec de potentiels récepteurs cellulaires.

DEUXIÈME PARTIE

Résultats

4

CRIBLAGE GÉNÉTIQUE À LA RECHERCHE DE FACTEURS PARASITAIRES IMPLIQUÉS DANS L'UTILISATION DE LA VOIE CD81-INDÉPENDANTE

4.1 Contexte et objectifs

Utilisation des voies CD81-dépendante ou CD81-indépendante lors de l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium*

Lors de l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium* le sporozoïte utilise des protéines de surface de la cellule hôte. La première à avoir été identifiée est CD81 [Silvie *et al.*, 2003]. CD81 est un récepteur impliqué également dans l'invasion des hépatocytes par le virus de l'hépatite C. Il est indispensable pour l'invasion par *Plasmodium yoelii* et *Plasmodium falciparum*, tandis que *Plasmodium berghei* est capable d'infecter des cellules n'exprimant pas CD81 (voir section 2.4) [Silvie *et al.*, 2003, 2006a, 2007]. Il existe donc plusieurs voies d'entrée dans les hépatocytes : une voie CD81-dépendante et une voie CD81-indépendante (figure 4.1).

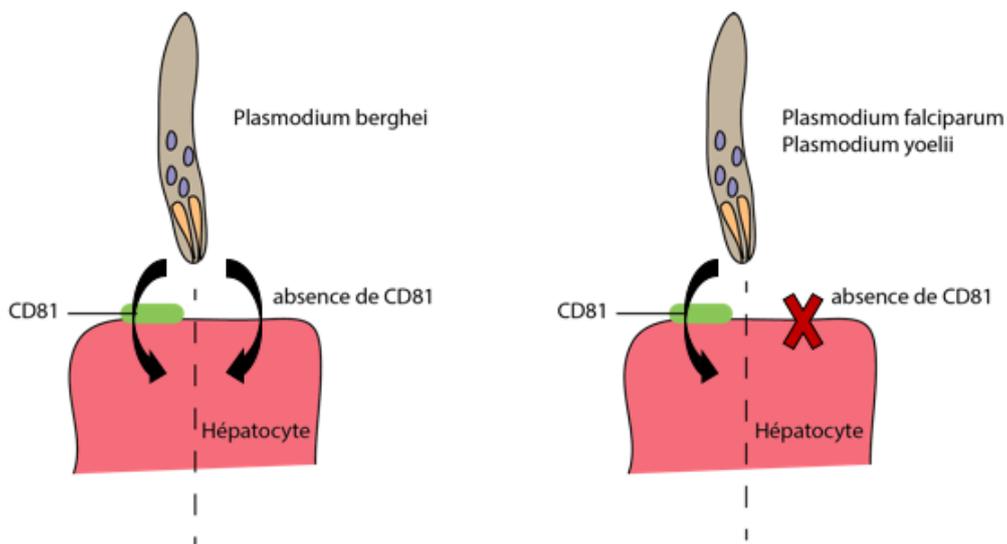


FIGURE 4.1 | Voies CD81-dépendante et CD81-indépendante lors de l'invasion des hépatocytes.

Néanmoins le mécanisme utilisé et les protéines parasitaires mises en jeu lors de l'utilisation de CD81 ne sont à ce jour pas connus.

Utilisation de la voie SR-B1 lors de l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium berghei* mais pas *Plasmodium yoelii*

Il a été mis en évidence que le récepteur SR-B1 (*Scavenger Receptor class B type 1*), également utilisé par le virus de l'hépatite C, est mis en jeu lors de l'infection des hépatocytes par *Plasmodium* [Yalaoui *et al.*, 2008a; Rodrigues *et al.*, 2008] (voir section 2.4.2).

Utilisation des voies CD81 ou SR-B1 lors de l'invasion par *Plasmodium berghei*

Plus récemment l'équipe a démontré que SR-B1 est utilisé par les sporozoïtes de *Plasmodium berghei* pour infecter les cellules n'exprimant pas CD81. En effet, l'incubation de sporozoïtes de *Plasmodium berghei* avec des cellules HepG2, n'exprimant naturellement pas CD81, et en présence d'anticorps polyclonaux ciblant SR-B1 aboutit à une forte réduction du nombre de parasites capables d'envahir les cellules. Cette réduction est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents. Le même résultat a été observé en inhibant l'expression de SR-B1 par siRNA [Manzoni *et al.*, 2017].

De plus l'utilisation d'anticorps bloquant soit CD81, soit SR-B1 lors de l'infection de cellules HepG2/CD81, exprimant ectopiquement CD81, ne bloque pas l'infection par *Plasmodium berghei*. Mais l'utilisation simultanée des deux anticorps anti-CD81 et anti-SR-B1 sur ces mêmes cellules inhibe l'invasion [Manzoni *et al.*, 2017]. Les récepteurs CD81 et SR-B1 jouent des rôles redondants lors de l'infection.

Utilisation de la voie CD81 mais pas de la voie SR-B1 lors de l'invasion par *Plasmodium yoelii*

L'infection des cellules HepG2/CD81 par *Plasmodium yoelii* est fortement réduite en présence d'anticorps ciblant CD81, mais pas avec des anticorps anti-SR-B1 [Manzoni *et al.*, 2017]. *Plasmodium yoelii* utilise la voie CD81 mais pas la voie SR-B1 pour envahir les hépatocytes. L'équipe a observé le même comportement pour *Plasmodium falciparum*.

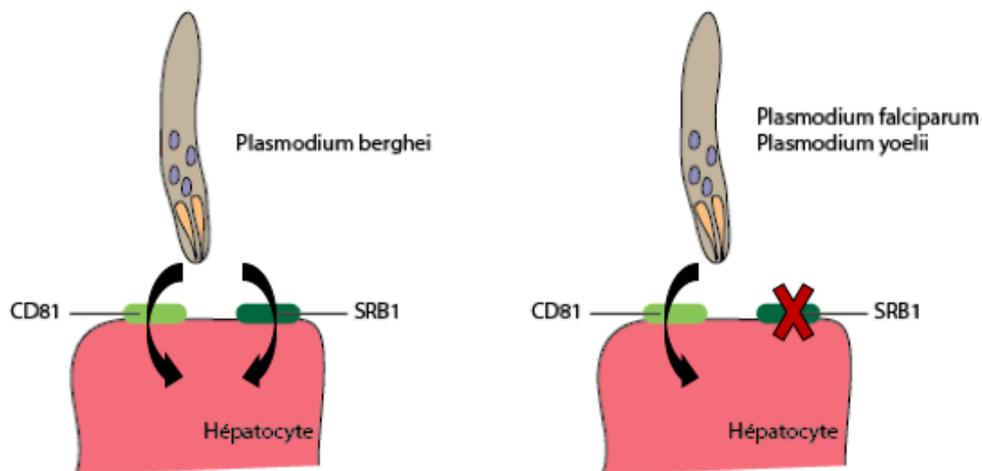


FIGURE 4.2 | Voies CD81-dépendante ou CD81-indépendante et utilisation de SR-B1 lors de l'invasion des hépatocytes.

Le récepteur SR-B1 appartient à la superfamille des récepteurs CD36

SR-B1 appartient à la superfamille des récepteurs CD36 (voir section 2.4.2). CD36 est un récepteur présent à la surface de nombreuses cellules. CD36 interagit avec la thrombospondine [Asch *et al.*, 1987].

Grâce à cette interaction CD36 est impliqué dans des phénomènes d'adhérence entre cellules. L'utilisation de protéines recombinantes de CD36 fusionnées à la GST, a montré que le domaine compris entre les acides aminés 93 et 120 de CD36 est mis en jeu lors de l'interaction avec la thrombospondine (figure 4.3.A) [Pearce *et al.*, 1995].

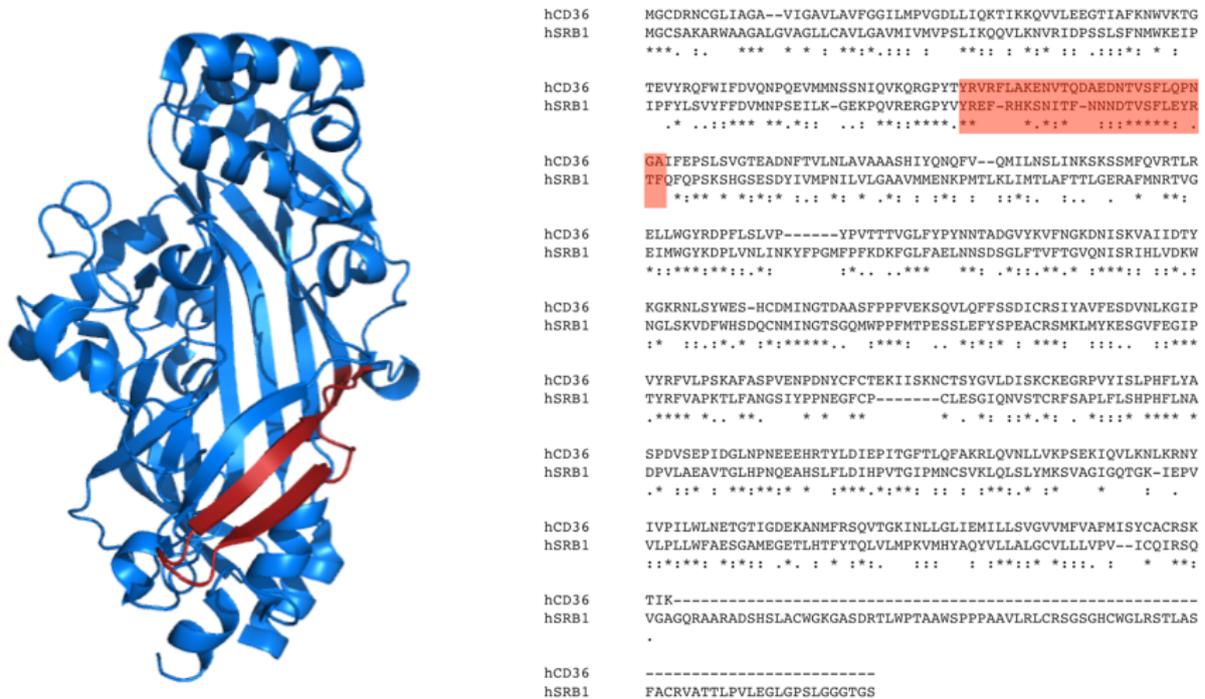


FIGURE 4.3 | Organisation structurale de CD36 et homologies avec SR-B1. A. Structure de CD36 et domaine de fixation à la thrombospondine (PDB 5LGD) [Hsieh *et al.*, 2016]. B. Alignement de la séquence de CD36 et SR-B1, avec le domaine de liaison à la thrombospondine surligné en rouge.

L'alignement des séquences de CD36 et SR-B1 montre que la région impliquée dans la liaison à la thrombospondine présente des acides aminés communs entre CD36 et SR-B1 (figure 4.3.B). Or il existe chez *Plasmodium* des protéines contenant des domaines apparentés à la thrombospondine, ce sont les protéines à domaines TSR (*thrombospondin repeat*).

Plasmodium possède des protéines à domaine TSR

Il existe 11 protéines à domaine TSR chez *Plasmodium* (figure 4.4) exprimées à différents stades de développement du parasite. Au stade de sporozoïte le parasite exprime les protéines : CSP, TRAP, TRSP, TLP, TREP, SPATR, SSP3 et TRP1. Elles sont impliquées dans des phénomènes d'adhérence, d'invasion et de motilité (voir section 2.3.1). Ces protéines possèdent un seul domaine TSR, à l'exception de SPATR qui est composé de 2 domaines TSR dégénérés.

Les structures des domaines TSR de la CSP et de TRAP ont été résolues [Doud *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012]. Ils conservent la même organisation que le domaine présent chez la thrombospondine (figure 4.5). C'est à dire trois brins associés en antiparallèle dont deux brins β. Néanmoins le domaine TSR de la protéine CSP présente également deux hélices α sur la boucle reliant les brins β.

Les domaines TSR des protéines de *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* ont des séquences très proches (tableau 4.1). Il y a plus de 95% de similitude entre les 40-50 acides aminés des domaines des deux espèces .

Étude fonctionnelle et structurale des protéines d'invasion de *Plasmodium*

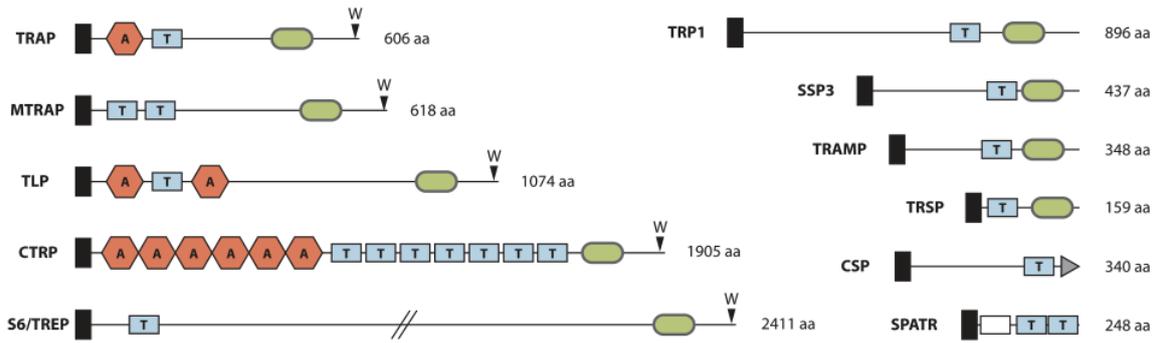


FIGURE 4.4 | Protéines de *Plasmodium* à domaine TSR [Klug et Frischknecht, 2017] noir : signal peptide de sécrétion; T : domaine à thrombospondin repeat; A : domaine von Willebrandt factor A; blanc : domaine EGF; vert : domaine transmembranaire; gris : ancre GPI; W : tryptophane conservé en position terminale.

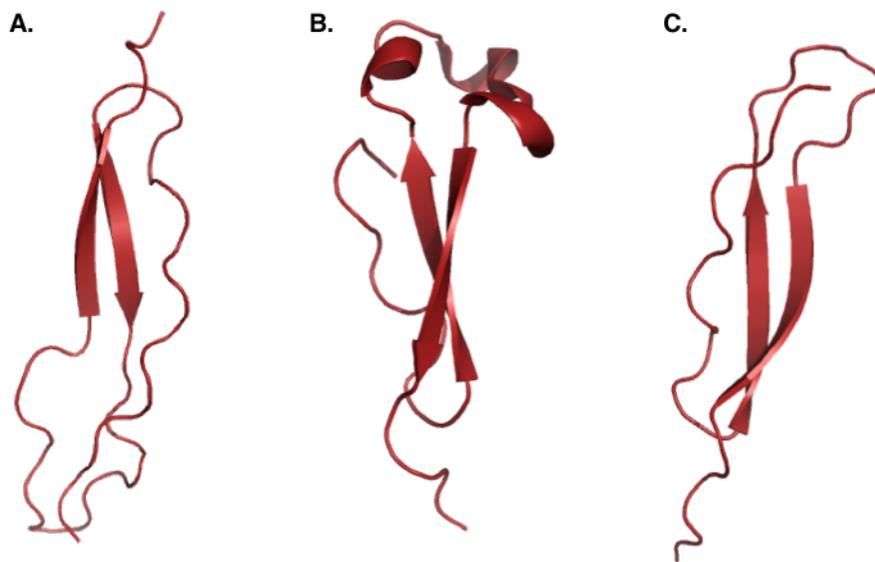


FIGURE 4.5 | Domaines TSR des protéines thrombospondin, CSP et TRAP. A. Domaine TSR de la thrombospondine humaine (PDB : 1LSL) [Tan *et al.*, 2002] B. Domaine TSR de la CSP de *Plasmodium falciparum* [Doud *et al.*, 2012]. C. Domaine TSR de la protéine TRAP de *Plasmodium vivax*.

Tableau 4.1 | Pourcentage de similitude entre les protéines ou les domaines TSR des protéines à domaines TSR de *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* calculés sur SerialCloner.

protéine	CSP	TRAP	TRSP	TLP	TREP	SSP ₃	TRP ₁
similitude protéines	89,72%	89,04%	93,71%	84,79%	77,68%	96,10%	89,81%
similitude domaines	95,83%	95,45%	95,92%	98,36%	92,50%	95,45%	93,85%

Les protéines à domaine 6 cystéines sont impliquées dans l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium*

Nous avons également vu dans l'introduction que les protéines à domaines 6 cystéines de *Plasmodium* sont impliquées dans l'invasion (voir section 2.3.2), notamment les protéines P52 et P36 qui sont exprimées chez le sporozoïte. Cependant leur rôle reste mal défini et controversé (voir section 2.3.2).

4.2 Complémentation des parasites *Plasmodium yoelii* avec les gènes TSR de *Plasmodium berghei*

4.2.1 Objectif : Identification des facteurs parasitaires mis en jeu lors de l'utilisation de la voie SR-B1

Objectif : Nous voulons savoir si les protéines à domaines TSR de *Plasmodium berghei* sont impliquées dans la voie d'entrée via SR-B1. Pour cela, j'ai complétement des parasites *Plasmodium yoelii* avec des chromosomes artificiels permettant l'expression des protéines à domaine TSR de *Plasmodium berghei*. J'ai ensuite testé l'invasion des cellules via la voie SR-B1.

La première étape consiste donc à obtenir des vecteurs de complémentation permettant d'exprimer chez *Plasmodium yoelii* les différentes protéines de *Plasmodium berghei* de façon stable et sans intégration dans le génome. Ces vecteurs sont transfectés chez un parasite *Plasmodium yoelii* exprimant la GFP [Manzoni *et al.*, 2014]. Les parasites ayant intégré le plasmide ont été sélectionnés grâce à une cassette de résistance à la pyriméthamine. Les parasites sélectionnés sont ensuite génotypés pour vérifier la présence du vecteur de complémentation (figure 4.6 ①).

Les parasites possédant les chromosomes artificiels ont été transmis aux moustiques afin de récupérer des sporozoïtes et de réaliser des tests d'invasion. Les tests d'invasion ont été réalisés sur des cellules HepG2 ne permettant pas l'infection par la voie CD81 et sur des cellules HepG2/CD81 possédant les deux voies d'invasion. Les cellules sont analysées par FACS 24 heures post-infection afin de détecter la présence des parasites GFP dans les cellules lorsqu'il y a eu invasion (figure 4.6 ②).

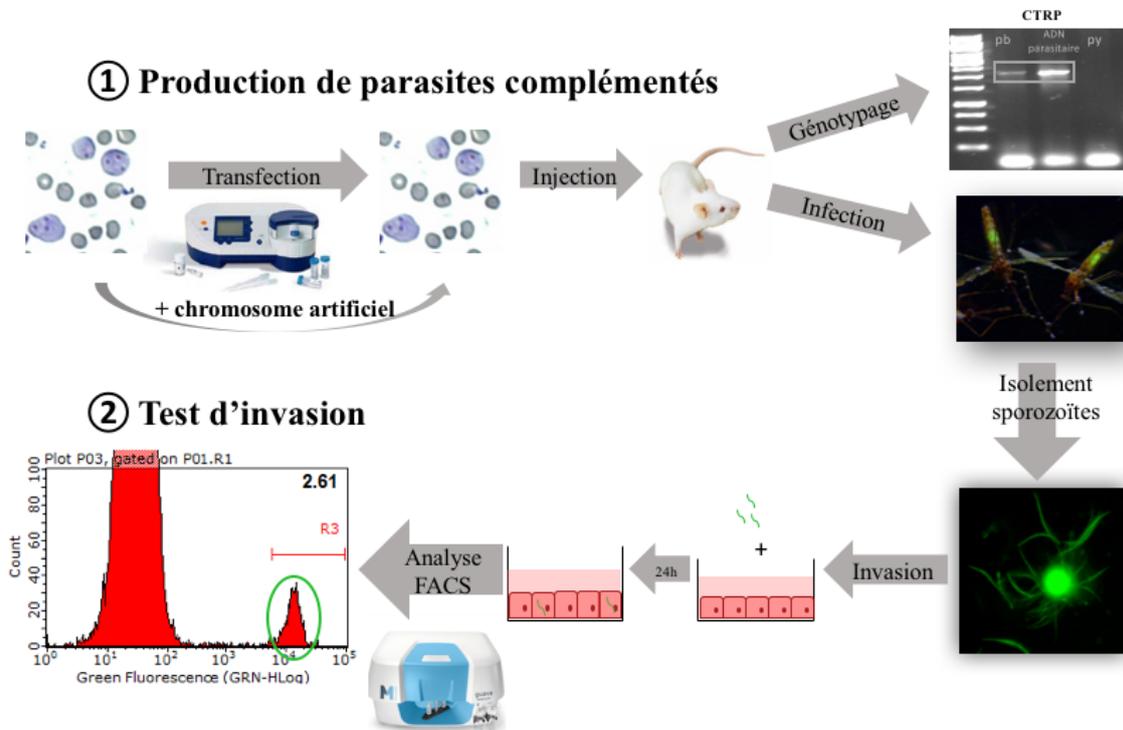


FIGURE 4.6 | Stratégie mise en place pour l'étude des protéines de la famille TSR. ① Production de parasites *Plasmodium yoelii* complétements avec les protéines de la famille TSR de *Plasmodium berghei*. ② Tests d'invasion des lignées cellulaires HepG2 et HepG2/CD81 par les parasites complétements afin de voir si la voie SR-B1 est restaurée.

4.2.2 Obtention de chromosomes artificiels permettant l'expression de protéines TSR de *Plasmodium berghei*

Les plasmides ont été obtenus grâce à la banque PlasmogEM de l'institut Sanger. Cette banque possède des vecteurs que l'on peut transformer en chromosomes artificiels permettant l'expression de protéines de *Plasmodium berghei*. Nous avons donc demandé les vecteurs correspondant aux protéines TSR listées dans le tableau 4.2. Ces vecteurs possèdent les différents gènes ainsi que des régions en amont et en aval du gène.

Tableau 4.2 | Liste des vecteurs contenant des protéines à domaines TSR de *Plasmodium berghei* présents dans la banque plasmogEM. Id clone : identité du clone dans la banque PlasmogEM; amont : taille de la région présente en amont du gène sur le vecteur; aval : taille de la région présente en aval du gène sur le vecteur; taille insert : taille de l'insert comprenant le gène et les régions en amont et aval.

nom	Id clone	Id gene	taille gène	début	fin	amont	aval	taille insert
CTRP	pbACo2_23c12	pbANKA_041290	5 718pb	473 151	480 751	943 pb	940 pb	7 600pb
TRAP	pbACo2_123ho8	pbANKA_134980	1 821pb	1 900 822	1 907 331	4432	257	6 509pb
TLP	pbACo2_23c06	pbANKA_111600	3 225pb	584 929	591 372	1 545 pb	1 674 pb	6 443pb
MTRAP	pbACo2_128c06	pbANKA_051280	1 974pb	497 244	503 225	2 037 pb	1 971 pb	5 981pb
CSP	pbACo2_78c04	pbANKA_040320	1 023pb	124 687	132 605	5 028 pb	1 868 pb	7 918pb
TRSP	pbACo2-73b05	pbANKA_020910	809pb	335 544	341 564	3 166 pb	2 046 pb	6 020pb
SPATR	pbACo2_136f08	pbANKA_030950	1 083pb	343 042	349 092	909 pb	4 059 pb	6 050pb
TRAMP	pbACo2_93d12	pbANKA_143360	1 047pb	1 196 802	1 199 955	3 892 pb	2 100 pb	3 153pb
SSP3	pbACo2_120f06	pbANKA_142520	1 314pb	907 281	914 739	4 887 pb	1 258 pb	7 458pb

Les vecteurs utilisés sont des vecteurs linéaires qui permettent l'insertion de grandes régions d'ADN de *Plasmodium*. Les extrémités sont ainsi libres de pivoter lors de la réplication et les régions clonées sur le vecteur ne sont pas sujettes au stress résultant du superenroulement. Afin de garantir la stabilité de ces vecteurs, des régions télomériques en épingles à cheveux ont été ajoutées aux extrémités. Le vecteur est composé d'une origine de réplication R6K, une protéine initiatrice de la réplication repA, une cassette de résistance au chloramphénicol et une cassette de résistance à l'ampicilline qui permettent de maintenir le plasmide chez la bactérie (figure 4.7). Ce vecteur est présent en faible nombre (≈ 5 copies par cellule) afin de permettre une propagation stable des inserts.

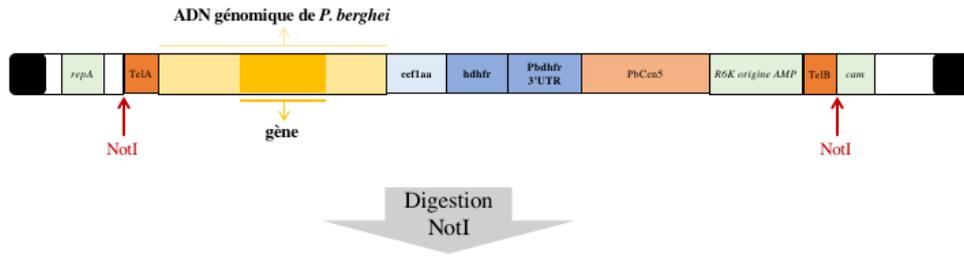
Les vecteurs sont clivés en NotI ce qui permet d'obtenir un chromosome artificiel stable chez *Plasmodium*. Ce chromosome artificiel possède des télomères et une région centromérique de *Plasmodium berghei* permettant de garantir la stabilité du chromosome artificiel [Pace *et al.*, 1987; Iwanaga *et al.*, 2010]. Le promoteur eef1aa permet l'expression de la DHFR humaine avec la région 3'UTR de la DHFR de *Plasmodium berghei* (figure 4.7).

Après réception des vecteurs ceux-ci ont été transformés dans des bactéries XL-1 (voir protocole B.2.1), puis les bactéries ont été cultivées en milieu liquide toute la nuit afin d'en extraire l'ADN par miniprep (voir protocole B.2.2). Les vecteurs obtenus ont été digérés par l'enzyme NotI selon le protocole de digestion enzymatique (voir protocole B.1.1).

4.2.3 Transfection des parasites *Plasmodium yoelii* avec les chromosomes artificiels et vérification de la présence des gènes TSR de *Plasmodium berghei* chez les parasites transfectés

Une fois les chromosomes artificiels linéarisés ceux-ci sont transfectés chez un parasite *Plasmodium yoelii* exprimant la GFP (voir protocole C.1.1). Pour cela, des parasites *Plasmodium yoelii* GFP sont injectés chez une souris et collectés lorsque la parasitémie est supérieure à 2%. Le sang parasité est alors

A. pJPAC (13.7 kb) + ADN génomique (6-9kb)



B. Chromosome Artificiel à injecter

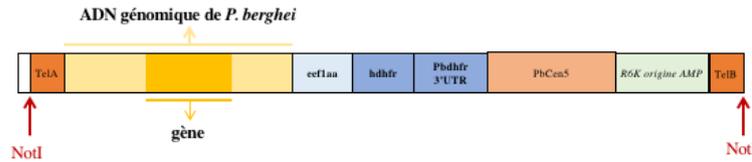


FIGURE 4.7 | Schéma représentant les chromosomes artificiels permettant la complémentation avec les protéines TSR de *Plasmodium berghei*. A. Chromosome artificiel avant linéarisation. B. Chromosome artificiel après linéarisation par digestion enzymatique avec NotI. Rectangles noirs : télomères en épingle à cheveux; repA : origine de réplication; TelA et TelB : régions télomériques de *Plasmodium berghei*; eef1aa : promoteur bidirectionnel; hdhfr : human dihydrofolate réductase; Pbdhfr 3'UTR : région 3'UTR du gène de la dihydrofolate réductase de *Plasmodium berghei*; PbCen5 : région centromérique de *Plasmodium berghei*; R6K origin AMP ; cam : cassette de résistance à la chloramphénicol.

mis en culture à 37 °C sous une légère agitation après avoir été oxygéné. Après 12h d'incubation, on vérifie que les parasites soient bien au stade schizonte que l'on isole ensuite sur un coussin de Nycodenz. La rupture mécanique en pipettant les schizontes purifiés permet de libérer les mérozoïtes qui peuvent alors être électroporés en présence d'un chromosome artificiel. Après l'électroporation, les parasites sont injectés chez une souris afin qu'ils se développent et 24 heures après l'injection, on ajoute de la pyriméthamine dans l'eau de boisson des souris pour sélectionner les parasites ayant bien incorporés la construction (figure 4.8).

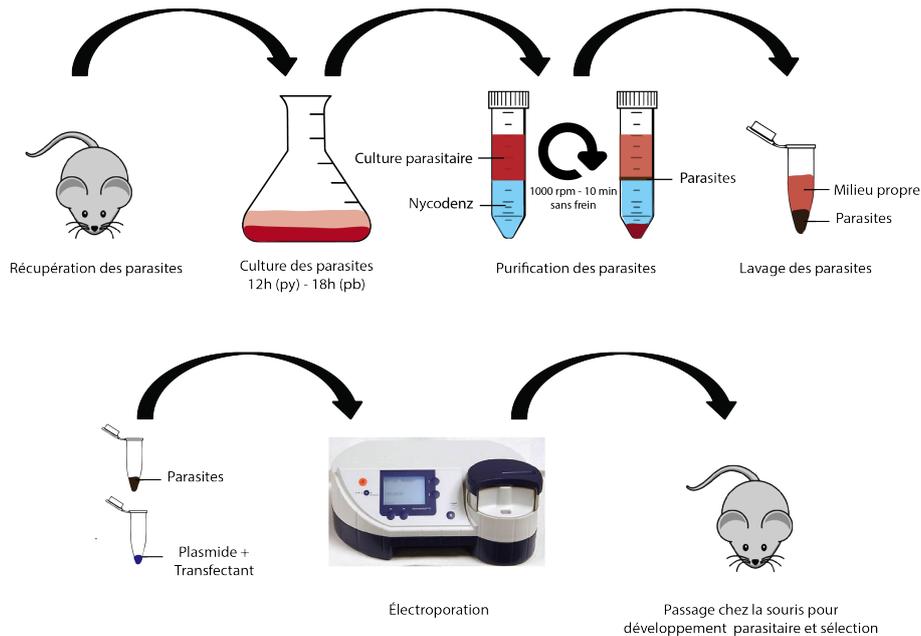


FIGURE 4.8 | Schéma représentant le protocole de transfection de parasites de rongeurs. La première ligne représente l'isolement des parasites après collecte chez la souris, maturation sur la nuit et séparation sur coussin de Nycodenz. La seconde ligne montre l'électroporation du parasite avec l'ADN à intégrer et l'injection dans la souris.

Lorsque la parasitémie atteint plus de 5%, le sang est collecté et les parasites sont isolés. L'ADN est ensuite extrait et permet de réaliser des PCR de génotypage afin de vérifier la présence du chromosome artificiel (voir protocole C.2).

4.2.4 Génotypage des parasites *Plasmodium yoelii* ayant été transfectés avec les chromosomes artificiels permettant l'expression des protéines TSR de *Plasmodium berghei*

Après avoir été transfectés et sélectionnés, les parasites ont été génotypés par PCR à partir de leur ADN génomique. Les primers utilisés (voir Annexe ??) ont été choisis de telle sorte que le gène de la protéine TSR homologue chez *Plasmodium yoelii* à celle transfectée ne soit pas détecté ou alors observé à une taille différente lors de la migration des PCR sur gel d'agarose. Les PCR ont donc été réalisées également sur des parasites sauvages de *Plasmodium berghei* pour vérifier la bonne détection et de *Plasmodium yoelii* pour vérifier que les amorces soient bien spécifiques. Comme observé sur la figure 4.9, les parasites ont bien intégré le chromosome artificiel à l'exception du gène TRAP.

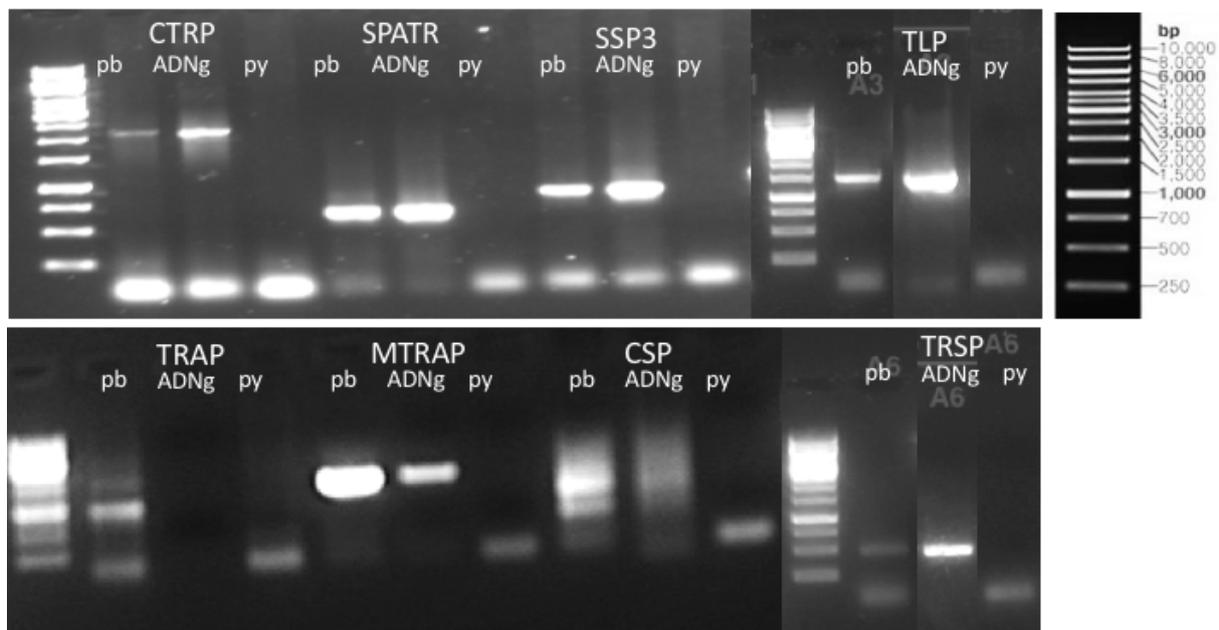


FIGURE 4.9 | Résultat des PCR de génotypage des parasites *Plasmodium yoelii* complétés avec les gènes TSR de *Plasmodium berghei*. À droite, marqueur de taille de 1kb. Tailles attendues : CTRP 2 248pb; SPATR 668pb; SSP3 869pb; TLP 1 510pb; TRAP 911pb; MTRAP 1 411pb; CSP 522pb; TRSP 482 pb.

4.3 Résultats des tests d'invasion

4.3.1 Résultats des tests d'invasion des cellules HepG2 et HepG2CD81 par les parasites *Plasmodium yoelii* complétés avec les gènes TSR de *Plasmodium berghei*

Les parasites possédant les chromosomes artificiels sont transmis aux moustiques. Après 15 jours de maturation, les parasites ont migré dans les glandes salivaires. Les moustiques sont collectés et disséqués afin de récupérer les glandes salivaires. Les sporozoïtes sont ensuite isolés et lavés avant d'être déposés sur les cellules HepG2 ou HepG2/CD81. Les cellules sont mises en plaque P96 la veille, en disposant 30 000 cellules par puits. 10 000 sporozoïtes sont ajoutés par puits. La plaque est alors incubée à 37 °C pendant 3 heures le temps que les sporozoïtes envahissent les cellules. Les cellules sont ensuite

lavées avec du milieu et remises à incuber pendant 24 heures. Le lendemain, les cellules sont décollées à la trypsine puis analysées par FACS. Les cellules présentant une fluorescence verte sont des cellules infectées, car les parasites utilisés possèdent une cassette permettant l'expression de la GFP.

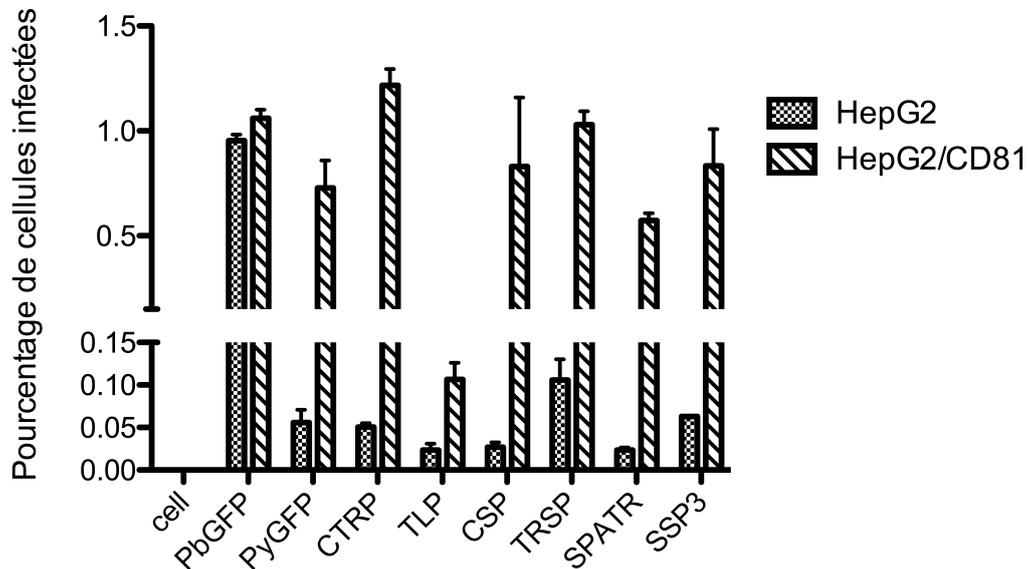


FIGURE 4.10 | Pourcentage des cellules HepG2 ou HepG2/CD81 infectées par les différents parasites complémentés. Les cellules HepG2 ou HepG2/CD81 sont incubées en présence des différents parasites *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. yoelii* complémentés avec les différents vecteurs contenant les gènes des protéines TSR de *P. berghei*. Les cellules sont analysées par FACS 24 heures après l'infection. Les cellules infectées sont détectées grâce à la fluorescence verte des parasites.

Les résultats obtenus sont présentés sur le graphique de la figure 4.10. Les cellules seules ne sont pas fluorescentes. Les cellules HepG2 ou HepG2/CD81 sont infectées par *Plasmodium berghei*, tandis que *Plasmodium yoelii* n'infecte que les cellules HepG2/CD81. On observe cependant un faible pourcentage d'infection des cellules HepG2 par *Plasmodium yoelii*. Ce faible pourcentage d'infection correspond à la présence de parasites intranucléaires lorsque l'on observe les cellules au microscope. En effet, il arrive que des parasites entrent dans le noyau lors de la traversée cellulaire, mais ils sont ensuite incapables de se développer complètement [Silvie *et al.*, 2006b].

Les parasites *Plasmodium yoelii* complémentés par les protéines TSR de *Plasmodium berghei* présentent un phénotype identique à *Plasmodium yoelii*. Malgré le faible pourcentage de cellules infectées par le parasite complémenté par la protéine TLP de *Plasmodium berghei*, la différence d'infection entre les cellules HepG2 et HepG2/CD81 reste présente. La complémentation ne permet pas d'infecter des cellules n'exprimant pas CD81 par *Plasmodium yoelii* possédant un vecteur d'expression d'une des protéines TSR de *Plasmodium berghei*. Les protéines CTRP, TLP, CSP, TRSP, SPATR et SSP3 de *Plasmodium berghei* ne permettent pas l'utilisation de la voie CD81-indépendante.

4.3.2 Identification des protéines à 6 cystéines P36 et P52 comme facteurs parasitaires impliqués dans les voies d'entrées SR-B1 et CD-81 dépendantes

L'équipe a mis en évidence qu'une autre famille de protéines de *Plasmodium* joue un rôle déterminant lors de l'invasion. Il s'agit de la famille des protéines à domaine 6 cystéines, et plus précisément les protéines P36 et P52 dont le rôle était jusqu'alors controversé (voir section 2.3.2).

Les protéines parasites P36 et P52 sont nécessaires lors de l'invasion des hépatocytes

Il a tout d'abord été montré que les parasites de *Plasmodium berghei* délétés à la fois de P36 et P52 ne sont plus capables d'infecter les cellules HepG2 (voie d'entrée via SR-B1) et Hepa1-6 (voie d'entrée via CD81) contrairement au parasite sauvage (figure 4.11.A.B.). Les cinétiques observées pour les parasites mutants sont les mêmes que celles des parasites sauvages en présence d'anticorps ciblant SR-B1 lors de l'invasion des HepG2 ou CD81 lors de l'invasion des Hepa1-6 (figure 4.11.C). De plus, les parasites $\Delta P36/P52$ ne sont pas capables de former de vacuole parasitophore. Les mutants contrairement aux parasites sauvages ne sont pas capables de se développer que ce soit dans les cellules HepG2 ou les cellules HepG2/CD81 (figure 4.11.C) [Manzoni *et al.*, 2017].

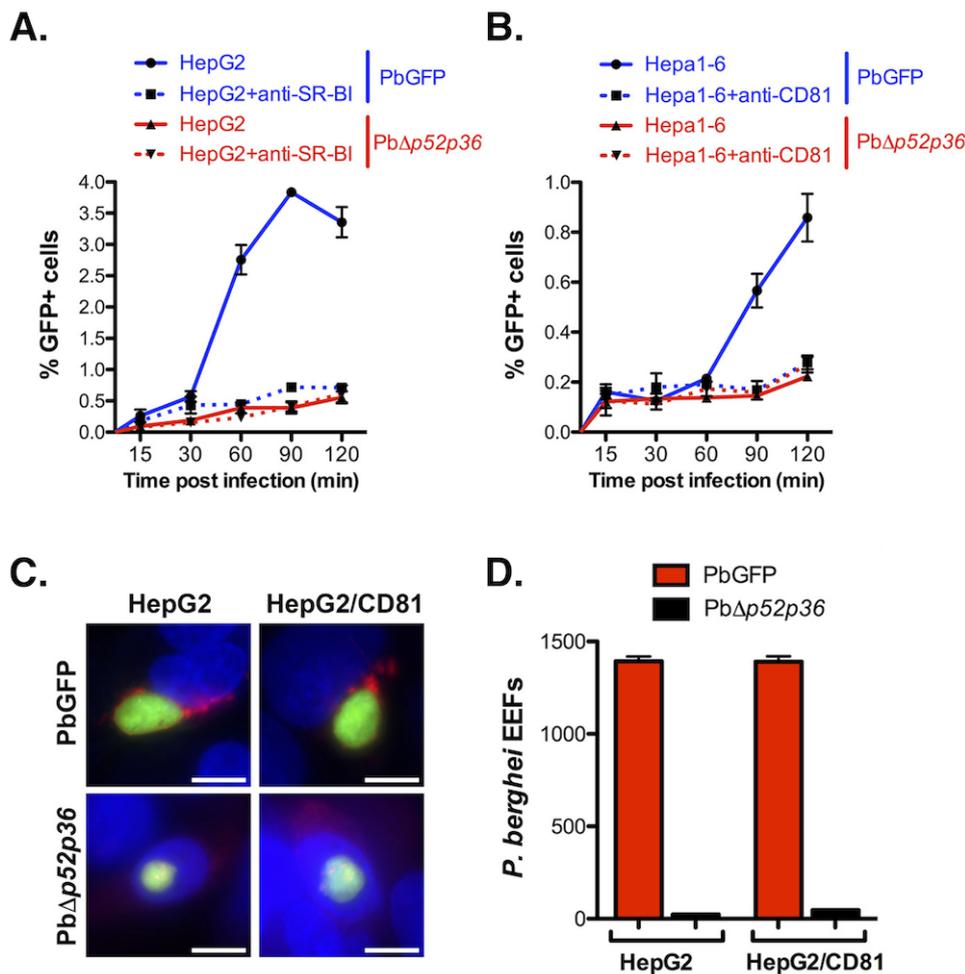


FIGURE 4.11 | Les protéines P52 et P36 sont nécessaires à l'invasion productive des hépatocytes par *Plasmodium* [Manzoni *et al.*, 2017]. **A.** Pourcentage de cellules infectées après incubation des cellules HepG2 avec des sporozoïtes PbGFP (lignes bleues) ou Pb $\Delta P52/P36$ (lignes rouges) en présence (lignes pointillées) ou absence (lignes pleines) d'anticorps anti-SRB1. **B.** Pourcentage de cellules infectées après l'incubation des cellules HepG2/CD81 avec des sporozoïtes PbGFP (lignes bleues) ou Pb $\Delta P52/P36$ (lignes rouges) en présence (lignes pointillées) ou absence (lignes pleines) d'anticorps anti-SRB1. **C.** Immunofluorescence de cellules HepG2 ou HepG2/CD81 infectées par des parasite PbGFP ou Pb $\Delta P52/P36$. Les cellules ont été fixées 24 heures post-infection. La vacuole parasitophore est marquée avec un anticorps anti-UIS4 (en rouge) et le noyau avec du Hoechst-33342 (en bleu). Les parasites sont fluorescents verts. Barre d'échelle : 10 μ m. **D.** Nombre de formes exo-érythrocytaires (EEFs, *exo-erythrocytic forms*) observées par microscopie à fluorescence 24 heures post-infection. Les cellules HepG2 et HepG2/CD81 infectées avec PbGFP sont représentées en rouge et celles infectées par Pb $\Delta P52/P36$ en noir.

Les mêmes résultats ont été obtenus pour le parasite *Plasmodium yoelii* $\Delta P36/P52$ [Manzoni *et al.*, 2017].

P36 joue un rôle clé lors de l'utilisation des voies d'entrée CD81 et SR-B1

Afin d'étudier plus en détail le rôle joué par P36 et P52 lors de l'invasion, les parasites *Pb* Δ P52/P36 ont été complétés avec des chromosomes centromériques [Iwanaga *et al.*, 2010] permettant l'expression de P36 et P52. Ces chromosomes sont composés soit de P36 et P52 de *Plasmodium berghei* ou *Plasmodium yoelii*, soit de p36 de *Plasmodium berghei* et P52 de *Plasmodium yoelii* et inversement [Manzoni *et al.*, 2017].

La complémentation avec les protéines de *Plasmodium berghei* permet de restaurer l'infection à la fois pour les cellules HepG2 et les cellules HepG2/CD81, avec formation d'une vacuole parasitophore autour des parasites (figure 4.12). Tandis que la complémentation avec des protéines de *Plasmodium yoelii* ne restaure efficacement l'invasion que pour les cellules HepG2/CD81 et pas pour les cellules HepG2 où l'on observe quelques parasites intranucléaires incapables de former une vacuole parasitophore (figure 4.12). Néanmoins lorsque le parasite est complété avec la protéine P36 de *Plasmodium berghei* que ce soit en association avec P52 de *Plasmodium berghei* ou de *Plasmodium yoelii* les parasites sont capables d'envahir les deux types cellulaires et de former des vacuoles parasitophores (figure 4.12). Ce qui n'est pas le cas pour la complémentation avec la protéine P36 de *Plasmodium yoelii*.

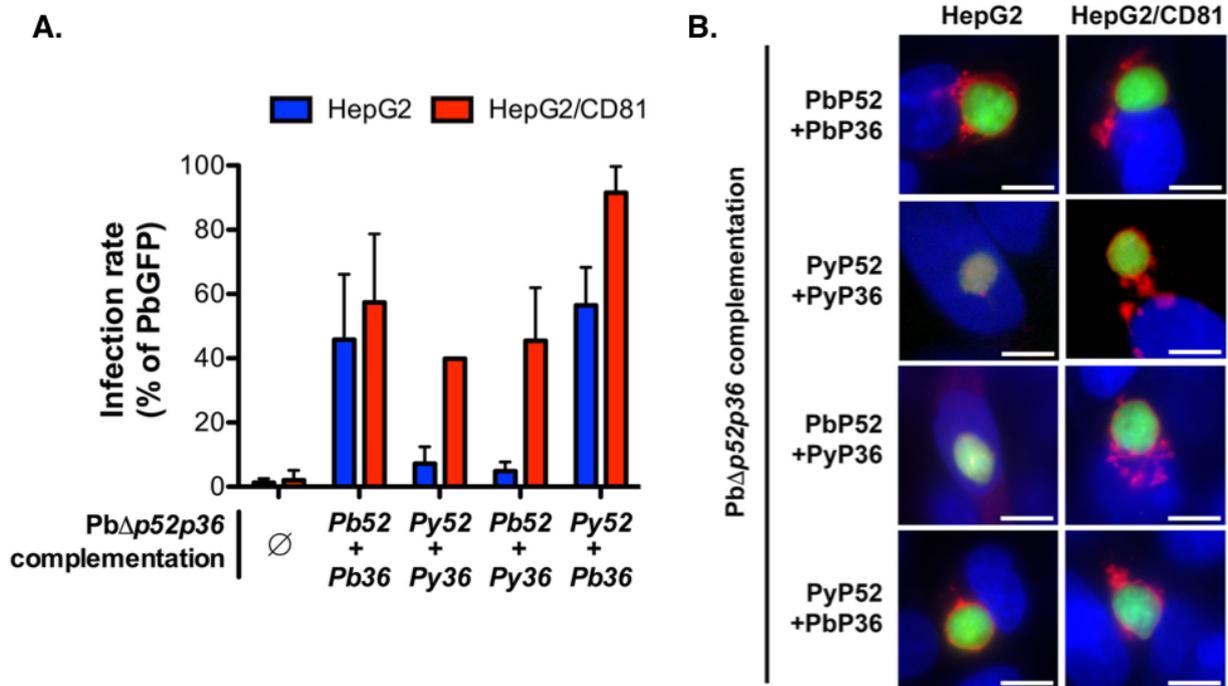


FIGURE 4.12 | La protéine P36 permet l'utilisation de la voie CD81-indépendante par les sporozoïtes [Manzoni *et al.*, 2017]. A. Infection des cellules HepG2 (en bleu) et HepG2/CD81 (en rouge) par les parasites *Pb* Δ P52/P36 complétés avec les protéines P52 et P36 de *Plasmodium berghei* et/ou *Plasmodium yoelii* ou non complétés \emptyset . Les résultats présentés sont issus de trois expériences indépendantes et les taux d'infection sont calculés par rapport aux cellules contrôles infectées par *Pb*GFP (moyenne \pm écart-type). B. Analyse par immunofluorescence des cellules HepG2 ou HepG2/CD81 infectées par les sporozoïtes de *Pb* Δ P52/P36 complétés. Les cellules ont été fixées à la PFA 28 heures post-infection, perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-UIS4 (en rouge) et du Hoechst 33342 pour colorer les noyaux (en bleu). Les parasites sont observés en vert grâce à l'expression de la GFP. Barre d'échelle : 10 μ m.

La complémentation du parasite *Py* Δ P36/P52 avec *Pb*P52 et *Py*P36 restaure l'infection des cellules HepG2/CD81 mais pas des cellules HepG2. Ce qui confirme le rôle essentiel de ces deux protéines lors de l'invasion. De plus, la complémentation du parasite *Plasmodium yoelii* délété pour les protéines P36 et P52, avec la protéine P36 de *Plasmodium berghei* associée à P52 de *Plasmodium berghei* ou *Plasmodium yoelii* rend le parasite capable d'infecter et de se développer dans les cellules HepG2 et HepG2/CD81

(figure 4.13). Ainsi, PbP36 permet à *Plasmodium yoelii* d'infecter des cellules n'exprimant pas CD81 qu'il n'est pas capable d'infecter lorsqu'il est sauvage.

En conclusion, P52 et P36 jouent un rôle essentiel lors de l'invasion des hépatocytes, et l'expression de PbP36 est suffisante pour permettre au parasite *Plasmodium yoelii* d'infecter les cellules en l'absence de CD81. P36 est donc un déterminant de la voie d'entrée.

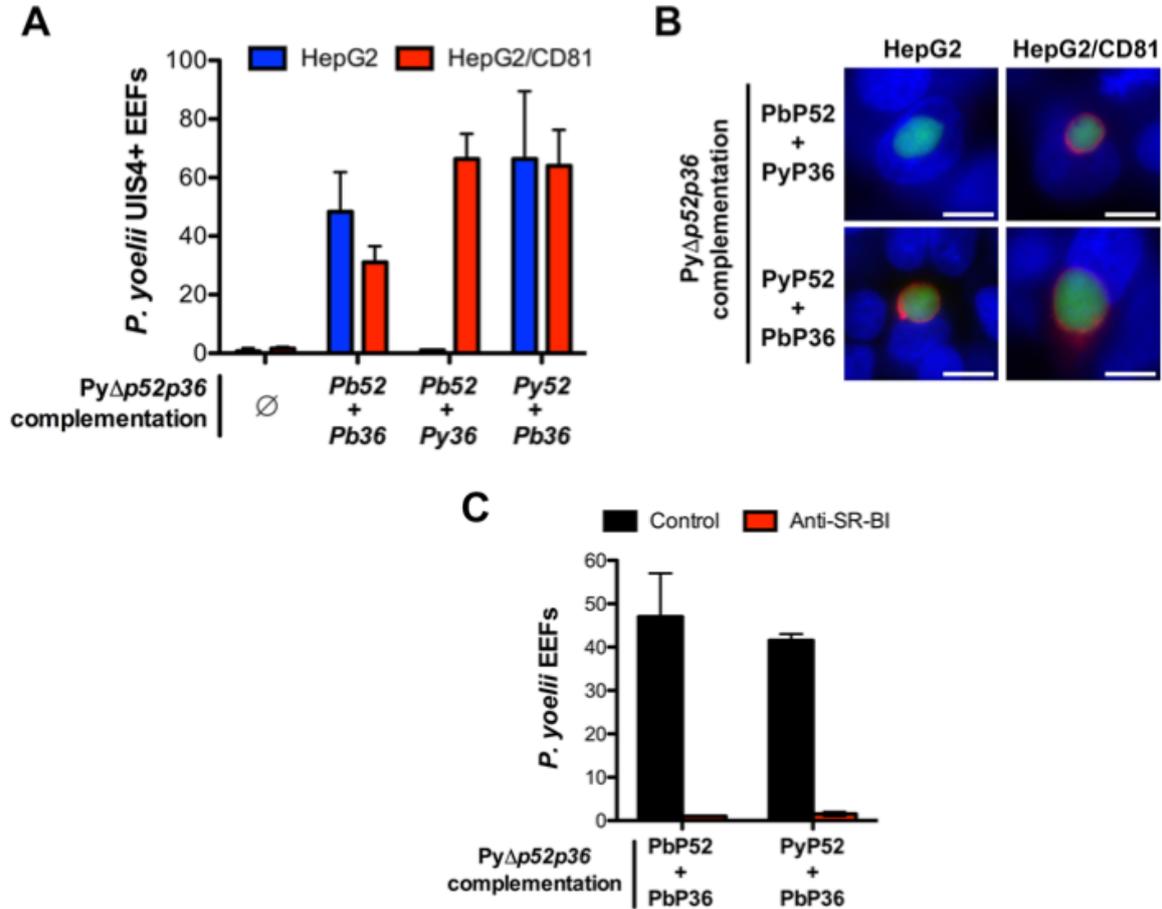


FIGURE 4.13 | L'expression de PbP36 chez *Plasmodium yoelii* permet au parasite d'infecter les cellules n'exprimant pas CD81 en utilisant la voie SR-B1 [Manzoni et al., 2017]. **A.** Infection des cellules HepG2 (en bleu) et HepG2/CD81 (en rouge) par les parasites Py Δ P52/P36 complétés avec les protéine P52 et P36 de *Plasmodium berghei* et/ou *Plasmodium yoelii*. Les résultats présentés sont issus de trois expériences indépendantes et les taux d'infections sont calculés par rapport aux cellules contrôles infectées par PyGFP (moyenne \pm écart-type). **B.** Analyse par immunofluorescence des cellules HepG2 ou HepG2/CD81 infectées par les sporozoïtes de Py Δ P52/P36 complétés. Les cellules ont été fixées à la PFA 28 heures post-infection, perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-UIS4 (en rouge) et de l'Hoechst 33342 pour colorer les noyaux (en bleu). Les parasites sont observés en vert grâce à l'expression de la GFP. Barre d'échelle : 10 μ m. **C.** Infection des cellules HepG2 ou HepG2/CD81 avec les parasites Py Δ P52/P36 complétés avec PbP36 et PbP52 ou PyP52 en présence d'anticorps anti-SR-B1. Les cultures sont fixées 24 heures post-infection et le nombre de EEFs (*exo-erythrocytic forms*) a été déterminé par microscopie à fluorescence.

5

ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES DIFFÉRENTS DOMAINES DE P36 DANS L'UTILISATION DES VOIES CD81 OU SR-B1

5.1 Contexte et objectif :

Rôle clé de PbP36 dans la voie CD81-indépendante

Nous venons de voir que P36 joue un rôle clé lors de l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium* [Manzoni *et al.*, 2017] (voir section 4.3.2). Nous avons vu tout d'abord que les protéines P52 et P36 sont nécessaires à l'invasion des hépatocytes par les voies CD81 ou SR-B1, que ce soit pour *Plasmodium berghei* ou *Plasmodium yoelii*. Nous avons ensuite identifié la protéine P36 de *Plasmodium berghei* comme déterminant moléculaire permettant l'utilisation de la voie SR-B1. C'est pourquoi nous proposons un modèle de type clé serrure avec les protéines P52 et P36 composant la clé permettant d'utiliser les voies d'entrées CD81 ou SR-B1 (figure 5.1). La protéine PbP36 permet l'utilisation de la voie SR-B1 que ne permet pas PyP36.

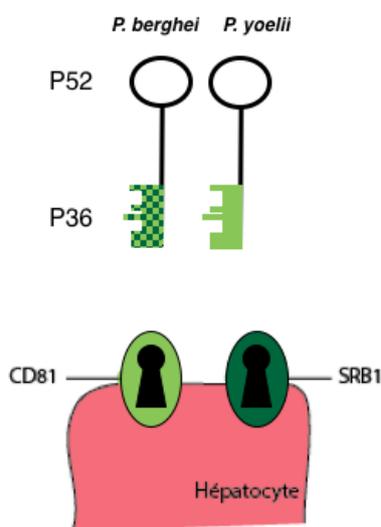


FIGURE 5.1 | Modèle clé-serrure de P36 et P52 lors de l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium*. Les protéines sont représentées sous forme de clé, avec P52 représentant la structure de la clé en noir et P36 le bout de la clé en vert. Les récepteurs CD81 (en vert clair) et SR-B1 (en vert foncé) sont représentés sous forme de serrures. La protéine P36 de *Plasmodium berghei* permet d'utiliser à la fois la voie d'entrée CD81 et SR-B1. Tandis que P36 de *Plasmodium yoelii* ne permet l'invasion que via la voie CD81.

Objectif : identifier et analyser les déterminants structuraux impliqués dans la fonction de la protéine P36

Existe-t-il une différence structurale entre les protéines P36 de *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* qui permettrait d'expliquer la différence d'utilisation des voies d'entrées par ces espèces ?

Pour répondre à cette question je vais dans un premier temps m'intéresser aux séquences et aux structures de PbP36 et PyP36. J'utiliserai ensuite des parasites de *Plasmodium berghei* délétés pour la protéine P36 et complétés avec des protéines chimériques de P36 mixant les domaines de *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. L'invasion des cellules HepG2 et HepG2/CD81 par ces parasites me permettra de tester si l'un des domaines de *Plasmodium berghei* est associé à l'invasion par la voie SR-B1.

5.2 Modélisation et analyse structurale de la protéine P36

5.2.1 Comparaison des séquences de P36 entre différentes espèces plasmodiales

P36 appartient à la famille des protéines à domaine 6 cystéines (voir section 2.3.2). C'est une protéine d'un poids moléculaire prédit à 35kDa, mais observée à 26kDa [Ishino *et al.*, 2005].

L'annotation pour certaines espèces de *Plasmodium* de P36 dans PlasmoDB semble erronée. En effet, lorsque l'on réalise un alignement de la protéine de plusieurs espèces, on remarque que la première méthionine de la séquence n'est pas alignée, alors que quelques acides aminés plus loin, toutes les espèces partagent la même méthionine suivie des acides aminés arginine (R) et lysine (K) (figure 5.2). Il est donc possible de considérer cette méthionine comme le début de la séquence de P36.



FIGURE 5.2 | Alignement de la région N-terminale de P36 de 12 espèces plasmodiales différentes. Le premier acide aminé conservé entre toutes les espèces présentées ici est la méthionine surlignée en rouge. Cette méthionine conservée correspondrait avec notre nouvelle annotation à la méthionine initiatrice de la séquence protéique.

De plus, les données de protéomique suggèrent également que la protéine ne débute pas à la première méthionine annotée. Aucun peptide n'est identifié dans la région N-terminale que ce soit pour l'espèce *Plasmodium falciparum* (figure 5.3.A) ou *Plasmodium yoelii* (figure 5.3.B) alors qu'ils sont répartis sur le reste de la protéine de chaque espèce.

Enfin, la protéine annotée dans PlasmoDB possède deux domaines transmembranaires à la suite en N-terminal. Il y aurait donc un signal peptide d'ancrage à la membrane *via* un domaine transmembranaire. Or de toutes les protéines à 6 cystéines que l'on connaît à l'heure actuelle aucune ne possède de domaine transmembranaire. Elles sont soit solubles, soit ancrées à la membrane grâce à une ancre GPI. Or l'annotation telle que nous la suggérons réduit la région N-terminale à un unique segment hydrophobe qui correspondrait au signal peptide.

5.2.2 Analyse de la structure de P36

Organisation générale de la protéine P36

P36 possède donc un signal peptide de sécrétion mais pas d'ancre GPI. Une hypothèse serait qu'elle soit sécrétée et forme un dimère avec P52, qui possède un ancrage GPI et permettrait ainsi à P36 d'être

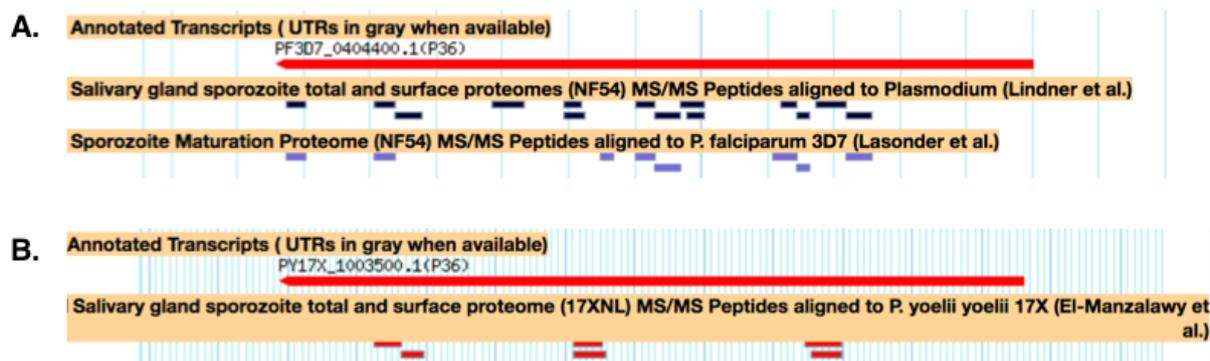


FIGURE 5.3 | Données de protéomique pour la protéine P36 de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium yoelii* [Lindner *et al.*, 2013; Lasonder *et al.*, 2008]. A. Répartition des peptides de P36 de *Plasmodium falciparum* identifiés par protéomique. B. Répartition des peptides de P36 de *Plasmodium yoelii* identifiés par protéomique. Les peptides identifiés sont répartis sur une grande partie de la protéine, néanmoins aucun peptide n'est présent dans la région N-terminale, que ce soit pour la protéine de *Plasmodium falciparum* ou *Plasmodium yoelii*. Les données ont été récupérées sur PlasmoDB [Aurrecochea *et al.*, 2009].

présentée à la surface du parasite. En effet, il a été montré que deux autres protéines de la famille à 6 cystéines, P12 et P41 sont capables de s'associer pour former un hétérodimère (voir section 2.3.2 et figure 2.30) [Tonkin *et al.*, 2013].

P36 est composée de deux domaines à 6 cystéines (voir section 2.3.2), dont l'organisation est détaillée dans les paragraphes suivants.



FIGURE 5.4 | Représentation schématique de l'organisation de la protéine P36. En orange : peptide signal de sécrétion ; en bleu et vert : les deux domaines à 6 cystéines ; en jaune : les ponts disulfures mis en jeu par les domaines.

Alignement des protéines P36 de différentes espèces plasmodiales

Un alignement des séquences de P36 de *Plasmodium falciparum* (379 aa, PlasmoDB : PF3D7_0404400), *Plasmodium vivax* (320 aa, PlasmoDB : PVX_001025), *Plasmodium berghei* (352 aa, PlasmoDB : PBANKA_1002100) et *Plasmodium yoelii* (356 aa, PlasmoDB : PY17X_1003500) a été réalisé en utilisant Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La figure 5.5 présente l'alignement des protéines P36 de *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*, ainsi qu'une région comportant une insertion chez *Plasmodium falciparum*.

Les domaines à 6 cystéines sont conservés entre les espèces de *Plasmodium*, et tout particulièrement entre *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* (figure 5.5.A). En effet, la majorité des acides aminés sont communs aux deux espèces. Les positions des cystéines impliquées dans les domaines sont très conservées. Néanmoins, on peut observer deux régions plus variables dans le domaine 2, qui sont entourées en rouge et violet sur la figure 5.5.A et appelées boucle A et boucle B. La boucle B correspond notamment à une région où il y a une grande insertion dans la séquence de *Plasmodium falciparum* (figure 5.5.C).

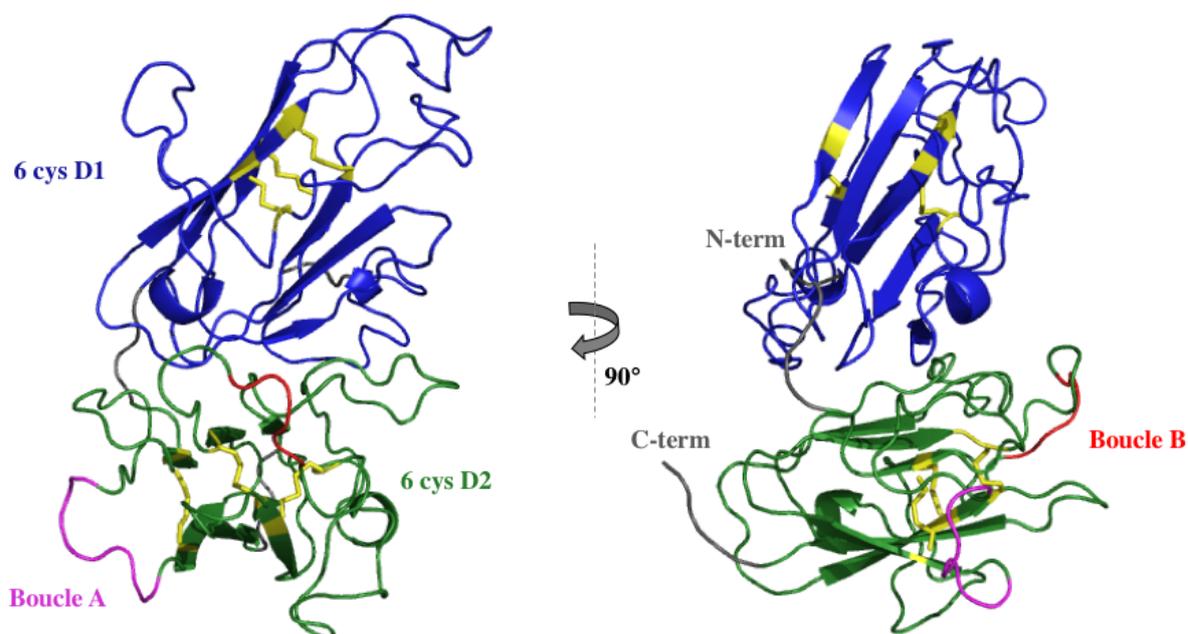


FIGURE 5.6 | Modélisation par I-Tasser de la protéine P36 de *Plasmodium berghei*. En bleu : premier domaine à 6 cystéines ; en vert : second domaine à 6 cystéines ; en jaune : cystéines et ponts disulfures ; en magenta : boucle A et en rouge : boucle B.

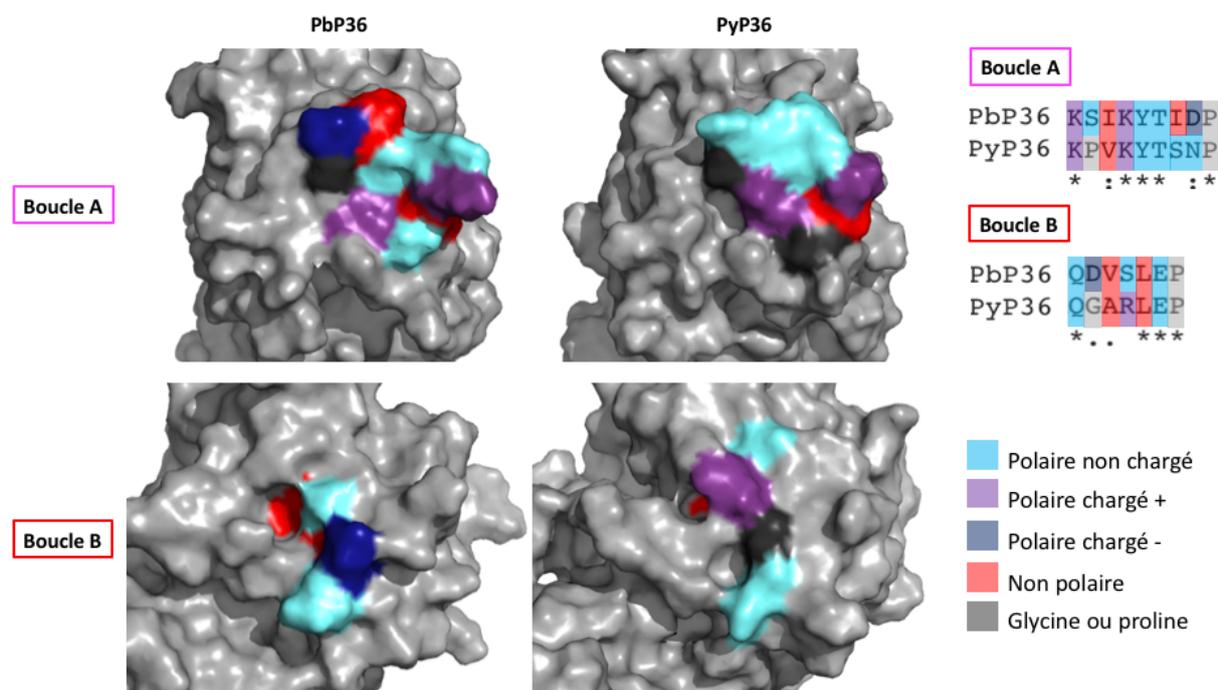


FIGURE 5.7 | Propriétés des acides aminés des boucles A et B de *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. Modélisation de la surface des boucles A et B de *P. berghei* et *P. yoelii* et alignement des séquences protéiques des boucles. En cyan : acides aminés polaires non chargés ; en violet : acides aminés polaires chargés positivement ; en bleu marine : acides aminés polaires chargés négativement ; en rouge acides aminés apolaires et en gris acides aminés aux propriétés particulières (Glycine et Proline).

Les boucles A montrent 3 différences notables. Tout d'abord une sérine est présente chez *P. berghei* tandis que la séquence de *P. yoelii* est composée d'une proline. Cette différence peut jouer sur l'architecture de la boucle puisque la proline peut par exemple faire un coude dans la structure que la sérine ne permet pas. La différence suivante est la présence d'une isoleucine, résidu apolaire, chez *P. berghei* et

d'une sérine, résidu polaire, chez *P. yoelii*. Un acide aspartique est présent chez *P. berghei* et remplacé par une asparagine chez *P. yoelii*. Ces résidus sont tous deux polaires et la taille de leur chaîne latérale est équivalente, mais la présence de l'acide asparagique apporte une charge négative dans la séquence de *P. berghei*.

Les boucles B comportent quant à elles 2 différences majeures. L'acide aspartique présent chez *P. berghei* est remplacé par une glycine chez *P. yoelii*. La chaîne latérale de la glycine étant réduite à un atome d'hydrogène, les contraintes structurales imposées par cet acide aminé permettent une grande flexibilité de la chaîne protéique. Au contraire, l'acide aspartique possède une longue chaîne latérale en comparaison et possède une charge négative. La seconde différence est la présence d'une sérine chez *P. berghei* et d'une arginine chez *P. yoelii* qui est responsable d'un encombrement stérique de part la longueur de sa chaîne latérale. L'arginine possède une charge positive, absente chez la sérine.

5.3 Stratégie de complémentation de Pb Δ P36 avec les protéines chimériques de P36

Objectifs : La protéine P36 de *Plasmodium berghei* permet l'utilisation de la voie SR-B1, contrairement à celle de *Plasmodium yoelii*. Existe-t-il des différences structurales entre ces deux protéines permettant d'expliquer ce phénomène ?

Pour répondre à cette question, j'ai complétement des parasites *Plasmodium berghei* délétés pour la protéine P36 avec des protéines P36 chimériques. Ces protéines chimériques expriment soit les deux domaines à 6 cystéines de la même espèce, soit le domaine 1 de *Plasmodium berghei* et le domaine 2 de *Plasmodium yoelii* ou inversement, soit les deux domaines de la même espèce mais avec la boucle A ou B de l'autre espèce (figure 5.8).

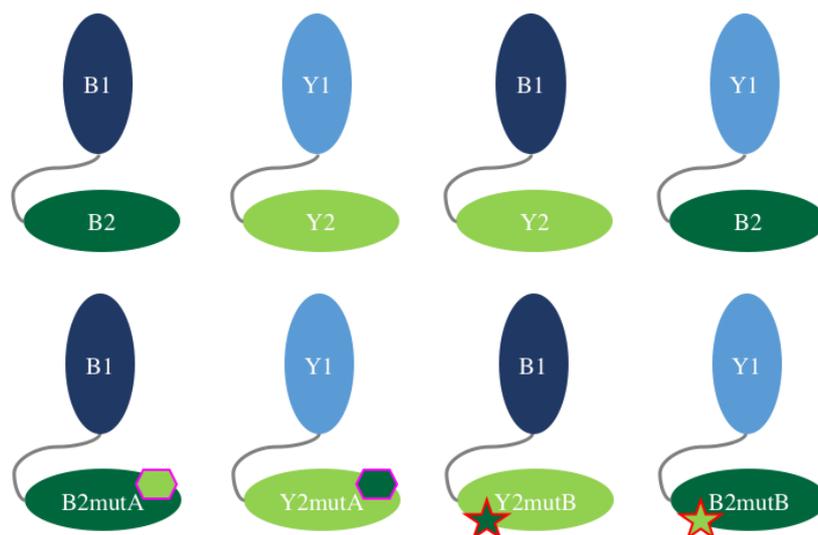


FIGURE 5.8 | Protéines chimériques de P36 utilisées pour la complémentation. Sur la première ligne, les domaines sont de la même espèce ou échangé entre espèces. Sur la seconde ligne, seule une des boucles A ou B a été modifiée pour intégrer la boucle de l'autre espèce. En bleu foncé : domaine 1 de *Plasmodium berghei*; en bleu clair : domaine 1 de *Plasmodium yoelii*; en vert foncé : domaine 2 de *Plasmodium berghei*; en vert clair : domaine 2 de *Plasmodium yoelii*; hexagone au contour magenta : boucle A et étoile au contour rouge : boucle B.

5.3.1 Production des vecteurs

Dans un premier temps, j'ai produit des vecteurs permettant l'expression stable de ces différentes protéines chimériques. Ces vecteurs comportent une région centromérique, appelée Pbcen5, permettant leur maintien au sein du parasite sans être intégrés dans le génome [Iwanaga *et al.*, 2010]. Le vecteur se compose également d'une cassette hDHFR conférant une résistance à la pyriméthamine. Cette cassette est encadrée en amont par le promoteur *eef1 α* et en aval par la région régulatrice 3'UTR de pbDFHFR. La région promotrice de la protéine P36 de *Plasmodium berghei* et la région 3' UTR de AMA1 encadre la protéine P36 chimérique à laquelle il a été ajouté du côté C-terminal une étiquette mCherry. L'étiquette mCherry permettra de valider l'expression des protéines chimériques chez les sporozoïtes.

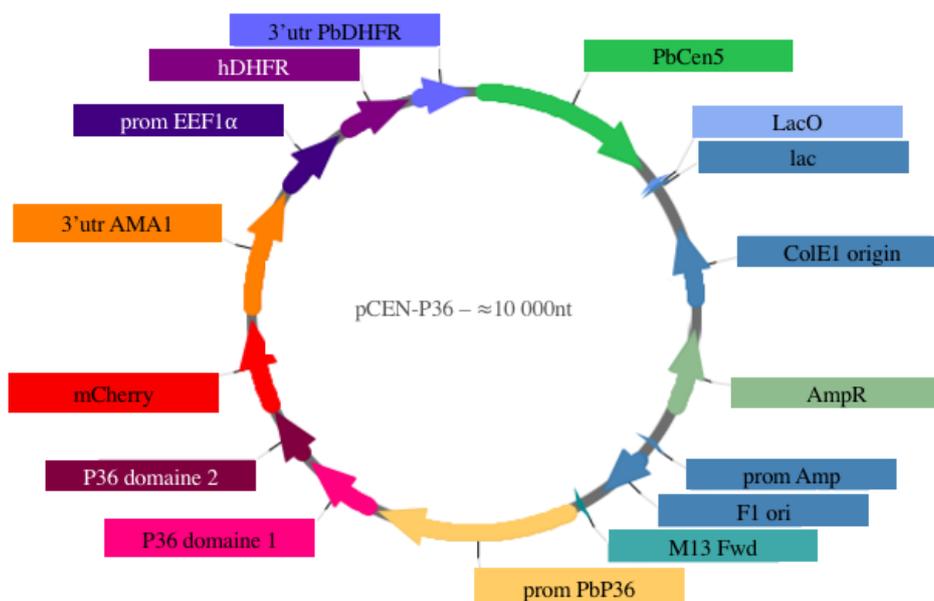


FIGURE 5.9 | Vecteur utilisé pour la complémentation avec des protéines chimériques de P36. En bleu et vert pastel : les gènes nécessaires à la bactérie dont une cassette de résistance à l'ampicilline; en vert : région centromérique de *Plasmodium berghei*; en violet : cassette de résistance à la pyriméthamine et ses régions régulatrices; en jaune : région promotrice pour l'expression de la protéine chimérique; en rose et pourpre : domaines 1 et 2 de la protéine chimérique; en rouge : étiquette mCherry et en orange : région 3'UTR de AMA1.

Les vecteurs ont été construits à partir d'un vecteur déjà produit au laboratoire contenant la région centromérique Pbcen5, la cassette de résistance et ses régions régulatrices, ainsi que la région 3'UTR de AMA1 et l'étiquette mCherry. Dans un premier temps, j'ai introduit le promoteur de P36 de *Plasmodium berghei*. Pour cela le vecteur a été digéré par les enzymes de restriction XhoI et KpnI et le fragment obtenu par PCR sur de l'ADN génomique de *Plasmodium berghei* en utilisant les amorces (voir Annexe E.2) a été inséré par la technique d'infusion. La seconde étape consistait en l'insertion de deux fragments à la fois afin de reconstituer les deux domaines de P36 en permettant soit de combiner un domaine d'une espèce avec l'autre, soit d'échanger la boucle A ou B d'une espèce avec l'autre. Le vecteur a été digéré en XhoI puis les fragments également insérés grâce à la technique In-fusion®. Après transformation, l'insertion des fragments a été validée par digestion enzymatique suivie d'un séquençage par la méthode de Sanger.

5.3.2 Transfection et sélection

Les chromosomes artificiels ainsi produits ont été transfectés dans des parasites *Plasmodium berghei* exprimant la GFP et défectueux pour P36. Les parasites PbGFP Δ P36 ont été amplifiés chez la souris puis cultivés sur la nuit pour obtenir des schizontes matures. Ces schizontes ont été isolés et leurs mérozoïtes

libérés pour être transfectés en présence du chromosome artificiel puis injectés chez une souris. Après 24 heures, la pyriméthamine a été ajoutée dans l'eau des souris afin de sélectionner les parasites possédant le chromosome artificiel.

Après transmission aux moustiques, l'expression des protéines chimériques a été vérifiée par microscopie à fluorescence. L'étiquette mCherry du côté C-terminal des protéines chimériques permet de vérifier l'expression des protéines.

5.3.3 Tests d'invasion des cellules HepG2 et HepG2/CD81

Les tests d'invasion des cellules HepG2 et HepG2/CD81 sont réalisés comme expliqué au chapitre précédent. Les parasites sont prélevés dans les glandes salivaires des moustiques, puis incubés avec les cellules 24 heures. L'infection est analysée par microscopie à fluorescence après fixation des cellules à la PFA (Paraformaldéhyde) et marquage de la vacuole parasitophore avec un anticorps anti-UIS4.

5.4 Résultats

5.4.1 Validation de la complémentation des parasites

Après 21 jours de développement, les sporozoïtes isolés à partir des glandes salivaires sont observés par microscopie à fluorescence. Les parasites présentent une fluorescence verte due à la GFP qu'ils expriment. La présence des protéines P36 chimériques est détectée en rouge grâce à l'étiquette mCherry.

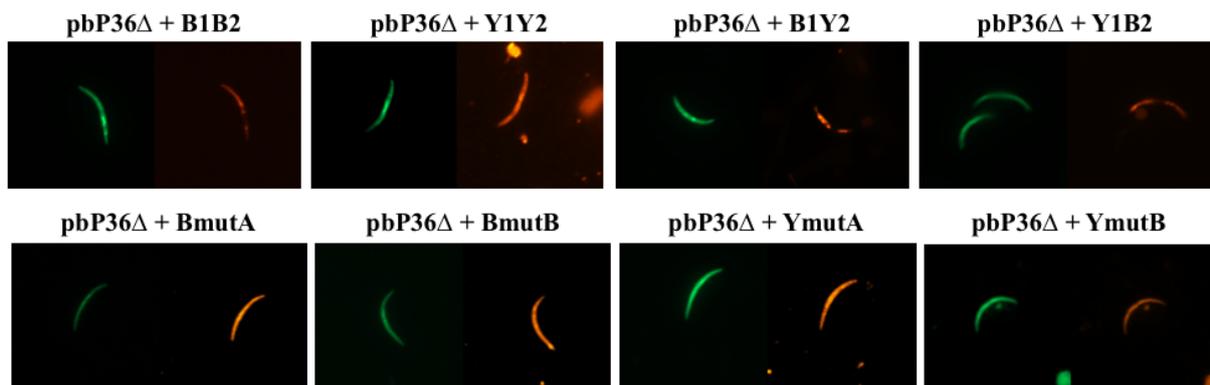


FIGURE 5.10 | Observation par microscopie à fluorescence des sporozoïtes de pbP36 Δ complémentés avec les différentes constructions chimériques. Les sporozoïtes sont déposés sur une lame couverte de poly-L-lysine puis observés par microscopie à fluorescence. Les sporozoïtes sont fluorescents vert grâce à l'insertion du gène de la GFP dans leur génome. Les protéines chimériques sont exprimées car la fluorescence rouge de l'étiquette mCherry est détectée.

Les parasites sont donc correctement complémentés. Néanmoins chez certains parasites la fluorescence rouge n'est pas observée, comme c'est le cas sur la figure 5.10 pour le parasite pbP36 Δ P36+Y1B2, un seul des deux sporozoïtes présents possède de la fluorescence rouge.

5.4.2 Tests d'invasion des cellules HepG2 et HepG2/CD81 par les sporozoïtes PbGFP Δ P36 complémentés avec les protéines P36 chimériques

Les sporozoïtes sont déposés sur les cellules HepG2 ou HepG2/CD81, puis incubés à 37 °C. Le milieu de culture surnageant contenant les sporozoïtes n'ayant pas envahi les cellules est changé après 3 heures d'incubation et les cellules sont remises à incuber 24 heures. À la fin de l'incubation les cellules sont fixées à la PFA et marquées avec un anticorps anti-UIS4 afin de détecter la formation de vacuoles parasitophores formées par les parasites ayant infectés les cellules.

Parasites dont la protéine P36 permettant la complémentation possède des domaines de la même espèce ou d'espèces différentes

Infection des cellules HepG2/CD81 par tous les parasites complétés

Les cellules HepG2/CD81 sont infectées avec chaque parasite complété : PbP36 Δ +B1B2, PbP36 Δ +Y1Y2, PbP36 Δ +B1Y2 et PbP36 Δ +Y1B2 (figure 5.11). On peut remarquer que le parasite PbP36 Δ +B1Y2 semble moins infectieux car sur les deux graphiques résultant de deux expériences distinctes ces parasites ont infecté moins de cellules que les autres.

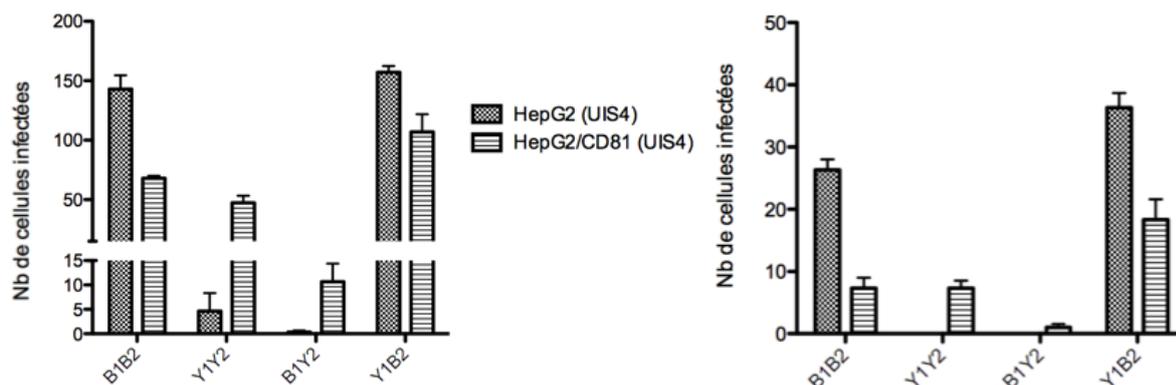


FIGURE 5.11 | Le second domaine à 6 cystéines de P36 de *Plasmodium berghei* est suffisant pour permettre au parasite d'utiliser la voie CD81-indépendante. Graphiques représentant le nombre de cellules HepG2 et HepG2/CD81 infectées par les parasites PbP36 Δ complétés avec des protéines chimériques de P36 lors de deux expériences indépendantes d'invasion.

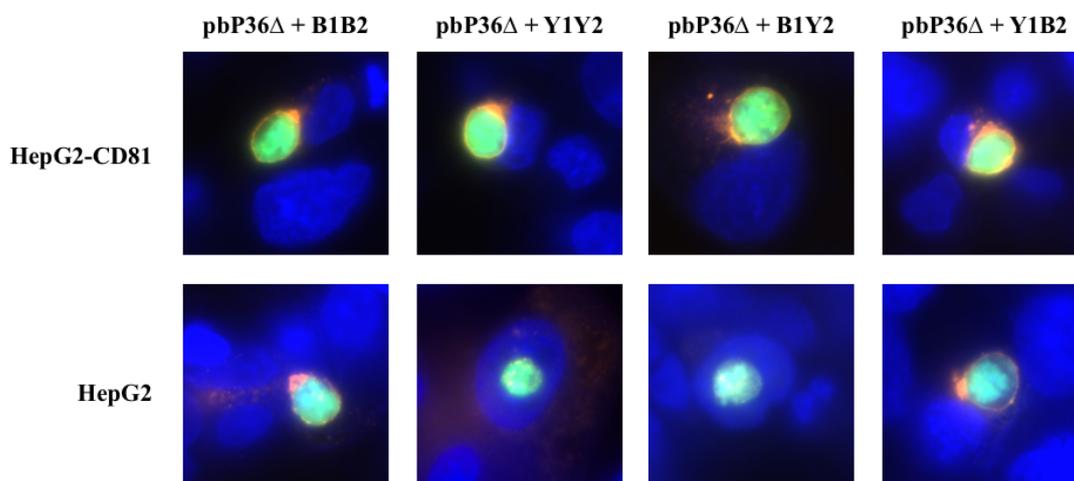


FIGURE 5.12 | Analyse par immunofluorescence des parasites ayant infecté les cellules HepG2 et HepG2/CD81 24 heures après l'invasion. Immunofluorescence de cellules HepG2 ou HepG2/CD81 infectées par des parasites Pb Δ P36 complétés avec les protéines chimériques d'échange de domaines (voir figure 5.8). Les cellules ont été fixées 24 heures post-infection. La vacuole parasitophore est marquée avec un anticorps anti-UIS4 (en rouge) et le noyau avec du Hoechst-33342 (en bleu). Les parasites sont fluorescents verts.

Infection des cellules HepG2 uniquement par les parasites possédant le second domaine à 6 cystéines de *Plasmodium berghei*

Seuls les parasites complétés avec le second domaine à 6 cystéines de *Plasmodium berghei*, c'est à dire PbP36 Δ +B1B2 et PbP36 Δ +Y1B2 sont capables d'infecter efficacement les cellules HepG2 (figures 5.11 et 5.12). En effet, le nombre de cellules HepG2 infectées par chacun d'eux est égal ou supérieur au nombre de cellules HepG2/CD81 infectées par le même parasite. De plus, ces parasites qui se développent

dans les cellules HepG2 sont capables de former une vacuole parasitophore comme l'attestent les images obtenues après marquage avec un anticorps anti-UIS4 (figure 5.12).

Contrairement aux parasites complémentés avec le domaine 2 de *Plasmodium berghei*, les parasites possédant le domaine 2 de *Plasmodium yoelii* ne sont pas capables d'envahir efficacement et de se développer dans les cellules HepG2 (figures 5.11 et 5.12). On observe très peu de cellules infectées. L'observation de ces cellules infectées par microscopie après marquage de la vacuole parasitophore met en évidence que les parasites ayant réussi à entrer dans les cellules HepG2 ne sont pas capables de former de vacuole parasitophore.

Parasites dont la protéine P36 permettant la complémentation possède une boucle de la protéine P36 de l'autre espèce

Infection des cellules HepG2/CD81 par tous les parasites complémentés

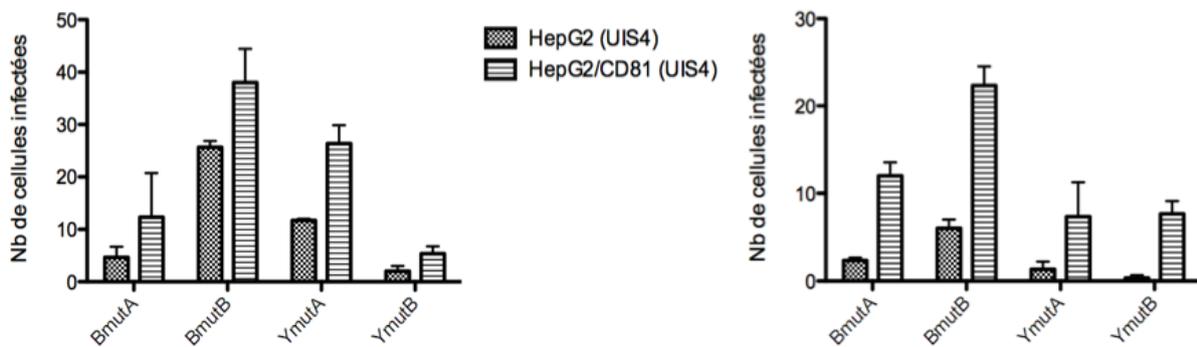


FIGURE 5.13 | Les parasites $PbP36\Delta$ complémentés avec des protéines chimériques de P36 dont certaines boucles ont été échangées sont capables d'envahir les cellules HepG2/CD81 et HepG2. Graphiques représentant le nombre de cellules HepG2 et hepG2/CD81 infectées par les parasites $PbP36\Delta$ complémentés avec des protéines chimériques de P36 lors de deux expériences indépendantes d'invasion.

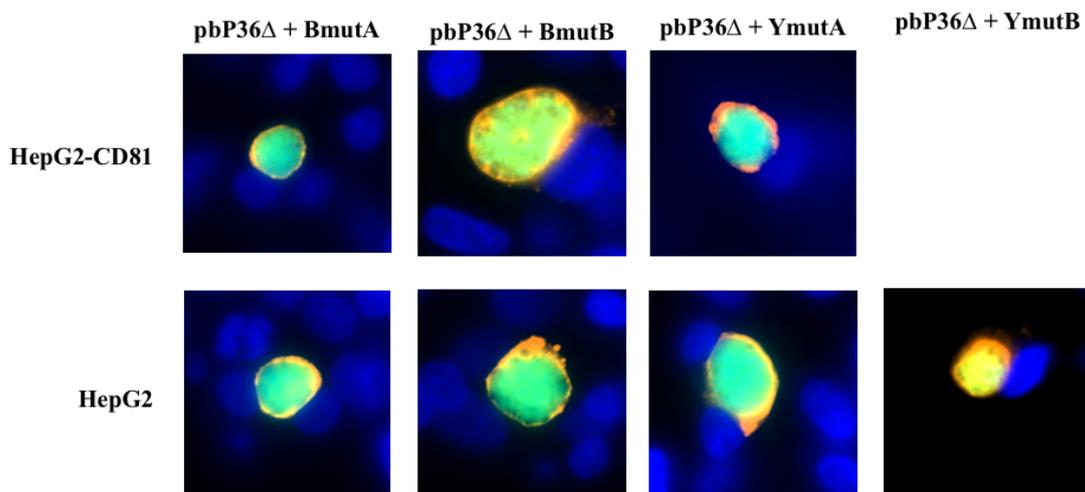


FIGURE 5.14 | Analyse par immunofluorescence des parasites ayant infectés les cellules HepG2 et HepG2/CD81 48 heures après l'invasion. Immunofluorescence de cellules HepG2 ou HepG2/CD81 infectées par des parasites $Pb\Delta P36$ complémentés avec les différentes protéines chimériques d'échange de boucles (voir figure 5.8). Les cellules ont été fixées 24 heures post-infection. La vacuole parasitophore est marquée avec un anticorps anti-UIS4 (en rouge) et le noyau avec du Hoechst-33342 (en bleu). Les parasites sont fluorescents verts.

Les parasites complémentés avec les différentes formes chimériques d'échange de boucles sont capables d'infecter les cellules HepG2/CD81 (figures 5.13 et 5.14). Bien que le nombre de cellules infectées

par le parasite PbP36 Δ +YmutB sur la première expérience de la figure 5.13 est plus faible que pour les autres parasites, le parasite est capable d'envahir les cellules hepG2/CD81 et de s'y développer à l'intérieur d'une vacuole parasitophore et le nombre de cellules infectées lors de la seconde expérience est comparable aux autres mutants.

Infection des cellules HepG2 faible mais les parasites sont capables de les envahir et de s'y développer

L'infection des cellules HepG2 est quant à elle fluctuante, il y a de l'infection mais à un niveau qui semble inférieur à celui des HepG2/CD81. Néanmoins les parasites sont capables d'envahir et de se développer dans les cellules HepG2. Les mutants se développant dans les cellules HepG2 possèdent une vacuole parasitophore comme l'atteste la présence de UIS4 autour des parasites (figure 5.14).

Cette seconde série d'expériences ne permet pas d'orienter vers la fonctionnalité d'une des boucles déterminées précédemment.

Le second domaine à 6 cystéines de *Plasmodium berghei* est la clé de l'utilisation de la voie CD81-indépendante

Nous venons donc de voir que le second domaine à 6 cystéines de *Plasmodium berghei* est suffisant pour permettre l'infection des cellules n'exprimant pas CD81. Il est possible d'actualiser le modèle clé serrure, en présentant le domaine 2 de P36 de *Plasmodium berghei* comme déterminant de l'utilisation de la voie SR-B1 chez *Plasmodium berghei*.

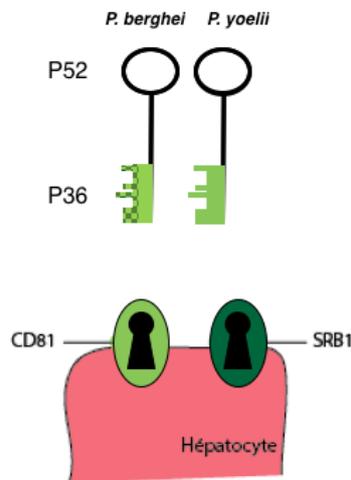


FIGURE 5.15 | Nouveau modèle clé-serrure de P36 et P52 lors de l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium*. Les protéines sont représentées sous forme de clé, avec P52 représentant la structure de la clé en noir et P36 le bout de la clé en vert. Les récepteurs CD81 (en vert clair) et SR-B1 (en vert foncé) sont représentés sous forme de serrures. Le second domaine à 6 cystéine (D2) de P36 de *Plasmodium berghei* permet d'utiliser à la fois la voie d'entrée CD81 et SR-B1.

6

PRODUCTION DE LA PROTÉINE P36 ET TESTS D'INTERACTIONS

6.1 Contexte

Objectif : Nous savons que P36 joue un rôle important lors de l'invasion. Cependant, nous ne connaissons pas le récepteur cellulaire mis en jeu lors de ce phénomène. L'objectif est ici de produire la protéine P36 afin de tester son éventuelle interaction avec différents récepteurs cellulaires. La protéine pourra également être utilisée pour produire des anticorps.

Malheureusement la production de protéines de *Plasmodium* n'est pas une chose facile et la richesse en cystéines de P36 constitue un obstacle supplémentaire. Néanmoins, certaines protéines de la famille des protéines à 6 cystéines ont été produites dans différents systèmes : bactéries *E. coli*, levures *P. pastoris*, baculovirus et plantes *N. benthamiana* (tableau 6.1). La majorité des protéines à 6 cystéines produites en système bactérien ont du être dénaturées généralement dans 8M d'urée avant d'être repliées par dialyse dans des tampons successifs contenant des concentrations d'urée décroissantes.

Tableau 6.1 | Utilisation des différents systèmes de production de protéines recombinantes pour produire les protéines à 6 cystéines de *Plasmodium*.

trx : étiquette thioredoxine; throm : site de clivage de la thrombine; DsbC : signal de translocation dans le périplasma bactérien

protéine	séquence	opt	système	vecteur	étiquette	denat	référence
Pfs48/45	M1-I448	non	baculovirus	pJVP10Z	-	-	[Kocken <i>et al.</i> , 1993]
Pfs230	E375-K1132	non	<i>E.coli</i>		MBP	non	[Williamson <i>et al.</i> , 1996]
Pbs48/45	L62-A408	non	<i>E. coli</i>	pET25b	6His	oui	[Van Dijk <i>et al.</i> , 2001]
Pv41		non	<i>E. coli</i>	pEXP5-CT/TOPO	6His	oui	[Angel <i>et al.</i> , 2008]
Pv38		non	<i>E. coli</i>	pEXP5-CT/TOPO	6His	oui	[Mongui <i>et al.</i> , 2008]
Pf12	M128-S274	oui	<i>E. coli</i> BL21 Star(DE3)	pET28a	DsbC/6His/throm	non	[Arredondo <i>et al.</i> , 2012]
Pf12	H26-S321	non	<i>E. coli</i>	pASK45(+)	StrepII/6His	oui	[Taechalertpaisarn <i>et al.</i> , 2012]
Pf41	K21-S378	non	<i>E. coli</i>	pASK45(+)	StrepII/6His	oui	[Taechalertpaisarn <i>et al.</i> , 2012]
Pf38	M1-S328	oui	<i>N. benthamiana</i>	pTRAc-rfp-ERH	6His	non	[Feller <i>et al.</i> , 2013]
Pf41	K21-S378	oui	baculovirus	pAcSecG2T	6His/MBP/TEV	non	[Parker <i>et al.</i> , 2015]
Pf12	H26-S321	oui	baculovirus	pAcSecG2T	6His/MBP/TEV	non	[Parker <i>et al.</i> , 2015]
PbPSOP12	I294-V721	oui	baculovirus			non	[Sala <i>et al.</i> , 2015]
PyP52	V25-T457	oui	HEK293		8His	non	[Kaushansky <i>et al.</i> , 2015b]
PyP36	K74-S356	oui	HEK293		8His	non	[Kaushansky <i>et al.</i> , 2015b]
Pfs230	Y444-G736	oui	<i>P. pastoris</i>	pPIC9K	6His		[Macdonald <i>et al.</i> , 2016]
Pfs230	E443-N916	oui	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET24a	6His	oui	[Macdonald <i>et al.</i> , 2016]
Pfs38	K153-S328	oui	<i>E. coli</i> BL21	pET28b	6His	oui	[Paul <i>et al.</i> , 2017]
Pfs41	T28-S378	oui	<i>E. coli</i> Rosetta	pET28b	6His	oui	[Paul <i>et al.</i> , 2017]
Pfs12	H26-S323	oui	<i>E. coli</i> Rosetta	pET28b	6His	oui	[Paul <i>et al.</i> , 2017]
Pb47	I22-K412	oui	<i>E. coli</i> Shuffle	pET32	6His et trx	oui	[Ukegbu <i>et al.</i> , 2017]

Production de protéines de la famille des protéines à 6 cystéines en systèmes procaryotes

Principe de production en système bactérien

Un des systèmes communément utilisé pour la production en système bactérien est le système pET. Il met en jeu des bactéries portant l'insertion DE3 composée du gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur Lac et de son opérateur; et un vecteur de type pET possédant le gène Lac permettant l'expression de répresseurs, ainsi que le gène de la protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur T7 et de l'opérateur Lac (figure 6.1). Les bactéries utilisées sont déficientes pour les gènes *ompT* et *lon* qui codent des protéases qui dégraderaient la protéine sur-exprimée.

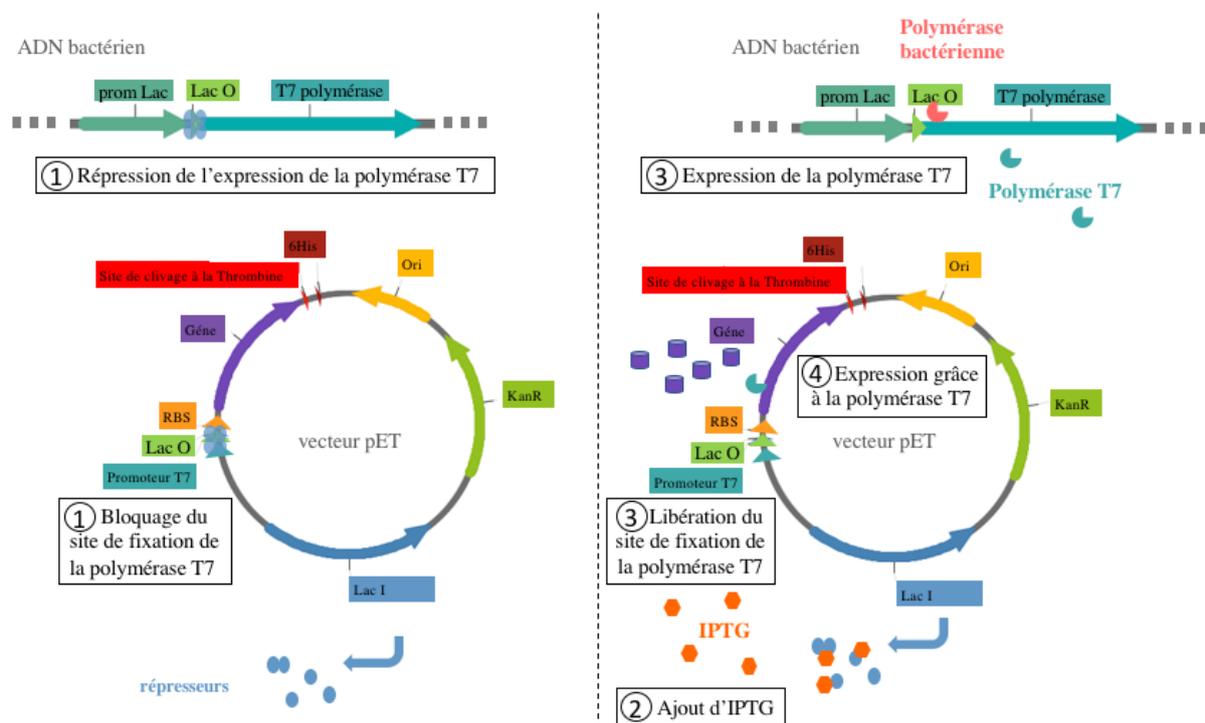


FIGURE 6.1 | Principe de production de protéine recombinante en bactérie *E. coli* avec le système pET. À gauche le système avant induction est composé au niveau de l'ADN du chromosome bactérien du gène de la polymérase T7 sous le contrôle du promoteur Lac et de son opérateur. L'opérateur est réprimé par les répresseurs produits par le gène Lac I porté par le vecteur pET. Les répresseurs se fixent également sur l'opérateur Lac en amont du gène d'intérêt sur le vecteur afin d'éviter toute fuite d'expression de la protéine au cas où celle-ci serait toxique pour la bactérie. À droite le système après induction avec de l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) permet de bloquer les répresseurs produits par le gène Lac I. Cette inhibition va libérer l'opérateur Lac et permettre ainsi d'une part l'expression de la polymérase T7 puis l'expression de la protéine d'intérêt par la polymérase T7.

Pour produire la protéine d'intérêt, des bactéries de type DE3 sont transformées avec le vecteur pET portant le gène de la protéine puis déposées sur une boîte de pétrie contenant du LB-agar et l'antibiotique de sélection. Une colonie est ensuite repiquée pour être amplifiée en milieu LB. Une fois que les bactéries ont été amplifiées, la production est initiée par l'ajout d'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). À la fin de la production, les bactéries sont centrifugées et les culots bactériens sont lysés afin de récupérer la protéine d'intérêt pour la purifier (figure 6.2).

L'utilisation de ce système bactérien présente plusieurs avantages et inconvénients (tableau 6.3).

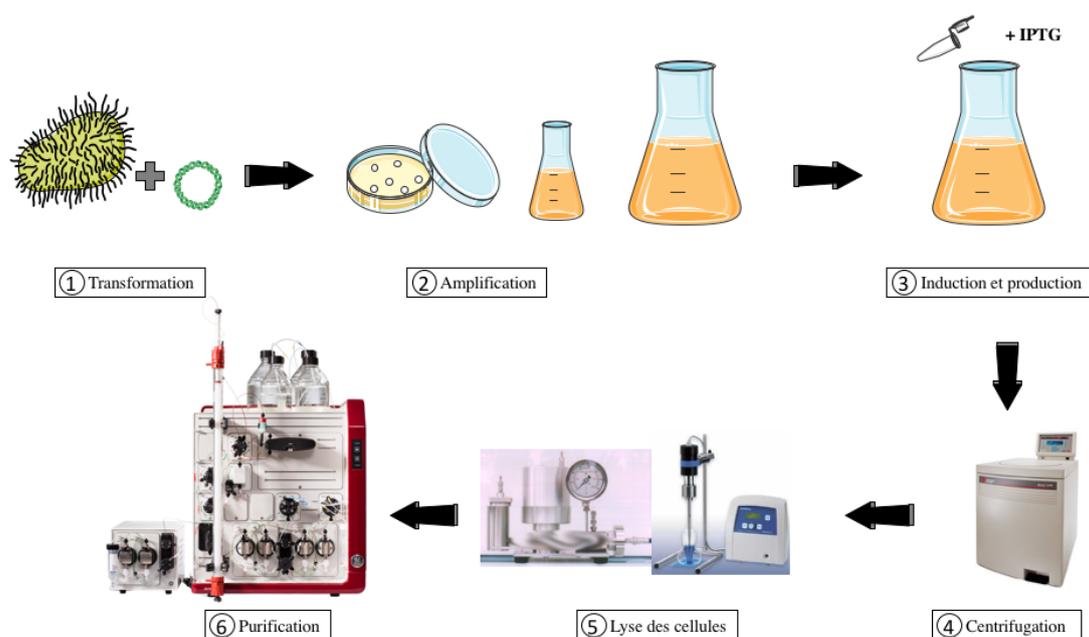

 FIGURE 6.2 | Schéma du protocole de production de protéines recombinantes en système bactérien *E. coli*.

Tableau 6.2 | Avantages et inconvénients de l'utilisation du système bactérien pour produire des protéines recombinantes

avantages	inconvénients
croissance rapide	pas de modification post-traductionnelle
peu onéreux	présence d'endotoxines bactériennes
non pathogène pour l'homme	corps d'inclusion si protéine insoluble ou mal repliée
expression contrôlable	
très bon rendement (g/L)	

Exemples de production de protéines à domaines 6 cystéines en système bactérien

Dès 1996, une région de 750 acides aminés de Pfs230 a été produite chez *E. coli* [Williamson *et al.*, 1996]. L'étiquette utilisée était la MBP (*maltose binding protein*) afin d'augmenter la solubilité de la protéine et de permettre sa purification sur colonne de maltose. Les protéines Pbs48/45, Pv41, Pv38, Pf12, Pf41, Pfs38 et Pb47 ont quant à elles été produites avec une étiquette de 6 histidines afin de les purifier sur colonne de nickel [Van Dijk *et al.*, 2001; Angel *et al.*, 2008; Mongui *et al.*, 2008; Arredondo *et al.*, 2012; Taechalertpaisarn *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2017; Ukegbu *et al.*, 2017].

Néanmoins les bactéries ne forment pas de ponts disulfures dans leur cytoplasme, toutes les protéines à domaine 6 cystéines ayant été produites chez *E. coli*, à l'exception de Pfs230 par Williamson *et al.* [Williamson *et al.*, 1996] et Pf12 [Arredondo *et al.*, 2012], sont retrouvées dans les corps d'inclusion. Pour Pf12, la protéine a été adressée au périplasma bactérien grâce à l'étiquette DsbC. Le périplasma bactérien étant le lieu de formation des ponts disulfures chez *E. coli*, la protéine a été bien repliée par la bactérie [Arredondo *et al.*, 2012].

Récemment, la protéine Pb47 a été produite sans son peptide signal et sa région hydrophobe en C-terminale. La production a été faite dans des bactéries *E. coli* de type Shuffle. Ces bactéries ont la particularité de permettre la formation de ponts disulfures dans le cytoplasme. La protéine possède deux étiquettes, une 6 histidines qui permet la purification sur colonne de nickel et une thioredoxine

qui augmente la solubilité de la protéine et assiste le repliement des protéines qui nécessitent un environnement oxydant. Malgré tout, la protéine a du être extraite des corps d'inclusion avant d'être purifiée sur colonne de nickel en conditions dénaturantes (8M d'urée) avant d'être repliée dans du PBS [Ukegbu *et al.*, 2017].

Production de protéines de la famille des protéines à 6 cystéines en systèmes eucaryotes

Principe de production en système de cellules d'insectes infectées par un baculovirus

Les protéines à domaine 6 cystéines ont également été produites en cellules d'insectes infectées par baculovirus. Il existe plusieurs méthodes. Parmi ces méthodes, je vais détailler celle que j'utiliserai par la suite. Cette méthode de production consiste à co-transfecter dans des cellules d'insectes Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) de l'ADN linéarisé du baculovirus *Autographa californica* molyhedrosis virus (AcNPV) avec un vecteur adapté comportant le gène de la protéine d'intérêt entre les régions d'homologie à l'ADN linéarisé. Une fois refermé grâce à l'intégration du gène de la protéine d'intérêt, l'ADN devient infectieux et permet de produire des virus en utilisant la machinerie cellulaire. Les virus produits sont ensuite amplifiés et permettent de produire des protéines recombinantes qui peuvent être sécrétées si le vecteur utilisé permet l'insertion d'une séquence de sécrétion en amont du gène de la protéine (figure 6.3).

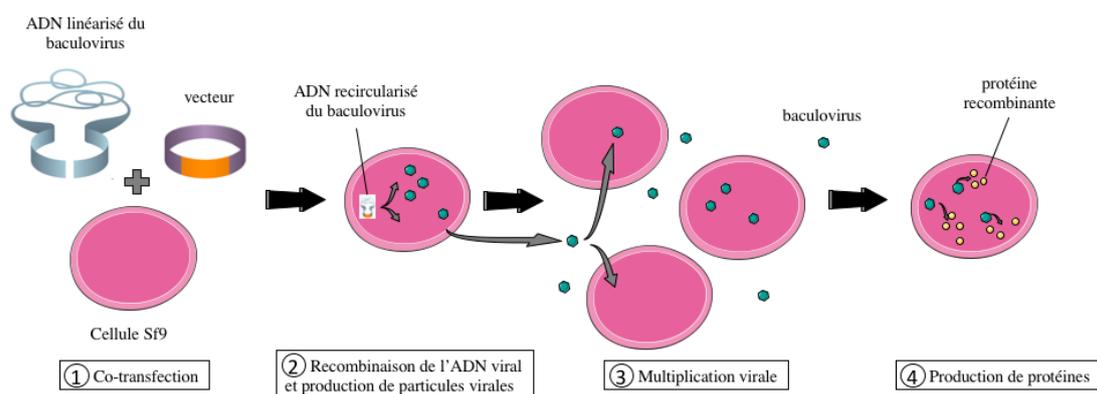


FIGURE 6.3 | Principe de production de protéine recombinante en cellules d'insectes infectées par un baculovirus. Les cellules sont dans un premier temps co-transfectées avec de l'ADN linéaire de baculovirus et un vecteur donneur contenant le gène de la protéine à produire. Les virus sont initialement produits à partir de l'ADN viral lorsqu'il s'est refermé suite à l'intégration du gène d'intérêt. Les virus se multiplient et envahissent de nouvelles cellules où ils peuvent produire la protéine recombinante.

Le protocole de production est long, il faut dans un premier temps co-transfecter l'ADN et le vecteur dans les cellules Sf9 puis incuber les cellules transfectées 7 jours pour que le virus se multiplie. Les virus présents dans le surnageant sont ensuite mis en contact avec de nouvelles cellules Sf9 et laissés se multiplier de nouveau pendant 7 jours. Les virus obtenus dans le surnageant de culture sont alors dilués à différentes concentrations et incubés en plaque 96 puits pendant 7 jours afin d'isoler un clone. Les plaques sont analysées et un clone viral est choisi parmi ceux obtenus à la dilution limite, c'est à dire la dilution ayant permis l'obtention d'un ou zéro virus déposé par puits. Les virus de ce clone sont amplifiés de nouveau pendant 7 jours. Ce nouveau stock viral est titré par dilution dans des plaques P96 et observation après une semaine de multiplication. Les virus sont alors incubés avec une densité de 5 virus par cellule pendant 3 jours afin de produire la protéine recombinante. Le surnageant contenant la protéine est alors collecté, puis concentré avant de purifier la protéine sur colonne (figure 6.4).

L'utilisation des cellules d'insectes permet d'avoir accès à un système plus complet avec une formation des ponts disulfures et des modifications post-traductionnelles. Ce système permet d'obtenir un bon

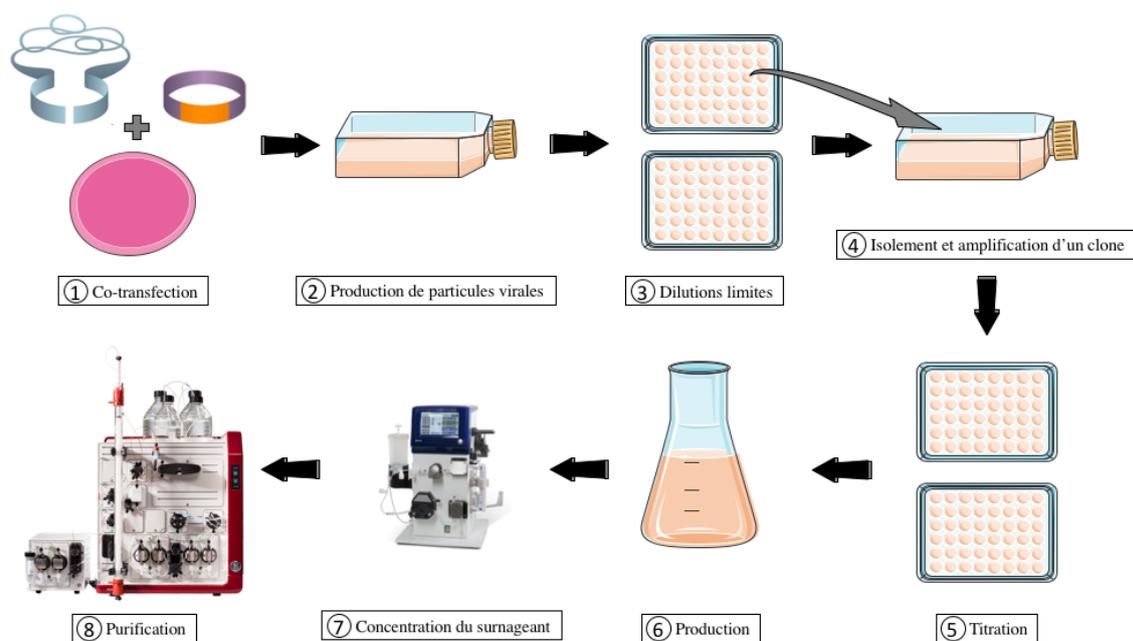


FIGURE 6.4 | Schéma du protocole de production de protéines recombinantes en système de cellules d'insectes infectées par un baculovirus.

Tableau 6.3 | Avantages et inconvénients de l'utilisation du système de cellules d'insectes infectées par un baculovirus pour produire des protéines recombinantes

avantages	inconvénients
modifications post-traductionnelles	lancement de la production lente
non pathogène pour l'homme	onéreux
bon rendement (mg/L)	

rendement, cependant moindre que celui issu du système bactérien. La production en cellules d'insectes est un processus plus long et plus onéreux que la production chez *E. coli*.

Exemples de production de protéines à domaines 6 cystéines en système baculovirus

Kocken et al. ont tenté de produire la protéine Pfs48/45 dans les années 90. Le seul système qui a fonctionné est le système d'infection de cellules d'insectes Sf9 avec un baculovirus possédant la séquence de Pfs48/45. Les cellules infectées et produisant les protéines ont été utilisées telles quelles pour tester des anticorps [Kocken *et al.*, 1993].

Pour les protéines Pf41, Pf12 et PSOP12 les sites de N-glycosylations ont été mutés en même temps que les codons de la séquence ont été optimisés. Les protéines Pf41 et Pf12 possèdent une étiquette MBP pour aider à solubiliser la protéine et une étiquette 6 histidines pour la purification. Elles ont été produites en cellules Hi5, après une première amplification en cellules Sf9 [Parker *et al.*, 2015]. La protéine PSOP12 a été produite par le système Bac to Bac (Invitrogen) [Sala *et al.*, 2015].

Exemples d'utilisation d'autres systèmes eucaryotes d'expression de protéines

Il existe d'autres systèmes de production en cellules eucaryotes : levures, cellules de mammifères de type HEK, plantes ...

Une région de la protéine Pfs230 a été produite chez des levures *Pichia pastoris* [Macdonald *et al.*, 2016]. Les levures étant le siège de glycosylation très développées, les sites de N-glycosylations ont été mutés. Pour permettre l'insertion du plasmide qui s'intègre par recombinaison dans l'ADN de *Pichia pastoris*, les levures sont généralement électroporées. L'induction se fait au méthanol car le gène de la protéine d'intérêt est sous le contrôle du promoteur du gène *AOX1* qui permet en temps normal à la bactérie de métaboliser le méthanol afin de s'en servir comme source de carbone.

PyP52 et PyP36 ont été produites dans des cellules HEK293 [Kaushansky *et al.*, 2015b]. Du côté N-terminal de la protéine le signal peptide du gène de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) permet la sécrétion de la protéine et du côté C-terminal une étiquette de 8 histidines permet la purification de la protéine sur colonne de nickel. Le gène de la protéine d'intérêt est placé sous le contrôle du promoteur CMV permettant l'expression en culture de cellules mammifères. Les vecteurs obtenus ont été transfectés dans des cellules HEK293 et 5 à 6 jours post-transfection, le surnageant a été collecté afin d'en extraire la protéine PyP52 ou PyP36.

Pf38 a quant à elle pu être produite en utilisant un système d'infiltration d'*Agrobacterium tumefaciens* comportant un plasmide de production de la protéine d'intérêt dans des plants de tabac de type *N. benthamiana*. Après l'infiltration, les plants ont été cultivés entre 4 et 10 jours. Les feuilles ont ensuite été récupérées et les protéines extraites puis purifiées [Feller *et al.*, 2013].

6.2 Production de la protéine P36

6.2.1 Test de la production de P36 en système bactérien

Construction des vecteurs d'expression pET29

Les gènes ont été optimisés pour la production en bactérie par Genscript (voir Annexe F.1). Afin d'amplifier la séquence des gènes d'intérêt et d'ajouter les régions d'homologies aux vecteurs pET29b, des PCR ont été réalisées en utilisant les primers du tableau en annexe E.3 et selon le protocole en annexe B.1.2. L'insertion du fragment de PCR dans le vecteur pET29 digéré s'est fait par recombinaison grâce au système Infusion® (voir section B.1.3).

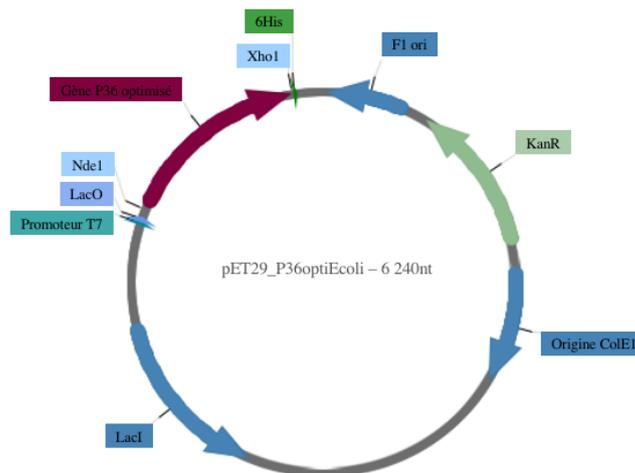


FIGURE 6.5 | Représentation du vecteur pET29 contenant le gène optimisé codant la protéine P36.

Le vecteur final contient une cassette de résistance à la kanamycine ce qui permet de sélectionner les bactéries possédant le plasmide. Le gène d'intérêt possède en amont un promoteur T7 qui permet sa transcription par la polymérase T7 et en aval une étiquette 6 histidines qui permet sa purification sur colonne de nickel (figure 6.5).

Tests de production de P36 en système bactérien (BL21, Rosetta, C41, Origami)

Tests de production en BL21, Rosetta et C41.

Des tests de production ont été réalisés dans différentes souches de bactéries "classiques" :

- **BL21 (DE3)** : DE3 lambda lysogen → système avec le promoteur T7; lon⁻ et ompT⁻ → *améliore la stabilité des protéines*
- **Rosetta** : lon⁻ and ompT⁻ → *améliore la stabilité des protéines*; possède des tRNAs pour les codons rares UAU, AGG, AGA, CUA, CCC et CGA.
- **C41** : mutations → *tolère les protéines toxiques*.

Pour réaliser ces tests, les bactéries ont été transformées avec le plasmide pET29 contenant le gène P36 d'une des espèces de *Plasmodium*. Une colonie a été sélectionnée puis amplifiée. Lorsque la culture bactérienne atteint une densité optique à 600 nm entre 0,5 et 1, l'ajout d'IPTG permet d'initier la synthèse de notre protéine d'intérêt grâce à la polymérase T7 (figure 6.1). Les bactéries sont ensuite lysées par congélation dans l'azote et décongelation à 37 °C et centrifugées afin de séparer les débris bactériens. Un test de purification sur billes de nickel est utilisé sur le surnageant. L'analyse des différentes fractions : culot bactérien, surnageant ou billes de nickel permet de détecter ou non l'expression de P36 (voir protocole D.2.2 et figure 6.2).

Ces premiers tests n'ont malheureusement pas permis de produire la protéine que ce soit en solution ou dans les corps d'inclusion bactériens. Sur gels SDS-page colorés au coomassie, il semblait y avoir une petite production de P36, mais pas de surexpression et il m'a été impossible d'optimiser l'expression malgré des inductions à des températures différentes.

Tests de production en Origami.

Chez les protéines à domaine 6 cystéines, la formation de ponts disulfures est importante pour la structure du domaine (voir section 2.3.2) il est probable que l'échec de production de P36 dans des bactéries classiques soit dû à cette richesse en cystéines. Je me suis donc orientée vers une bactérie facilitant la formation de ponts disulfures dans le cytoplasme : la souche Origami. En effet les bactéries de type Origami possèdent des mutations dans leurs gènes codant la thioredoxine réductase (trxB) et de la glutathione réductase (gor) qui sont des enzymes maintenant l'environnement réduit du cytoplasme bactérien. Cette souche bactérienne a été utilisée pour produire une région riche en cystéines de la protéine MIC6 de *Toxoplasma* [Sawmynaden *et al.*, 2008].

Néanmoins cela ne m'a pas permis d'aboutir à une production de la protéine P36, il n'y avait également pas de surexpression.

Tests de production après induction à l'éthanol de protéines chaperones.

Cependant il est possible d'induire des protéines chaperonnes chez les bactéries afin de faciliter le repliement des protéines. Pour cela 4% d'éthanol est ajouté à la culture une heure avant l'induction de la production de P36 par l'IPTG. Ce choc à l'éthanol va stimuler les bactéries et leur faire produire des protéines chaperonnes. Malgré la présence de ces protéines chaperonnes, il n'a pas été possible d'obtenir de surexpression de la protéine P36 en bactérie.

6.2.2 Test de la production de P36 en cellules d'insectes Sf9 infectées par un baculo-virus

La production de la protéine P36 n'ayant pas été possible en système bactérien, je me suis tournée vers le système eucaryote de cellules d'insectes permettant la formation de ponts disulfures, mais dont la mise en place est plus longue. Ce système a été utilisé auparavant pour produire d'autres protéines de la famille à 6 cystéines telles que Pfs48/45 [Kocken *et al.*, 1993], PSOP12 [Sala *et al.*, 2015], Pf12 et Pf41 dont la structure a été résolue [Parker *et al.*, 2015].

Construction des vecteurs d'expression de P36 et PvP36

Les sites de N-glycosylation ont été mutés en alanines chez *Plasmodium falciparum* pour 5 acides aminés (T116-A116, S136-A136, S224-A224, S316-A316, T392-A392). *Plasmodium vivax* ne possède aucun site de N-glycosylation. Les séquences pour chacun des gènes ont été optimisées et une séquence codant le site de clivage de la TEV et l'étiquette Strep a été ajouté du côté C-terminal (voir annexe F.2). Ces séquences ont été amplifiées par PCR grâce aux oligos en annexe E.4 (protocole B.1.2). Elles ont ensuite été insérées par Infusion® (protocole B.1.3) dans le vecteur pACgp67 après digestion par BamHI et EcoRI (protocole B.1.1).

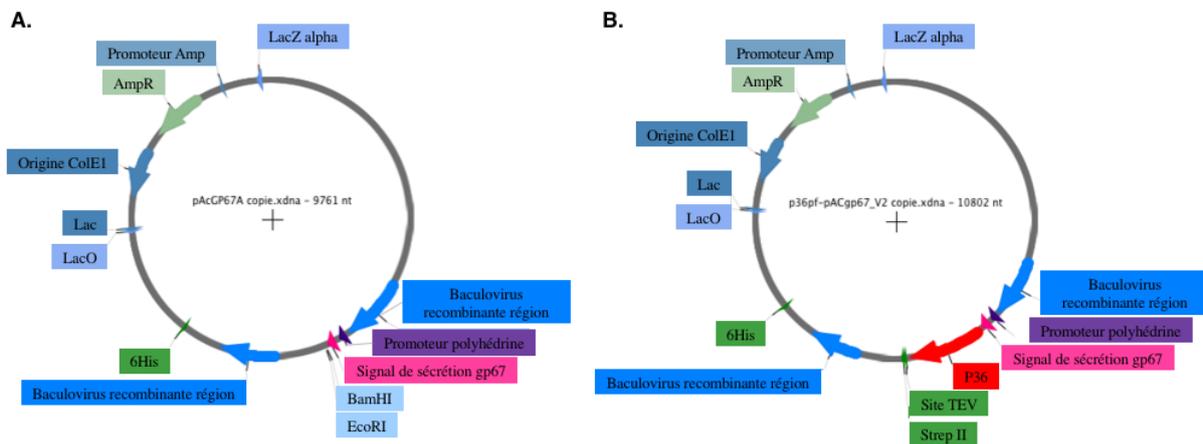


FIGURE 6.6 | Représentation des vecteurs pACgp67 avant et après insertion du gène P36. En pourpre : le gène de la protéine P36 à exprimer; en vert : l'étiquette de 6 histidines; en bleu clair : les sites de restriction utilisés; en bleu et vert pastel : les gènes nécessaires à la bactérie dont une casse de résistance à l'ampicilline.

Le vecteur ainsi obtenu permet l'expression et la sécrétion de la protéine P36 (figure 6.6).

Tests de production

Les tests de production se sont déroulés comme expliqué précédemment 6.1 (figure 6.4 et protocole D.2.3). Dans un premier temps les vecteurs ont été co-transfectés dans les cellules Sf9 avec l'ADN viral. Après une première amplification, des dilutions ont été effectuées afin d'atteindre une dilution limite permettant d'isoler un clone viral. La production par 4 clones différents a été testée pour chacune des espèces : *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*. L'expression étant très faible, elle a été analysée par western blot en utilisant un anticorps contre l'étiquette Strep. Tous les clones présentent le même profil d'expression. Les protéines PfP36 et PvP36 ne semblent pas sécrétées mais contenues en faible quantité dans le culot (figure 6.7). Le clone F9 a néanmoins été choisi pour PfP36, afin d'essayer d'optimiser la production.

Pour tenter d'optimiser le système, des tests de productions avec différentes quantités de virus, MOI (*Multiplicity of infection*) de 1 à 10, et différentes durées d'incubations, 2 à 4 jours, ont été testées pour la

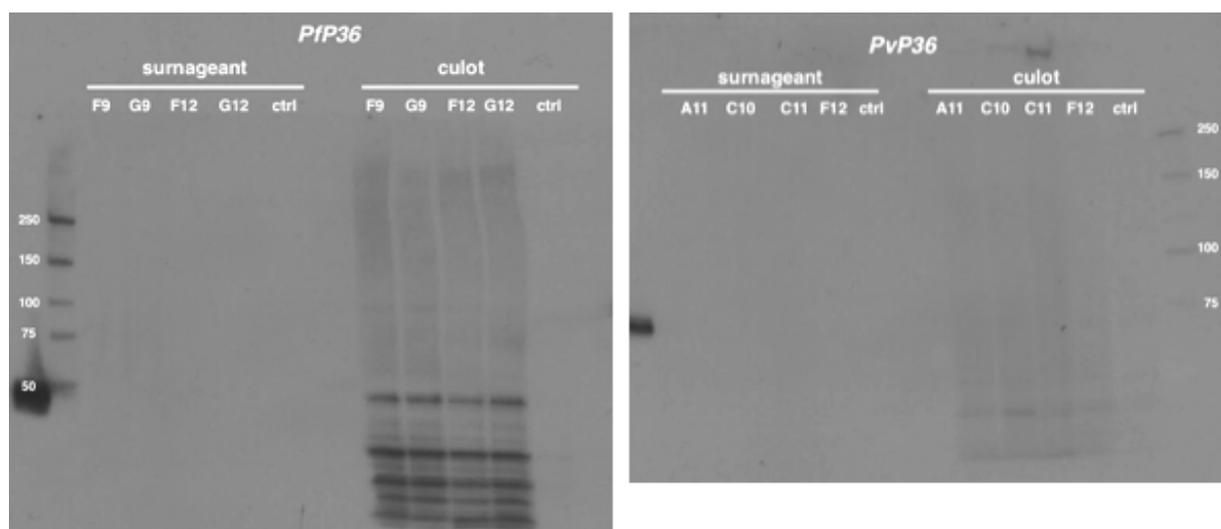


FIGURE 6.7 | Tests d'expression des protéines PFP36 et PVP36 chez différents clones viraux. L'expression a été analysée par western blot car elle était trop faible pour être détectée par coomassie. À gauche, résultats des tests d'expression de PFP36 et à droite ceux de PVP36. Les protéines sont attendues à une taille de 45 kDa.

protéine PFP36. Étonnamment, seules les infections de cellules avec une MOI de 2 produisant pendant 2 ou 10 jours, mais pas 5, ont permis d'obtenir la protéine sécrétée, mais toujours en très faible quantité et détectable uniquement par western blot (figure 6.8).

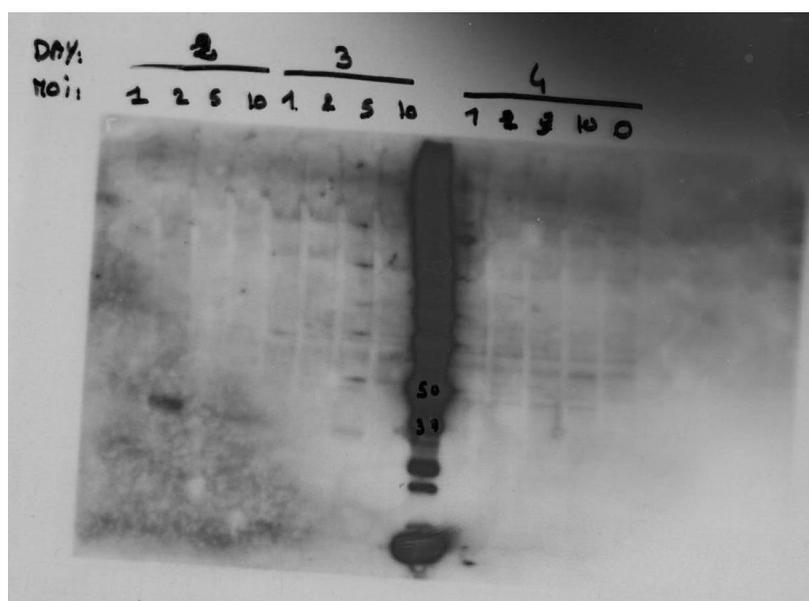


FIGURE 6.8 | Tests d'optimisation de la production de la protéine PFP36. Différentes MOI (*Multiplicity of infection*) (1,2,5,10) et différentes durées d'incubation (2, 3 ou 4 jours) ont été testées afin d'optimiser la production de la protéine PFP36.

Un test de production à plus grande échelle a été réalisé sur une culture de 500 mL de cellules infectées par le clone F9 de PFP36 avec une MOI de 2 pendant 2 jours. Le surnageant obtenu a été concentré sur Äkta flux avant d'être purifié sur une colonne StrepTRAP. L'élution s'est faite avec 2,5 mM de desthiobiotine. Le pic d'élution ne culmine qu'à 76 mAU (figure 6.9) et la protéine n'est pas observée sur gel coloré au coomassie (figure 6.10 gauche). Elle est cependant bien détectée par western blot (figure 6.10 droite).

Face à ce faible rendement de production que je n'ai pas réussi à optimiser, j'ai préféré changer de stratégie et opter de nouveau pour un système bactérien, en utilisant cette fois-ci la bactérie *E. coli* de

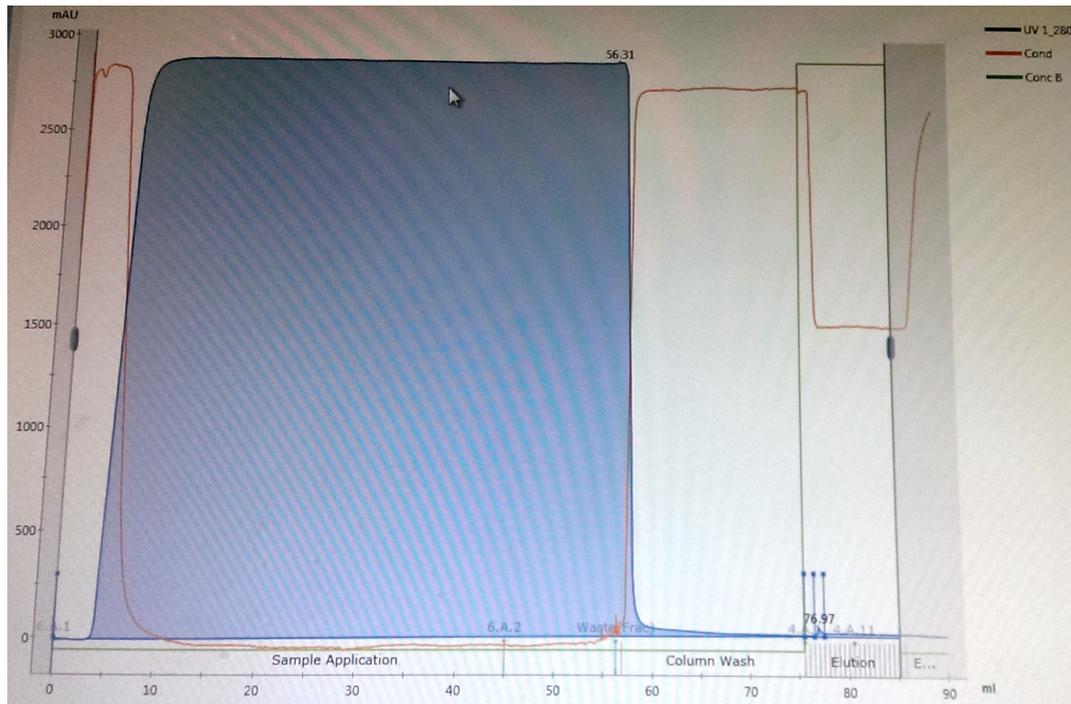


FIGURE 6.9 | Suivi de l'absorbance à 280 nm lors de la purification de Pfp36 sur colonne StrepTRAP.

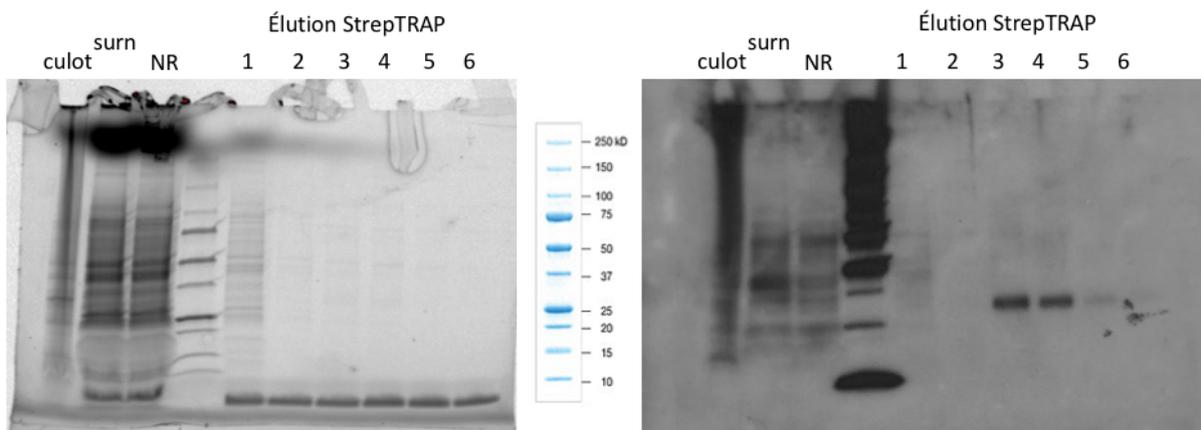


FIGURE 6.10 | Gel coloré au coomassie et western blot des différentes étapes et fractions de la purification de Pfp36. À gauche, gel coloré au coomassie et à droite western blot réalisé avec des anticorps ciblant l'étiquette Strep. La protéine est attendue à une taille de 45 kDa.

type Shuffle qui a déjà été utilisée pour produire la région FCR3-DBL3X de Var2CSA comportant 14 cystéines [Srivastava *et al.*, 2011].

6.2.3 Test de la production de P36 en bactéries Shuffle avec étiquette MBP (*Maltose Binding Protein*)

Construction des vecteurs pMAL contenant les gènes optimisés de P36

Les gènes optimisés précédemment pour la production en système bactérien ont été amplifiés par PCR avec de nouveaux oligos (voir Annexe E.5) afin d'être insérés dans le vecteur pMALc2x après digestion par EcoRI et SalI.

Le vecteur contient un gène de résistance à l'ampicilline, la machinerie de l'opéron lactose. Le gène P36 possède en N-terminal une étiquette MBP (*Maltose Binding Protein*) qui permet de stabiliser et

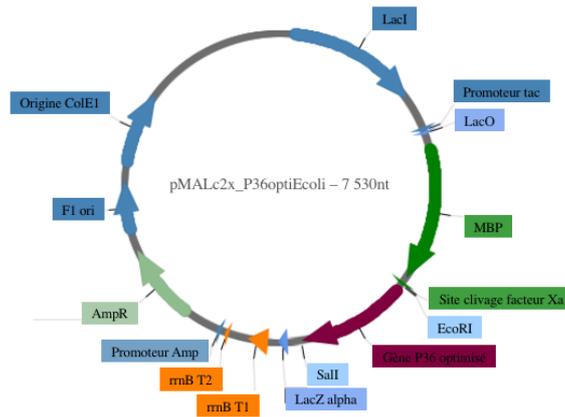


FIGURE 6.11 | Représentation du vecteur pMALc2x contenant le gène optimisé codant la protéine P36. En pourpre : le gène de la protéine P36 à exprimer; en vert : l'étiquette MBP et le site de clivage par le facteur Xa; en bleu clair : les sites de restriction utilisés; en bleu et vert pastel : les gènes nécessaires à la bactérie dont une casse de résistance à l'ampicilline.

solubiliser la protéine et un site de clivage par le facteur Xa. Le gène est sous le contrôle du promoteur tac, dont la région -35 correspond au promoteur trp et la région -10 au promoteur lac.

Production de la protéine P36 en bactéries Shuffle

La croissance des bactéries se fait à 30 °C. Une fois que la densité optique à 600 nm a atteint 1, la production est induite avec 0,2 mM d'IPTG et les bactéries sont incubées à 20 °C sur la nuit voir le protocole en annexe D.2.4 (figure 6.2). Le lendemain la culture est centrifugée et le culot bactérien resuspendu dans du PBS avant d'être congelé à -20 °C.

Lyse des bactéries et purification de P36

Pour extraire et purifier la protéine P36 des bactéries, ces dernières sont lysées par passage à la *french presse* (voir protocole D.2.4). Le lysat est centrifugé afin de culoter les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est filtré avant d'être purifié sur Äkta.

La première étape de purification est une étape de purification par affinité sur colonne MBP-TRAP à résine de sépharose dextrine (figure 6.12). La seconde étape est une purification par exclusion de taille sur colonne S200.

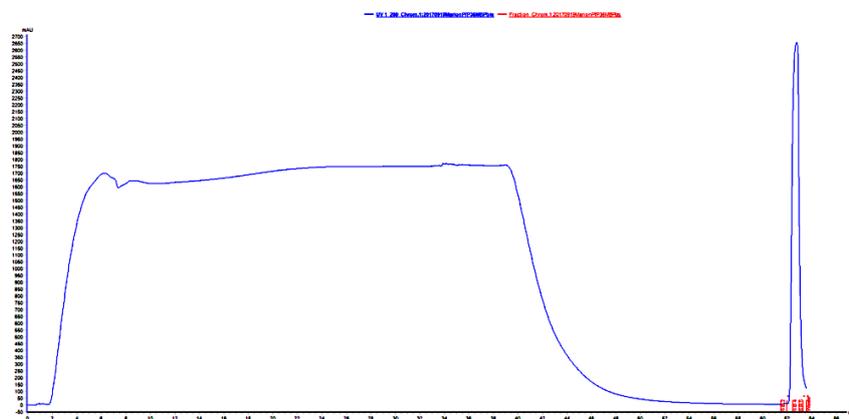


FIGURE 6.12 | Suivi de l'absorbance à 280 nm lors de la purification de P36 sur colonne MBP-TRAP. L'élution s'est faite avec du maltose à 10 mM, le pic d'absorbance a atteint 2600 mAu. 2 fractions de 500 µL chacune ont pu être collectées avant d'être réinjectées sur une colonne S200.

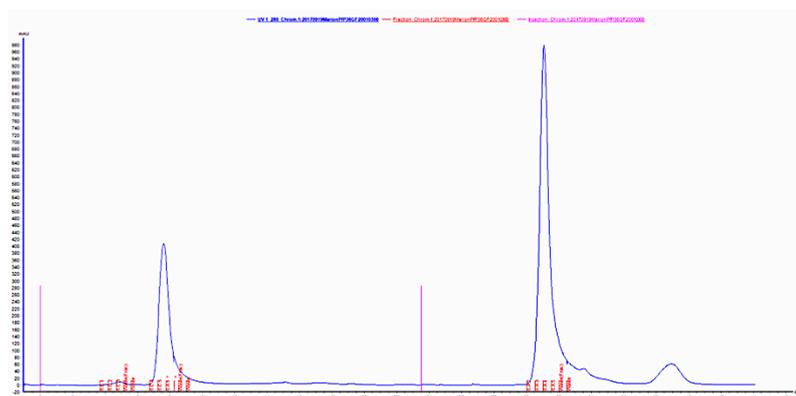


FIGURE 6.13 | Suivi de l'absorbance à 280 nm lors de la purification de Pfp36 sur colonne S200 10/300. Les deux fractions obtenues lors de la purification par affinité ont été injectées l'une après l'autre (marqueurs magenta). Les pics d'absorption correspondant à la protéine P36 ont été collectés par fractions de 500 μ L. Le premier pic atteint 400 mAU et a permis de collecter 2 fractions à 0,8 et 0,7 mg/mL. Le second pic atteint 1000 mAU et a permis de collecter 3 fractions de 2,4 puis 2,9 et 1,4 mg/mL.

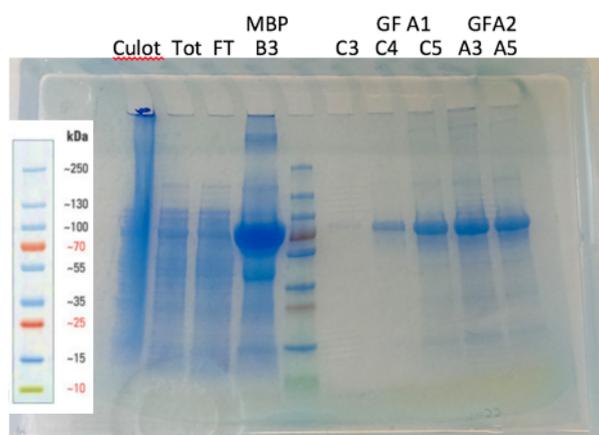


FIGURE 6.14 | Gel SDS-Page des différentes fractions obtenues lors de la purification de Pfp36. La protéine Pfp36 avec l'étiquette MBP a un poids moléculaire prédit de 78 kDa. De gauche à droite : culot bactérien contenant à la fois les protéines bactériennes et la protéine P36; Tot : surnageant après la lyse et la centrifugation des débris cellulaires; FT : protéines non retenues par la colonne MBP-TRAP; B3 : fraction d'éluion de la colonne MBP-TRAP; GFA1 (C3,C4 et C5) : fractions obtenues après purification par exclusion de taille de la première fraction résultant de l'éluion de MBP-TRAP (graphique pas présenté ici); GFA2 (A3 et A5) : fractions obtenues après purification par exclusion de taille de la seconde fraction résultant de l'éluion de MBP-TRAP (figure 6.13)

La protéine Pfp36 obtenue est pure à plus de 90% (figure 6.14). Les protéines PvP36, PyP36 et PbP36 ont également pu être produites dans ce système avec un rendement de production de l'ordre de 2 mg par culture de 500 mL (figure 6.4). La production de la protéine PbP36 a été analysée et validée par spectrométrie de masse (protocole D.3.4 et figures 6.15 et ??).

Tableau 6.4 | Exemple de production et rendement obtenus pour différentes protéines P36.

protéine	volume de culture	volume de protéine	concentration	quantité totale
Pfp36	500mL	1mL	2,3mg/mL	2,3mg
PvP36	500mL	1mL	1,6mg/mL	1,6mg
PyP36	500mL	1,5mL	1,4mg/mL	2,1mg
Pfp36	500mL	2,5mL	1,7mg/mL	4mg



FIGURE 6.15 | Identification de la protéine Pbp36-MBP par spectrométrie de masse. A. Identification de la région Pbp36 de la protéine. **B.** Identification de l'étiquette MBP. Les peptides identifiés couvrent une grande partie de la séquence y compris la région C-terminale.

6.3 Tests

Il est probable que la protéine P36, de par son implication dans l'invasion des cellules hépatiques, interagisse avec un récepteur présent à la surface des hépatocytes. Nous avons choisi de tester les récepteurs CD81 et SR-B1 connus pour être impliqués dans les voies d'entrée des sporozoïtes dans les hépatocytes (voir sections 2.4.1 et 2.4.2), mais également CD36, impliqué dans l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes, et LIMPII appartenant à la même famille que SR-B1 (voir section 2.4.2). EphA2 a également été testé car une étude récente suggère que P36 jouerait un rôle en rapport avec EphA2 (voir section 2.4.3).

L'interaction de P36 avec différents récepteurs a donc été testée dans un premier temps par méthode immuno-enzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, puis par résonance des plasmons de surface SPR (*surface plasmon resonance*).

6.3.1 Test d'interaction entre Pbp36 et différents récepteurs hépatocytaires par ELISA

Les récepteurs CD81, SR-B1, LIMPII, CD36, EphA2 à 1 µg/mL et un contrôle de BSA (*bovine serum albumin*) à 2% ont été incubés toute la nuit pour leur permettre de recouvrir le fond de la plaque Elisa. Après un blocage à la BSA 2%, les protéines Pbp36-MBP ou MBP ont été ajoutées à différentes concentrations (figure 6.16) et incubées une heure à température ambiante. La révélation s'est effectuée avec un anticorps anti-MBP (HRP). Le protocole détaillé est présent en annexe D.3.5.

Les protéines Pbp36-MBP et MBP seules sont correctement détectées par l'anticorps (figure 6.17). Mais elles ne se sont fixées à aucun récepteur testé ici. Aucune interaction n'a pu être détectée.

6.3.2 Test d'interaction entre Pbp36 et différents récepteurs hépatocytaires par SPR

En complément des tests ELISA, les interactions ont été analysées par SPR (Résonance plasmon de surface). La protéine de contrôle MBP a été fixée sur la première piste d'une puce Sensor Chip CM5 et la protéine Pbp36 sur la seconde piste. Une gamme de neuf dilutions allant de 500 nM à 0 nM a été effectuée pour les différents récepteurs testés : CD81, CD36, SR-B1, LIMPII, EphA2 et l'anticorps antiMBP comme contrôle. Les sensogrammes obtenus sont présentés sur la figure 6.18.

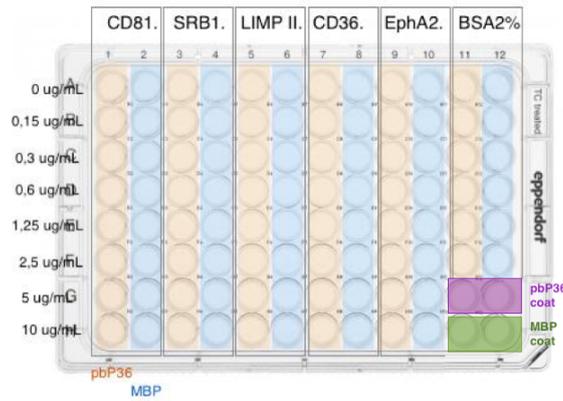


FIGURE 6.16 | Schéma représentant l'organisation de la plaque d'ELISA. Les récepteurs sont déposés sur deux colonnes, une colonne permettant de tester l'interaction avec la protéine PbP36-MBP et une seconde étant le contrôle de la MBP seule. Les différentes concentrations pour chaque protéine sont déposées sur les différentes lignes. Les deux dernières colonnes sont les contrôles négatifs où aucun récepteur n'a été fixé à la plaque excepté pour les 2 dernières lignes où les protéines PbP36-MBP ou MBP ont été fixées comme contrôles positifs.

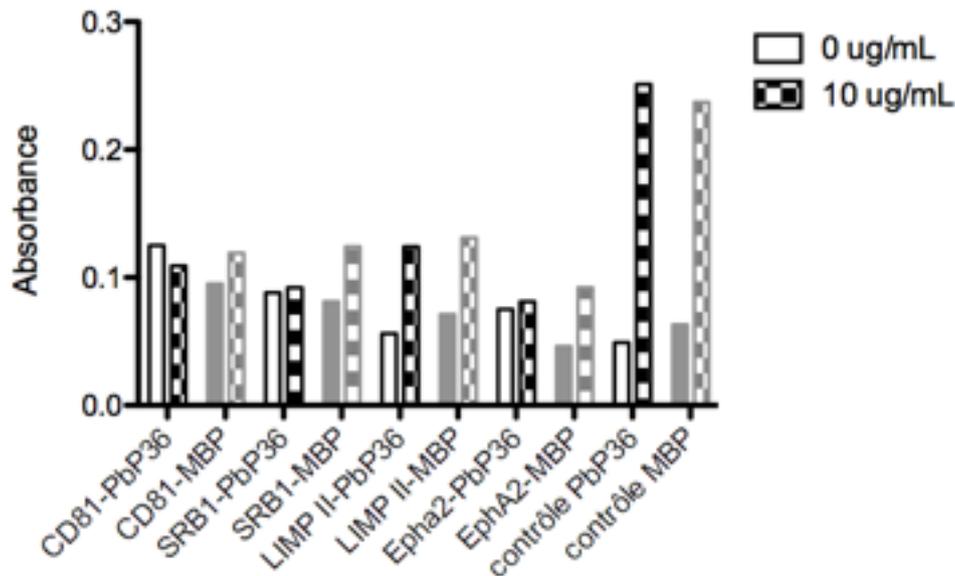


FIGURE 6.17 | Résultats des tests ELISA. Les barres sans motifs représentent les mesures en l'absence de protéines MBP ou PbP36-MBP, tandis que les barres avec motifs représentent les mesures où les protéines PbP36-MBP et MBP à une concentration de $10\mu\text{g/mL}$ ont été incubées avec les récepteurs. Les mesures représentées en noir correspondent à la protéine PbP36-MBP, en gris celles du contrôle avec la MBP seule.

La fixation de l'anticorps anti-MBP est confirmée pour les deux pistes MBP et PbP36MBP, où l'on observe une augmentation progressive de la réponse dont la courbe est caractéristique d'interaction entre la protéine fixée et la protéine testée. Les courbes observées pour le récepteur CD81 sont quant à elles caractéristiques d'une absence d'interaction entre les protéines fixées et le ligand testé. Néanmoins l'analyse des courbes pour les récepteurs CD36, SR-B1, LIMPII et EphA2, n'est pas aussi simple. Il semblerait qu'il n'y ait pas d'interaction car les courbes observées ne présentent pas l'augmentation sous forme logarithmique qui caractérise la fixation croissante de ligand.

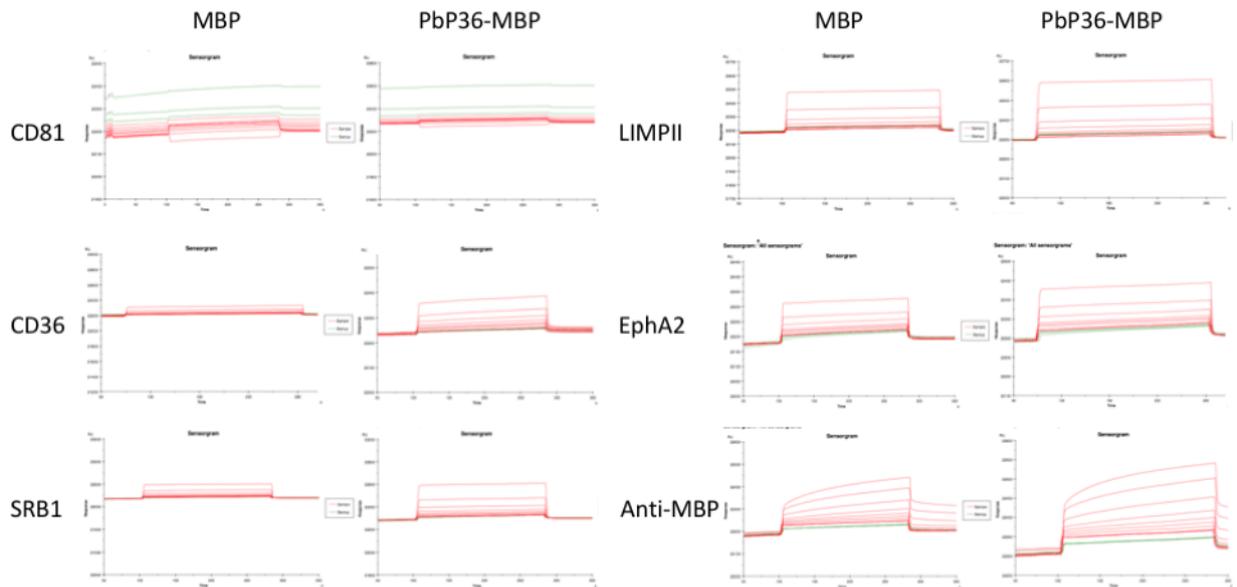


FIGURE 6.18 | Sensogrammes obtenus par SPR des mesures d'interaction entre la protéine PbP36-MBP et son contrôle MBP avec différents récepteurs potentiels.

7.1 Étude des polymorphismes

Dans un premier temps, l'étude des variations génétiques de P36 va me permettre d'appréhender le niveau de conservation de la protéine.

7.1.1 Orthologues

Les gènes des protéines P36 et P52 sont organisés en tandem sur le chromosome 4 de *Plasmodium falciparum*, 3 de *Plasmodium vivax* et 10 de *Plasmodium berghei* ou *Plasmodium yoelii*. Cette organisation est conservée chez toutes les espèces de *Plasmodium* (figure 7.1). Il y a cependant la présence chez certaines espèces, notamment *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium fragile* et *Plasmodium malariae* d'une troisième protéine appelée P52-like (chez *Plasmodium vivax* : PvPo1_0303900.1). Cette protéine possède également 2 domaines à 6 cystéines.

La conservation de l'organisation de ces protéines dans le génome des différentes espèces plasmodyales est compatible avec l'importance du rôle joué par P36 lors de l'invasion des hépatocytes.

7.1.2 La protéine P36 de *Plasmodium falciparum* possède peu de polymorphisme

Pour étudier la variation génétique de P36, je vais dans un premier temps comparer les polymorphismes de P36 à ceux présents chez AMA1 qui possède de nombreux polymorphismes et HSP70 qui est une protéine très conservée. J'étudierai ensuite la position de ces SNPs (*Single Nucleotide polymorphisms*) chez P36.

La variation génétique de P36 est semblable à celle de la protéine HSP70 dont le rôle est essentiel pour *Plasmodium*

La comparaison de P36 aux protéines AMA1 et HSP70 va permettre de déterminer si P36 est une protéine dont la variation génétique est importante, comme chez AMA1, ou au contraire si la protéine est très conservée comme HSP70.

AMA1 est un antigène exposé à la surface du parasite. Cette protéine est très polymorphique, ce qui lui permet d'échapper à la pression immunitaire. Pour la protéine AMA1 les acides aminés touchés par des SNPs représentent 15% de la séquence protéique totale et la majorité des SNPs présents sont non-synonymes (tableau 7.1). Ils sont répartis tout au long de sa séquence avec néanmoins quelques régions plus concernées (figure 7.2).

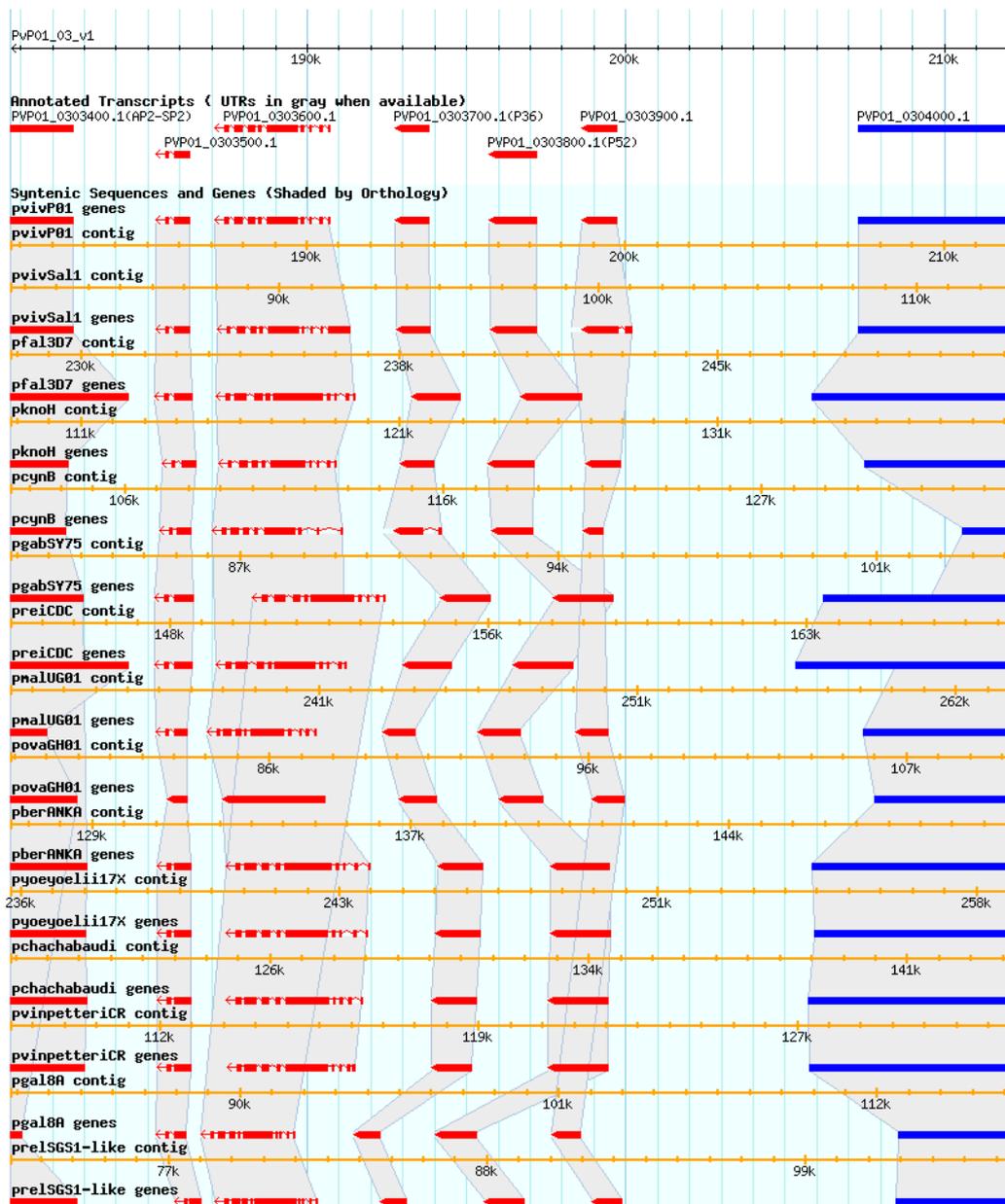


FIGURE 7.1 | Organisation des gènes P52 et P36 chez différentes espèces de *Plasmodium* [Aurrecochea et al., 2009].

Tableau 7.1 | Comparaison du polymorphisme nucléotidique de P36 avec AMA1 et HSP70 de *Plasmodium falciparum* 3D7 (SNPs Single Nucleotide polymorphisms); var aa : pourcentage d'acides aminés touchés par des SNPs; aa syn : pourcentage d'acides aminés touchés par des SNPs synonymes; SNPs STOP : nombre de SNPs provoquant l'apparition d'un codon stop dans la séquence.

gène	acides aminés	SNPs	variation aa	SNPs syn	aa syn	SNPs STOP
AMA1	622	97	15%	7	7%	1
HSP70	679	20	3%	8	40%	1
P36	379	17	4%	6	35%	1

HSP70 quant à elle est une protéine très conservée. En effet, en tant que protéine chaperone elle joue un rôle essentiel dans le repliement des protéines chez *Plasmodium*. Les variations de séquence de HSP70 peuvent entraîner une perte de fonction de la protéine. HSP70 possède peu de polymorphismes, avec seulement 3% des acides aminés dont le codon possède un SNPs (tableau 7.1 et figure 7.2). De plus,

40% de ses SNPs sont synonymes et permettent ainsi de conserver la séquence de HSP70 (figure 7.2).

En comparaison, P36 possède un profil semblable à HSP70, avec peu de polymorphismes. En effet les acides aminés dont les codons possèdent des SNPs ne représentent que 4% de la séquence protéique de P36. Comme pour la protéine HSP70, une grande partie des SNPs présents sont synonymes et n'altère donc pas la séquence (table 7.2 et figure 7.2).

P36 est donc une protéine dont la séquence protéique est conservée. Ce qui suggère des contraintes structurales importantes afin de maintenir le rôle de la protéine.

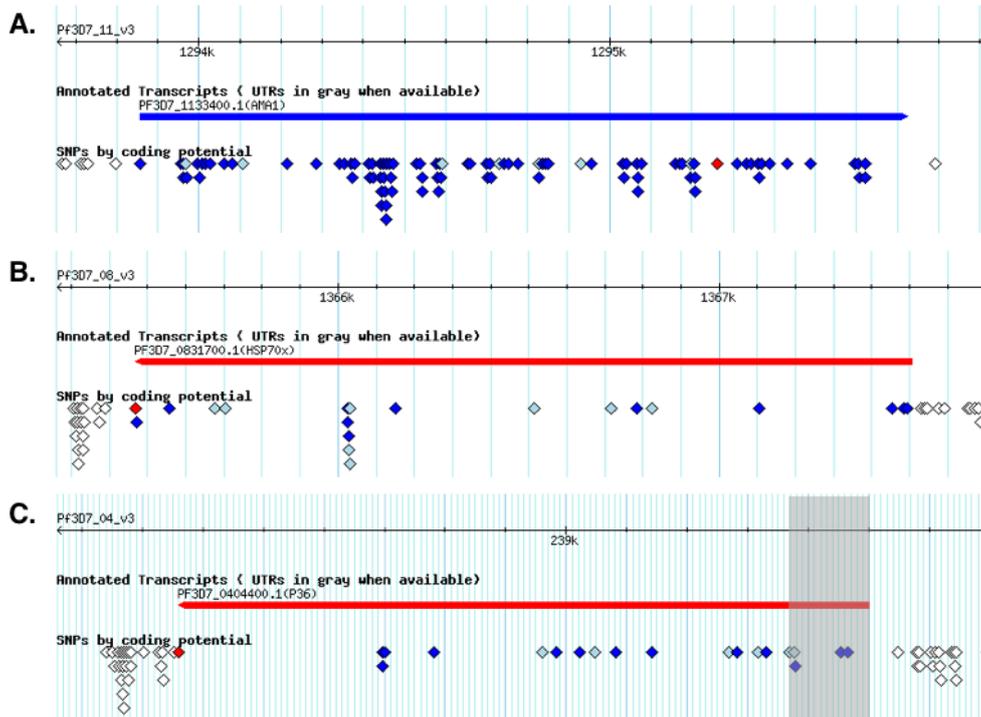


FIGURE 7.2 | Répartition des SNPs (Single Nucleotide polymorphisms) des protéines AMA1, HSP70 et P36 de *Plasmodium falciparum* 3D7 [Aurrecochea et al., 2009]. A. Répartition des SNPs de la protéine très polymorphique AMA1 de *Plasmodium falciparum* 3D7. B. Répartition des SNPs de la protéine très conservée HSP70 de *Plasmodium falciparum* 3D7. C. Rép de *Plasmodium falciparum* 3D7. La région grisée correspond à la région de la protéine P36 mal annotée et qui n'appartient pas à la séquence protéique exprimée. En bleu foncé : SNP non synonymes; en bleu clair : SNP synonyme et en rouge : SNP non sens.

Le domaine 1 de Pfp36 possède plus de SNPs que le domaine 2

La répartition des polymorphismes est inégale au sein du gène de P36 chez *Plasmodium falciparum*. En effet, le domaine 1 contient 8 SNPs, tandis que le domaine 2 n'en comporte que 4 (tableau 7.2 et figure 7.3). Mais, 37% des SNPs observés dans le domaine 1 sont synonymes, alors que les SNPs du domaine 2 sont tous non synonymes. La région N-terminale possède également deux SNPs.

Afin de localiser les acides aminés dont les codons possèdent des SNPs, ceux-ci ont été identifiés et positionnés sur les modélisations des protéines Pfp36 et Pvp36 (figures 7.3 et 7.4).

Les variations de séquence protéique résultant des SNPs du domaine 1 sont réparties à la surface de la protéine, que ce soit au niveau de brins β ou de boucles. Celles du domaine 2 sont présentes uniquement au niveau de boucles, dont notamment trois sont situés au niveau de la grande boucle d'insertion caractérisant *Plasmodium falciparum*. Le dernier SNP du domaine 2 est également présent à la surface du domaine à 6 cystéine. La structure du deuxième domaine à 6 cystéine est donc très conservée.

Le fait que le domaine 2 possède moitié moins de SNPs que le domaine 1 suggère que le domaine 2 est soumis à une pression de sélection plus forte et pourrait jouer un rôle important pour *Plasmodium*.

Tableau 7.2 | Polymorphisme nucléotidique de P36 *Plasmodium falciparum* (SNPs *Single Nucleotide polymorphisms*)

Région	Position		Type SNP	gène	Allèle majeur		Allèle mineur		
	CDS	protéine			protéine	fréquence	gène	protéine	fréquence
N-ter	169	57	NonSyn	A	I	0,99	T	F	0,01
N-ter	183	61	Syn	G	S	0,98	T	S	0,02
6cys D1	218	73	NonSyn	G	C	0,98	T	F	0,02
6cys D1	231	77	Syn	A	G	0,99	T	G	0,01
6cys D1	358	120	NonSyn	A	S	0,99	C	R	0,01
6cys D1	417	139	NonSyn	A	L	0,99	T	F	0,01
6cys D1	453	151	Syn	C	T	0,99	A	T	0,01
6cys D1	478	160	NonSyn	T	L	0,93	A	I	0,07
6cys D1	516	172	NonSyn	G	M	0,98	A	I	0,02
6cys D1	540	180	Syn	A	I	0,99	C	I	0,01
6cys D2	719	240	NonSyn	A	N	0,99	G	S	0,01
6cys D2	800	267	NonSyn	C	T	0,93	T	I	0,07
6cys D2	802	268	NonSyn	A	T	0,96	G	A	0,04
6cys D2	803	268	NonSyn	C	T	0,93	A	N	0,07
C-ter	1 140	380	NonSens	G	*	0,99	A	*	0,01

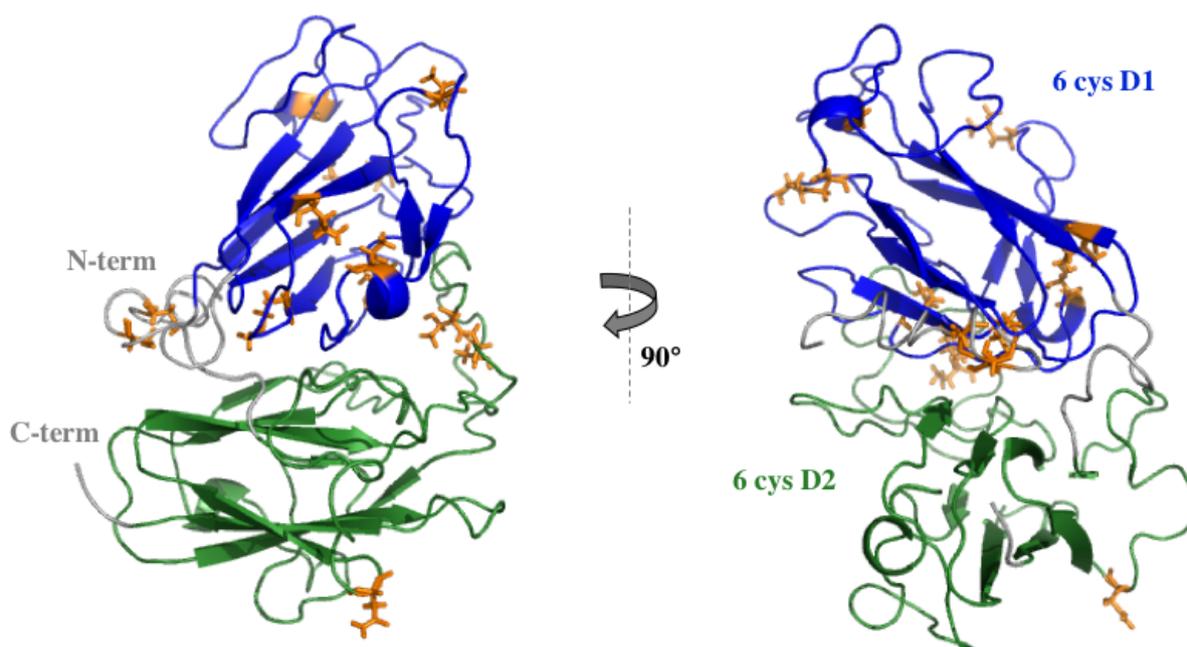


FIGURE 7.3 | Représentation des variations de séquence protéique résultant des SNPs (*Single Nucleotide polymorphisms*) sur la modélisation de la protéine P36 de *Plasmodium falciparum*. Le premier domaine à 6 cystéines est représenté en bleu, le second en vert et les régions N-terminale, C-terminale et d'inter-domaine sont grises. Les variations de séquence protéique résultant des SNPs sont représentées en orange sous forme de bâtonnets.

7.1.3 PvP36

La protéine P36 de *Plasmodium vivax* comporte 26 SNPs, dont 6 synonymes et un non sens (tableau 7.3 et figure 7.5). Ce qui est légèrement plus que pour la même protéine de *Plasmodium falciparum* dont la séquence comporte 4% de SNPs, tandis que la séquence de *Plasmodium vivax* en possède 7%.

Comme pour le gène de *Plasmodium falciparum*, la majorité des variations de séquence protéique résultant des SNPs sont localisées dans le domaine 1 (tableau 7.3 et figure 7.6).

Tableau 7.3 | Polymorphisme nucléotidique de P36 *Plasmodium vivax* (SNPs *Single Nucleotide polymorphisms*)

Région	Position		Type SNP	gène	Allèle majeur		Allèle mineur		
	CDS	protéine			protéine	fréquence	gène	protéine	fréquence
6cys D1	214	72	NonSyn	A	N	0,99	H	D	0,01
6cys D1	246	82	Syn	G	V	0,64	A	V	0,36
6cys D1	311	104	NonSyn	A	E	0,99	T	V	0,01
6cys D1	363	121	Syn	C	D	0,99	T	D	0,01
6cys D1	369	123	Syn	C	L	0,99	T	L	0,01
6cys D1	462	154	Syn	C	I	0,99	A	I	0,01
6cys D1	463	155	NonSyn	T	Y	0,99	A	N	0,01
6cys D1	465	155	Stop	C	Y	0,99	A	*	0,01
6cys D1	466	156	NonSyn	C	L	0,99	T	F	0,01
6cys D1	469	157	NonSyn	A	M	0,99	G	V	0,01
inter domaine	576	192	NonSyn	C	N	0,99	A	K	0,01
inter domaine	579	193	NonSyn	T	N	0,99	A	K	0,01
inter domaine	580	194	Syn	C	L	0,99	A	L	0,01
inter domaine	583	195	NonSyn	C	L	0,99	A	K	0,01
inter domaine	584	195	NonSyn	T	L	0,99	A	K	0,01
inter domaine	585	195	NonSyn	T	L	0,99	A	K	0,01
inter domaine	586	196	NonSyn	G	G	0,99	A	K	0,01
inter domaine	587	196	NonSyn	G	G	0,99	A	K	0,01
inter domaine	602	201	NonSyn	A	D	0,99	G	G	0,01
6cys D2	669	223	NonSyn	G	Q	0,97	C	H	0,03
6cys D2	752	251	NonSyn	G	G	0,99	C	A	0,01
6cys D2	830	277	NonSyn	G	S	0,98	A	N	0,02
6cys D2	942	314	Syn	G	L	0,99	A	L	0,02
C-ter	1006	336	NonSyn	C	E	0,91	G	Q	0,09
C-ter	1006	336	NonSyn	C	E	0,91	T	K	0,04

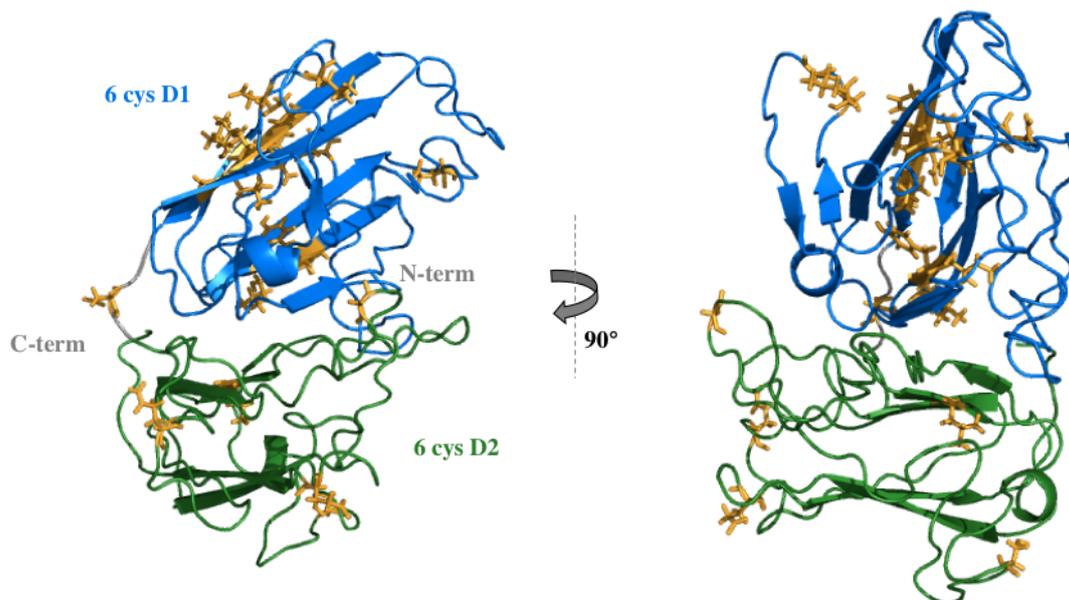


FIGURE 7.4 | Représentation des variations de séquence protéique résultant des SNPs (*Single Nucleotide polymorphisms*) sur la modélisation de la protéine P36 de *Plasmodium vivax*. Le premier domaine à 6 cystéines est représenté en bleu, le second en vert et les régions N-terminale, C-terminale et d'inter-domaine sont grises. Les variations de séquence protéique résultant des SNPs sont représentées en orange sous forme de bâtonnets.

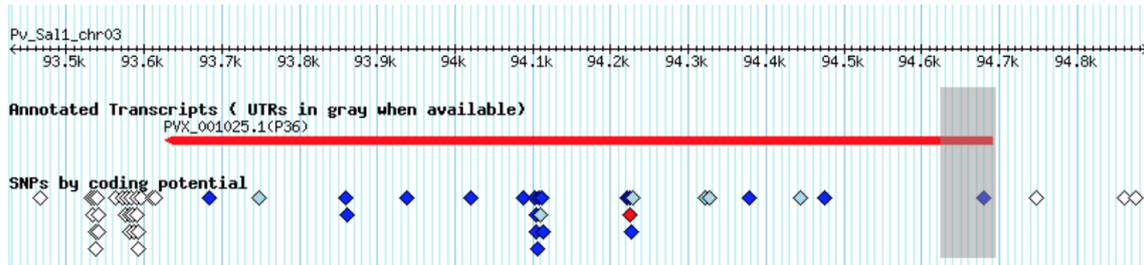


FIGURE 7.5 | Répartition des SNPs (*Single Nucleotide polymorphisms*) de P36 de *Plasmodium vivax* [Aurrecochea et al., 2009]. En bleu foncé : SNP non synonymes; en bleu clair : SNP synonyme et en rouge : SNP non sens.



FIGURE 7.6 | Alignement des séquences protéique de P36 de *P. falciparum* et *P. vivax* et positionnement des SNPs. L'alignement été réalisé avec ClustalOmega. En jaune : encadrement des deux domaines à 6 cystéines; en bleu foncé : SNP non synonymes; en bleu clair : SNP synonyme et en rouge : SNP non sens.

TROISIÈME PARTIE

Discussion

Jusqu'à maintenant la nature moléculaire des interactions mises en jeu lors de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium* était évasive. Des études ont permis d'identifier CD81 et SR-B1 en tant que facteurs d'hôte importants pour l'infection des hépatocytes [Silvie *et al.*, 2003; Yalaoui *et al.*, 2008a; Rodrigues *et al.*, 2008], mais leur contribution dans l'entrée du parasite était mal définie. De plus, les facteurs parasitaires associés à l'utilisation de CD81 ou SR-B1 n'avaient pas été identifiés.

Nous savons désormais que CD81 et SR-B1 définissent deux voies d'entrée indépendantes et que les parasites *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium yoelii* utilisent la voie d'entrée CD81-dépendante mais pas la voie SR-B1-dépendante [Silvie *et al.*, 2003, 2006a; Manzoni *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2008; Yalaoui *et al.*, 2008a; Foquet *et al.*, 2015]. *Plasmodium vivax* quant à lui n'est pas capable d'utiliser la voie CD81-dépendante, mais utilise la voie SR-B1-dépendante [Manzoni *et al.*, 2017]. Ainsi les deux principales espèces de *Plasmodium* infectant les humains utilisent deux voies d'invasion différentes. *Plasmodium berghei* peut utiliser l'une ou l'autre des deux voies [Manzoni *et al.*, 2017]. Mais contrairement au virus de l'hépatite C [Pileri *et al.*, 1998; Scarselli *et al.*, 2002; Bartosch *et al.*, 2003; Kapadia *et al.*, 2007], *Plasmodium* utilise les récepteurs CD81 et SR-B1 indépendamment et dans deux voies distinctes. L'utilisation alternative des voies CD81 et SR-B1 par *Plasmodium berghei* est surprenante, ces deux protéines étant structurellement très différentes.

Nous avons démontré dans les chapitres précédents que la protéine parasitaire P36 joue un rôle critique dans la détermination de la voie d'entrée dans les hépatocytes. Plus particulièrement nous avons pu identifier le second domaine à 6 cystéines de P36 comme déterminant du choix de la voie d'entrée.

8.1 Identification des facteurs parasitaires mis en jeu lors de l'invasion des hépatocytes

Nous avons testé plusieurs facteurs parasitaires afin de déterminer s'ils jouaient un rôle dans l'invasion hépatique. Les premiers facteurs parasitaires testés sont les protéines à domaine TSR. En effet SR-B1 étant un récepteur de la même famille que CD36 il possède un domaine de fixation à la thrombospondine. Les parasites *Plasmodium yoelii* ont été complémentés avec des vecteurs permettant l'expression des protéines TSR de *Plasmodium berghei*. Ces vecteurs ont été obtenus par la banque PlasmoGEM. L'incorporation des vecteurs au sein des parasites a pu être vérifiée par génotypage, après extraction de l'ADN des parasites au stade sanguin. Cependant il n'a pas été possible de vérifier l'expression des protéines TSR chez les sporozoïtes. En effet, les vecteurs utilisés ne comportaient pas d'étiquette permettant de

suivre l'expression de la protéine et nous ne possédons pas d'anticorps permettant de cibler les protéines testées. Bien que la complémentation des parasites *Plasmodium yoelii* avec les vecteurs d'expression des protéines TSR de *Plasmodium berghei* ne permette pas l'utilisation de la voie CD81-indépendante (figure 4.10), l'expression des protéines TSR ne pouvant pas être confirmée, il n'est pas possible d'exclure que ces protéines soient tout de même impliquées dans la voie d'entrée CD81-indépendante. Cependant, les résultats obtenus avec P52 et P36 nous ont fait abandonner la piste des protéines à domaine TSR au profit des protéines à domaine 6 cystéines.

La famille des protéines à domaine 6 cystéines est caractérisée par la présence de domaines riches en cystéines : le domaine 6 cystéines ou s48/45. *Plasmodium* possède une douzaine de protéines de cette famille. Ces protéines sont impliquées à différents stades du cycle de vie, généralement localisées à la surface du parasite où elles pourraient jouer un rôle dans les interactions cellulaires [Annoura *et al.*, 2014; Arredondo et Kappe, 2016].

Il a été mis en évidence que les protéines P52 et P36 jouent un rôle crucial au cours de l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes [Van Dijk *et al.*, 2005; Ishino *et al.*, 2005; Van Schaijk *et al.*, 2008]. Néanmoins le rôle précis de ces protéines n'a pas été élucidé. Elles seraient impliquées dans l'entrée dans les hépatocytes [Ishino *et al.*, 2005; Labaied *et al.*, 2007] ou dans le maintien de la vacuole parasitophore une fois le parasite entré dans l'hépatocyte [Van Dijk *et al.*, 2005; VanBuskirk *et al.*, 2009; Mikolajczak *et al.*, 2014].

Tout d'abord nous avons pu mettre en évidence grâce à notre modèle de test d'invasion que les protéines P52 et P36 sont impliquées non pas lors de la traversée cellulaire, mais lors de l'invasion productive. En effet, la délétion de P52 et P36 reproduit le phénotype obtenu lors du blocage des récepteurs CD81 ou SR-B1. De plus, l'association de nos données avec celles des études précédentes [Van Dijk *et al.*, 2005; Ishino *et al.*, 2005; Van Schaijk *et al.*, 2008; Kaushansky *et al.*, 2015b] démontre que les protéines P52 et P36 sont nécessaires pour que les sporozoïtes envahissent les hépatocytes, quelle que soit la voie d'entrée utilisée.

Notre étude met en évidence que la protéine P36, et non la protéine P52, est responsable de l'utilisation différente des voies d'entrées par *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*.

En effet, l'utilisation de complémentation trans-espèces avec des protéines P52 et P36 de *Plasmodium berghei* ou *Plasmodium yoelii*, a permis de restaurer l'infection des cellules HepG2 dépourvues de CD81 uniquement lorsque la protéine P36 de *Plasmodium berghei* était présente. Ce qui a permis d'identifier P36 comme déterminant parasitaire crucial dans la détermination de la voie d'entrée utilisée par le sporozoïte, et surtout que la protéine P36 de *Plasmodium berghei* permet l'utilisation de la voie CD81 et SR-B1, tandis que la protéine P36 de *Plasmodium yoelii* ne permet que l'utilisation de la voie CD81-dépendante.

Ces résultats suggèrent que la protéine PbP36 possède des déterminants structuraux qui lui permettent d'interagir avec SR-B1 ou des molécules dépendantes de SR-B1.

8.2 Structure de P36 et identification du second domaine comme déterminant structural

Les séquences protéiques de P36 de *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* partagent 88% d'identité et 97% de similarité. La modélisation structurale de PbP36 basée sur la structure de la protéine PfP12 appartenant également à la famille des protéines à domaine 6 cystéines présente un repliement en sandwich β caractéristique de la famille. L'alignement des séquences protéiques combiné à la modélisation de la protéine PbP36 a permis de déterminer que la majorité des acides aminés divergents entre les protéines PbP36 et PyP36 sont localisés sur le second domaine à 6 cystéines au niveau de deux boucles. Une des

boucles, localisée entre la troisième et la quatrième cystéine du domaine, présente chez *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* une insertion de 21 et 3 acides aminés respectivement.

Afin d'identifier les déterminants structuraux de la P36, des parasites Pb Δ P36 ont été complétés avec différentes constructions de protéines chimériques de P36. Ces constructions mêlent les domaines des deux espèces *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* ou permettent l'échange des boucles contenant les acides aminés divergents entre *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. Chaque protéine chimérique possède du côté C-terminal une étiquette mCherry, ce qui nous a permis de vérifier l'expression des protéines chimériques.

Les sporozoïtes ont été déposés sur des lames couvertes de poly-L-lysine et observés par microscopie à fluorescence. Les sporozoïtes étaient fluorescents en vert grâce à l'expression de la GFP et si la protéine chimérique P36 était exprimée alors de la fluorescence rouge était également observée. Dans la majorité des cas les sporozoïtes possédaient de la fluorescence rouge témoin de l'expression de P36. Néanmoins tous les sporozoïtes ne possédaient pas cette fluorescence rouge (figure 5.10).

L'absence de fluorescence chez certains sporozoïtes peut être due à un parasite qui n'est pas encore mature et dont l'expression de P36 n'aurait pas encore eu lieu. En effet, les sporozoïtes des glandes salivaires ne sont pas tous infectieux, seuls 10 à 15% d'entre eux sont capables d'infecter les cellules. En fonction du stade de maturation le sporozoïte n'exprime pas les mêmes protéines [Srinivasan *et al.*, 2004]. Ainsi, la protéine AMA1 est absente chez les sporozoïtes dans les oocystes mais exprimées chez les sporozoïtes matures des glandes salivaires [Srinivasan *et al.*, 2004]. L'expression de P36 au cours de la maturation des sporozoïtes reste à déterminer, et les parasites exprimant P36mCherry pourraient permettre de mieux caractériser le profil d'expression au cours de la maturation du parasite chez le moustique.

La complémentation de Pb Δ P36 avec des protéines P36 possédant le second domaine à 6 cystéines de Pb36 permet de restaurer l'infection des cellules HepG2, ce qui n'est pas le cas pour les parasites possédant le second domaine de PyP36. Nous avons ainsi pu identifier le second domaine à 6 cystéines de P36 comme déterminant structural du choix de la voie d'entrée.

Le second domaine à 6 cystéines est le domaine comportant l'essentiel des variations d'acides aminés entre les séquences de *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*. Deux boucles présentant la majorité des divergences entre les deux espèces ont été identifiées précédemment.

L'étude des propriétés des acides aminés présents au niveau de ces boucles chez *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* met en évidence des différences pouvant modifier les interactions mises en jeu. En effet, les boucles A et B de *Plasmodium berghei* portent des charges négatives qui sont absentes chez *Plasmodium yoelii*. De plus, la boucle A de *Plasmodium yoelii* comporte une proline à la place d'une sérine, ce qui modifie l'encombrement stérique de la boucle. Il est donc possible que les différences dans les séquences protéiques au niveau des boucles A et B de *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* soient à l'origine de l'utilisation de différentes voies d'entrées.

Afin d'étudier ces boucles, des protéines chimériques dont une des deux boucles a été remplacée par celle de l'autre espèce ont été utilisées pour compléter les parasites Pb Δ P36. Cependant, l'échange de ces boucles entre les espèces n'a pas permis d'aboutir à l'identification d'un déterminant structural. Il est donc probable que ce soit l'association de ces deux boucles qui soit nécessaire au parasite.

Il faut également noter que les taux d'infection obtenus lors de ces tests sont faibles (figures 5.11 et 5.13). Il est possible que les protéines chimériques ne permettent pas une complémentation optimale.

La présence de l'étiquette ne semble pas gêner le parasite, car l'utilisation de sporozoïtes exprimant la protéine P36-mCherry présente des taux d'invasion cellulaire similaires au parasite sauvage (données de l'équipe).

Nous ne pouvons pas exclure que le repliement soit incomplet ou différent de la protéine native. Le fait de posséder un domaine de chaque espèce peut limiter les interactions mises en place dans la protéine native pour le maintien de sa structure.

La protéine P36 est une protéine composée de deux domaines à 6 cystéines. Nous venons de voir que le second domaine à 6 cystéines de P36 est impliqué en tant que déterminant de la voie d'entrée qu'utilise le sporozoïte pour envahir un hépatocyte. En effet, la complémentation d'un parasite délété pour P36 avec une protéine P36 dont le second domaine est celui de *Plasmodium berghei* permet de restaurer l'infection par la voie CD81-indépendante.

Néanmoins le rôle du premier domaine reste inconnu. Ce domaine est-il nécessaire à l'organisation structurale de P36 ? Est-il impliqué dans des interactions avec d'autres facteurs parasitaires ? Il existe d'autres protéines à 6 cystéines de *Plasmodium* qui interagissent en association. En effet, les protéines P12 et P41 s'associent pour former un hétérodimère [Parker *et al.*, 2015]. Les domaines sont associés de telle sorte que le domaine 1 de P12 interagit avec le domaine 2 de P41 et inversement (figure ??). Si P36 est impliquée dans un hétérodimère semblable il est alors probable que son premier domaine soit nécessaire à la stabilisation du dimère.

Il serait intéressant de compléter le parasite Pb Δ P36 avec uniquement le domaine 1 puis uniquement le domaine 2 de la protéine PbP36 afin de déterminer si le second domaine à 6 cystéine a besoin d'être associé au premier domaine ou s'il peut jouer son rôle seul.

8.3 Interactions mises en jeu par les protéines à 6 cystéines

Nous savons qu'au niveau des hépatocytes les sporozoïtes sont capables d'utiliser au moins deux récepteurs, CD81 et SR-B1 lors de l'invasion [Silvie *et al.*, 2003; Yalaoui *et al.*, 2008a; Rodrigues *et al.*, 2008].

Néanmoins d'autres récepteurs peuvent être mis en jeu. En effet, les sporozoïtes semblent envahir préférentiellement des hépatocytes riches en récepteurs EphA2 et CD74 [Kaushansky *et al.*, 2015b,a]. Les récepteurs EphA2 et CD74, présents à la surface des cellules hépatocytaires, pourraient donc jouer un rôle dans l'invasion par *Plasmodium*. Cependant, des données récentes de l'équipe suggèrent que EphA2 n'est pas nécessaire quelle que soit la voie d'entrée.

Il existe également d'autres récepteurs qui pourraient être utilisés par le parasite pour envahir les hépatocytes. Nous savons par exemple que le récepteur CD36, présent à la surface des cellules endothéliales est mis en jeu lors de la cytoadhérence des globules rouges infectés par *P. falciparum* via l'interaction avec PfEMP1. CD36 présente un domaine de liaison à la thrombospondine. Or les sporozoïtes de *Plasmodium* expriment plusieurs protéines possédant des domaines TSR *thrombospondin repeat*, notamment la CSP et TRAP. Il a donc été supposé que CD36 pourrait jouer un rôle lors de l'invasion des hépatocytes. Néanmoins, les sporozoïtes de *Plasmodium yoelii* sont capables d'infecter des souris déficientes pour CD36 [Sinnis et Febbraio, 2002]. CD36 n'est donc pas indispensable pour l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium yoelii*.

Plusieurs protéines à 6 cystéines sont impliquées dans des interactions avec des facteurs d'hôtes.

C'est le cas notamment de la séquestrine qui interagit avec le récepteur CD36 [Ockenhouse *et al.*, 1991], bien que la pertinence de cette interaction reste à déterminer, car la séquestrine n'est exprimée qu'à la fin du développement au stade hépatique [Orito *et al.*, 2013].

Récemment il a été montré que la protéine Pf92 se lie au facteur H et permet ainsi aux mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* d'échapper au système du complément humain [Kennedy *et al.*, 2016].

Le moustique possède un système semblable au système du complément. La protéine TEP1 (*thioester-containing protein 1*), sécrétée par les hémocytes dans l'hémolymphe constitue un facteur essentiel de la réponse antiparasitaire des *Anopheles*. TEP1 se fixe à la surface des ookinètes et déclenche ainsi leur élimination [Blandin *et al.*, 2004]. La protéine Pfs47 exprimée chez les ookinètes de *Plasmodium falciparum* est mise en jeu dans l'évasion immunitaire au sein de l'appareil digestif du moustique. Pfs47 permet la suppression de la cascade de signalisation JNK (c-Jun N-terminal kinase), ce qui inhibe la nitration et empêche ainsi l'activation de TEP1 [Molina-Cruz *et al.*, 2013; Ramphul *et al.*, 2015; Ukegbu *et al.*, 2017]. Il a été observé que les souches de *Plasmodium falciparum* se sont adaptées à leur moustique hôte. Ainsi une souche originaire d'Afrique pourra efficacement échapper au système immunitaire des moustiques présents sur le continent africain mais perdra grandement en efficacité vis à vis de moustiques asiatiques ou américains [Molina-cruz *et al.*, 2015]. La protéine Pfs47 est mise en jeu lors de ce phénomène [Molina-cruz *et al.*, 2015]. Il est proposé que Pfs47 joue le rôle d'une clé qui permet aux parasites de neutraliser le système immunitaire du moustique en interagissant avec un récepteur du moustique encore non identifié jouant le rôle de serrure.

Il est tout à fait possible que P36 soit un déterminant du sporozoïte jouant le rôle de clé qui "ouvre" la voie SR-B1 et/ou CD81 représentant les serrures permettant l'entrée dans les hépatocytes.

Des études préliminaires par ELISA et SPR pour tester l'interaction de P36 avec les récepteurs CD81, SR-B1, CD36, LIMPII, et EphA2 n'ont pas permis de détecter d'interaction.

Il semble peu probable que la protéine P36 soit mal repliée car elle n'est pas présente dans les corps d'inclusions lors de la production et est produite en grande quantité grâce à l'étiquette aidant à sa solubilité et sa stabilité. Néanmoins une analyse par DLS (*Dynamic light scattering*) pourrait permettre de confirmer le repliement de P36.

Cependant, l'encombrement stérique résultant de la présence de la MBP pourrait gêner les interactions de P36 avec son ligand. En effet, la MBP est de taille similaire à P36 et l'étiquette est placée du côté N-terminal qui correspond à la région centrale entre les domaines (figure 5.6).

De plus, les récepteurs testés sont sous forme de protéines recombinantes en solution et ne correspondent qu'aux régions extracellulaires. Il est donc possible que ces formes soient trop éloignées des formes natives et ne permettent donc pas l'interaction avec P36.

Nous savons également que l'environnement membranaire peut influencer le rôle du récepteur. C'est notamment le cas pour le récepteur CD81 qui appartient à la famille des tétraspanines. Les protéines de cette famille sont capables d'interagir directement et spécifiquement avec des molécules partenaires. CD81 peut s'associer aux protéines EWI-F (également appelée CD9P-1, FPRP ou CD315) et EWI-2 (aussi appelée PGRL, IgSF8 ou CD316). Bien qu'aucun de ces partenaires ne soit nécessaire à l'infection par *Plasmodium yoelii*, il a été montré que EWI-F joue un rôle négatif au cours de l'invasion [Charrin *et al.*, 2009b]. L'effet inhibiteur d'un des partenaires de CD81 au cours de l'invasion par *Plasmodium* met en évidence un contrôle de l'activité de CD81 par son environnement moléculaire. Au niveau de la membrane, les tétraspanines s'associent au sein d'environnements lipidiques riches en cholestérols et gangliosides et forment ainsi des microdomaines enrichis en tétraspanines (TEMs) [Charrin *et al.*, 2009a]. De plus, il a été démontré que le cholestérol membranaire joue un rôle dans l'organisation de ces TEMs et dans l'invasion CD81-dépendante par les sporozoïtes [Silvie *et al.*, 2006a].

L'utilisation de formes recombinantes de la grande boucle extracellulaire de CD81 humain ou murin ne permet pas d'inhiber l'infection des hépatocytes par *Plasmodium falciparum* ou *Plasmodium yoelii* [Silvie *et al.*, 2003]. Les expériences d'immunofluorescence et de far-western ne montrent pas d'interaction entre les sporozoïtes et CD81 [Silvie *et al.*, 2003]. Ces données suggèrent que le domaine

extracellulaire de CD81 seul n'interagit pas directement avec les sporozoïtes.

Il est également possible que P36 n'interagisse pas directement avec un récepteur membranaire. L'interaction pourrait se faire par un co-facteur au sein d'un complexe protéique.

L'équipe a montré que la complémentation de *PbΔp52/p36* avec les protéines P52 et P36 de *Plasmodium falciparum* ou *Plasmodium vivax* ne permet pas de restaurer l'infectiosité des sporozoïtes [Manzoni *et al.*, 2017]. Cela suppose l'existence d'autres facteurs parasitaires encore non identifiés qui coopèrent avec les protéines P52 et P36. Les séquences protéiques des protéines P36 de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* n'étant pas aussi proches de celle de *PbP36* que *Plasmodium yoelii*, l'interaction avec les co-facteurs pourrait ne pas se faire de manière efficace.

La délétion de P52 seule ou P36 seule présente un phénotype similaire à la double délétion de P52 et P36, ce qui suggère que les deux protéines agissent ensemble [Van Dijk *et al.*, 2005; Ishino *et al.*, 2005; Van Schaijk *et al.*, 2008; Labaied *et al.*, 2007]. Au stade sanguin les protéines P41 et P12, appartenant également à la famille des protéines à domaine 6 cystéines, interagissent pour former un hétérodimère stable à la surface des mérozoïtes [Taechalertpaisarn *et al.*, 2012; Tonkin *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2015]. Il est prédit que la protéine P12 possède un ancrage GPI, ce qui n'est pas le cas pour la protéine P41. Il est donc possible que l'association entre ces deux protéines permette à P41 d'être exprimée à la surface du parasite. Par analogie, nous pouvons donc supposer que P36 interagit pour former un hétérodimère avec une protéine à 6 cystéines exprimée à la surface du sporozoïte, telle que P52.

En plus de P52 et P36, les sporozoïtes expriment au moins trois autres protéines à domaine 6 cystéines : B9, P12p et P38 [Lindner *et al.*, 2013; Swearingen *et al.*, 2016]. B9 joue un rôle critique lors de l'infection des hépatocytes par *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* et *Plasmodium falciparum* [Annoura *et al.*, 2014]. Annoura *et al.* ne retrouvent pas d'expression de B9 chez le sporozoïte et proposent un rôle plus tardif de cette protéine dans le développement du parasite au sein des hépatocytes. Cependant d'après les données présentes sur plasmoDB des peptides de PfB9 et PyB9 sont identifiés chez les sporozoïtes et les données de microscopie d'Annoura *et al.* ne permettent pas d'exclure un rôle de B9 dans l'invasion ce qui pourrait être confirmé par un suivi de l'infection par FACS. La protéine P12p ne semble pas jouer un rôle majeur, car sa délétion n'aboutit à aucun phénotype [Arredondo et Kappe, 2016]. Comme pour P12p, la délétion de la protéine P38 chez *Plasmodium berghei* ne présente pas de phénotype [Van Dijk *et al.*, 2010; Harupa, 2015]. Néanmoins il a été montré qu'au stade sanguin P38 appartient à un complexe incluant P41, P12, MSP1, SERA5, GLURP qui interagit avec la glycophorine A présente à la surface des globules rouges [Paul *et al.*, 2017]. Mais nous ne savons pas si les protéines P36, P52, B9, P12p et P38 sont capables d'interagir entre elles.

Nous savons donc désormais que la protéine P36 est un déterminant de la voie d'entrée dans les hépatocytes. Cependant le mécanisme mis en jeu dans cette détermination n'a pas été élucidé. La liaison de P36 à SR-B1 ou CD81 que ce soit directement ou indirectement, pourrait être impliquée dans des cascades de signalisation qui aboutiraient à la sécrétion des rhoptries et l'assemblage de la jonction mobile, qui sont des événements clés de l'invasion par *Plasmodium* [Besteiro *et al.*, 2011].

D'autre part, P36 pourrait également activer des cascades de signalisation chez la cellule hôte en interagissant avec SR-B1 ou d'autres récepteurs. En effet, Kaushansky *et al.* ont récemment montré que les sporozoïtes envahissent préférentiellement les cellules riches en récepteur EphA2, et proposé que p36 interagit avec EphA2 [Kaushansky *et al.*, 2015b]. Le récepteur EphA2 est un récepteur d'éphrines, et Arredondo *et al.*, dans leur étude de la structure de la protéine Pf12, ont remarqués que le domaine à 6 cystéines de cette protéine possède un arrangement structural proche des protéines éphrines [Arredondo *et al.*, 2012]. La préférence pour ces cellules riches en EphA2 est conservée chez les parasites délétés

pour p52 et p36, ce qui suggère qu'il n'y a pas de lien direct entre EphA2 et la voie d'invasion productive utilisant P52-P36. Cependant la même étude montre que P36 interfère avec la phosphorylation de EphA2 par son ligand Ephrin A1 [Kaushansky *et al.*, 2015b]. Il semblerait donc possible que P36 affecte la phosphorylation d'EphA2 indirectement, par exemple via SR-B1 ou la voie SRC [Naudin *et al.*, 2014; Mineo et Shaul, 2003].

La localisation de la protéine P36 reste aujourd'hui mal définie. L'observation par microscopie de sporozoïtes exprimant la protéine P36 avec une étiquette mCherry met en évidence la présence de la protéine avec un aspect granuleux et compatible avec une localisation dans les micronèmes. Néanmoins l'utilisation de microscope à haute résolution et d'anticorps spécifiques des protéines de micronèmes pourraient permettre de confirmer cette hypothèse. Il serait également intéressant de voir si P36 se retrouve en surface après activation des sporozoïtes. En effet, P36 n'est pas identifié dans le protéome de surface des sporozoïtes contrairement aux protéines P38 et P12p [Swearingen *et al.*, 2016]. La localisation cellulaire de P36 pourra apporter des éléments de réponse sur sa fonction.

8.4 Production de la protéine P36

Une grande partie de mon travail a été consacrée à la production et la purification de protéines de *Plasmodium*. Comme nous avons pu le voir, la production de la protéine P36 a nécessité de nombreux essais. Néanmoins l'utilisation d'une étiquette MBP et de la bactérie *E. coli* de type Shuffle a permis de contourner les obstacles auxquels nous étions confrontés et d'obtenir la protéine sous forme soluble.

Un des premiers obstacles rencontrés lors de la production de protéines de *Plasmodium* est la richesse du génome en acides nucléiques A+T. L'optimisation des gènes pour les différents systèmes d'expression a donc permis de contourner ce premier problème.

La présence de nombreux ponts disulfures chez P36 semble également avoir été un facteur limitant pour sa production. La majorité des protéines à 6 cystéines ayant été produites jusqu'à aujourd'hui ont dû être dénaturées dans de l'urée avant d'être repliées [Van Dijk *et al.*, 2001; Angel *et al.*, 2008; Mongui *et al.*, 2008; Taechalertpaisarn *et al.*, 2012; Macdonald *et al.*, 2016; Paul *et al.*, 2017; Ukegbu *et al.*, 2017]. Grâce à l'utilisation des bactéries de types Shuffle qui facilitent la formation des ponts disulfures dans le cytoplasme bactérien et l'ajout d'un tag MBP en N-terminal nous n'avons pas eu besoin de replier P36 une fois produite.

Les premiers tests de production de P36 dans la bactérie Shuffle ont été réalisés avec une étiquette à 6 histidines. Ces premiers tests ont permis d'obtenir de la protéine mais en très faible quantité, il a donc été fait le choix d'utiliser une étiquette au poids moléculaire plus important mais facilitant la solubilité et la stabilité de la protéine. C'est pourquoi une étiquette MBP a été ajoutée du côté N-terminal de P36 en remplacement de l'étiquette à 6 histidines. Cette modification a permis d'aboutir à une production des protéines P36 de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* avec un rendement moyen de 2,5mg de protéine pour des cultures de 500mL.

Dans l'hypothèse où P52 et P36 formeraient un complexe, il serait intéressant d'essayer de produire les deux protéines en même temps dans la bactérie shuffle. Il est possible que la co-expression permette la formation d'un complexe P52/P36 stable et permette ainsi de réduire la taille de l'étiquette MBP de nouveau à une étiquette 6 histidines. Étant donné que la production de P36 est désormais mise au point, il est probable que l'utilisation de ce système permette également de produire d'autres protéines de la

famille à 6 cystéines. Il serait donc intéressant de produire P52 afin d'étudier plus précisément son rôle.

Les protéines obtenues sont pures à plus de 90%. Une production d'anticorps a donc été initiée avec les protéines PbP36-MBP et PfP36-MBP ainsi que la protéine MBP comme contrôle. L'obtention de la protéine étant récente, je n'ai pour le moment pas réussi à optimiser le clivage de l'étiquette MBP. Il est possible que sans cette étiquette la protéine ne soit pas stable.

Les anticorps produits pourront être utilisés pour réaliser des tests de blocage de l'invasion des hépatocytes. Si l'incubation de ces anticorps en même temps que les sporozoïtes sur les cellules hépatocytaires permet de bloquer l'invasion, il sera alors possible d'imaginer l'utilisation de la protéine P36 comme cible vaccinale.

Bien que quelques SNPs soient présents, P36 est une protéine très conservée que ce soit chez *Plasmodium falciparum* ou *Plasmodium vivax*. Le second domaine est le plus conservé, ce qui peut être lié à son rôle important dans le choix de la voie d'entrée dans les hépatocytes par les sporozoïtes. De plus, la faible variabilité de la séquence protéique de P36 en fait une bonne cible vaccinale.

8.5 Conclusion

En conclusion, cette thèse a permis d'identifier la protéine P36 et plus précisément son second domaine à 6 cystéines comme déterminant clé du choix de la voie d'entrée par les sporozoïtes. Ce résultat permet d'avancer dans la compréhension du mécanisme mis en place par *Plasmodium* pour envahir les hépatocytes.

P36 est nécessaire à l'invasion par les voies CD81 et SR-B1 dépendantes, ce qui suggère que P36 est également nécessaire à *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* lors de l'invasion.

L'obtention de la protéine P36 devrait permettre de mieux comprendre les interactions moléculaires avec son ou ses partenaires.

L'identification du ligand de P36 permettant l'entrée dans la cellule hôte permettrait de développer de nouvelles approches thérapeutiques. P36 pourrait notamment être la cible de vaccins.

Annexes

A

ARTICLE PUBLIÉ



Plasmodium P36 determines host cell receptor usage during sporozoite invasion

Giulia Manzoni¹, Carine Marinach^{1†}, Selma Topçu^{1†}, Sylvie Briquet¹, Morgane Grand¹, Matthieu Tolle¹, Marion Gransagne¹, Julien Lescar¹, Chiara Andolina^{2,3}, Jean-François Franetich¹, Mirjam B Zeisel^{4,5}, Thierry Huby⁶, Eric Rubinstein^{7,8}, Georges Snounou¹, Dominique Mazier^{1,9}, François Nosten^{2,3}, Thomas F Baumert^{4,5,10}, Olivier Silvie^{1*}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, U1135, ERL8255, Paris, France; ²Shoklo Malaria Research Unit, Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Mae Sot, Thailand; ³Centre for Tropical Medicine and Global Health, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford, United Kingdom; ⁴INSERM, U1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Strasbourg, France; ⁵Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁶Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, UMR_S 1166, Paris, France; ⁷INSERM, U935, Villejuif, France; ⁸Université Paris Sud, Institut André Lwoff, Villejuif, France; ⁹Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre Hospitalo-Universitaire Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ¹⁰Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépatodigestif, Hopitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

*For correspondence: olivier.silvie@inserm.fr

†These authors contributed equally to this work

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 19

Received: 09 February 2017

Accepted: 10 May 2017

Published: 16 May 2017

Reviewing editor: Elena Levashina, Max Planck Institute for Infection Biology, Germany

© Copyright Manzoni et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract *Plasmodium* sporozoites, the mosquito-transmitted forms of the malaria parasite, first infect the liver for an initial round of replication before the emergence of pathogenic blood stages. Sporozoites represent attractive targets for antimalarial preventive strategies, yet the mechanisms of parasite entry into hepatocytes remain poorly understood. Here we show that the two main species causing malaria in humans, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*, rely on two distinct host cell surface proteins, CD81 and the Scavenger Receptor BI (SR-BI), respectively, to infect hepatocytes. By contrast, CD81 and SR-BI fulfil redundant functions during infection by the rodent parasite *P. berghei*. Genetic analysis of sporozoite factors reveals the 6-cysteine domain protein P36 as a major parasite determinant of host cell receptor usage. Our data provide molecular insights into the invasion pathways used by different malaria parasites to infect hepatocytes, and establish a functional link between a sporozoite putative ligand and host cell receptors.

DOI: [10.7554/eLife.25903.001](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.001)

Introduction

Hepatocytes are the main cellular component of the liver and the first replication niche for the malaria-causing parasite *Plasmodium*. Malaria begins with the inoculation of sporozoites into the host skin by infected *Anopheles* mosquitoes. Sporozoites rapidly migrate to the liver and actively invade hepatocytes by forming a specialized compartment, the parasitophorous vacuole (PV), where they differentiate into thousands of merozoites (Ménard et al., 2013). Once released in the blood, merozoites invade and multiply inside erythrocytes, causing the malaria disease.

eLife digest Malaria is an infectious disease that affects millions of people around the world and remains a major cause of death, especially in Africa. It is caused by *Plasmodium* parasites, which are transmitted by mosquitoes to mammals. Once in the mammal, the parasites infect liver cells, where they multiply. Previous studies have suggested that proteins on the surface of the liver cells and on the parasite affect how *Plasmodium* infects liver cells. Understanding how these proteins enable the parasites to enter the cells may help researchers to develop treatments that interrupt the parasite life cycle and prevent infection.

Manzoni et al. have now investigated how different malaria parasite species interact with liver cells. The main parasite species that infect humans are *Plasmodium falciparum* in Africa and *Plasmodium vivax* outside Africa. Manzoni et al. found that *P. falciparum* and *P. vivax* infect human liver cells by two different routes: *P. falciparum* interacts with a liver cell protein called CD81, and *P. vivax* interacts with a liver cell protein called SR-BI. Further experiments that used mutant forms of malaria parasites that infect mice showed that a parasite protein called P36 determines which liver cell protein the parasite will interact with.

The next step is to understand how P36 interacts with the liver cell proteins and to identify other parasite proteins that help *Plasmodium* to invade cells. In the future, such knowledge may help to develop a highly effective malaria vaccine.

DOI: [10.7554/eLife.25903.002](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.002)

Under natural transmission conditions, infection of the liver is an essential, initial and clinically silent phase of malaria, and therefore constitutes an ideal target for prophylactic intervention strategies. However, the molecular mechanisms underlying *Plasmodium* sporozoite entry into hepatocytes remain poorly understood. Highly sulphated proteoglycans in the liver sinusoids are known to bind the circumsporozoite protein, which covers the parasite surface, and contribute to the homing and activation of sporozoites (Frevert et al., 1993; Coppi et al., 2007). Subsequent molecular interactions leading to sporozoite entry into hepatocytes have not been identified yet. Several parasite proteins have been implicated, such as the thrombospondin related anonymous protein (TRAP) (Matuschewski et al., 2002), the apical membrane antigen 1 (AMA-1) (Silvie et al., 2004), or the 6-cysteine domain proteins P52 and P36 (van Dijk et al., 2005; Ishino et al., 2005; van Schaijk et al., 2008; Kaushansky et al., 2015; Labaied et al., 2007), however their role during sporozoite invasion remains unclear (Bargieri et al., 2014).

Our previous work highlighted the central role of the host tetraspanin CD81, one of the receptors for the hepatitis C virus (HCV) (Pileri et al., 1998), during *Plasmodium* liver infection (Silvie et al., 2003). CD81 is an essential host entry factor for human-infecting *P. falciparum* and rodent-infecting *P. yoelii* sporozoites (Silvie et al., 2003, 2006a). CD81 acts at an early step of invasion, possibly by providing signals that trigger the secretion of rhoptries, a set of apical organelles involved in PV formation (Risco-Castillo et al., 2014). Whereas CD81 binds the HCV E2 envelope protein (Pileri et al., 1998), there is no evidence for such a direct interaction between CD81 and *Plasmodium* sporozoites (Silvie et al., 2003). Rather, we proposed that CD81 acts indirectly, possibly by regulating an as yet unidentified receptor for sporozoites within cholesterol-dependent tetraspanin-enriched microdomains (Silvie et al., 2006b; Charrin et al., 2009a). Intriguingly, the rodent malaria parasite *P. berghei* can infect cells lacking CD81 (Silvie et al., 2003, 2007), however the molecular basis of this alternative entry pathway was until now totally unknown.

Another hepatocyte surface protein, the scavenger receptor BI (SR-BI), was shown to play a dual role during malaria liver infection, first in promoting parasite entry and subsequently its development inside hepatocytes (Yalaoui et al., 2008a; Rodrigues et al., 2008). However, the contribution of SR-BI during parasite entry is still unclear. SR-BI, which is also a HCV entry factor (Scarselli et al., 2002; Bartosch et al., 2003), binds high-density lipoproteins with high affinity and mediates selective cellular uptake of cholesteryl esters (Acton et al., 1996). Yalaoui et al. reported that SR-BI is involved indirectly during *P. yoelii* sporozoite invasion, by regulating the levels of membrane cholesterol and the expression of CD81 and its localization in tetraspanin-enriched microdomains (Yalaoui et al., 2008a). In another study, Rodrigues et al. observed a reduction of *P. berghei* invasion of Huh-7 cells

upon SR-BI inhibition (Rodrigues *et al.*, 2008). Since CD81 is not required for *P. berghei* sporozoite entry into Huh-7 cells (Silvie *et al.*, 2007), these results suggested a CD81-independent role for SR-BI. More recently, Foquet *et al.* showed that anti-CD81 but not anti-SR-BI antibodies inhibit *P. falciparum* sporozoite infection in humanized mice engrafted with human hepatocytes (Foquet *et al.*, 2015), questioning the role of SR-BI during *P. falciparum* infection.

These conflicting results prompted us to revisit the contribution of SR-BI during *P. falciparum*, *P. yoelii* and *P. berghei* sporozoite infections. For the first time, we also explored the role of CD81 and SR-BI during hepatocyte infection by *P. vivax*, a widely distributed yet highly neglected cause of malaria in humans, for which the contribution of hepatocyte surface receptors has not been investigated to date.

Here, we show that SR-BI is an important entry factor for *P. vivax* but not for *P. falciparum* or *P. yoelii* sporozoites. Remarkably, SR-BI and CD81 fulfil redundant functions during host cell invasion by *P. berghei* sporozoites, which can use one or the other molecule. We further investigated parasite determinants associated with host cell receptor usage. We show that genetic depletion of P52 and P36, two members of the *Plasmodium* 6-cysteine domain protein family, abrogates sporozoite productive invasion and mimics the inhibition of CD81 and/or SR-BI entry pathways, in both *P. berghei* and *P. yoelii*. Finally, we identify P36 as the molecular driver of *P. berghei* sporozoite entry via SR-BI. Our data, by revealing a functional link between parasite and host cell entry factors, pave the way towards the identification of ligand-receptor interactions mediating *Plasmodium* infection of hepatocytes, and open novel perspectives for preventive and therapeutic approaches.

Results

Antibodies against SR-BI inhibit *P. vivax* but not *P. falciparum* or *P. yoelii* sporozoite infection

To evaluate the contribution of CD81 and SR-BI during *P. vivax* infection, we tested the effects of neutralizing CD81- and/or SR-BI- specific antibodies on *P. vivax* sporozoite infection in primary human hepatocyte cultures (Mazier *et al.*, 1984). A monoclonal antibody (mAb) against the main extracellular domain of CD81, previously shown to inhibit *P. falciparum* sporozoite infection (Silvie *et al.*, 2003), had no effect on the number of *P. vivax*-infected cells in vitro (Figure 1A). In sharp contrast, a mouse mAb specific for SR-BI (Zahid *et al.*, 2013) greatly reduced infection, with no additive effect of anti-CD81 antibodies (Figure 1A). The same inhibitory effect was observed using polyclonal anti-SR-BI antibodies (Figure 1B). We performed the same experiments with *P. falciparum* sporozoites and found that anti-CD81 but not anti-SR-BI antibodies inhibit *P. falciparum* infection in vitro (Figure 1C), in agreement with the in vivo data from Foquet *et al.* (Foquet *et al.*, 2015). These data strongly suggest that *P. vivax* and *P. falciparum* sporozoites use distinct entry pathways to infect hepatocytes, reminiscent of the differences between *P. berghei* and *P. yoelii* (Silvie *et al.*, 2003).

Two distinct populations of *P. vivax* exo-erythrocytic forms (EEFs) could be distinguished in the infected cultures, large EEFs representing replicating schizonts, and small EEFs that may correspond to hypnozoites (Dembele *et al.*, 2011) (Figure 1D). Anti-SR-BI antibodies reduced the numbers of large and small EEFs to the same extent (Figure 1E), suggesting an effect on sporozoite invasion rather than on parasite intracellular development.

SR-BI is required for productive invasion of CD81-null cells by *P. berghei* sporozoites

In order to investigate in more details the role of SR-BI during sporozoite entry, we used the more tractable rodent malaria parasite *P. berghei*. Indeed, *P. berghei* sporozoites readily infect HepG2 cells, which lack CD81 (Charrin *et al.*, 2001; Berditchevski *et al.*, 1996) but express high levels of SR-BI (Figure 2—figure supplement 1), raising the possibility that this rodent parasite uses a SR-BI route to infect CD81-null cells. To test this hypothesis, *P. berghei* sporozoites constitutively expressing GFP (PbGFP) (Manzoni *et al.*, 2014) were incubated with HepG2 cells in the presence of increasing concentrations of polyclonal anti-SR-BI rabbit antibodies. We observed a dramatic and dose-dependent reduction of the number of EEF-infected cells induced by anti-SR-BI antibodies (Figure 2A). Quantification of host cell invasion by FACS demonstrated that the rabbit anti-SR-BI

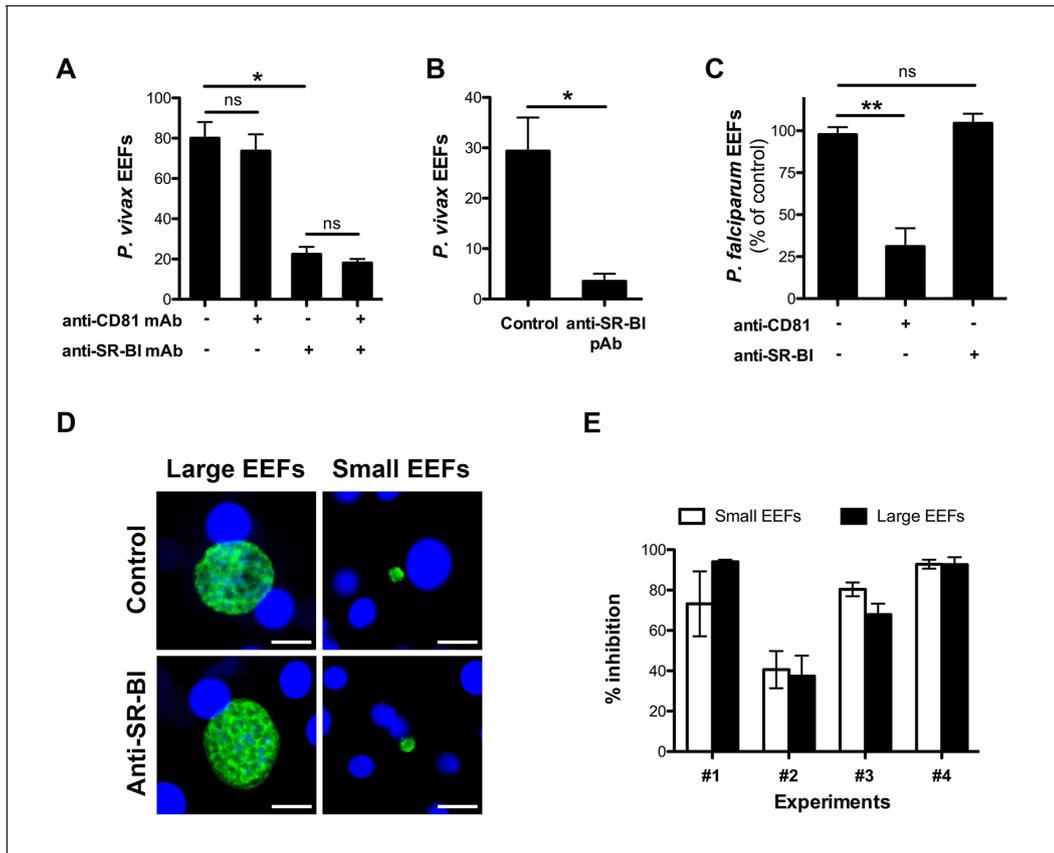


Figure 1. Anti-SR-BI antibodies inhibit *P. vivax* but not *P. falciparum* sporozoite infection. (A) Primary human hepatocyte cultures were incubated with *P. vivax* sporozoites in the presence of anti-CD81 and/or anti-SR-BI mAbs at 20 $\mu\text{g/ml}$, and the number of EEF-infected cells was determined 5 days post-infection after labeling of the parasites with anti-HSP70 antibodies. (B) Primary human hepatocytes were incubated with *P. vivax* sporozoites in the presence or absence of anti-SR-BI polyclonal rabbit serum (diluted 1/100), and the number of EEFs was determined at day 5 by immunofluorescence. (C) Primary human hepatocyte cultures were incubated with *P. falciparum* sporozoites in the presence of anti-CD81 mAb (20 $\mu\text{g/ml}$) and/or anti-SR-BI polyclonal rabbit serum (diluted 1/100), and the number of EEF-infected cells was determined 5 days post-infection after labeling of the parasites with anti-HSP70 antibodies. Results from three independent experiments are shown and expressed as the percentage of control (mean \pm SD). (D) Immunofluorescence analysis of *P. vivax* EEFs at day 5 post-infection of primary human hepatocytes. Parasites were labeled with anti-HSP70 antibodies (green), and nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Large EEFs and small EEFs were observed in both control and anti-SR-BI antibody-treated cultures. Scale bars, 10 μm . (E) Inhibitory activity of anti-SR-BI antibodies on small EEFs (white histograms) and large EEFs (black histograms). The results from four independent experiments are shown, and are expressed as the percentage of inhibition observed with anti-SR-BI antibodies as compared to the control.

DOI: 10.7554/eLife.25903.003

antibodies block infection at the invasion step (Figure 2B). Similar results were obtained with polyclonal rat antibodies and a mouse mAb directed against human SR-BI (Figure 2—figure supplement 2).

As a complementary approach, we used small interfering RNA (siRNA) to specifically knockdown SR-BI expression in HepG2 cells (Figure 2D). SR-BI silencing caused a dramatic reduction of the number of EEF-infected cells (Figure 2E), but had no significant effect on the intracellular development of the few invaded parasites (Figure 2F). *Plasmodium* sporozoites migrate through several cells before invading a final one inside a PV (Mota et al., 2001). Sporozoite cell traversal was increased in SR-BI-depleted HepG2 cells, as compared to the control (Figure 2—figure supplement 3). This is likely due to the robust cell traversal activity of *P. berghei* sporozoites, which continue to migrate through cells when productive invasion is impaired. Altogether, these data establish that SR-BI is a major entry factor for *P. berghei* sporozoites in CD81-null HepG2 cells.

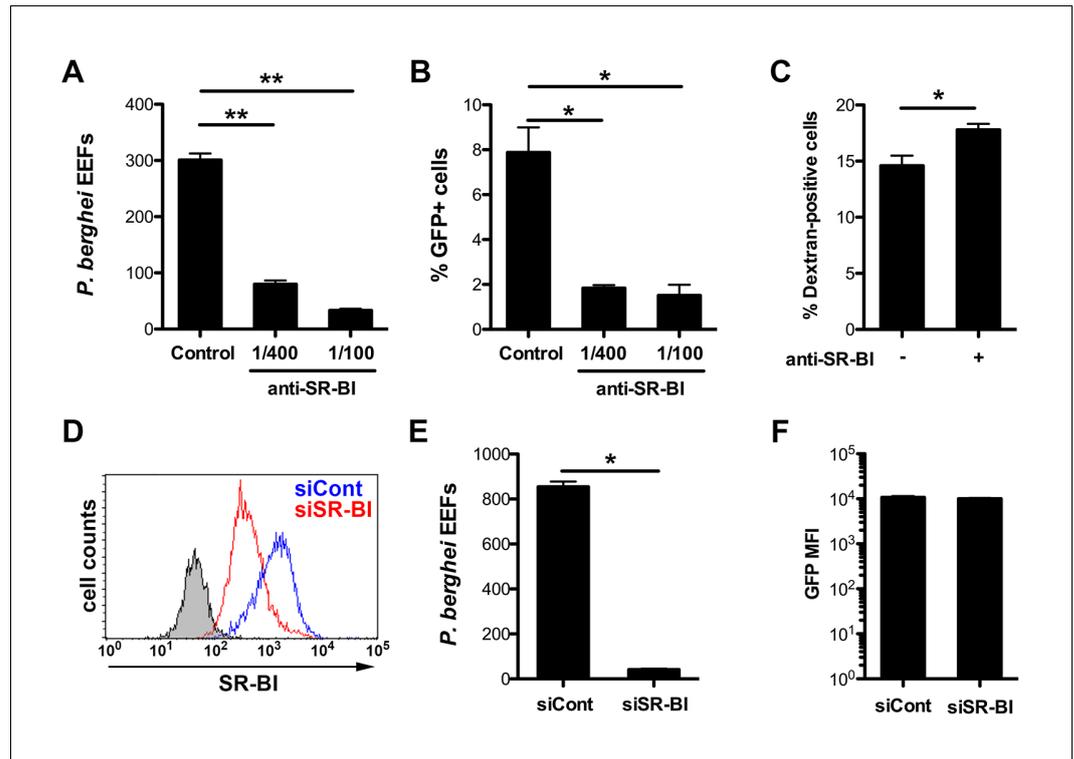


Figure 2. Infection of human HepG2 cells by *P. berghei* sporozoites depends on SR-BI. (A) HepG2 cells were incubated with *P. berghei* sporozoites for 3 hr in the absence (Control) or presence of increasing concentrations of rabbit polyclonal SR-BI antisera. Infected cultures were further incubated for 24 hr before quantification of EEFS-infected cells by fluorescence microscopy. (B) HepG2 cell cultures were infected with PbGFP sporozoites as in A, and the number of invaded cells (GFP+) was quantified by FACS 3 hr post-infection. (C) HepG2 cells were incubated for 3 hr with PbGFP sporozoites and rhodamine-labeled dextran, in the presence or absence of anti-SR-BI antibodies. The percentage of traversed (dextran-positive) cells was then determined by FACS. (D) HepG2 cells transfected with siRNA oligonucleotides targeting SR-BI (siSR-BI, red histogram) or with a control siRNA (siCont, blue histogram) were stained with anti-SR-BI antibodies and analyzed by flow cytometry. The negative staining control is in grey. (E) *P. berghei* EEF number in HepG2 cells transfected with siRNA oligonucleotides targeting SR-BI (siSR-BI) or a control siRNA (siCont). (F) HepG2 cells transfected with siRNA oligonucleotides targeting SR-BI (siSR-BI) or a control siRNA (siCont) were infected with PbGFP sporozoites and incubated for 24 hr, before measurement of the mean fluorescence intensity (GFP MFI) of infected (GFP-positive) cells by FACS.

DOI: [10.7554/eLife.25903.004](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.004)

The following figure supplements are available for figure 2:

Figure supplement 1. CD81 and SR-BI surface expression in HepG2 and HepG2/CD81 cells.

DOI: [10.7554/eLife.25903.005](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.005)

Figure supplement 2. Anti-SR-BI antibodies neutralize *P. berghei* infection of HepG2 cells.

DOI: [10.7554/eLife.25903.006](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.006)

Figure supplement 3. Effect of SR-BI silencing on sporozoite cell traversal and invasion.

DOI: [10.7554/eLife.25903.007](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.007)

CD81 and SR-BI play redundant roles during *P. berghei* sporozoite invasion

We next tested whether the presence of CD81 would affect SR-BI function during *P. berghei* sporozoite infection. We monitored invasion and replication of *P. berghei* sporozoites in HepG2 cells genetically engineered to express CD81 (HepG2/CD81) (Figure 2—figure supplement 1) (Silvie et al., 2006a), in the presence of anti-SR-BI and/or anti-CD81 antibodies. Strikingly, unlike in CD81-null HepG2 cells, anti-SR-BI antibodies had no inhibitory effect on *P. berghei* infection in

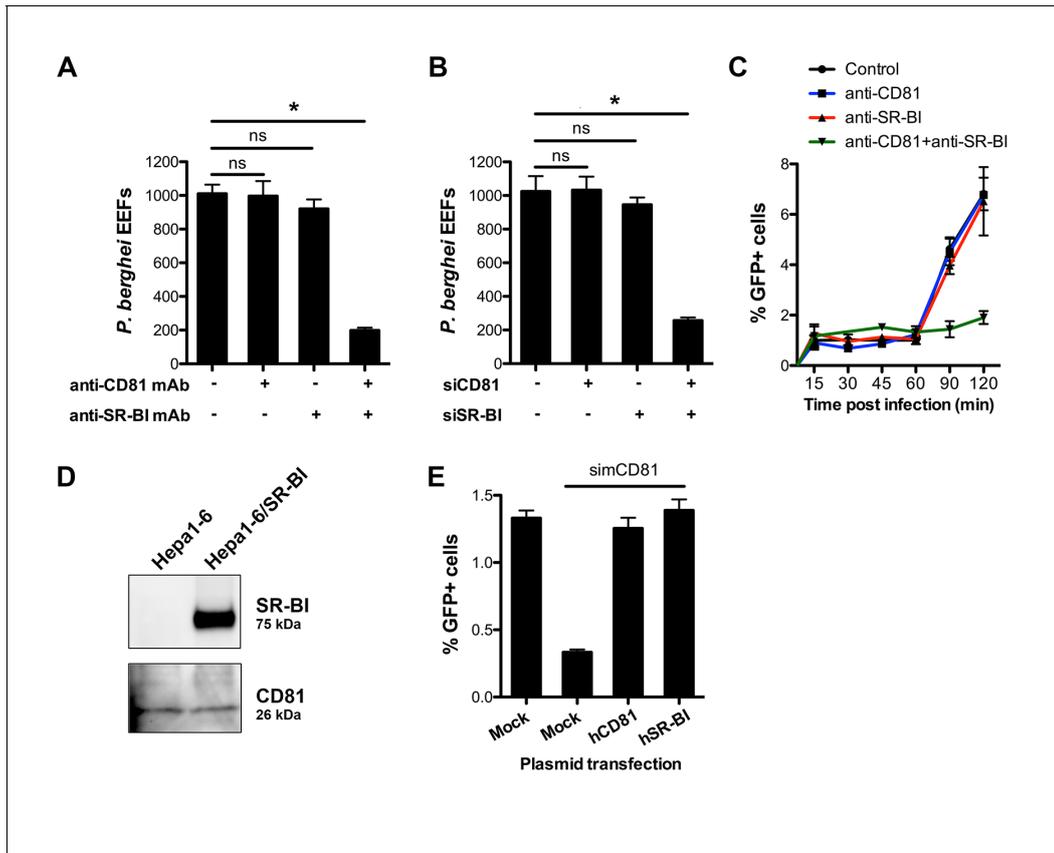


Figure 3. CD81 and SR-BI define alternative entry routes for *P. berghei* sporozoites. (A) HepG2/CD81 cells were incubated with *P. berghei* sporozoites in the presence or absence of anti-human CD81 and/or SR-BI mAbs, and the number of EEFs-infected cells was determined by fluorescence microscopy 24 hr post-infection. (B) *P. berghei* EEF numbers in HepG2/CD81 cells transfected with siRNA oligonucleotides targeting CD81 (siCD81) and/or SR-BI (siSR-BI). (C) HepG2/CD81 cells were incubated with PbGFP sporozoites for 15–120 min, in the presence or absence of anti-CD81 and/or anti-SR-BI antibodies, then trypsinized and directly analyzed by FACS to quantify invaded (GFP-positive) cells. (D) Protein extracts from Hepa1-6 cells and Hepa1-6 cells transiently transfected with a human SR-BI expression plasmid were analyzed by Western blot using antibodies recognizing mouse and human SR-BI (Abcam) or mouse CD81 (MT81). (E) Hepa1-6 cells were transfected first with siRNA oligonucleotides targeting endogenous mouse CD81 (simCD81), then with plasmids encoding human CD81 (hCD81) or SR-BI (hSR-BI). Cells were then incubated with PbGFP sporozoites, and the number of infected (GFP-positive) cells was determined 24 hr post-infection by FACS.

DOI: [10.7554/eLife.25903.008](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.008)

The following figure supplement is available for figure 3:

Figure supplement 1. Effect of anti-CD81 and anti-SR-BI antibodies on *P. berghei* sporozoite cell traversal and intracellular development.

DOI: [10.7554/eLife.25903.009](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.009)

HepG2/CD81 cells (Figure 3A). Remarkably, whilst neither anti-SR-BI nor anti-CD81 antibodies alone had any significant impact on invasion (Figure 3A) or parasite intracellular development (Figure 3—figure supplement 1), the combination of CD81 and SR-BI antibodies markedly reduced the number of infected cells (Figure 3A). Similarly, siRNA-mediated silencing of either CD81 or SR-BI alone had no effect on infection, whereas simultaneous silencing of both factors greatly reduced infection (Figure 3B).

Blocking both CD81 and SR-BI was associated with an increase in cell traversal activity (Figure 3—figure supplement 1), suggesting that the concomitant neutralization of the two host factors prevented commitment to productive invasion. To directly test this hypothesis, we analysed the invasion kinetics of PbGFP sporozoites in HepG2/CD81 cells, in the presence of anti-SR-BI and/or anti-CD81 neutralizing antibodies. We have shown that in vitro sporozoite invasion follows a two-step kinetics (Risco-Castillo et al., 2015), with initially low invasion rates at early time points, reflecting cell

traversal activity, followed by a second phase of productive invasion associated with PV formation. In HepG2/CD81 cells, the invasion kinetics of *P. berghei* sporozoites in the presence of anti-SR-BI or anti-CD81 specific antibodies were comparable to those of the control without antibody (Figure 3C). In sharp contrast, blocking both CD81 and SR-BI simultaneously suppressed the second phase of productive invasion (Figure 3C). Based on these results, we conclude that SR-BI and CD81 are involved in the commitment to productive entry.

P. berghei sporozoites infect mouse hepatocytic Hepa1-6 cells via a CD81-dependent pathway, as shown by efficient inhibition of infection by CD81 specific antibodies or siRNA (Silvie et al., 2007). Interestingly, we failed to detect SR-BI in Hepa1-6 cells (Figure 3D), providing a plausible explanation as to why CD81 is required for *P. berghei* infection in this model. We tested whether ectopic expression of SR-BI would rescue *P. berghei* infection of Hepa1-6 cells upon silencing of endogenous murine CD81 by siRNA. CD81-silenced Hepa1-6 cells were transiently transfected with plasmids encoding human SR-BI or CD81, before exposure to *P. berghei* sporozoites. The number of infected cells was greatly reduced in CD81-silenced cells as compared to control non-silenced cells (Figure 3E), in agreement with our previous observations (Silvie et al., 2007). Remarkably, transfection of either human CD81 or human SR-BI was sufficient to rescue infection in CD81-silenced cells (Figure 3E), demonstrating that the two receptors can independently perform the same function to support *P. berghei* infection. Collectively, our data provide direct evidence that CD81 and SR-BI play redundant roles during productive invasion of hepatocytic cells by *P. berghei* sporozoites.

P. yoelii sporozoites require host CD81 but not SR-BI for infection

We next investigated the contribution of SR-BI to *P. yoelii* sporozoite infection in HepG2/CD81 cells. *P. yoelii* infection was dramatically reduced by anti-CD81 antibodies, consistent with our previous work (Silvie et al., 2006a), but strikingly was not affected by anti-SR-BI antibodies (Figure 4A). In addition, *P. yoelii* infection was not affected by siRNA-mediated silencing of SR-BI, but was almost abolished upon knockdown of CD81 (Figure 4B). These results indicate that CD81 but not SR-BI plays a central role during *P. yoelii* sporozoite invasion in HepG2/CD81 cells, similarly to *P. falciparum* in human hepatocytes.

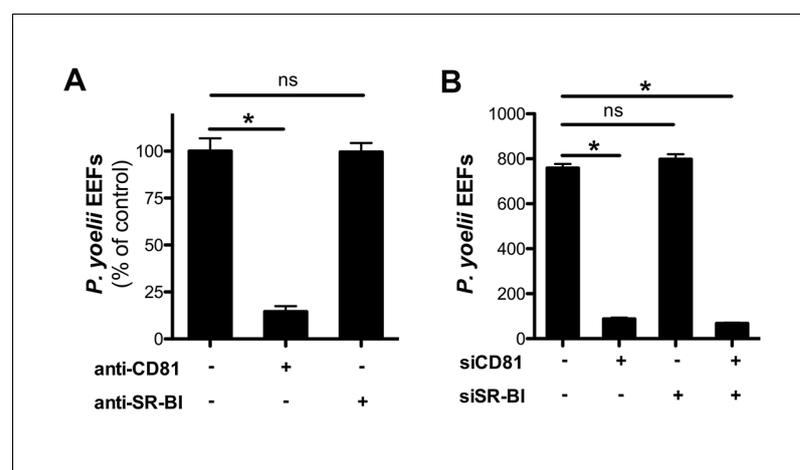


Figure 4. Infection of HepG2/CD81 cells by *P. yoelii* sporozoites depends on CD81 but not SR-BI. (A) HepG2/CD81 cells were incubated with *P. yoelii* sporozoites in the presence of anti-CD81 mAb (20 μ g/ml) or anti-SR-BI polyclonal rabbit serum (diluted 1/100), and the number of EEF-infected cells was determined 24 hr post-infection by fluorescence microscopy. Results from three independent experiments are shown and expressed as the percentage of control (mean \pm SD). (B) *P. yoelii* EEF numbers in HepG2/CD81 cells transfected with siRNA oligonucleotides targeting CD81 (siCD81) and/or SR-BI (siSR-BI).

DOI: [10.7554/eLife.25903.010](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.010)

The 6-cysteine domain proteins P52 and P36 are required for sporozoite productive invasion irrespective of the host cell entry pathway

The data above show that *P. berghei* sporozoites can use either CD81 or SR-BI to infect hepatocytic cells, whereas *P. yoelii* utilizes CD81 but not SR-BI, suggesting that one or several *P. berghei* factors may be specifically associated with SR-BI usage. Among potential candidate parasite factors involved in sporozoite entry, we focused on the 6-cysteine domain proteins P52 and P36, two micronemal proteins of unknown function previously implicated during liver infection (van Dijk et al., 2005; Ishino et al., 2005; van Schaijk et al., 2008; Kaushansky et al., 2015; Labaied et al., 2007; VanBuskirk et al., 2009; Mikolajczak et al., 2014). To facilitate monitoring of the role of P52 and P36 during host cell invasion, we used a Gene Out Marker Out (GOMO) strategy (Manzoni et al., 2014) to generate highly fluorescent *p52/p36*-knockout parasite lines in *P. berghei* (Figure 5—figure supplement 1) and *P. yoelii* (Figure 5—figure supplement 2). Pure populations of GFP-expressing, drug selectable marker-free *PbΔp52/p36* and *PyΔp52/p36* blood stage parasites were obtained and transmitted to mosquitoes in order to produce sporozoites.

Analysis of the kinetics of *PbΔp52/p36* sporozoite invasion by FACS, in comparison to control *PbGFP* sporozoites, revealed that genetic ablation of *p52/p36* abrogates sporozoite productive invasion of HepG2 (SR-BI-dependent entry pathway) and Hepa1-6 cells (CD81-dependent entry pathway) (Figure 5A and B). *PbΔp52/p36* sporozoite invasion followed similar kinetics to those observed for *PbGFP* sporozoites upon blockage of SR-BI or CD81, respectively, and was not modified by addition of anti-SRBI or anti-CD81 antibodies. Using antibodies specific for UIS4, a marker of the PV membrane (PVM) that specifically labels productive vacuoles (Risco-Castillo et al., 2015; Mueller et al., 2005), we confirmed that *PbGFP* but not *PbΔp52/p36* parasites could form replicative PVs, in both HepG2 and HepG2/CD81 cells (Figure 5C). In both cell types, only very low numbers of EEFs were observed with *PbΔp52/p36* parasites (Figure 5D), all of which were seemingly intranuclear and lacked a UIS4-labeled PVM (Figure 5E). We have shown before that intranuclear EEFs result from cell traversal events (Silvie et al., 2006a). Altogether these data demonstrate that *PbΔp52/p36* sporozoites fail to productively invade host cells, irrespective of the entry route. Similar results were obtained with a *P. berghei* *Δp36* single knockout line using the GOMO strategy (Figure 5—figure supplement 3). *PbΔp36* sporozoites did not invade HepG2 cells or HepG2/CD81 cells, reproducing a similar phenotype as *PbGFP* parasites in the presence of anti-CD81 and anti-SR-BI neutralizing antibodies (Figure 5—figure supplement 4).

We then examined the kinetics of *P. yoelii* *Δp52/p36* sporozoite invasion, in comparison to those of *PyGFP* sporozoites, in HepG2/CD81 versus HepG2 cells. *PyΔp52/p36* sporozoites showed a lack of productive invasion in HepG2/CD81 cells, reproducing the invasion kinetics of *PyGFP* in the CD81-null HepG2 cells (Figure 5F). The *PyΔp52/p36* mutant failed to form PV in HepG2/CD81 cells (Figure 5G), where only intranuclear EEFs lacking a UIS4-labeled PVM were observed, similarly to the control *PyGFP* parasites in HepG2 cells (Figure 5H and I).

Altogether, these results reveal that P52 and P36 are required for sporozoite productive invasion, in both *P. berghei* and *P. yoelii*, irrespective of the entry route.

P36 is a key determinant of host cell receptor usage during sporozoite invasion

We further sought to investigate whether P52 and/or P36 proteins contribute to the selective usage of host cell receptors by different sporozoite species. We designed a trans-species genetic complementation strategy in which copies of *P. berghei* (Pb), *P. yoelii* (Py), *P. falciparum* (Pf) or *P. vivax* (Pv) P52 and P36 were introduced in the *Δp52/p36* parasites. For this purpose, we used centromeric plasmid constructs for stable expression of the transgenes from episomes (Iwanaga et al., 2010). Complementation of *PbΔp52/p36* sporozoites with *PbP52* and *PbP36* restored sporozoite infectivity to both HepG2 and HepG2/CD81 cells (Figure 6A), where the parasite formed UIS4-positive vacuoles (Figure 6B, C and D), confirming that genetic complementation was efficient. Remarkably, complementation of *PbΔp52/p36* with *PyP52* and *PyP36* restored infection in HepG2/CD81 but not in HepG2 cells (Figure 6A), where only low numbers of UIS4-negative intranuclear EEFs were observed (Figure 6B and D). Thus, the concomitant replacement of *PbP52* and *PbP36* by their *P. yoelii* counterparts reproduced a *P. yoelii*-like invasion phenotype in chimeric *P. berghei* sporozoites, indicating

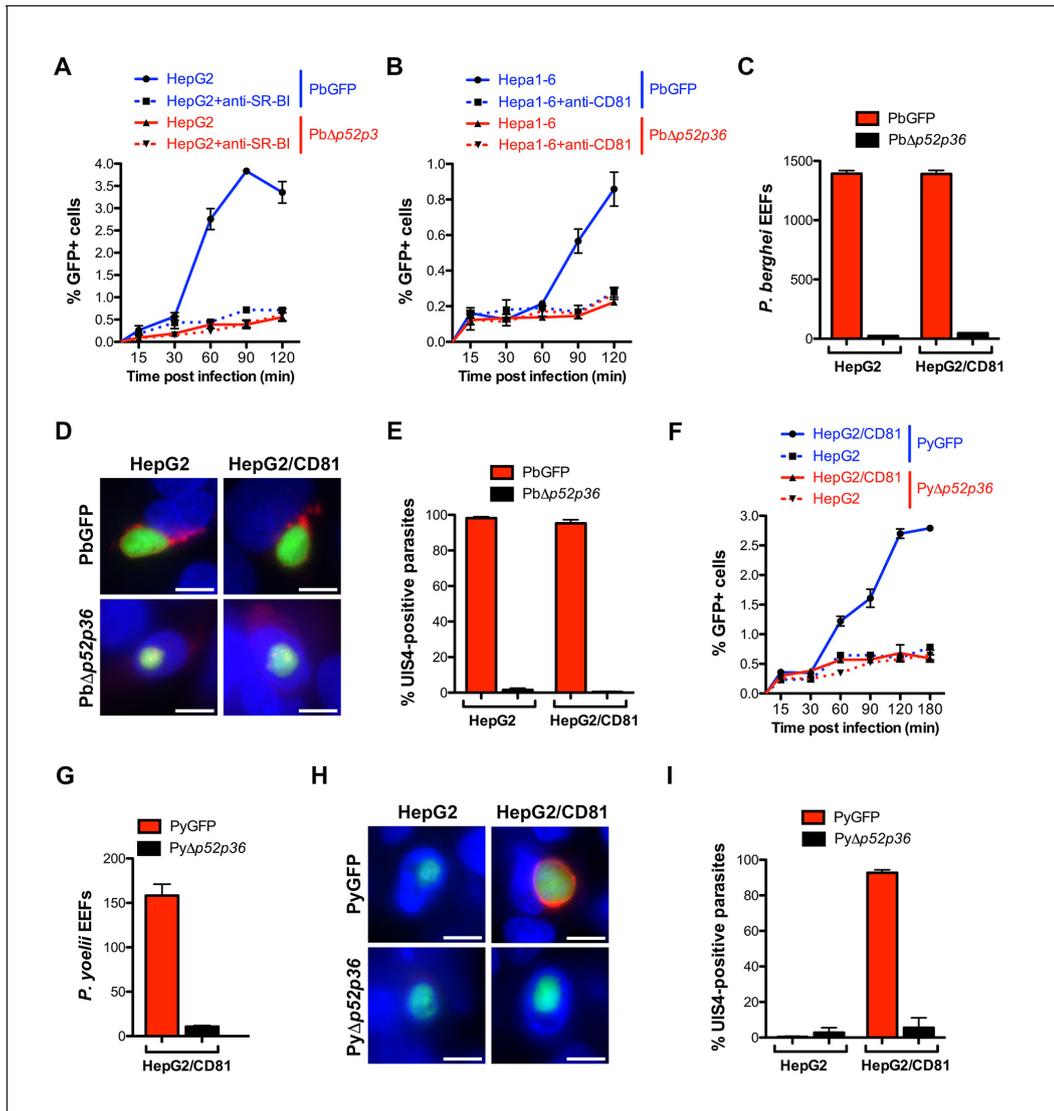


Figure 5. The 6-cys proteins P52 and P36 are required for productive host cell invasion. (A–B) HepG2 (A) or Hepa1-6 cells (B) were incubated with PbGFP (blue lines) or PbΔp52/p36 sporozoites (red lines) for 15–120 min, in the presence (dotted lines) or absence (solid lines) of anti-SR-BI (A) or anti-CD81 (B) antibodies. Cells were then trypsinized and directly analyzed by FACS to quantify invaded (GFP-positive) cells. (C) HepG2 and HepG2/CD81 cells were infected with PbGFP or PbΔp52/p36 sporozoites and the number of EEFs was determined 28 hr post-infection by fluorescence microscopy. (D) HepG2 and HepG2/CD81 cells infected with PbGFP or PbΔp52/p36 sporozoites were fixed at 28 hr post-infection, stained with anti-UIS4 antibodies (red) and the nuclear stain Hoechst 33342 (blue), and examined by fluorescence microscopy. Parasites were detected based on GFP expression (green). Scale bars, 10 μm. (E) Quantification of UIS4 expression in HepG2 and HepG2/CD81 cells infected with PbGFP (red) or PbΔp52/p36 (black). (F) HepG2 (dotted lines) and HepG2/CD81 cells (solid lines) were incubated with PyGFP (blue lines) or PyΔp52/p36 sporozoites (red lines) for 15–180 min, trypsinized, and directly analyzed by FACS to quantify invaded (GFP-positive) cells. (G) HepG2/CD81 cells were infected with PyGFP or PyΔp52/p36 sporozoites and the number of EEFs was determined 24 hr post-infection by fluorescence microscopy. (H) HepG2 and HepG2/CD81 cells infected with PyGFP or PyΔp52/p36 sporozoites were fixed at 24 hr post-infection, stained with anti-UIS4 antibodies (red) and the nuclear stain Hoechst 33342 (blue), and examined by fluorescence microscopy. Parasites were detected based on GFP expression (green). Scale bars, 10 μm. (I) Quantification of UIS4 expression in HepG2 and HepG2/CD81 cells infected with PyGFP (red) or PyΔp52/p36 (black).

DOI: [10.7554/eLife.25903.011](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.011)

The following figure supplements are available for figure 5:

Figure supplement 1. Targeted gene deletion of p52 and p36 in *P. berghei*.

DOI: [10.7554/eLife.25903.012](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.012)

Figure supplement 2. Targeted gene deletion of p52 and p36 in *P. yoelii*.

DOI: [10.7554/eLife.25903.013](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.013)

Figure 5 continued on next page

Figure 5 continued

Figure supplement 3. Targeted gene deletion of *p36* in *P. berghei*.

DOI: [10.7554/eLife.25903.014](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.014)

Figure supplement 4. P36 is required for *P. berghei* sporozoite entry via both SR-BI- and CD81-dependent routes.

DOI: [10.7554/eLife.25903.015](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.015)

that P52 and/or P36 contribute to the selective usage of a CD81-independent entry pathway in *P. berghei* sporozoites. Complementation of *PbΔp52/p36* parasites with either *P. falciparum* or *P. vivax* P52 and P36 coding sequences did not restore infectivity of transgenic sporozoites, not only in HepG2 and HepG2/CD81 cells (**Figure 6—figure supplement 1A**), but also in primary human hepatocytes, the most permissive cellular system for human malaria sporozoites in vitro (**Figure 6—figure supplement 1B**). Hence it was not possible using this approach to assess the function of *P. falciparum* or *P. vivax* P52 and P36 in transgenic *P. berghei* sporozoites.

We next dissected the individual contribution of P52 and P36 by complementing *PbΔp52/p36* parasites with mixed combinations of either PyP52 and PbP36 or PbP52 and PyP36. This approach revealed that P36 determines the ability of *P. berghei* sporozoites to enter cells via a CD81-independent route. Indeed, *PbΔp52/p36* complemented with PyP52 and PbP36 infected both HepG2/CD81 and HepG2 cells (**Figure 6A**), forming UIS4-labeled PVs in both cell types (**Figure 6B, C and D**). P52 therefore is not responsible for the phenotypic difference between *P. berghei* and *P. yoelii*. In sharp contrast, complementation of *PbΔp52/p36* with PbP52 and PyP36 restored sporozoite infectivity to HepG2/CD81 but not HepG2 cells, thus reproducing a *P. yoelii*-like invasion phenotype (**Figure 6A, B and D**).

In reciprocal experiments, we analysed whether expression of PbP36 would be sufficient to allow *P. yoelii* sporozoites to invade CD81-null cells. For this purpose, we performed genetic complementation experiments in *PyΔp52/p36* parasites, using the same constructs employed with the *P. berghei* mutant. Strikingly, whilst HepG2 cells are normally refractory to *P. yoelii* productive invasion, complementation with *P. berghei* P52 and P36 protein was sufficient to confer chimeric *P. yoelii* mutants the capacity to infect HepG2 cells (**Figure 7A**). Most importantly, *PyΔp52/p36* parasites complemented with PyP52 and PbP36 infected both HepG2 and HepG2/CD81 cells (**Figure 7A**). In particular, *PyΔp52/p36* parasites expressing PbP36 became capable of forming UIS4-positive PVs in HepG2 cells (**Figure 7B**). Thus, the transgenic expression of PbP36 appears to be sufficient to recapitulate a *P. berghei*-like invasion phenotype in *P. yoelii* sporozoites. In contrast, complementation of *PyΔp52/p36* parasites with PbP52 and PyP36 restored sporozoite infectivity in HepG2/CD81 cells only, but not in HepG2 cells (**Figure 7A and B**). This confirms that P52, although essential for sporozoite entry, is not directly associated with host receptor usage. Finally, invasion of PbP36-expressing *PyΔp52/p36* sporozoites was abrogated by anti-SR-BI antibodies in HepG2 cells (**Figure 7C**), demonstrating that *P. berghei* P36 is a key determinant of CD81-independent entry via SR-BI.

Discussion

Until now, the nature of the molecular interactions mediating *Plasmodium* sporozoite invasion of hepatocytes has remained elusive. Previous studies have identified CD81 and SR-BI as important host factors for infection of hepatocytes (*Silvie et al., 2003; Yalaoui et al., 2008a; Rodrigues et al., 2008*). Still, the relation between CD81 and SR-BI and their contribution to parasite entry was unclear (*Silvie et al., 2007; Foquet et al., 2015*), and, importantly, parasite factors associated with CD81 or SR-BI usage had not been identified. Here we demonstrate that CD81 and SR-BI define independent entry pathways for sporozoites, and identify the parasite protein P36 as a critical parasite factor that determines host receptor usage during hepatocyte infection.

Our data provide molecular insights into the host entry pathways used by different sporozoite species (**Figure 8A**). We show that *P. falciparum*, like *P. yoelii*, relies on CD81 but not SR-BI, in agreement with the recent observation that antibodies against CD81 but not anti-SR-BI induce protection in humanized mice infected with *P. falciparum* (*Foquet et al., 2015*). Our results are also consistent with the study from Yalaoui *et al.* showing that in primary mouse hepatocytes antibodies against SR-BI do not inhibit *P. yoelii* infection when co-incubated together with sporozoites (*Yalaoui et al., 2008a*). In the same study, the authors proposed a model where SR-BI indirectly

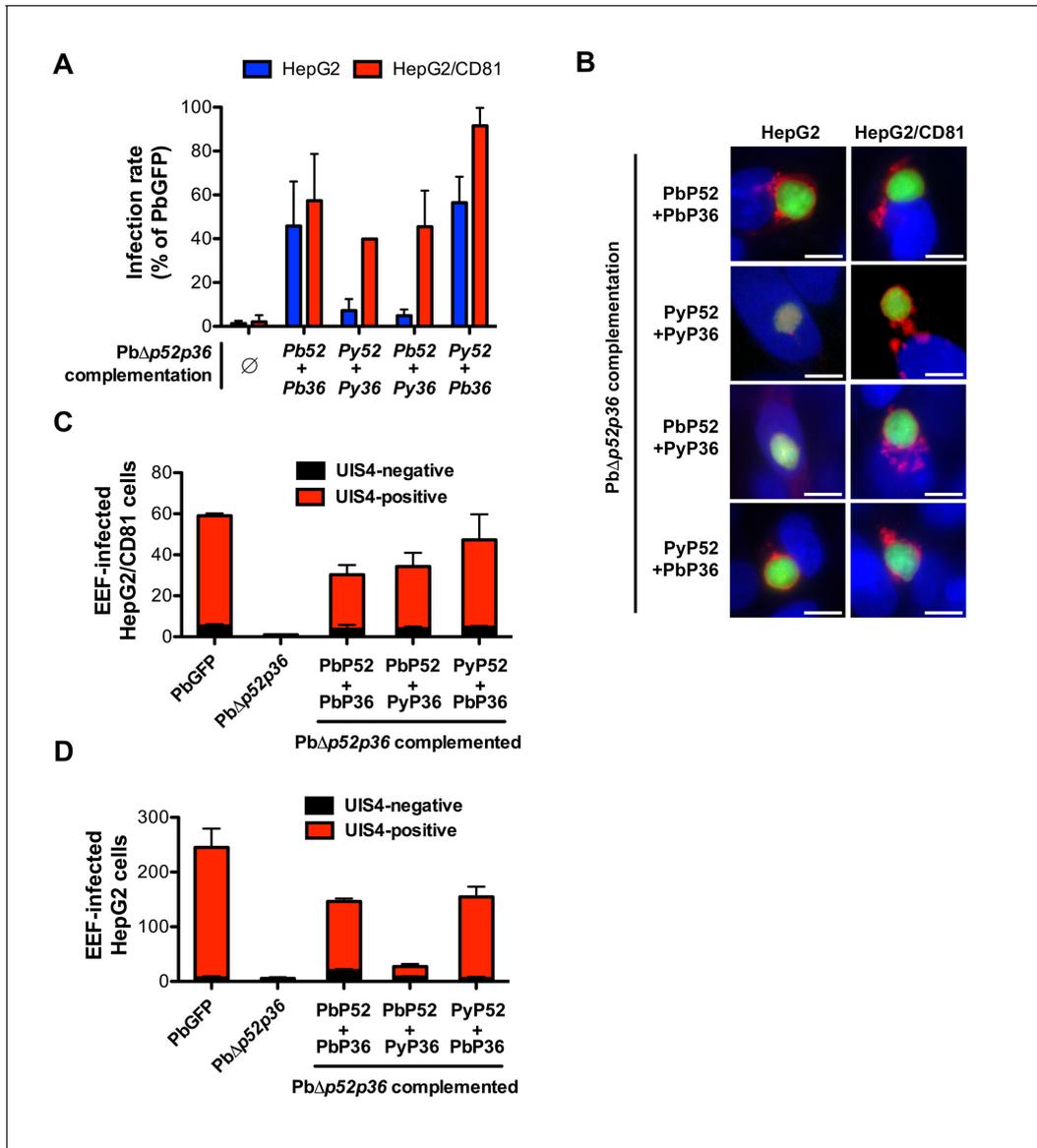


Figure 6. P36 mediates CD81-independent entry in *P. berghei* sporozoites. (A) HepG2 (blue histograms) or HepG2/CD81 cells (red histograms) were incubated with sporozoites from Pb Δ p52/p36 parasites genetically complemented with *P. berghei* and/or *P. yoelii* P52 and P36, and analysed by FACS or fluorescence microscopy to determine the number of GFP-positive cells 24 hr post-infection. Results from three independent experiments are shown and are expressed as the percentage of infection in comparison to control PbGFP-infected cultures (mean \pm SD). (B) Immunofluorescence analysis of UIS4 expression in HepG2 or HepG2/CD81 cells infected with genetically complemented Pb Δ p52/p36 sporozoites. Cells were fixed with PFA 28 hr post-infection, permeabilized, and stained with anti-UIS4 antibodies (red) and the nuclear stain Hoechst 33342 (blue). Parasites were detected based on GFP expression (green). Scale bars, 10 μ m. (C–D) HepG2/CD81 (C) and HepG2 (D) cells were infected with PbGFP, Pb Δ p52/p36 and complemented Pb Δ p52/p36 sporozoites. The numbers of UIS4-positive (red histograms) and UIS4-negative (black histograms) EEFs were determined by fluorescence microscopy 24 hr post-infection.

DOI: [10.7554/eLife.25903.016](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.016)

The following figure supplement is available for figure 6:

Figure supplement 1. Genetic complementation with p52 and p36 from *P. falciparum* or *P. vivax* does not restore sporozoite infectivity in Pb Δ p52/p36 parasites.

DOI: [10.7554/eLife.25903.017](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.017)

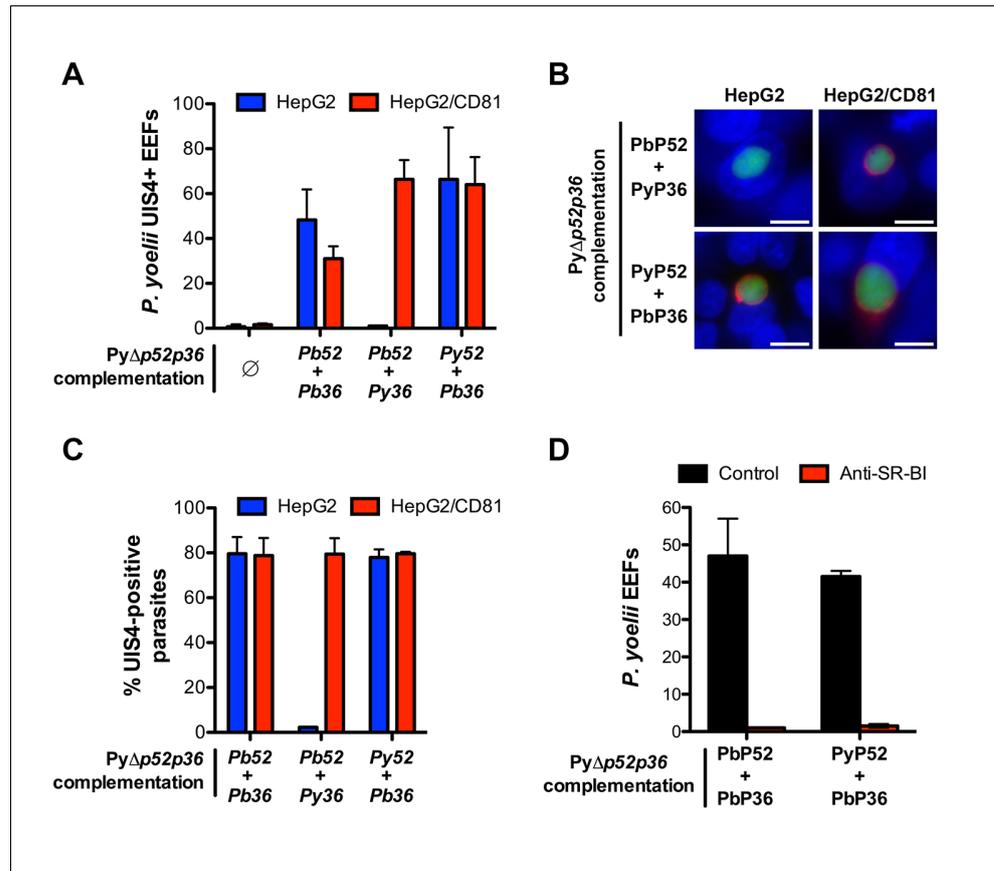


Figure 7. Transgenic *P. yoelii* sporozoites expressing *Pbp36* can infect CD81-null cells via SR-BI. (A) HepG2 (blue) and HepG2/CD81 cells (red) were incubated with genetically complemented $\text{Py}\Delta p52/p36$ sporozoites, and fixed 24 hr post-infection. The number of UIS4-positive vacuoles was then determined by immunofluorescence. (B) Immunofluorescence analysis of UIS4 expression in HepG2 or HepG2/CD81 cells infected with sporozoites of $\text{Py}\Delta p52/p36$ parasites genetically complemented with P52 and P36 from *P. berghei* or *P. yoelii*. Cells were fixed with PFA, permeabilized, and stained with anti-UIS4 antibodies (red) and the nuclear stain Hoechst 33342 (blue). Parasites were detected based on GFP expression (green). Scale bars, 10 μm . (C) Quantification of UIS4 expression in HepG2 (blue) and HepG2/CD81 cells (red) infected with genetically complemented $\text{Py}\Delta p52/p36$ sporozoites and processed as in B for immunofluorescence. (D) HepG2 cells were incubated with $\text{Py}\Delta p52/p36$ sporozoites complemented with *Pbp36* and either *Pbp52* or *PyP52*, in the presence or absence of anti-SR-BI antibodies. Infected cultures were fixed 24 hr post-infection, and the number of EEFs was then determined by fluorescence microscopy.

DOI: 10.7554/eLife.25903.018

contributes to *P. yoelii* infection through regulation of membrane cholesterol and CD81 expression, however our data in the HepG2/CD81 cell model with both *P. yoelii* and *P. berghei* clearly rule out a role of SR-BI during CD81-dependent sporozoite entry. For the first time, we also analysed the role of host factors during *P. vivax* sporozoite infection. We found that, in contrary to *P. falciparum*, antibodies against SR-BI but not against CD81 inhibit infection of primary human hepatocyte cultures by *P. vivax* sporozoites, illustrating that the two main species causing malaria in humans use distinct routes to infect hepatocytes.

SR-BI and CD81 both have been shown to bind the HCV envelope glycoprotein E2 (Pileri et al., 1998; Scarselli et al., 2002; Bartosch et al., 2003), and act in a sequential and cooperative manner to mediate virus entry (Kapadia et al., 2007), together with several additional entry factors (Colpitts and Baumert, 2016; Evans et al., 2007; Ploss et al., 2009). By contrast, as shown here, SR-BI and CD81 operate independently during *Plasmodium* sporozoite infection. Remarkably, *P. berghei* can use alternatively CD81 or SR-BI to infect cells, which is surprising given that CD81 and SR-

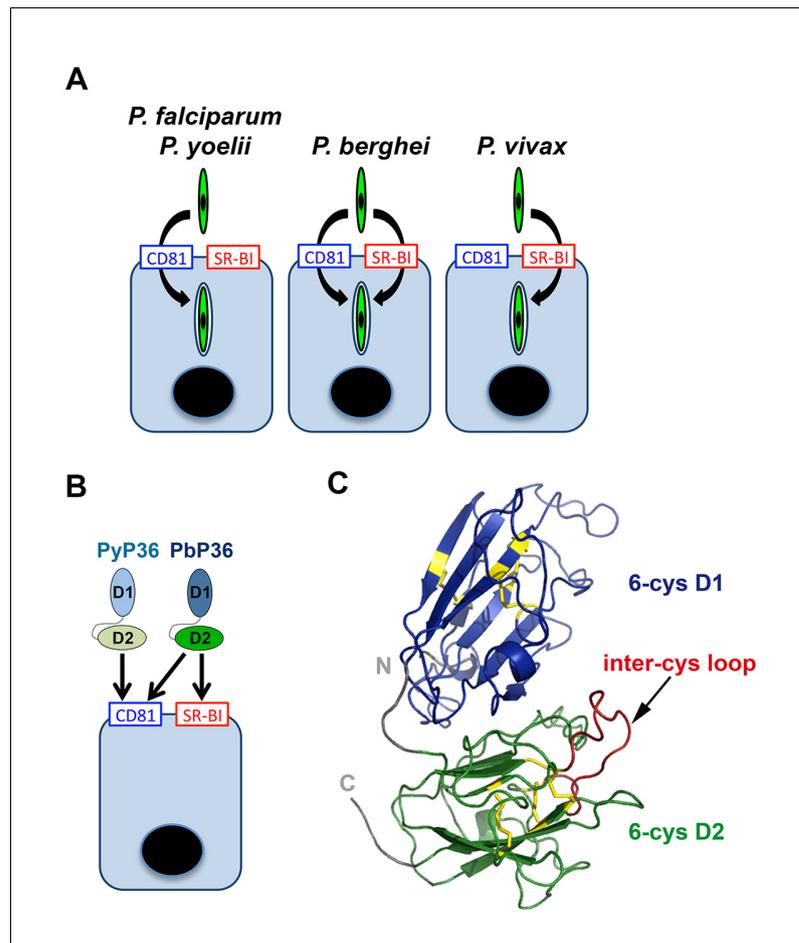


Figure 8. Model of host cell entry pathways for *Plasmodium* sporozoites. (A) Host cell membrane proteins CD81 and SR-BI define two independent entry routes for *Plasmodium* sporozoites. *P. falciparum* and *P. yoelii* sporozoites require CD81 for infection, whereas *P. vivax* sporozoites infect hepatocytes using SR-BI. *P. berghei* sporozoites can enter cells alternatively via CD81 or SR-BI. (B) The 6-cysteine domain protein P36 determines host cell receptor usage during *P. yoelii* and *P. berghei* sporozoite invasion. Whilst PyP36 supports only CD81-dependent sporozoite entry, PbP36 mediates sporozoite invasion through both CD81- and SR-BI-dependent pathways. (C) Model of the 3D structure of *P. berghei* P36, established based on the crystal structure of PfP12 (2YMO). In the ribbon diagram, the tandem 6-cysteine domains are shown in blue (D1) and green (D2), respectively, and the cysteine residues and disulphide bonds in yellow. The loop located between the third and fourth cysteine residues of the D2 domain (inter-cys loop) is indicated in red.

DOI: [10.7554/eLife.25903.019](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.019)

The following figure supplement is available for figure 8:

Figure supplement 1. P36 protein sequence analysis.

DOI: [10.7554/eLife.25903.020](https://doi.org/10.7554/eLife.25903.020)

BI are structurally unrelated. CD81 belongs to the family of tetraspanins, which are notably characterized by their propensity to dynamically interact with other membrane proteins and organize tetraspanin-enriched membrane microdomains (Charrin *et al.*, 2014). CD81 might play an indirect role during *Plasmodium* sporozoite entry, possibly by interacting with other host receptors within these microdomains (Silvie *et al.*, 2006b; Charrin *et al.*, 2009a, 2009b). Interestingly, SR-BI is structurally related to CD36 (Neculai *et al.*, 2013), which is known to bind several *Plasmodium* proteins, including *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) in the context of cytoadherence of infected erythrocytes to endothelial cells (Baruch *et al.*, 1996; Oquendo *et al.*, 1989; Barnwell *et al.*, 1989). CD36 was also reported to interact with *P. falciparum* sequestrin (also called

LISP2) (*Ockenhouse et al., 1991*), a member of the 6-cys protein family involved in parasite liver stage development (*Orito et al., 2013; Annoura et al., 2014*), and is a major determinant of *P. berghei* asexual blood stage sequestration (*Franke-Fayard et al., 2005*). CD36 was shown to be dispensable for mouse hepatocyte infection by *P. yoelii* and *P. berghei* sporozoites (*Sinnis and Febbraio, 2002*). However, it is conceivable that SR-BI, which shares a similar 3D structure as CD36 (*Neculai et al., 2013*), may interact with parasite proteins expressed by sporozoites, such as the 6-cys protein P36.

The 6-cys protein family is characterized by the presence of a cysteine-rich domain, the 6-cysteine (6-cys) or s48/45 domain. *Plasmodium* spp. possess a dozen 6-cys proteins, which perform important functions in different life cycle stages, and are often located on the parasite surface, consistent with a role in cellular interactions (*Annoura et al., 2014*). Previous studies have shown that *Plasmodium* P52 and P36 are crucial for infection of the liver by sporozoites (*van Dijk et al., 2005; Ishino et al., 2005; van Schaijk et al., 2008*), although it remained unclear whether their role was at the sporozoite entry step (*Ishino et al., 2005; Labaied et al., 2007*) or for maintenance of the PV post-entry (*van Dijk et al., 2005; VanBuskirk et al., 2009; Mikolajczak et al., 2014*). It should be noted that standard invasion assays, as performed in these studies, do not distinguish between sporozoite productive entry and non-productive invasion events associated with cell traversal, complicating the interpretation of phenotypic analysis of the mutants. Here, using GFP-expressing *p52* and *p36* mutants and a robust FACS-based invasion assay (*Risco-Castillo et al., 2015*), we unequivocally establish that *P. yoelii* and *P. berghei* sporozoites lacking P52 and P36 efficiently migrate through cells but do not commit to productive invasion, reproducing the phenotype observed upon blockage of CD81 or SR-BI.

Using a trans-species genetic complementation strategy, we identified P36 as a crucial parasite determinant of host receptor usage. Our data, combined with previous studies (*van Dijk et al., 2005; Ishino et al., 2005; van Schaijk et al., 2008; Kaushansky et al., 2015*), demonstrate that both P36 and P52 are necessary for sporozoite infection of hepatocytes, irrespective of the invasion route used by the parasite. Our study now reveals that P36 but not P52 is responsible for the phenotypic differences between *P. berghei* and *P. yoelii* sporozoites regarding host cell entry pathways. Importantly, *P. berghei* P36 mediates sporozoite entry via either CD81 or SR-BI, whereas *P. yoelii* P36 only supports CD81-dependent invasion (**Figure 8B**). These results strongly suggest that PbP36 contains specific structural determinants that confer the ability of the protein to interact with SR-BI or SR-BI-dependent molecules. *P. berghei* and *P. yoelii* P36 proteins share 88% identity and 97% similarity in their amino acid sequence (**Figure 8—figure supplement 1**). Structural modelling of PbP36, using the crystal structure of the 6-cys protein PfP12 (*Tonkin et al., 2013*) as a template, shows a typical beta sandwich fold for each of the tandem 6-cysteine domains (**Figure 8C**). Most of the divergent residues between PbP36 and PyP36 are located in the second 6-cys domain (**Figure 8—figure supplement 1**), including in a loop located between the third and fourth cysteine residues. In this particular loop, PfP36 and PvP36 contain an inserted sequence of 21 and 3 amino acids, respectively, which may affect their binding properties and functions.

Single gene deletions of *p52* or *p36* result in similar phenotypes as *p52/p36* double knockouts, suggesting that the two proteins act in concert (*van Dijk et al., 2005; Ishino et al., 2005; van Schaijk et al., 2008; Labaied et al., 2007*). In *P. falciparum* blood stages, the two 6-cys proteins P41 and P12 interact to form stable heterodimers on the surface of merozoites (*Tonkin et al., 2013; Taechalerpaisarn et al., 2012; Parker et al., 2015*). Whilst P12 is predicted to be GPI-anchored, P41 lacks a membrane-binding domain, similarly to P36. By analogy, we hypothesize that P36 may form heterodimers with other GPI-anchored 6-cys proteins, including P52. Our data show that complementation of *PbΔp52/p36* parasites with P52 and P36 from *P. falciparum* or *P. vivax* does not restore sporozoite infectivity, supporting the idea that other yet unidentified parasite factors cooperate with P52 and P36 during invasion. In addition to P52 and P36, sporozoites express at least three other 6-cys proteins, B9, P12p and P38 (*Lindner et al., 2013; Swearingen et al., 2016*). Whereas gene deletion of *p38* causes no detectable phenotypic defect in *P. berghei* (*van Dijk et al., 2010*), B9 has been shown to play a critical role during liver stage infection, not only in *P. berghei* but also in *P. yoelii* and *P. falciparum* (*Annoura et al., 2014*). Whether B9, P38 and P12p associate with P52 and/or P36 and contribute to sporozoite invasion still deserves further investigations.

Several 6-cys proteins have been implicated in molecular interactions with host factors. As mentioned above, sequestrin was reported to interact with CD36 (*Ockenhouse et al., 1991*), although

the functional relevance of this interaction remains to be determined, as sequestrin is only expressed towards the end of liver stage development (*Orito et al., 2013*). Recent studies have shown that *P. falciparum* merozoites evade destruction by the human complement through binding of host factor H to the 6-cys protein Pf92 (*Rosa et al., 2016; Kennedy et al., 2016*). Pfs47 expressed by *P. falciparum* ookinetes plays a critical role in immune evasion in the mosquito midgut, by suppressing nitration responses that activate the complement-like system (*Molina-Cruz et al., 2013; Ramphul et al., 2015*). Pfs47 was proposed to act as a 'key' that allows the parasite to switch off the mosquito immune system by interacting with yet unidentified mosquito receptors ('lock') (*Molina-Cruz et al., 2015*). By analogy, based on our results, one could envisage P36 as a crucial determinant of a sporozoite 'key' that opens SR-BI and/or CD81-dependent 'locks' for entry into hepatocytes.

The function of P36 interaction with host cell receptors remains to be defined. P36 binding to SR-BI and/or CD81, either directly or indirectly, may participate in a signalling cascade that triggers rhoptry secretion and assembly of the moving junction, key events committing the parasite to host cell entry (*Besteiro et al., 2011*). Alternatively, P36 may induce signalling in the host cell by acting on SR-BI or other hepatocyte receptors. In this regard, Kaushansky *et al.* recently reported that sporozoites preferentially invade host cells expressing higher levels of the EphA2 receptor (*Kaushansky et al., 2015*). Interestingly, this preference was still observed with *p52/p36*-deficient parasites, strongly suggesting that there is no direct link between EphA2 and P52/P36-dependent productive invasion. However, the same study showed that P36 interferes with Ephrin A1-mediated EphA2 phosphorylation (*Kaushansky et al., 2015*), raising the possibility that P36 may affect EphA2 signalling indirectly, for example via SR-BI and the SRC pathway (*Naudin et al., 2014; Mineo and Shaul, 2003*).

In conclusion, our study reveals that host CD81 and SR-BI define two alternative pathways in human cells for sporozoite entry. Most importantly, we identified the parasite 6-cysteine domain protein P36 as a key determinant of host receptor usage during infection. These results pave the way toward the elucidation of the mechanisms of sporozoite invasion. The identification of the parasite ligands that mediate host cell entry may provide potential targets for the development of next-generation malaria vaccines. P36 is required for both CD81- and SR-BI-dependent sporozoite entry, suggesting that it may represent a relevant target in both *P. falciparum* and *P. vivax*. The understanding of host-parasite interactions may also contribute to novel therapeutic approaches. SR-BI-targeting agents have entered clinical development for prevention of HCV graft infection (*Felmlee et al., 2016*). Our data suggest that SR-BI-targeting strategies may be effective to prevent establishment of the liver stages of *P. vivax*, including the dormant hypnozoite forms.

Materials and methods

Experimental animals, parasites and cells

We used wild type *P. berghei* (ANKA strain, clone 15cy1) and *P. yoelii* (17XNL strain, clone 1.1), and GFP-expressing PyGFP and PbGFP parasite lines, obtained after integration of a GFP expression cassette at the dispensable *p230p* locus (*Manzoni et al., 2014*). *P. berghei* and *P. yoelii* blood stage parasites were propagated in female Swiss mice (6–8 weeks old, from Janvier Labs). *Anopheles stephensi* mosquitoes were fed on *P. berghei* or *P. yoelii*-infected mice using standard methods (*Ramakrishnan et al., 2013*), and kept at 21°C and 24°C, respectively. *P. berghei* and *P. yoelii* sporozoites were collected from the salivary glands of infected mosquitoes 21–28 or 14–18 days post-feeding, respectively. *A. stephensi* mosquitoes infected with *P. falciparum* sporozoites (NF54 strain) were obtained from the Department of Medical Microbiology, University Medical Centre, St Radboud, Nijmegen, the Netherlands. *P. vivax* sporozoites were isolated from *A. cracens* mosquitoes, 15–21 days after feeding on blood from infected patients on the Thailand-Myanmar border, as described (*Andolina et al., 2015*). HepG2 (ATCC HB-8065), HepG2/CD81 (*Silvie et al., 2006a*) and Hepa1-6 cells (ATCC CRL-1830) were checked for the absence of mycoplasma contamination and cultured at 37°C under 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (Life Technologies), as described (*Silvie et al., 2007*). HepG2 and HepG2/CD81 were cultured in culture dishes coated with rat tail collagen I (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France). Primary human hepatocytes were isolated and cultured as described previously (*Silvie et al., 2004*).

In vitro infection assays

Primary human hepatocytes (5×10^4 per well in collagen-coated 96-well plates) were infected with *P. vivax* or *P. falciparum* sporozoites (3×10^4 per well), as described (Silvie et al., 2004), and cultured for 5 days before fixation with cold methanol and immunolabeling of EEFs with antibodies specific for *Plasmodium* HSP70 (Tsuji et al., 1994). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Life Technologies). Host cell invasion by GFP-expressing *P. berghei* and *P. yoelii* sporozoites was monitored by flow cytometry (Prudêncio et al., 2008). Briefly, hepatoma cells (3×10^4 per well in collagen-coated 96-well plates) were incubated with sporozoites (5×10^3 to 1×10^4 per well). At different time points, cell cultures were washed, trypsinized and analyzed on a Guava EasyCyte 6/2L bench cytometer equipped with a 488 nm laser (Millipore), for detection of GFP-positive cells. To assess liver stage development, HepG2 or HepG2/CD81 cells were infected with GFP-expressing sporozoites and cultured for 24–36 hr before analysis either by FACS or by fluorescence microscopy, after fixation with 4% PFA and staining with antibodies specific for UIS4 (Sicgen) and Hoechst 33342. For antibody-mediated inhibition assays, we used polyclonal antisera against human SR-BI raised after genetic immunization of rabbits and rats (Maillard et al., 2006; Zeisel et al., 2007), and monoclonal antibodies against human SR-BI (NK-8H5-E3) (Zahid et al., 2013), human CD81 (1D6, Abcam) or mouse CD81 (MT81) (Silvie et al., 2006b).

Small interfering RNA and plasmid transfection

We used small double stranded RNA oligonucleotides targeting human CD81 (5'-GCACCAAGTGCA TCAAGTA-3'), human SR-BI (5'-GGACAAGTTCGGATTATTT-3') or mouse CD81 (5'-CGTGTCCACC TTCAACTGTA-3'). An irrelevant siRNA oligonucleotide targeting human CD53 (5'-CAACTCGGAG TGCTCTTC-3') was used as a control. Transfection of siRNA oligonucleotides was performed by electroporation, as described (Silvie et al., 2006a). Following siRNA transfection, cells were cultured for 48 hr before flow cytometry analysis or sporozoite infection. Transfection of pcDNA3 plasmids encoding human CD81 (Yalaoui et al., 2008b) or SR-BI (Maillard et al., 2006) was performed 24 hr after siRNA using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. Following plasmid transfection, cells were cultured for an additional 24 hr before sporozoite infection.

Constructs for targeted gene deletion of p52 and p36

Pb Δ p52p36 and Pb Δ p36 mutant parasites were generated using a 'Gene Out Marker Out' strategy (Manzoni et al., 2014). For generation of Pb Δ p52p36 parasites, a 5' fragment of PbP52 gene (PBANKA_1002200) and a 3' fragment of PbP36 gene (PBANKA_1002100) were amplified by PCR from *P. berghei* ANKA WT genomic DNA, using primers PbP52rep1for (5'-TCCCCGCGGAATCG TGATGCTATGGATAACGTAACAC-3'), PbP52rep2rev (5'-ATAAGAATGCGGCCGCAAAAAGAGACAAACACACTTTGTGAACACC-3'), PbP36rep3for (5'-CCGCTCGAGTTAATATGTGATGTGTG TAGAAGAGTGAGG-3') and PbP36rep4rev (5'-GGGGTACCTTGATATACATGCAACTTTTCACA TAGG-3'), and inserted into *Sac*II/*Not*I and *Xho*I/*Kpn*I restriction sites, respectively, of the GOMO-GFP vector. For generation of Pb Δ p36 parasites, a 5' and a 3' fragment of PbP36 gene were amplified by PCR from *P. berghei* ANKA WT genomic DNA, using primers PbP36repAfor (5'-AGC TGGAGCTCCACCGCGGGAAAAAAGGTTAACACATATATTGAAAAGC-3'), PbP36repArev (5'-CGGCTGAGGGCGGCCGCAATCAAAAAAATAATAAAAACAAATATGTACTACTCG-3'), and PbP36repBfor (5'-ATTAATTTCACTCGAGTATGTGATGTGTGTAGAAGAGTGAGG-3') and PbP36repBrev (5'-TATAGGGCGAATTGGGTACCGCACGCCGAAAAATTACAATACAAATGG-3'), and inserted into *Sac*II/*Not*I and *Xho*I/*Kpn*I restriction sites, respectively, of the GOMO-GFP vector using the In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech).

For generation of Py Δ p52p36 parasites, 5' and 3' fragments of PyP52 gene (PY17X_1003600) and a 3' fragment of PyP36 gene (PY17X_1003500) were amplified by PCR from *P. yoelii* 17XNL WT genomic DNA, using primers PyP52rep1for (5'-TCCCCGCGGAATCGCCATGCTATGGATAGTGTAGC-3'), PyP52rep2rev (5'-ATAAGAATGCGGCCGCCATTGAAGGGGGGAACAAATCGACG-3'), PyP52rep3for (5'-CCGCTCGAGTCAATATATGCCACTATTCGAATTTTTGG-3'), PyP52rep4rev (5'-GGGGTACCTTATTGATATGCATGCAACTTTTCACATAGG-3'), PyP36repFor (5'-ATAAGAA TGCGGCCGCAAAATGCAAGGCGCCCGTTTAGAACC-3') and PyP36repRev (5'-CCGGAATTCAAAAAGATGCTACTGTGAAAAGCTCACC-3'). The fragments were inserted into *Sac*II/*Not*I, *Xho*I/

KpnI and *NotI/EcoRI* restriction sites, respectively, of a GOMO vector backbone containing mCherry and hDHFR-yFCU cassettes. The resulting targeting constructs were verified by DNA sequencing (GATC Biotech), and were linearized with *SacI* and *KpnI* before transfection.

Wild type *P. berghei* ANKA blood stage parasites were transfected with *pbp52p36* and *pbp36* targeting constructs using standard transfection methods (Janse *et al.*, 2006). GFP-expressing parasite mutants were isolated by flow cytometry after positive and negative selection rounds, as described (Manzoni *et al.*, 2014). PyGFP blood stage parasites were transfected with a *pyp52pyp36* targeting construct and a GFP-expressing drug selectable marker-free *PyΔp52p36* mutant line was obtained using a two steps 'Gene Out Marker Out' strategy. Correct construct integration was confirmed by analytical PCR using specific primer combinations.

Constructs for genetic complementation of $\Delta p52p36$ mutants

For genetic complementation experiments, we used centromeric plasmids to achieve stable transgene expression from episomes (Iwanaga *et al.*, 2010). Complementation plasmids were obtained by replacing the GFP cassette of pCEN-SPECT2 plasmid (kindly provided by Dr S. Iwanaga) with a P52/P36 double expression cassette. Four complementing plasmids were generated, allowing expression of PbP52/PbP36, PyP52/PyP36, PbP52/PyP36 or PyP52/PbP36.

The centromeric plasmid constructs were assembled by In-Fusion cloning of 4 fragments in two-steps, into *KpnI/SalI* restriction sites of the pCEN-SPECT2 plasmid. For this purpose, fragments corresponding to the promoter region of PbP52 (insert A, 1.5 kb), the open reading frame (ORF) of PbP52 (insert B, 1.7 kb), the 3' untranslated region (UTR) of PbP52 and promoter region of PbP36 (insert C, 1.5 kb), the ORF and 3' UTR of PbP36 (insert D, 2 kb), the promoter region of PyP52 (insert E, 1.5 kb), the open reading frame (ORF) of PyP52 (insert F, 1.7 kb), the 3' untranslated region (UTR) of PyP52 and promoter region of PyP36 (insert G, 1.6 kb), and the ORF and 3' UTR of PyP36 (insert H, 2 kb) were first amplified by PCR from *P. berghei* or *P. yoelii* WT genomic DNA, using the following primers: Afor (5'-TATAGGGCGAATTGGGTACCTTCACATGCATAAACCCGAAGTGTGC-3'), Arev (5'-GAAAAAAGCAGCTAGCTTGTCTTAATGTAGAAAAAATATTTATGGATTTGG-3'), Bfor (5'-ATTAAAGCAAGCTAGCAATATTACATTTGTGGTAAGTAAAAC-3'), Brev (5'-GAAGAGGTACCAAAAAGGTTTTGCCAAAATG-3'), Cfor (5'-TTTTGGTACCTCTTCTTCTTATTATGAGG-3'), Crev (5'-GAAAAAAGCAGCTAGCAGAAAGAAACAACAGTTATCGTAATAAAG-3'), Dfor (5'-GCTAGCTGCTTTTTCTTGAATCGACAATTATAACTGAGGC-3'), Drev (5'-TACAAGCATCGTCGACATTGCCATTACAATATGCTATAATCTG-3'), Efor (5'-TATAGGGCGAATTGGGTACCTGCACATGCATAAAC TCGAAGTGTGC-3'), Erev (5'-AAAAAAGCAGCTAGCTTGTCTTAATGTAGAAAAAATATTTATGTA TTTGG-3'), Ffor (5'-ATTAAGCAAGCTAGAATATTGCATTTGTGGTAAGGCAAATC-3'), Frev (5'-GAAGACGTACCAACATATTTTCCAAAATG-3'), Gfor (5'-GTTTGGTACGTCTTCTTCTTATTA TGAGG-3'), Grev (5'-GAAAAAAGCAGCTAGGATAACTGTGCGATTCAAAGAAACAACC-3'), Hfor (5'-GCTAGCTGCTTTTTTATACTTGAAGCATTTTTGTTGACTCTACC-3'), Hrev (5'-TACAAGCATCG TCGACATTACCATTACGATATGCTATAATCTG-3'). Cloning of fragments A and D followed by B and C into the pCEN vector resulted in the PbP52/PbP36 complementation plasmid. Cloning of fragments E and H followed by F and G into the pCEN vector resulted in the PyP52/PyP36 complementation plasmid. Cloning of fragments A and D followed by F and G into the pCEN vector resulted in the PyP52/PbP36 complementation plasmid. Cloning of fragments E and H followed by B and C into the pCEN vector resulted in the PbP52/PyP36 complementation plasmid. The centromeric plasmids for expression of *P. falciparum* and *P. vivax* P52 and P36 were assembled by In-Fusion cloning of 5 fragments in two steps. For this purpose, fragments corresponding to the promoter region of *PbP52* (insert B1, 1.9 kb), the 3' UTR of *PbP52* and promoter region of *PbP36* (insert B2, 1.6 kb), the 3' UTR of *PbP36* (insert B3, 2 kb), the ORF of *PfP52* (insert F1, 1.4 kb), the ORF of *PfP36* (insert F2, 1.1 kb), the ORF of *PvP52* (insert V1, 1.4 kb) and the ORF of *PvP36* (insert V2, 1.1 kb), were first amplified by PCR from *P. berghei*, *P. falciparum* or *P. vivax* genomic DNA, using the following primers: B1for (5'-tataggcgcaattgggtaccTTCACATGCATAAACCCGAAGTGTGC-3'), B1rev (5'-gctagcTTACTATTATTCTCAAAATGTGTATCACATTG-3'), B2for (5'-ATCACAATATGTGCATAG TGCAATATGCC-3'), B2rev (5'-AATCAAAAAAATAATAAAAACAAATATATGTACTACTCG-3'), B3for (5'-TAATAGTAAgctagcTATGTGATGTGTGTAGAAAGAGTGAGGGAG-3'), B3rev (5'-tacaagcatcgtcgacATTGCCATTACAATATGCTATAATCTG-3'), F1for (5'-ATAATAGTAAgctagcAAAATGTA TGATTGGTGCTTATTCATATGTG-3'), F1rev (5'-TGCACATATTGTGATTTATGTTGAATATATATATA TAAAAATATGAATAATATTAAG-3'), F2for (5'-TTATTTTTTTTGATTATGGCTTATAATA

TTTGGGAGGAATATATAATGG-3'), F2rev (5'-ACATCACATAgctagcCTAACTTTCTACAGTTTTATTTA TGTTAAATAAACC-3'), V1for (5'-ATAATAGTAAgctagcAAAATGAGGCGGATTCTGCTGGGCTGC TTGG-3'), V1rev (5'-TGCACATATTGTGATTTACAGGGACGAGAAACCCGCGTAG-3'), V2for (5'-TTA TTTTTTTGATTATGAGCACATGCCTTCCAGTAGTGTTGG-3'), and V2rev (5'-ACATCACATAgctagcT-CACACCGCTTCAACCGCTGCG-3'). An intermediate vector was first assembled by cloning inserts B1 and B3 into *KpnI/SalI* restriction sites of the pCEN-SPECT2 plasmid. Subsequently, In-Fusion cloning of inserts F1, B2 and F2 or inserts V1, B2 and V2 into the *NheI* restriction site of the intermediate vector resulted into Pfp52/Pfp36 and Pvp52/Pvp36 expression centromeric plasmids, respectively. All constructs were verified by DNA sequencing (GATC Biotech) before transfection.

Parasite transfection and selection

For double crossover replacement of P52 and P36 genes and generation of the Pb Δ p52p36, Pb Δ p36 and Py Δ p52p36 parasite lines, purified schizonts of wild type *P. berghei* ANKA or PyGFP were transfected with 5–10 μ g of linearized construct by electroporation using the AMAXA NucleofectorTM device (program U33), as described elsewhere (Janse *et al.*, 2006), and immediately injected intravenously in the tail of one mouse. The day after transfection, pyrimethamine (70 or 7 mg/L for *P. berghei* and *P. yoelii*, respectively) was administered in the mouse drinking water, for selection of transgenic parasites. Pure transgenic parasite populations were isolated by flow cytometry-assisted sorting of GFP and mCherry-expressing blood stage parasites on a FACSaria II (Becton-Dickinson), transferred into naïve mice, treated with 1 mg/ml 5-fluorocytosine (Meda Pharma) in the drinking water, and sorted again for selection of GFP⁺ parasites only, as described (Manzoni *et al.*, 2014). In the case of the Py Δ p52p36 mutant, GFP⁺ mCherry⁺ recombinant parasites were first cloned by injection of limiting dilutions into mice prior to the negative selection step. For genetic complementation of the mutants, purified schizonts of Pb Δ p52p36 and Py Δ p52p36 parasites were transfected with 5 μ g of centromeric plasmids, followed by positive selection of transgenic parasites with pyrimethamine, as described above.

Parasite genotyping

Parasite genomic DNA was extracted using the Purelink Genomic DNA Kit (Invitrogen), and analysed by PCR using primer combinations specific for WT and recombined loci. For genotyping of Pb Δ p52p36 parasites, we used primer combinations specific for the WT Pbp52 locus (5'-AATGAGA TGCAAAAAATATAGTGCTTCC-3' and 5'-AAATGAGCAGTTTCTTCTACGTTGTTTCC-3'), for the 5' region of the recombined locus (5'-TATGTTTGAATATCAGGACAAGGCATGG-3' and 5'-TAATAA TTGAGTCTTTAGTAACGAATTGCC-3'), and for the 3' region of the recombined locus before (5'-ATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGG-3' and 5'-ATTGGACGTTTATTATTATTGCAAAAAGCG-3') or after excision of the selectable marker (5'-GATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACC-3' and 5'-ATTGGACGTTTATTATTATTGCAAAAAGCG-3'). For genotyping of Pb Δ p36 parasites, we used primer combinations specific for the WT Pbp36 locus (5'-GAGTTTCGCACGCCATATTAACACG-3' and 5'-CCATGATGAGATGCTAAATCGGG-3'), for the 5' region of the recombined locus (5'-GGAAGCA TCATACAAAAAAGAAAGC-3' and 5'-TAATAATTGAGTCTTTAGTAACGAATTGCC-3'), and for the 3' region of the recombined locus before (5'-ATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGG-3' and 5'-CGTTATCTCTTTTTTACTCATTAAAGTATTG-3') or after excision of the selectable marker (5'-GTGGAAGCGTTCAACTAGCAGACC-3' and 5'-CGTTATCTCTTTTTTACTCATTAAAGTATTG-3'). For genotyping of Py Δ p52p36 parasites, we used primer combinations specific for the WT PyP52 locus (5'-ACTATATTTCAATTGGAGACATGTGG-3' and 5'-ATGCAAAAAAAGTTATCATTGCTAGTTGG-3'), for the 5' region of the recombined locus (5'-GTATGTTTGAATGCCAGGATATGACATGG-3' and 5'-CCGGAATTCACAAAAAGATGCTACTGTGAAAAGCTCACC-3'), and for the 3' region of the recombined locus before (5'-AGTTACACGTATATTACGCATACAACGATG-3' and 5'-TAAGCATATA TTGTATATTTGCCTTGTCC-3') or after excision of the selectable marker (5'-GTATGTTTGGAA TGCCAGGATATGACATGG-3' and 5'-AATCTGATATGATAAATTATGGTATTGGAC-3').

Bioinformatic and structural analysis

Amino-acid sequences of the P36 proteins from *P. falciparum* (379 aa, gi:296004390, PF3D7_0404400), *P. vivax* (320 aa, gi:156094683, PVX_001025), *P. berghei* (352 aa, gi:991456178, PBANKA_1002100) and *P. yoelii* (356 aa, gi:675237743, PY17X_1003500) were obtained from

Genbank. Sequence alignments were carried out using Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A 3D model of *P. berghei* P36 was generated by the prediction program I-Tasser ([Yang et al., 2015](#)), using the 3D structure of Pf12 (Pf12short in ref [[Tonkin et al., 2013](#)]), which contains two 6-cys domains D1 and D2 arranged in tandem, as a template (PDB access code 2YMO). The 3D model for PbP36 was then superimposed to the template Pf12short and visually inspected using the program Coot ([Emsley and Cowtan, 2004](#)), and the rotamers for the Cys residues adjusted such that the three disulfides bonds for each domain were formed following the pattern C1-C2, C3-C6 and C4-C5.

Statistical analysis

Statistical significance was assessed by non-parametric analysis using the Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests. All statistical tests were computed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Significance was defined as $p < 0.05$ (ns, statistically non-significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). In vitro experiments were performed at least three times, with a minimum of three technical replicates per experiment.

Ethics statement

All animal work was conducted in strict accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and Council 'On the protection of animals used for scientific purposes'. The protocol was approved by the Charles Darwin Ethics Committee of the University Pierre et Marie Curie, Paris, France (permit number Ce5/2012/001). Blood samples were obtained from *P. vivax*-infected individuals attending the Shoklo Malaria Research Unit (SMRU) clinics on the western Thailand-Myanmar border, after signature of a consent form ([Andolina et al., 2015](#)). Primary human hepatocytes were isolated from healthy parts of human liver fragments, which were collected from adult patients undergoing partial hepatectomy (Service de Chirurgie Digestive, Hépatobilio-Pancréatique et Transplantation Hépatique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France). The collection and use of this material were undertaken in accordance with French national ethical guidelines under Article L. 1121-1 of the 'Code de la Santé Publique', and approved by the Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes) of the Centre Hospitalo-Universitaire Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, France.

Acknowledgements

We thank Maurel Tefit, Thierry Houpert, Prapan Kittiphanakun and Saw Nay Hsel for rearing of mosquitoes in Paris and at SMRU; Geert-Jan van Gemert and Robert W Sauerwein for providing *P. falciparum*-infected mosquitoes; Bénédicte Hoareau-Coudert (Flow Cytometry Core CyPS) for parasite sorting by flow cytometry; Valérie Soulard, Audrey Lorthiois and Morgane Mitermite for technical assistance; Maryse Lebrun for critically reading the manuscript; and Shiroh Iwanaga for kindly providing the pCEN-SPECT2 plasmid. This work was funded by the European Union (FP7 Marie Curie grant PCIG10-GA-2011-304081, FP7 PathCo Collaborative Project HEALTH-F3-2012-305578, ERC-AdG-2014-671231-HEPCIR, FP7 HepaMab, and Interreg IV-Rhin Supérieur-FEDER Hepato-Regio-Net 2012, H2020-2015-667273-HEP-CAR), the Laboratoires d'Excellence ParaFrap and HepSYS (ANR-11-LABX-0024 and ANR-10-LABX-0028), and the National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs, project grant NC/L000601/1). SMRU is part of the Mahidol-Oxford University Research Unit supported by the Wellcome Trust of Great Britain. GM and MG were supported by a 'DIM Malinf' doctoral fellowship awarded by the Conseil Régional d'Ile-de-France.

Additional information

Funding

Funder

European Commission

Author

Dominique Mazier
Thomas F Baumert
Olivier Silvie

Agence Nationale de la Recherche

Mirjam B Zeisel
Dominique Mazier
Thomas F Baumert
Olivier Silvie

National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research

Olivier Silvie

Conseil Régional, Île-de-France

Giulia Manzoni
Marion Gransagne

Wellcome

François Nosten

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

GM, CM, Formal analysis, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—review and editing; ST, SB, MGra, MT, MGra, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—review and editing; JL, Formal analysis, Visualization, Writing—review and editing; CA, Resources, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; J-FF, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; MBZ, TH, ER, GS, FN, TFB, Resources, Formal analysis, Writing—review and editing; DM, Formal analysis, Writing—review and editing; OS, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing

Author ORCIDs

Thierry Huby, <http://orcid.org/0000-0001-6634-551X>

Eric Rubinstein, <http://orcid.org/0000-0001-7623-9665>

François Nosten, <http://orcid.org/0000-0002-7951-0745>

Olivier Silvie, <http://orcid.org/0000-0002-0525-6940>

Ethics

Human subjects: Blood samples were obtained from *P. vivax*-infected individuals attending the Shoklo Malaria Research Unit (SMRU) clinics on the western Thailand-Myanmar border, after signature of a consent form. Primary human hepatocytes were isolated from healthy parts of human liver fragments, which were collected from adult patients undergoing partial hepatectomy (Service de Chirurgie Digestive, Hépatobilio-Pancréatique et Transplantation Hépatique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France). The collection and use of this material were undertaken in accordance with French national ethical guidelines under Article L. 1121-1 of the 'Code de la Santé Publique', and approved by the Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes) of the Centre Hospitalo-Universitaire Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hopitaux de Paris, France.

Animal experimentation: All animal work was conducted in strict accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and Council 'On the protection of animals used for scientific purposes'. The protocol was approved by the Charles Darwin Ethics Committee of the University Pierre et Marie Curie, Paris, France (permit number Ce5/2012/001).

References

- Acton S**, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**:518–520. doi: [10.1126/science.271.5248.518](https://doi.org/10.1126/science.271.5248.518), PMID: [8560269](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8560269/)
- Andolina C**, Landier J, Carrara V, Chu CS, Franetich JF, Roth A, Rénia L, Roucher C, White NJ, Snounou G, Nosten F. 2015. The suitability of laboratory-bred *Anopheles cracens* for the production of *Plasmodium vivax* sporozoites. *Malaria Journal* **14**:312. doi: [10.1186/s12936-015-0830-0](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0830-0), PMID: [26259952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26259952/)
- Annoura T**, van Schaijk BC, Ploemen IH, Sajid M, Lin JW, Vos MW, Dinmohamed AG, Inaoka DK, Rijpma SR, van Gemert GJ, Chevalley-Maurel S, Kielbasa SM, Scheltinga F, Franke-Fayard B, Klop O, Hermsen CC, Kita K, Gego A, Franetich JF, Mazier D, et al. 2014. Two plasmodium 6-Cys family-related proteins have distinct and critical roles in liver-stage development. *The FASEB Journal* **28**:2158–2170. doi: [10.1096/fj.13-241570](https://doi.org/10.1096/fj.13-241570), PMID: [24509910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24509910/)

- Bargieri D**, Lagal V, Andenmatten N, Tardieux I, Meissner M, Ménard R. 2014. Host cell invasion by apicomplexan parasites: the junction conundrum. *PLoS Pathogens* **10**:e1004273–1004279. doi: [10.1371/journal.ppat.1004273](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004273), PMID: [25232721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25232721/)
- Barnwell JW**, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo P. 1989. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation* **84**:765–772. doi: [10.1172/JCI114234](https://doi.org/10.1172/JCI114234), PMID: [2474574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2474574/)
- Bartosch B**, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. 2003. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *Journal of Biological Chemistry* **278**:41624–41630. doi: [10.1074/jbc.M305289200](https://doi.org/10.1074/jbc.M305289200), PMID: [12913001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12913001/)
- Baruch DI**, Gormely JA, Ma C, Howard RJ, Pasloske BL. 1996. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *PNAS* **93**:3497–3502. doi: [10.1073/pnas.93.8.3497](https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3497), PMID: [8622965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8622965/)
- Berditchevski F**, Zutter MM, Hemler ME. 1996. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Molecular Biology of the Cell* **7**:193–207. doi: [10.1091/mbc.7.2.193](https://doi.org/10.1091/mbc.7.2.193), PMID: [8688552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8688552/)
- Besteiro S**, Dubremetz JF, Lebrun M. 2011. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cellular Microbiology* **13**:797–805. doi: [10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x), PMID: [21535344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21535344/)
- Charrin S**, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E. 2014. Tetraspanins at a glance. *Journal of Cell Science* **127**:3641–3648. doi: [10.1242/jcs.154906](https://doi.org/10.1242/jcs.154906), PMID: [25128561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25128561/)
- Charrin S**, Le Naour F, Oualid M, Billard M, Faure G, Hanash SM, Boucheix C, Rubinstein E. 2001. The Major CD9 and CD81 molecular partner. identification and characterization of the complexes. *The Journal of Biological Chemistry* **276**:14329–14337. doi: [10.1074/jbc.M011297200](https://doi.org/10.1074/jbc.M011297200), PMID: [11278880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11278880/)
- Charrin S**, le Naour F, Silvie O, Milhiet PE, Boucheix C, Rubinstein E. 2009b. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochemical Journal* **420**:133–154. doi: [10.1042/BJ20082422](https://doi.org/10.1042/BJ20082422), PMID: [19426143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19426143/)
- Charrin S**, Yalaoui S, Bartosch B, Cocquerel L, Franetich JF, Boucheix C, Mazier D, Rubinstein E, Silvie O. 2009a. The ig domain protein CD9P-1 down-regulates CD81 ability to support plasmodium yoelii infection. *Journal of Biological Chemistry* **284**:31572–31578. doi: [10.1074/jbc.M109.057927](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.057927), PMID: [19762465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19762465/)
- Colpitts CC**, Baumert TF. 2016. Hepatitis C virus cell entry: a target for novel antiviral strategies to address limitations of direct acting antivirals. *Hepatology International* **10**:741–748. doi: [10.1007/s12072-016-9724-7](https://doi.org/10.1007/s12072-016-9724-7), PMID: [27048616](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27048616/)
- Coppi A**, Tewari R, Bishop JR, Bennett BL, Lawrence R, Esko JD, Billker O, Sinnis P. 2007. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host & Microbe* **2**:316–327. doi: [10.1016/j.chom.2007.10.002](https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.002), PMID: [18005753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18005753/)
- Dembele L**, Gego A, Zeeman AM, Franetich JF, Silvie O, Rametti A, Le Grand R, Dereuddre-Bosquet N, Sauerwein R, van Gemert GJ, Vaillant JC, Thomas AW, Snounou G, Kocken CH, Mazier D. 2011. Towards an in vitro model of plasmodium hypnozoites suitable for drug discovery. *PLoS One* **6**:e18162. doi: [10.1371/journal.pone.0018162](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018162), PMID: [21483865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21483865/)
- Emsley P**, Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **60**:2126–2132. doi: [10.1107/S0907444904019158](https://doi.org/10.1107/S0907444904019158), PMID: [15572765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15572765/)
- Evans MJ**, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**:801–805. doi: [10.1038/nature05654](https://doi.org/10.1038/nature05654), PMID: [17325668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17325668/)
- Felmlee DJ**, Coilly A, Chung RT, Samuel D, Baumert TF. 2016. New perspectives for preventing hepatitis C virus liver graft infection. *The Lancet Infectious Diseases* **16**:735–745. doi: [10.1016/S1473-3099\(16\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00120-1), PMID: [27301929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27301929/)
- Foquet L**, Hermsen CC, Verhoye L, van Gemert GJ, Cortese R, Nicosia A, Sauerwein RW, Leroux-Roels G, Meuleman P. 2015. Anti-CD81 but not anti-SR-B1 blocks plasmodium falciparum liver infection in a humanized mouse model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**:1784–1787. doi: [10.1093/jac/dkv019](https://doi.org/10.1093/jac/dkv019), PMID: [25656410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25656410/)
- Franke-Fayard B**, Janse CJ, Cunha-Rodrigues M, Ramesar J, Büscher P, Que I, Löwik C, Voshol PJ, den Boer MA, van Duinen SG, Febbraio M, Mota MM, Waters AP. 2005. Murine malaria parasite sequestration: cd36 is the Major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *PNAS* **102**:11468–11473. doi: [10.1073/pnas.0503386102](https://doi.org/10.1073/pnas.0503386102), PMID: [16051702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16051702/)
- Frevert U**, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B, Nussenzweig V. 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *Journal of Experimental Medicine* **177**:1287–1298. doi: [10.1084/jem.177.5.1287](https://doi.org/10.1084/jem.177.5.1287), PMID: [8478608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8478608/)
- Ishino T**, Chinzei Y, Yuda M. 2005. Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Molecular Microbiology* **58**:1264–1275. doi: [10.1111/j.1365-2958.2005.04801.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04801.x), PMID: [16313615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16313615/)
- Iwanaga S**, Khan SM, Kaneko I, Christodoulou Z, Newbold C, Yuda M, Janse CJ, Waters AP. 2010. Functional identification of the plasmodium centromere and generation of a plasmodium artificial chromosome. *Cell Host & Microbe* **7**:245–255. doi: [10.1016/j.chom.2010.02.010](https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.02.010), PMID: [20227667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20227667/)
- Janse CJ**, Ramesar J, Waters AP. 2006. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite plasmodium berghei. *Nature Protocols* **1**:346–356. doi: [10.1038/nprot.2006.53](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.53), PMID: [17406255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406255/)

- Kapadia SB**, Barth H, Baumert T, McKeating JA, Chisari FV. 2007. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *Journal of Virology* **81**:374–383. doi: [10.1128/JVI.01134-06](https://doi.org/10.1128/JVI.01134-06), PMID: [17050612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17050612/)
- Kaushansky A**, Douglass AN, Arang N, Vigdorovich V, Dambrauskas N, Kain HS, Austin LS, Sather DN, Kappe SH. 2015. Malaria parasites target the hepatocyte receptor EphA2 for successful host infection. *Science* **350**: 1089–1092. doi: [10.1126/science.aad3318](https://doi.org/10.1126/science.aad3318), PMID: [26612952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26612952/)
- Kennedy AT**, Schmidt CQ, Thompson JK, Weiss GE, Taechalerpaisarn T, Gilson PR, Barlow PN, Crabb BS, Cowman AF, Tham WH. 2016. Recruitment of factor H as a Novel Complement Evasion Strategy for Blood-Stage plasmodium falciparum infection. *The Journal of Immunology* **196**:1239–1248. doi: [10.4049/jimmunol.1501581](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501581), PMID: [26700768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26700768/)
- Labaied M**, Harupa A, Dumpit RF, Coppens I, Mikolajczak SA, Kappe SH. 2007. Plasmodium yoelii sporozoites with simultaneous deletion of P52 and P36 are completely attenuated and confer sterile immunity against infection. *Infection and Immunity* **75**:3758–3768. doi: [10.1128/IAI.00225-07](https://doi.org/10.1128/IAI.00225-07), PMID: [17517871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17517871/)
- Lindner SE**, Swearingen KE, Harupa A, Vaughan AM, Sinnis P, Moritz RL, Kappe SH. 2013. Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites. *Molecular & Cellular Proteomics* **12**:1127–1143. doi: [10.1074/mcp.M112.024505](https://doi.org/10.1074/mcp.M112.024505), PMID: [23325771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23325771/)
- Maillard P**, Huby T, Andréo U, Moreau M, Chapman J, Budkowska A. 2006. The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *The FASEB Journal* **20**:735–737. doi: [10.1096/fj.05-4728fje](https://doi.org/10.1096/fj.05-4728fje), PMID: [16476701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16476701/)
- Manzoni G**, Briquet S, Risco-Castillo V, Gaultier C, Topçu S, Ivănescu ML, Franetich JF, Hoareau-Coudert B, Mazier D, Silvie O. 2014. A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites. *Scientific Reports* **4**:4760. doi: [10.1038/srep04760](https://doi.org/10.1038/srep04760), PMID: [24755823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24755823/)
- Matuschewski K**, Nunes AC, Nussenzweig V, Ménard R. 2002. Plasmodium sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *The EMBO Journal* **21**:1597–1606. doi: [10.1093/emboj/21.7.1597](https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1597), PMID: [11927544](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11927544/)
- Mazier D**, Landau I, Druilhe P, Miltgen F, Guguen-Guillouzo C, Baccam D, Baxter J, Chigot JP, Gentilini M. 1984. Cultivation of the liver forms of plasmodium vivax in human hepatocytes. *Nature* **307**:367–369. doi: [10.1038/307367a0](https://doi.org/10.1038/307367a0), PMID: [6363939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6363939/)
- Mikolajczak SA**, Lakshmanan V, Fishbaugher M, Camargo N, Harupa A, Kaushansky A, Douglass AN, Baldwin M, Healer J, O'Neill M, Phuonng T, Cowman A, Kappe SH. 2014. A next-generation genetically attenuated plasmodium falciparum parasite created by triple gene deletion. *Molecular Therapy* **22**:1707–1715. doi: [10.1038/mt.2014.85](https://doi.org/10.1038/mt.2014.85), PMID: [24827907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24827907/)
- Mineo C**, Shaul PW. 2003. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends in Cardiovascular Medicine* **13**:226–231. doi: [10.1016/S1050-1738\(03\)00098-7](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(03)00098-7), PMID: [12922018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12922018/)
- Molina-Cruz A**, Canepa GE, Kamath N, Pavlovic NV, Mu J, Ramphul UN, Ramirez JL, Barillas-Mury C. 2015. Plasmodium evasion of mosquito immunity and global malaria transmission: the lock-and-key theory. *PNAS* **112**:15178–15183. doi: [10.1073/pnas.1520426112](https://doi.org/10.1073/pnas.1520426112), PMID: [26598665](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26598665/)
- Molina-Cruz A**, Garver LS, Alabaster A, Bangiolo L, Haile A, Winikor J, Ortega C, van Schaijk BC, Sauerwein RW, Taylor-Salmon E, Barillas-Mury C. 2013. The human malaria parasite Pfs47 gene mediates evasion of the mosquito immune system. *Science* **340**:984–987. doi: [10.1126/science.1235264](https://doi.org/10.1126/science.1235264), PMID: [23661646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23661646/)
- Mota MM**, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodríguez A. 2001. Migration of plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* **291**:141–144. doi: [10.1126/science.291.5501.141](https://doi.org/10.1126/science.291.5501.141), PMID: [11141568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11141568/)
- Mueller AK**, Camargo N, Kaiser K, Andorfer C, Frevert U, Matuschewski K, Kappe SH. 2005. Plasmodium liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface. *PNAS* **102**:3022–3027. doi: [10.1073/pnas.0408442102](https://doi.org/10.1073/pnas.0408442102), PMID: [15699336](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15699336/)
- Ménard R**, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. 2013. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology* **11**:701–712. doi: [10.1038/nrmicro3111](https://doi.org/10.1038/nrmicro3111), PMID: [24037451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24037451/)
- Naudin C**, Sirvent A, Leroy C, Larive R, Simon V, Pannequin J, Bourgaux JF, Pierre J, Robert B, Hollande F, Roche S. 2014. SLAP displays tumour suppressor functions in colorectal Cancer via destabilization of the SRC substrate EPHA2. *Nature Communications* **5**:3159f. doi: [10.1038/ncomms4159](https://doi.org/10.1038/ncomms4159), PMID: [24457997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24457997/)
- Neculai D**, Schwake M, Ravichandran M, Zunke F, Collins RF, Peters J, Neculai M, Plumb J, Loppnau P, Pizarro JC, Seitova A, Trimble WS, Saftig P, Grinstein S, Dhe-Paganon S. 2013. Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature* **504**:172–176. doi: [10.1038/nature12684](https://doi.org/10.1038/nature12684), PMID: [24162852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24162852/)
- Ockenhouse CF**, Klotz FW, Tandon NN, Jamieson GA. 1991. Sequestrin, a CD36 recognition protein on plasmodium falciparum malaria-infected erythrocytes identified by anti-idiotype antibodies. *PNAS* **88**:3175–3179. doi: [10.1073/pnas.88.8.3175](https://doi.org/10.1073/pnas.88.8.3175), PMID: [1707534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1707534/)
- Oquendo P**, Hundt E, Lawler J, Seed B. 1989. CD36 directly mediates cytoadherence of plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell* **58**:95–101. doi: [10.1016/0092-8674\(89\)90406-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90406-6), PMID: [2473841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2473841/)
- Orito Y**, Ishino T, Iwanaga S, Kaneko I, Kato T, Menard R, Chinzei Y, Yuda M. 2013. Liver-specific protein 2: a plasmodium protein exported to the hepatocyte cytoplasm and required for merozoite formation. *Molecular Microbiology* **87**:66–79. doi: [10.1111/mmi.12083](https://doi.org/10.1111/mmi.12083), PMID: [23216750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23216750/)
- Parker ML**, Peng F, Boulanger MJ. 2015. The structure of plasmodium falciparum Blood-Stage 6-Cys protein Pf41 reveals an Unexpected Intra-Domain insertion required for Pf12 coordination. *PLoS One* **10**:e0139407. doi: [10.1371/journal.pone.0139407](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139407), PMID: [26414347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26414347/)

- Pileri P**, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**:938–941. doi: [10.1126/science.282.5390.938](https://doi.org/10.1126/science.282.5390.938), PMID: [9794763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9794763/)
- Ploss A**, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**:882–886. doi: [10.1038/nature07684](https://doi.org/10.1038/nature07684), PMID: [19182773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19182773/)
- Prudêncio M**, Rodrigues CD, Ataíde R, Mota MM. 2008. Dissecting in vitro host cell infection by plasmodium sporozoites using flow cytometry. *Cellular Microbiology* **10**:218–224. doi: [10.1111/j.1462-5822.2007.01032.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01032.x), PMID: [17697130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17697130/)
- Ramakrishnan C**, Delves MJ, Lal K, Blagborough AM, Butcher G, Baker KW, Sinden RE. 2013. Laboratory maintenance of rodent malaria parasites. *Methods in Molecular Biology* **923**:51–72. doi: [10.1007/978-1-62703-026-7_5](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-026-7_5), PMID: [22990771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22990771/)
- Ramphul UN**, Garver LS, Molina-Cruz A, Canepa GE, Barillas-Mury C. 2015. Plasmodium falciparum evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells. *PNAS* **112**:1273–1280. doi: [10.1073/pnas.1423586112](https://doi.org/10.1073/pnas.1423586112), PMID: [25552553](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25552553/)
- Risco-Castillo V**, Topçu S, Marinach C, Manzoni G, Bigorgne AE, Briquet S, Baudin X, Lebrun M, Dubremetz JF, Silvie O. 2015. Malaria sporozoites Traverse Host cells within transient vacuoles. *Cell Host & Microbe* **18**:593–603. doi: [10.1016/j.chom.2015.10.006](https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.006), PMID: [26607162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26607162/)
- Risco-Castillo V**, Topçu S, Son O, Briquet S, Manzoni G, Silvie O. 2014. CD81 is required for rhoptry discharge during host cell invasion by plasmodium yoelii sporozoites. *Cellular Microbiology* **16**:1533–1548. doi: [10.1111/cmi.12309](https://doi.org/10.1111/cmi.12309), PMID: [24798694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24798694/)
- Rodrigues CD**, Hannus M, Prudêncio M, Martin C, Gonçalves LA, Portugal S, Epiphanyo S, Akinc A, Hadwiger P, Jahn-Hofmann K, Röhl I, van Gemert GJ, Franetich JF, Luty AJ, Sauerwein R, Mazier D, Kotliansky V, Vornlocher HP, Echeverri CJ, Mota MM. 2008. Host scavenger receptor SR-BI plays a dual role in the establishment of malaria parasite liver infection. *Cell Host & Microbe* **4**:271–282. doi: [10.1016/j.chom.2008.07.012](https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.07.012), PMID: [18779053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18779053/)
- Rosa TF**, Flammersfeld A, Ngwa CJ, Kiesow M, Fischer R, Zipfel PF, Skerka C, Pradel G. 2016. The plasmodium falciparum blood stages acquire factor H family proteins to evade destruction by human complement. *Cellular Microbiology* **18**:573–590. doi: [10.1111/cmi.12535](https://doi.org/10.1111/cmi.12535), PMID: [26457721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26457721/)
- Scarselli E**, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal* **21**:5017–5025. doi: [10.1093/emboj/cdf529](https://doi.org/10.1093/emboj/cdf529), PMID: [12356718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12356718/)
- Silvie O**, Charrin S, Billard M, Franetich JF, Clark KL, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Dautry F, Boucheix C, Mazier D, Rubinstein E. 2006b. Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *Journal of Cell Science* **119**:1992–2002. doi: [10.1242/jcs.02911](https://doi.org/10.1242/jcs.02911), PMID: [16687736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16687736/)
- Silvie O**, Franetich JF, Boucheix C, Rubinstein E, Mazier D. 2007. Alternative invasion pathways for plasmodium berghei sporozoites. *International Journal for Parasitology* **37**:173–182. doi: [10.1016/j.ijpara.2006.10.005](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.10.005), PMID: [17112526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17112526/)
- Silvie O**, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, Rubinstein E, Hannoun L, Charoenvit Y, Kocken CH, Thomas AW, Van Gemert GJ, Sauerwein RW, Blackman MJ, Anders RF, Pluschke G, Mazier D. 2004. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by plasmodium falciparum sporozoites. *Journal of Biological Chemistry* **279**:9490–9496. doi: [10.1074/jbc.M311331200](https://doi.org/10.1074/jbc.M311331200), PMID: [14676185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14676185/)
- Silvie O**, Greco C, Franetich JF, Dubart-Kupperschmitt A, Hannoun L, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Levy S, Boucheix C, Rubinstein E, Mazier D. 2006a. Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the plasmodium species. *Cellular Microbiology* **8**:1134–1146. doi: [10.1111/j.1462-5822.2006.00697.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00697.x), PMID: [16819966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16819966/)
- Silvie O**, Rubinstein E, Franetich JF, Prenant M, Belnoue E, Rénia L, Hannoun L, Eling W, Levy S, Boucheix C, Mazier D. 2003. Hepatocyte CD81 is required for plasmodium falciparum and plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nature Medicine* **9**:93–96. doi: [10.1038/nm808](https://doi.org/10.1038/nm808), PMID: [12483205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12483205/)
- Sinnis P**, Febbraio M. 2002. Plasmodium yoelii sporozoites infect CD36-deficient mice. *Experimental Parasitology* **100**:12–16. doi: [10.1006/expr.2001.4676](https://doi.org/10.1006/expr.2001.4676), PMID: [11971649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11971649/)
- Swearingen KE**, Lindner SE, Shi L, Shears MJ, Harupa A, Hopp CS, Vaughan AM, Springer TA, Moritz RL, Kappe SH, Sinnis P. 2016. Interrogating the plasmodium Sporozoite surface: identification of Surface-Exposed proteins and demonstration of glycosylation on CSP and TRAP by mass Spectrometry-Based proteomics. *PLoS Pathogens* **12**:e1005606. doi: [10.1371/journal.ppat.1005606](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005606), PMID: [27128092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27128092/)
- Taechalertpaisarn T**, Crosnier C, Bartholdson SJ, Hodder AN, Thompson J, Bustamante LY, Wilson DW, Sanders PR, Wright GJ, Rayner JC, Cowman AF, Gilson PR, Crabb BS. 2012. Biochemical and functional analysis of two plasmodium falciparum blood-stage 6-cys proteins: p12 and P41. *PLoS One* **7**:e41937. doi: [10.1371/journal.pone.0041937](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041937), PMID: [22848665](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22848665/)
- Tonkin ML**, Arredondo SA, Loveless BC, Serpa JJ, Makepeace KA, Sundar N, Petrotchenko EV, Miller LH, Grigg ME, Boulanger MJ. 2013. Structural and biochemical characterization of plasmodium falciparum 12 (Pf12) reveals a unique interdomain organization and the potential for an antiparallel arrangement with Pf41. *Journal of Biological Chemistry* **288**:12805–12817. doi: [10.1074/jbc.M113.455667](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455667), PMID: [23511632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23511632/)
- Tsuji M**, Mattei D, Nussenzweig RS, Eichinger D, Zavala F. 1994. Demonstration of heat-shock protein 70 in the sporozoite stage of malaria parasites. *Parasitology Research* **80**:16–21. doi: [10.1007/BF00932618](https://doi.org/10.1007/BF00932618), PMID: [8153120](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8153120/)

- van Dijk MR**, Douradinha B, Franke-Fayard B, Heussler V, van Dooren MW, van Schaijk B, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Mota MM, Waters AP, Janse CJ. 2005. Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. *PNAS* **102**:12194–12199. doi: [10.1073/pnas.0500925102](https://doi.org/10.1073/pnas.0500925102), PMID: [16103357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16103357/)
- van Dijk MR**, van Schaijk BC, Khan SM, van Dooren MW, Ramesar J, Kaczanowski S, van Gemert GJ, Kroeze H, Stunnenberg HG, Eling WM, Sauerwein RW, Waters AP, Janse CJ. 2010. Three members of the 6-cys protein family of plasmodium play a role in gamete fertility. *PLoS Pathogens* **6**:e1000853. doi: [10.1371/journal.ppat.1000853](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000853), PMID: [20386715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20386715/)
- van Schaijk BC**, Janse CJ, van Gemert GJ, van Dijk MR, Gego A, Franetich JF, van de Vegte-Bolmer M, Yalaoui S, Silvie O, Hoffman SL, Waters AP, Mazier D, Sauerwein RW, Khan SM. 2008. Gene disruption of plasmodium falciparum p52 results in attenuation of malaria liver stage development in cultured primary human hepatocytes. *PLoS One* **3**:e3549. doi: [10.1371/journal.pone.0003549](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003549), PMID: [18958160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18958160/)
- VanBuskirk KM**, O'Neill MT, De La Vega P, Maier AG, Krzych U, Williams J, Dowler MG, Sacci JB, Kangwanransan N, Tsuboi T, Kneteman NM, Heppner DG, Murdock BA, Mikolajczak SA, Aly AS, Cowman AF, Kappe SH. 2009. Preerythrocytic, live-attenuated plasmodium falciparum vaccine candidates by design. *PNAS* **106**:13004–13009. doi: [10.1073/pnas.0906387106](https://doi.org/10.1073/pnas.0906387106), PMID: [19625622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19625622/)
- Yalaoui S**, Huby T, Franetich JF, Gego A, Rametti A, Moreau M, Collet X, Siau A, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Luty AJ, Vaillant JC, Hannoun L, Chapman J, Mazier D, Froissard P. 2008a. Scavenger receptor BI boosts hepatocyte permissiveness to plasmodium infection. *Cell Host & Microbe* **4**:283–292. doi: [10.1016/j.chom.2008.07.013](https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.07.013), PMID: [18779054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18779054/)
- Yalaoui S**, Zougbedé S, Charrin S, Silvie O, Arduise C, Farhati K, Boucheix C, Mazier D, Rubinstein E, Froissard P. 2008b. Hepatocyte permissiveness to plasmodium infection is conveyed by a short and structurally conserved region of the CD81 large extracellular domain. *PLoS Pathogens* **4**:e1000010. doi: [10.1371/journal.ppat.1000010](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000010), PMID: [18389082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18389082/)
- Yang J**, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* **12**:7–8. doi: [10.1038/nmeth.3213](https://doi.org/10.1038/nmeth.3213), PMID: [25549265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25549265/)
- Zahid MN**, Turek M, Xiao F, Thi VL, Guérin M, Fofana I, Bachellier P, Thompson J, Delang L, Neyts J, Bankwitz D, Pietschmann T, Dreux M, Cosset FL, Grunert F, Baumert TF, Zeisel MB. 2013. The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. *Hepatology* **57**:492–504. doi: [10.1002/hep.26097](https://doi.org/10.1002/hep.26097), PMID: [23081796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23081796/)
- Zeisel MB**, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. 2007. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **46**:1722–1731. doi: [10.1002/hep.21994](https://doi.org/10.1002/hep.21994), PMID: [18000990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18000990/)

B

CLONAGE : CONSTRUCTION DE PLASMIDES

B.1 Construction des plasmides

B.1.1 Digestion enzymatique et purification du vecteur

Restriction enzymatique

Solutions et matériel :

- Les enzymes sont commandées chez New England Biolabs ®.

Protocole :

1. Préparation de la digestion :

Tableau B.1 | Digestion enzymatique ($V_{TOTAL}=40 \mu\text{L}$)

Vecteur	3 μg
Tampon (<i>TableauB.2</i>)	4 μL
Enzyme 1	20 unités
Enzyme 2	20 unités

2. Incuber ☉ sur la nuit – 37 °C.
3. Le lendemain matin ajouter 0.5 μL d'enzymes.
Incuber de nouveau ☉ 1-2 h à 37 °C pour compléter la digestion.

Purification du vecteur digéré (*MinElute® Gel Extraction Kit (Qiagen)*)

Solutions et matériel :

- Kit de purification : MinElute® Gel Extraction Kit (Qiagen - Ref : 28604)
- Éthanol : Ethanol BioUltra for molecular biology $\geq 99.8\%$ (Sigma - Ref : 51976-500ML-F)
- Isopropanol : 2-propanol BioUltra for molecular biology $\geq 99.5\%$ (GC) (Sigma - Ref : 59304-1L-F)
- Sodium Acétate 3 M pH 5,5 : (ThermoFisher - Ref : AM9740)

Tableau B.2 | Enzymes (NEB) :

Enzyme	Cutsmart	Tampon			Activité T °C	Dégradation T °C	Digestion rapide
		1.1	2.1	3.1			
BamHI	100%	75%	100%	100%	37	–	√
EcoRI-HF	100%	10%	100%	10%	37	65	√
HindIII-HF	100%	10%	100%	10%	37	80	√
KpnI-HF	100%	100%	25%	10%	37	–	√
MfeI-HF	100%	75%	25%	10%	37	–	√
NcoI-HF	100%	50%	100%	10%	37	80	√
SacI	100%	100%	50%	10%	37	65	√
Sall	10%	10%	10%	100%	37	65	√
XhoI	100%	75%	100%	100%	37	65	√

- Agarose à faible point de fusion : TopVision Low Melting Point Agarose (ThermoFisher - Ref : R0801)
- Tampon de Tris-Acétate EDTA : UltraPure™ TAE Buffer, 10X (ThermoFisher - Ref : 15558026)
- SyberSafe : SYBR™ Safe DNA Gel Stain 400 µL (ThermoFisher - Ref : S33102)
- Poids moléculaire et tampon de charge : GeneRuler 1kb DNA Ladder & Loading 6x, ready-to-use (ThermoFisher - Ref : SM0313)
- Cuve de migration et support de gel : Sub-Cell®GT Cell (BioRad - Ref : 1704483)
- Plateau de visualisation : SYBR™ Safe Photographic Filter (ThermoFisher - Ref : S37100)

⚠ Le tampon PB contient de la guanidine hydrochloride et de l'isopropanol qui sont nocifs, irritants et inflammables.

⚠ Le tampon QG contient de la guanidine thiocyanate qui est nocive et irritante.

Tableau B.3 | Caractéristiques de la colonne de purification :

Capacité de fixation	5 µg
Récupération de l'ADN	80%
Poids de gel maximum	400 mg
Limites de taille d'ADN	70 pb - 4 kb

Protocole :

1. Préparer un gel d'agarose 1% : faire fondre 1 g d'agarose dans 100 mL de TAE puis ajouter 10 µL de SyberSafe.
Verser le gel dans le support et ajouter les peignes, puis laisser le gel se solidifier au moins 30min.
2. Ajouter 8 µL de bleu de charge au plasmide digéré.
Déposer dans le gel avec un puits contenant l'échelle et faire migrer 30-45min en adaptant le voltage à la taille du gel 10 Volts/cm. (NB : si possible laisser un puit vide entre les échantillons pour faciliter la découpe ensuite).
3. Visualiser à l'aide de l'écran.

4. Découper les bandes d'intérêt et les placer dans un tube eppendorf.
5. Après avoir fait la tare, peser les morceaux de gel et ajouter 3 volumes de tampon QG pour 1 volume de gel (*cad 100µL pour 100µg*).
Incuber ☉ à 50 °C jusqu'à dissolution complète du gel.
6. Si la couleur est différente du jaune de départ (orange ou violette), ajouter 10 µL de sodium acétate 3 M pH 5,5 et mixer la solution qui va redevenir jaune.
7. Ajouter l'équivalent d'un volume de gel en isopropanol.
8. Charger sur la colonne (en plusieurs fois si nécessaire).
Centrifuger ☉ à 12 000 × g - 1 min.
9. Jeter ce qui est passé à travers la colonne.
Ajouter 500 µL de tampon QG.
Centrifuger ☉ à 12 000 × g - 1 min.
10. Jeter ce qui est passé à travers la colonne.
Ajouter 750 µL de tampon PE (*avec éthanol*).
Centrifuger ☉ à 12 000 × g - 1 min.
Jeter ce qui est passé à travers la colonne.
Centrifuger ☉ à 12 000xg - 2min.
11. Placer dans un nouveau tube eppendorf.
Ajouter 10 µL de tampon d'éluion (10 mM Tris pH 8,5).
Incuber ☉ 1min à température ambiante. Centrifuger ☉ à 12 000 × g - 2 min.
12. Stocker à -20 °C.

B.1.2 Amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et purification des fragments à insérer dans le vecteur

PCR à haute fidélité

Utilisation de l'ADN polymérase à haute fidélité de CloneAmp. Cette enzyme peut amplifier des fragments jusque 10 kb avec une fidélité de 12 erreurs/ 542 580 bases.

Solutions et matériel :

- ADN Polymérase : CloneAmp™ HiFi PCR Premix (Clontech - Ref : 639298)
- dH₂O : Distilled water DNase/RNase Free (Gibco - Ref :10977-035)
- Thermocycleur :
- Agarose : UltraPure™ Agarose (ThermoFisher - Ref : 16500500)
- Tampon de Tris-Acétate EDTA : UltraPure™ TAE Buffer, 10X (ThermoFisher - Ref : 15558026)
- SyberSafe : SYBR™ Safe DNA Gel Stain 400 µL (ThermoFisher - Ref : S33102)
- Poids moléculaire et tampon de charge : GeneRuler 1 kb DNA Ladder & Loading 6x, ready-to-use (ThermoFisher - Ref : SM0313)
- Cuve de migration : Sub-Cell® GT Cell (BioRad - Ref : 1704401)

- Plateau de visualisation : SYBR™ Safe Photographic Filter (ThermoFisher - Ref : S37100)

Protocole :

1. Mix des primers : 1µL amorce "Forward" ($[100 \mu M]_{initiale}$) + 1µL amorce "Reverse" ($[100 \mu M]_{initiale}$) + 8 µL dH₂O.
2. Préparation de la réaction de PCR :

Tableau B.4 | Réaction de PCR ($V_{TOTAL} 25 \mu L$) :

Mix primers ($10 / \mu M_i$)	1 µL
ADN ($< 100 \text{ ng}/\mu L$)	1 µL
dH ₂ O	10,5 µL
Clone Amp HIFI PCR Premix	12,5 µL

3. Programme du thermocycleur (adapter pour le génome riche en A/T de *Plasmodium*) :

Tableau B.5 | Thermocycler programme

initial denaturation	94 °C	5 min
25 cycles	dénaturation	94 °C 40 s
	hybridation	55 °C 40 s
	élongation	60 °C 90 s/kb
	élongation finale	60 °C 10 min
stocker à	4 °C	∞

4. Vérifier que les fragments de PCR ont bien été synthétisés :
 - (a) Préparer un gel d'agarose 1% : faire fondre 1 g d'agarose dans 100 mL de TAE puis ajouter 10 µL de SyberSafe.
Verser le gel dans le support et ajouter les peignes, puis laisser le gel se solidifier au moins 30min.
 - (b) Préparer une goutte de 1 µL de bleu de charge avec 2,5 µL de dH₂O et ajouter 2,5 µL de produit de PCR.
Déposer dans le gel avec un puits contenant l'échelle et faire migrer 30-45min en adaptant le voltage à la taille du gel 10 Volts/cm.
 - (c) Visualiser à l'aide de l'écran.

Purification des produits de PCR (*PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen)*)

Solutions et matériel :

- Kit de purification PCR : PureLink® PCR Purification Kit (ThermoFisher - Ref : K310001)
- Isopropanol : 2-Propanol BioUltra for molecular biology $\geq 99,5\%$ (GC) (Sigma - Ref : 59304-1L-F)
- Éthanol : Ethanol BioUltra for molecular biology $\geq 99,8\%$ (Sigma - Ref : 51976-500mL-F)

⚠ Les tampons contiennent de la guanidine hydrochloride et de l'isopropanol qui sont nocifs, irritants et inflammables.

Protocole :

Tableau B.6 | Caractéristiques de la colonne de purification :

Capacité de fixation	40 µg
Récupération de l'ADN	80%
Limites de taille d'ADN	0,1-12 kb

1. Ajouter 90µL de tampon de fixation (*avec isopropanol*) et bien homogénéiser.
2. Charger sur la colonne.
Centrifuger \odot 10 000 × g – 1 min – température ambiante.
3. Jeter ce qui est passé à travers la colonne.
Ajouter 650 µL de tampon de lavage (*avec éthanol*).
4. Jeter ce qui est passé à travers la colonne.
Centrifuger \odot V_{max} – 2-3 min – température ambiante.
5. Placer la colonne sur une nouveau tube eppendorf.
Ajouter 40 µL de tampon d'éluion (*NB : pour une meilleure éluion chauffer le tampon à 65 °C au préalable*).
Incuber \oplus 1 min – température ambiante.
Centrifuger \odot V_{max} – 2 min – température ambiante.
6. Stocker à -20 °C.

B.1.3 Ligation par la technique *In-fusion*®

Solutions et matériel :

- In-fusion® : In-Fusionfusion® HD Cloning Kit (Clontech - Ref : 639649)
- dH₂O : Distilled water DNase/RNase Free (Gibco - Ref : 10977-035)

Protocole :

1. Infusion solution :

Tableau B.7 | Préparation de la réaction de recombinaison par *InFusion*.

insert size	< 0.5 kb		[0.5-10] kb		> 10 kb	
	< 10 kb	> 10 kb	< 10 kb	> 10 kb	< 10 kb	> 10 kb
vector size						
purified PCR inserts	10-50 ng	10-50 ng	50-100 ng	50-100 ng	50-200 ng	50-200 ng
linearized vector	50-100 ng	50-200 ng	50-100 ng	50-200 ng	50-100 ng	50-200 ng
5x In-fusion Enzyme	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
dH ₂ O	complete	complete	complete	complete	complete	complete
V_{Total}	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

NB : Le volume peut être ajusté à 10 µL pour les réactions avec > 7 µL de vecteur et inserts.

2. Incuber ☉ 15 min à 50 °C.

3. Puis placer dans la glace.

NB : peut être utilisé ensuite pour une transformation ou stocké à -20 °C

B.2 Amplification du vecteur

B.2.1 Transformation bactérienne en vue d'isoler des clones :

Solutions et matériel :

- XL1-blue ou XL10-gold : XL1-Blue Competent Cells, 5 x 200 µl ou XL10-Gold Ultracompetent Cells, 5 x 100 µl (Agilent - Ref : 200249) ou (Agilent - Ref : 200314)
- LB : LB Broth base (Invitrogen - Ref : 12780052)
- LB agar : (Invitrogen - Ref : 22700025)
- Ampicilline : Ampicillin sodium salt (Sigma - Ref : A9518)
- Kanamycine : Kanamycin Sulfate (Gibco - Ref : 11815-024)
- Boîtes de Petri : Petri Dish (Greiner Bio-one - Ref : 633185)
- Tubes : PP Tube sterile 14mL (Greiner Bio-one - Ref : 187262)
- Source de chaleur : Bruleur électrique (Dutsher - Ref : 078522)
- Incubateur et agitateur : (ThermoScientific - Ref : MaxQ 4000)

Préparation des solutions stock d'antibiotiques :

antibiotique	stock mg/mL	solvant	utilisation		fonction
			µg/mL	dilution	
ampicilline	100	H ₂ O	100	1/1000	se fixe à la sous-unité ribosomale 50S et inhibe la synthèse protéique
chloramphenicol	35	EtOH ou MetOH	35	1/1000	inhibe la synthèse protéique
gentamycine	10	H ₂ O	10	1/1000	se fixe à la sous-unité ribosomale 50S et inhibe la synthèse protéique
kanamycine	50	H ₂ O	50	1/1000	se fixe à 3 sous-unités ribosomales, augmente les erreurs de translation et inhibe la synthèse protéique
streptomycine	100	H ₂ O	100	1/1000	se fixe à la sous-unité ribosomale 30S et inhibe la synthèse protéique

Préparation des boîtes de Petri

⚠ Travailler dans un environnement stérile.

1. Faire fondre le LB-Agar au micro-onde.

2. Laisser le revenir à température ambiante puis ajouter l'antibiotique (*diluer au 1/1000 la solution stock*).

3. Couler le LB dans les boîtes 10-20 mL par boîte de Petri.

4. Laisser sécher jusqu'à solidification de l'agar en conditions stériles.

NB : les boîtes peuvent se conserver environ 1 mois à 4 °C.

Transformation bactérienne

⚠ Travailler dans un environnement stérile.

1. Décongeler *E.coli XL1-blue* (or *E.coli XL10-gold*) sur la glace.
2. Dans un tube eppendorf placer 50 μL de bactéries.
Ajouter 0,85 μL de β -Mercaptoethanol ($C_i=1.42\text{ M}$). (Ou 2 μL de β -Mercaptoethanol pour *XL10*).
Incuber \ominus 10 min dans la glace en agitant toutes les 2 minutes.
3. Ajouter 50 ng d'ADN (ex : pour un produit de ligation utiliser 2,5 μL ; pour un plasmide déjà refermé utiliser 1-2 μL d'une dilution $\frac{1}{1000}$)
Incuber \ominus 30 min dans la glace.
4. Choc thermique : \ominus 45 sec à 42 °C \rightarrow puis placer immédiatement dans la glace pendant \ominus 2 min.
NB : \ominus 30 sec à 42 °C pour *XL-10*
5. Ajouter 100 μL de milieu LB (sans antibiotiques).
Incuber \ominus 1 h à 37 °C. (NB : si le plasmide est résistant à l'ampicilline cette étape peut être optionnelle)
6. Étaler sur une boîte de Petri à l'aide de billes de verre ou de râtaux.
Incuber \ominus à 37 °C toute la nuit.
NB : Lorsque les colonies ont poussé, les boîtes peuvent être stockées à 4 °C.

B.2.2 Miniprep (PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit)

- Kit miniprep : PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher - Ref : K210010)
- LB : LB Broth base (Invitrogen - Ref : 12780052)
- Ampicilline : Ampicillin sodium salt (Sigma - Ref : A9518)
- Kanamycine : Kanamycin Sulfate (Gibco - Ref : 11815-024)

Jour 1 : Culture bactérienne

1. Préparer dans un tube de 50 mL le milieu LB avec les antibiotiques.
2. Répartir 3-4 mL de ce milieu dans des tubes de 14 mL.
3. Piquer une colonie à l'aide d'un cône et le placer dans un tube.
Répéter pour 8-10 colonies par construction.
4. Incuber \ominus à 37 °C et 180 rpm toute la nuit.

Jour 2 : Extraction de l'ADN plasmidique

1. Centrifuger les cultures \odot 4000 rpm – 10 min – 4 °C.
2. Jeter le surnageant.
3. Ajouter 250 μL de tampon de resuspension (R3 stocké à 4 °C) (avec de la RNaseA) et resuspendre le culot.
4. Ajouter 250 μL de tampon de lyse (L7) (⚠ NaOH and SDS) et homogénéiser (⚠ NE PAS VORTEXER).
Incuber \ominus 5 min à température ambiante.

Étude fonctionnelle et structurale des protéines d'invasion de *Plasmodium*

5. Ajouter 350 μL de tampon de précipitation (N4) (Δ acide acétique) et homogénéiser (Δ NE PAS VORTEXER).
Centrifuger $\odot >12\ 000 \times g - 10\ \text{min}$.
6. Charger le surnageant dans la colonne.
Centrifuger $\odot >12\ 000 \times g - 1\ \text{min}$.
7. Jeter ce qui est passé à travers la colonne.
Ajouter 700 μL de tampon de lavage (W9) (avec de l'éthanol).
Centrifuger $\odot >12\ 000 \times g - 1\ \text{min}$.
Jeter ce qui est passé à travers la colonne.
Centrifuger $\odot >12\ 000 \times g - 1\ \text{min}$.
8. Placer la colonne dans un nouveau tube eppendorf.
Ajouter 50 μL de tampon d'éluion (TE).
NB : pré-chauffer le tampon d'éluion à 65 °C pour une meilleure éluion.
Incuber $\oplus 1\ \text{min}$ à température ambiante.
Centrifuger $\odot 12\ 000 \times g - 2\ \text{min}$.

C

BIOLOGIE CELLULAIRE ET PARASITOLOGIE : PRODUCTION DE PARASITES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS ET TEST D'INVASION

C.1 Production de parasites génétiquement modifiés et de sporozoïtes

C.1.1 Transfection de parasites de rongeurs : *Plasmodium berghei* ou *Plasmodium yoelii* – (Adapté de Janse *et al.* [2006])

La modification génétique de *Plasmodium* de rongeurs se fait en deux étapes. Une première étape consiste à collecter les parasites et les cultiver jusqu'à ce qu'ils atteignent le stade de schizontes matures. Ensuite, les mérozoïtes sont mécaniquement libérés de ces schizontes et électroporés en présence d'ADN. Ces parasites électroporés sont ensuite injectés dans une souris pour permettre leur multiplication et leur sélection via l'utilisation de traitements (figure C.2).

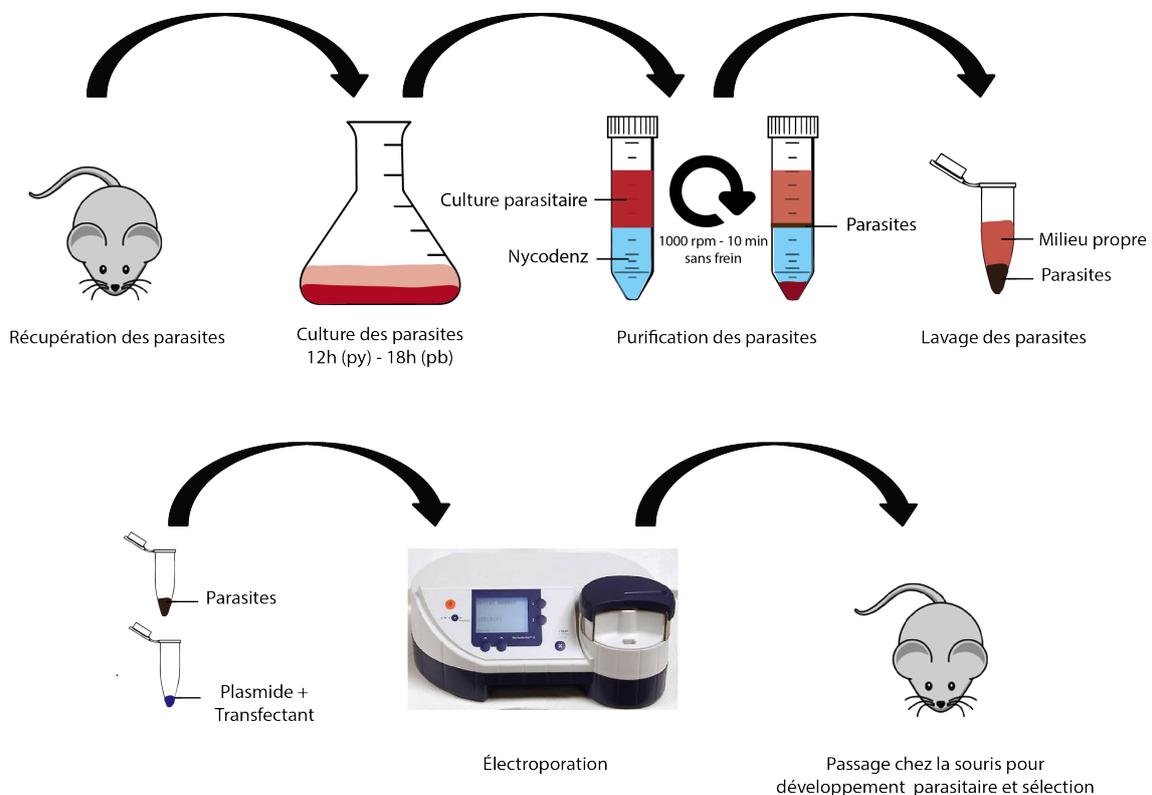


FIGURE C.1

Solutions et matériel :

- Alsever's : Alsever's solution with 4,2 g NaCl, 8,0 g sodium citrate et 20,5 g glucose/mL (500 mL) (Sigma - Ref : A3551)
- Lames : bords rodés 90° et surface dépolie et hydrophile (Ghäasel - Ref : BPBo37)
- Méthanol : $\geq 99,5\%$ GPR RECTAPUR (VWR - Ref : 20846.326)
- Giemsa R en solution : (RAL diagnostics - Ref : 320310-1000)
- RPMI : RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMax (Gibco - Ref : 61870-010)
- FBS-Hi : Heat Inactivated Fetal Bovine Serum (Gibco - Ref : 10500-064)
- Gentamycine : 50 mg/mL (Gibco - Ref : 15750-037)
- Nucleofactor : AmaxaTM Human T Cell NucleofactorTM Kit (Lonza - Ref : VPA-1002)
- Filtre : 0,22 μm GP Millipore Express(R) PLUS Membrane 250 mL (Merck - Ref : SCGPFU02RE)
- AMAXA : Nucleofactor(R) II (Lonza - Ref : AAD-10015)
- Huile à immersion : (Optika Italy - Ref : 15008)
- Incubateur avec agitateur : (ThermoScientific - Ref : MaxQ 4000)
- **Nycodenz :**

1. Préparer la solution de dilution du Nycodenz :

Tableau C.1 | Solution de dilution du Nycodenz :

	C_i		C_f
Tris/HCl	1 M	2 mL	5 mM
KCl	0.5 M	2.4 mL	3 mM
EDTA	0.5 M	240 μL	0,3 mM
dH ₂ O (gibco)		395.08 mL	

2. Dans un bécher dissoudre 110.4 g of Nycodenz dans ≈ 300 mL de tampon de dilution de Nycodenz.
3. Vérifier que le pH soit de 7,5.
4. Homogénéiser, et compléter à 400 mL.
5. Autoclaver à 121 °C 20 min
--> Stocker à 4 °C Δ couvrir d'aluminium (pour éviter la dégradation par la lumière).

- **Pyriméthamine :**

1. *Solution stock à 7 mg/mL dans du DMSO* : 250 mg de pyriméthamine + 35,7 mL de DMSO
⊕ Incuber à 37 °C pour solubiliser la pyriméthamine.
--> Stocker à 4 °C.
2. *Solution pour Plasmodium berghei* : 10 mL de Solution stock dans 1 L d'eau de l'animalerie.
 Δ Ajuster le pH entre [3.5 - 5.5].
--> Stocker à température ambiante pendant 3 semaines maximum.
3. *Solution pour Plasmodium yoelii* : dilution au 1/10^{ème} de la solution pour *Plasmodium berghei* dans de l'eau de l'animalerie. .
--> Stocker à température ambiante pendant 3 semaines maximum.

- **Ketamine/Xylazine :**

Tableau C.2 | Préparation de l'anesthésiant Ketamine/Xylazine :

	C_i	C_f	$V_{Total} = 5\text{mL}$
PBS			3.125 mL
Ketamine	25 mg/mL	100 ng/mL	1,25 mL
Xylamin	2,5 mg/mL	20 ng/mL	0.625 mL

- **Solution de congélation :** Alsevier + 20% de Glycérol. Dans un Falcon 50 mL : 45 mL Alsevier + 5 mL Glycérol à stocker à 4 °C.

4 jours auparavant : infection des souris

1. Infecter 1 à 5 souris, en fonction du nombre de constructions à transférer, avec du sang parasité frais ou congelé (*NB : le sang congelé doit impérativement être injecté en intra-péritonéale à cause de solution de congélation*).
2. Suivre la parasitémie tous les jours :
 - Récupérer une goutte de sang et l'étaler sur une lame. Laisser sécher à l'air.
 - Placer la lame dans un bain de méthanol pendant \ominus 40sec pour fixer les globules rouges.
 - Colorer avec du Giemsa 10% (*5mL de Giemsa dans 45mL d'eau milliQ*). Incuber \ominus 20 min pour du Giemsa rapide ou 1 h pour du Giemsa lent.
 - Rincer à l'eau pour retirer l'excès de Giemsa et laisser sécher à l'air (ou au sèche-cheveux).
 - Observer au microscope (*\times objectif à immersion 100 \times*) et compter la parasitémie.
 - Quand la parasitémie dépasse 5%, collecter le sang et démarrer la culture.

Jour 1 : Culture des parasites

- ▶ **Culture Medium :** Préparer le milieu en conditions stériles sous un PSM.

1. 160 mL RPMI + 40 mL FBS-Hi + 60 μ L gentamicine.
2. Filtrer à 0,22 μ m et diviser le milieu en :
 - 150 mL dans un erlenmeyer stérile, gazer avec 5%CO₂ 5%O₂ 95%N₂ pendant 1 minute puis placer à 37 °C.
 - 10 mL dans un falcon 50 mL \Rightarrow maintenir à 37 °C au bain-marie pour la ponction intracardiaque.
 - Garder le reste dans le flacon pour le jour 2 dans l'incubateur à 37 °C .

- ▶ **Ponction intracardiaque :**

1. Préparer une seringue (1 mL) + aiguille (23 G) : ajouter de l'héparine dans la seringue et faire des mouvements d'aller retour avec le piston afin de recouvrir les parois d'héparine. Remettre l'héparine en trop dans le flacon.
2. Anesthésier une souris avec 100-150 μ L de solution Ketamine/Xylazine.
NB : Vérifier que la souris est bien endormie en pinçant la patte.

3. Fixer la souris sur le dos et la nettoyer à l'éthanol 70%.
4. Ouvrir la cage thoracique et ponctionner le sang directement dans le coeur à l'aide de la seringue d'héparine.
5. Conserver le sang à 37 °C dans le falcon contenant du milieu au bain-marie.

► **Culture des parasites :**

1. Centrifuger le sang collecté \odot 1 000 rpm – 8 min – 20 °C sans frein (ou très peu de frein).
2. Retirer le surnageant à l'aide d'une pipette.
3. Resuspendre le culot dans 20 mL de milieu prélevé dans l'erenmeyer à 37 °C.
4. Déposer très doucement le sang au fond de l'Erlenmeyer. Il doit former un coussin sous le milieu.
5. Gazer doucement avec 5%CO₂ 5%O₂ 95%N₂ pendant 1 minute.
6. Incuber \oplus 15 min à 37 °C sans rotation.
7. Incuber \oplus 12 h pour *P. yoelii* ou \oplus 16-18 h pour *P. berghei* à 37 °C avec une rotation de 70 rpm.

Jour 2 : Transfection

► **Isolement des schizontes :**

1. Réaliser un frottis sanguin et le colorer au Giemsa afin de vérifier le développement des parasites (ils doivent avoir maturés en schizontes).
2. Préparation du Nycodenz : (\triangle ouvrir sous un PSM, afin de le garder stérile)

P. berghei : 27.5 mL de solution stock de Nycodenz + 22.5 mL de PBS

P. yoelii : 30 mL de solution stock de Nycodenz + 20 mL de PBS

\triangle Laisser à température ambiante (\oplus 30 min).

3. Homogénéiser l'Erlenmeyer de culture.
4. Diviser la culture dans 4 Falcons de 50 mL (30 mL de culture dans chaque) et ajouter 10 mL de Nycodenz à 55% sous la culture.

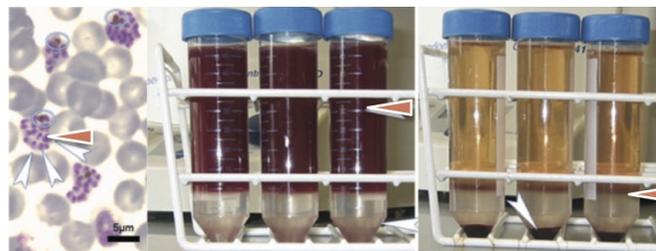


FIGURE C.2 | Isolement des schizontes de la culture sanguine. À gauche : observation de schizontes sur un frottis sanguin ; au centre : culture contenant les schizontes sur un coussin de nycodenz ; à droite : anneau contenant les schizontes à l'interface entre le nycodenz et le milieu. La flèche pointe vers les schizontes.

5. Centrifuger \odot 1 000 rpm – 25 min – température ambiante – sans frein!

6. Collecter à l'aide d'une pipette pasteur les parasites qui forment un anneau à l'interface du nycodenz et du milieu. Les déposer dans un falcon de 50 mL.
NB : réaliser cette étape sans attendre car le Nycodenz est toxique pour les parasites.
7. Compléter le falcon avec du milieu jusque 40 mL (utiliser le milieu au dessus des parasites de l'étape précédente).
8. Centrifuger \odot 1 000 rpm – 10 min à température ambiante (avec frein).
9. Retirer le surnageant à l'aide d'une pipette.
Resuspendre le culot avec 5-15 mL de milieu propre (qui était rester dans l'incubateur à 37 °C) et diviser en aliquot de 1 mL dans des tubes eppendorf de 1,5 mL.
10. Centrifuger \odot Vmax – 1 min à température ambiante.

► **Transfection :**

1. Préparer l'ADN à transférer :
100 μ L de tampon "Transfection Human T cell Nucleofactor" + 10 μ L (max 15 μ L) d'ADN (5-10 μ g d'ADN).
2. \Rightarrow aller à l'animalerie (P1000 + 2 \times P200 + ADN + 1 mL de milieu propre + AMAXA avec ses cuvettes et pipettes).
 - Retirer le surnageant avec une pipette P1000.
 - Resuspendre le culot avec l'ADN en solution (Tampon de transfection + ADN) + pipetter up and down plusieurs fois afin de "casser" les schizontes et libérer les mérozoïtes.
 - Placer la solution dans une cuvette et électroporer avec l'AMAXA Nucleofactor (programme U33).
 - Ajouter 50 μ L de milieu et placer l'ensemble dans un nouveau tube.
 - Injecter en intraveineuse dans la queue d'une souris.
NB : Injecter également une solution de parasites sans électroporer comme contrôle.

► **Suivi de transfection et récupération des parasites :**

1. Après \odot 24 h ajouter le traitement de sélection (*ex : pyriméthamine*).
2. Après 2-3 jours, suivre la parasitémie à l'aide de frottis sanguins colorés au Giemsa.
3. Quand la parasitémie atteint au moins 1-2%. Récupérer le sang par ponction intracardiaque.
4. Aliquoter : 100 μ L de sang + 200 μ L solution de congélation. Conserver dans de l'azote liquide ou à -80 °C.

C.2 Analyse de la transfection par géotypage des parasites

Solutions et matériel :

- Seringue 5 mL : Seringue 5 mL en polypropylène à usage unique (Dutsher - Ref : 050006D)
- Falcon 15 mL : Tube à fond conique 15 ml (sur socle) Falcon®(Dutsher - Ref : 352097)
- Coton : grande surface
- Cellulose : Cellulose fibers (Sigma - Ref : C6288-250G)

- Billes de verre : Glass beads, unwashed 212-300 μ m (Sigma - Ref : G9143-500G)
- PBS : Phosphate Buffered Saline pH 7,4 (1X) (Gibco - Ref : 10010-015)
- Centrifugeuse : Sorvall Legend XT Centrifuge (ThermoFisher - Ref : 75004520)
- Saponine : saponin from quillaja bark, sapogenin content 20-35% (Sigma - Ref : S4521-25G)
- Kit d'extraction d'ADN : PureLink™ Genomic DNA Kit
- dH₂O : Distilled water DNase/RNase Free (Gibco - Ref : 10977-035)
- dNTP : dNTP Mix (25 mM each) (Fermentas - Ref : R1121)
- Taq polymérase et tampon : FastStart Taq DNA polymerase, 5 U/ μ L (Roche - Ref : 12 032 937 001)
- oligos : les oligos sont commandés chez eurofins
- Thermocycleur : Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (ThermoFisher - Ref : ED000651)
- Agarose à faible point de fusion : TopVision Low Melting Point Agarose (ThermoFisher - Ref : R0801)
- Tampon de Tris-Acétate EDTA : UltraPure™ TAE Buffer, 10X (ThermoFisher - Ref : 15558026)
- SyberSafe : SYBR™ Safe DNA Gel Stain 400 μ L (ThermoFisher - Ref : S33102)
- Échelle et bleu de charge : GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (ThermoFisher - Ref : SM0313)
- Cuve de migration et support de gel : Sub-Cell®GT Cell (BioRad - Ref : 1704483)
- Plateau de visualisation : SYBR™ Safe Photographic Filter (ThermoFisher - Ref : S37100)

C.2.1 Isolement des parasites

Dans un premier temps les globules rouges sont isolés des globules blancs à l'aide d'une colonne de filtration afin de ne récupérer que de l'ADN parasitaire à la fin. Les globules rouges sont ensuite lysés et les parasites récupérés.

1. Préparation de la colonne :
Remplir une seringue de 5 mL avec : \sim 2 mL de coton + \sim 1 mL de cellulose (CF11) + \sim 0.4 mL de billes de verre.
Placer la seringue dans un Falcon de 15 mL en insérant un cône afin de permettre le passage d'air.
2. Laver la colonne avec 15 mL de PBS.
3. Séparation des globules rouges : placer la colonne dans un nouveau tube. Ajouter le sang et compléter avec du PBS jusqu'à atteindre 15 mL.
4. Jeter la colonne et centrifuger le Falcon \odot 1 500 \times rpm 8 min à température ambiante.
5. Aspirer et jeter le surnageant à l'aide d'une pipette de 10 mL et resuspendre le culot avec 0,2% de saponine
(0,1 g de saponine dans 50 mL de PBS \rightarrow stocker à 4 °C pour une courte durée).
6. \odot 2 800 \times rpm 8 min à température ambiante.
7. Jeter le surnageant et resuspendre le culot avec 200 μ L de PBS.
 \rightarrow Stocker à -20 °C.

C.2.2 Extraction de l'ADN (PureLink™ Genomic DNA Kit)

1. + 20 μL Protéinase K (20 mg/mL) + 20 μL RNase A (20 mg/mL in 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8)
Vortexer et \odot incuber 2 min à température ambiante.
2. + 200 μL tampon de lyse (\triangleleft chlorure de guanidium \leftrightarrow porter une blouse et des gants et NE PAS AJOUTER DE JAVEL OU D'ACIDE).
Vortexer et \odot incuber 3 à 10 heures à 55 °C.
3. + 200 μL 96-100% EtOH
Vortexer et déposer dans la colonne (capacité de fixation : \sim 0.5 mg d'ADN de taille 20-50 kb).
4. \odot 10 000 \times g pendant 1 min à température ambiante.
5. Placer la colonne sur un nouveau tube de collection.
+ 500 μL tampon de lavage 1.
6. \odot 10 000 \times g pendant 1 min à température ambiante.
7. Placer la colonne sur un nouveau tube de collection.
+ 500 μL tampon de lavage 2.
8. \odot V_{max} pendant 3 min à température ambiante.
9. Placer la colonne sur un nouveau tube eppendorf de 1,5 mL.
+ 25-200 μL tampon d'éluion (0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 9).
NB : l'éluion peut se faire avec 10 mM Tris-Hcl pH 8-9 ou de l'eau.
10. \odot Incuber 1 min à température ambiante.
11. \odot V_{max} pendant 1 min à température ambiante.
--> Stocker à -20 °C.

C.2.3 PCR de géotypage

1. Mix des primers : 1 μL amorce "Forward" ($[100 \mu\text{M}]_{initiale}$) + 1 μL amorce "Reverse" ($[100 \mu\text{M}]_{initiale}$) + 8 μL dH₂O.

2. Réaction de PCR :

NB : si le tampon de PCR ne contient pas de magnésium, il faut en rajouter pour obtenir une concentration finale de 2 mM.

Tableau C.3 | Réaction de PCR

dH ₂ O	37.5 μL
Tampon de PCR 10 \times	5 μL
dNTP 5 mM	5 μL
DNA	1 μL
Mixe des oligos	1 μL
Taq polymerase	0.5 μL
<hr/> V_{Total}	<hr/> 50 μL

3. Gel d'agarose 1%

Tableau C.4 | Programme du thermocycleur

dénaturation initiale	94 °C	5 min
35 cycles	dénaturation	94 °C 40 sec
	hybridation	55 °C 40 sec
	extension	60 °C 1 min/kb
Extension finale	60 °C	10 min

- Préparer un gel d'agarose 1% : faire fondre 1 g d'agarose dans 100 mL de TAE puis ajouter 10 μ L de SyberSafe.
Verser le gel dans le support et ajouter les peignes, puis laisser le gel se solidifier au moins 30 min.
- Déposer 3 μ L de tampon de charge sur du parafilm et ajouter 15 μ L de produit de PCR.
Déposer dans le gel avec un puits contenant l'échelle et faire migrer 30-45 min en adaptant le voltage à la taille du gel 10 Volts/cm.
- Visualiser à l'aide de l'écran.

C.2.4 Infection de moustiques et production de sporozoïtes

Solutions et matériel

- Lames : bords rodés 90° et surface dépolie et hydrophile (Ghäasel - Ref : BPBo37)
- Lamelles : (Deckgläser)
- Cellule Neubauer : (Dutscher - Ref :900505)
- Seringue : Terumo® syringe without needle (Scientific Laboratory Supplies Ltd - Ref : SYR6200)
- Aiguille : 23G×1" 0,6×25mm Regular Bevel 11" (Terumo Agani™ Needle - Ref : AN*2325R1)
- PBS : Phosphate Buffered Saline pH 7,4 (1X) (Gibco - Ref : 10010-015)
- Complete medium

Élevage des moustiques

1. Les moustiques sont élevés à l'insectarium.
2. Les moustiques sont nourris avec de l'eau sucrée à 10% dans un pot contenant un papier absorbant.

4 jours avant l'infection des moustiques : infecter les souris

Pour un aliquot frais le sang doit être injecté au maximum 3 jours avant le passage chez les moustiques. Pour un aliquot congelé le sang doit être injecté au maximum 5 jours avant la date du passage chez les moustiques.

► Injection en intraveineuse (sang frais).

1. Prélever quelques gouttes de sang frais et diluer le sang dans du PBS.
2. Remplir une seringue à insuline de 1 mL Terumo avec le sang dilué (100-200 μ L).
3. Placer la souris sur le support de rétention afin d'immobiliser la queue.

4. Placer la queue de la souris quelques secondes dans de l'eau chaude afin de dilater les veines.
5. Piquer en parallèle de la veine, lorsque l'aiguille est dans la veine injecter doucement le sang (*le sang étant visqueux l'injection doit être lente*).
6. Marquer la souris pour l'identifier.

► Injection intrapéritonéale (sang congelé ou frais non dilué).

1. Ne décongeler le sang qu'au dernier moment car la solution de congélation est toxique pour le parasite.
2. Remplir une seringue à insuline de 1 mL Terumo avec le sang (*100-200 µL*).
3. Saisir la souris et injecter doucement dans la cavité péritonéale \triangle *Faire attention aux organes sous-jacents et injecter doucement.*
4. Marquer la souris pour l'identifier.

Jour 1 : Infection des moustiques

1. Retirer le sucre de la cage la veille (*ou au minimum 1 heure avant*).
2. Anesthésier la souris avec 100-150 µL de solution de Ketamine/Xylazine.
3. Placer la ou les souris sur la cage pendant 1 heure, puis sacrifier la souris.
4. Remettre le sucre après 18-24 heures afin de réduire la présence de moustiques mâles ou non infectés.

NB : Il est également possible dans le cas de petites cages d'endormir les moustiques sur la glace ou au CO₂ afin de retirer les moustiques ne s'étant pas nourris (petit abdomen).

Jour 7-21 : Dissection des moustiques

► **Dissection des estomacs :**

La dissection des estomacs permet d'observer les oocystes et ainsi de vérifier l'infection des moustiques.

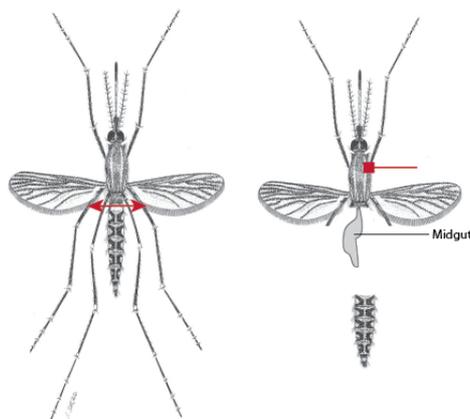


FIGURE C.3 | Dissection des estomacs.

1. Collecter les moustiques et les placer sur la glace (→ pour les endormir).

2. Tuer les moustiques avec de l'EtOH 70% et les laver dans du PBS.
3. Aligner les moustiques sur le dos sur une lame de microscope et les couvrir de PBS afin qu'ils ne sèchent pas.
4. Maintenir le thorax et inciser en haut de l'abdomen (Fig.C.3).
5. Tirer l'abdomen par le bas (à partir du 2nd segment).
6. Couper l'appareil respiratoire pour accéder à l'estomac. Récupérer l'estomac et le placer sur une lame de microscope avec du PBS puis observer au microscope.

► **Dissection des glandes salivaires :**

La dissection des glandes salivaires permet de récupérer les sporozoïtes. Elle se fait au bout de 15 jours pour *Plasmodium yoelii* et 21 jours pour *Plasmodium berghei* car le temps de développement chez le moustique de ces deux parasites est différent.

1. Collecter les moustiques et les placer sur la glace (→ pour les endormir).
2. Tuer les moustiques avec de l'éthanol 70%. ⚠ ne pas les laisser dans l'éthanol au risque de tuer les parasites, transférer rapidement dans du milieu de culture.
3. Laver les moustiques à l'aide de 3 bains de milieu successifs et séparer les moustiques ♂/ ♀ et infectés/non infectés dans le cas de parasites exprimant la GFP. Puis les aligner sur le côté sur une lame de microscope et les couvrir de milieu afin qu'ils ne sèchent pas (Fig.C.4).

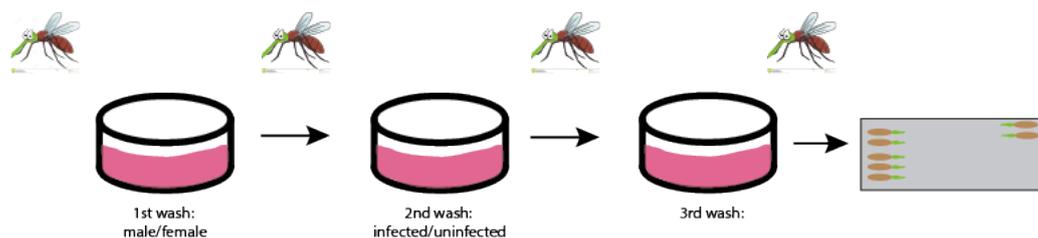


FIGURE C.4 | Préparation des moustiques avant dissection des glandes salivaires.

4. Placer la lame sous une loupe binoculaire. Couper la tête à l'aide du côté biseauté de l'aiguille (⚠ ne pas presser le thorax en même temps au risque de faire sortir les glandes salivaires avec la tête) (Fig.C.5).
5. Appuyer sur le thorax pour extraire les glandes salivaires et les séparer du corps à l'aide de l'aiguille. Ajouter du milieu et collecter les glandes avec une pipette (utiliser 80 µL de milieu pour éviter que les glandes ne se collent à la pointe). Placer les glandes dans un tube eppendorf sur la glace (Fig.C.5).
6. Lorsque toutes les glandes sont collectées, pipetter de haut en bas à l'aide d'une seringue avec une aiguille 25G afin de libérer les sporozoïtes des glandes salivaires.

⚠ Garder les sporozoïtes sur la glace afin d'éviter que le changement de température ne les active.

Lavage des sporozoïtes

1. Centrifuger Ⓞ 6 000 rpm – 4 min – 4 °C afin de culotter les parasites.
2. Jeter le surnageant, ajouter 100 µL de milieu et homogénéiser avec une pipette P200 puis compléter jusqu'à 1mL avec du milieu.

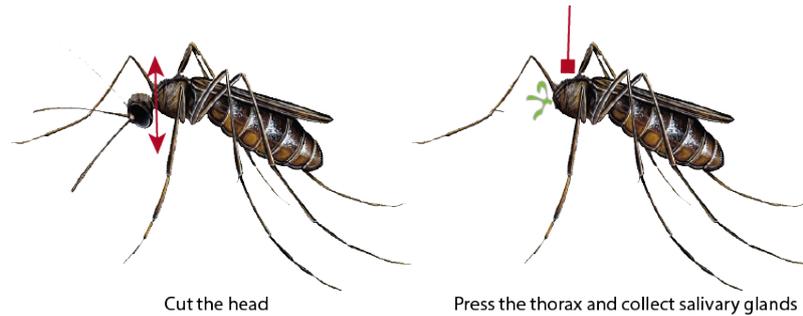


FIGURE C.5 | Dissection des glandes salivaires

3. Centrifuger \odot 1 000 rpm – 1 min – 4 °C afin de faire sédimenter les débris.
Ou laisser sédimenter \odot 10min les tubes bien droits dans la glace.
4. Récupérer le surnageant qui contient les sporozoïtes et le placer dans un nouveau tube.
5. Compter les sporozoïtes à l'aide d'une lame Neubauer (Tiefe-Depth 0,1 mm Neubauer / Marienfield 0.0025 mm²).
Compter les 4 carrés entourés en rouge sur la figure C.6.

$$\text{sporozoïtes/mL} = \frac{\text{sporozoïtes dans les 4 carrés} \times 10000 \times \text{facteur de dilution}}{4} \quad (\text{C.1})$$

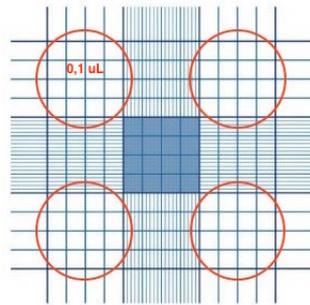


FIGURE C.6 | Représentation de la lame Neubauer. Les carrés entourés en rouge sont les zones dans lesquels il faut compter les sporozoïtes.

C.3 Culture cellulaire et test d'invasion

C.3.1 Culture cellulaire des lignées HepG2 et HepG2-CD81

Solutions et matériel

- Penicilline Streptomycin : Pen Strep (10 000 units/mL Penicillin Streptomycin) (Gibco – Ref : 15140-122)
- L-Glutamine 200mM (100X) (Gibco – Ref : 25030-024)
- 0,25% Trypsin-EDTA (1x) (Gibco – Ref : 25200-056)
- FBS-Hi : Heat Inactivated Fetal Bovine Serum (Gibco – Ref : 10500-064)
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco – Ref : 41966-029)
- Collagène : Collagen Type I rat tail 100milligrams (Corning – Ref : 354236)

Coating de flasques ou de plaques

1. Diluer le collagène dans 50 mL de PBS pour obtenir une concentration finale de 50 µg/µL. $V_i(\mu\text{L}) = \frac{2500}{C_i(\text{mg/mL})}$ – (ex : $C_i = 4.01 \text{ mg/mL} \rightarrow V_i = 623 \mu\text{L}$)
2. Ajouter le volume nécessaire de collagène en fonction de la taille de la flasque ou de la plaque (cf Tableau.C.6).
3. Incuber ⊕30 min à 37 °C.
4. Aspirer le collagène et laver une fois avec du PBS.
5. Bien aspirer le PBS et stocker à 4 °C.

Décongélation de cellules

1. Dès que l'aliquot est décongelé ajouter 20mL de milieu (car la solution de congélation est toxique pour les cellules).
2. Centrifuger ⊖ 1 200 rpm – 5 min – 20 °C
3. Jeter le surnageant et resuspendre les cellules dans 5mL de milieu.
Placer les cellules dans une T25 et incuber à 37 °C avec 5% de CO₂.

Passage des cellules

Les cellules HepG2 et HepG2-CD81 se divisent toutes les 24 heures. Il fautensemencer 20 000 à 30 000 cellules par cm² pour avoir une flasque à ≈80% de confluence au bout de 3 jours.

Tableau C.5 | Approximation du nombre de cellules HepG2 et HepG2-CD81 :

	Ensemencement (pour 70% de confluence au bout de 3j)	Nombre de cellules à 70% de confluence
T25	750 000 cellules	2-3 000 000 cellules
T75	2 000 000 cellules	6-8 000 000 cellules
T150	4 500 000 cellules	18-30 000 000 cellules

1. Aspirer le milieu et laver les cellules avec du PBS (car le sérum inhibe la trypsine).
2. Ajouter de la trypsine à 0,25% et incuber ⊕5 min à 37 °C.
3. Vérifier que les cellules se décollent en tapant la flasque sur votre paume de main → les cellules doivent glisser le long de la paroi.
4. Ajouter du milieu pour stopper la digestion (au moins 2 × le volume de trypsine).
5. À l'aide d'une pipette aspirer les cellules puis les repousser contre la paroi de la flasque afin de les dissocier.
6. Transférer 1/6 du volume de cellules dans une nouvelle flasque de culture et compléter avec du milieu.
7. Incuber à 37 °C avec 5% de CO₂.

Tableau C.6 | Volumes pour passage de cellules HepG2 et HepG2-CD81 :

	Collagène	Lavage PBS	Trypsine	Milieu (V_{final})
P96	50 μL	100 μL	50 μL	200 μL
T25	2 mL	1,5 mL	1 mL	5 mL
T75	4 mL	3 mL	2 mL	10-20 mL
T150	8 mL	6 mL	4 mL	15-30 mL

Congélation de cellules

1. Préparer la solution de congélation : 500mL DMEM + 20% FCS + 10% DMSO.
Filtrer la solution à 0,2 μm .
2. Aspirer le milieu et laver les cellules avec du PBS (car le sérum inhibe la trypsine).
3. Ajouter de la trypsine à 0,25% et incuber \ominus 5 min à 37 °C.
4. Vérifier que les cellules se décollent en tapant la flasque sur votre paume de main → les cellules doivent glisser le long de la paroi.
5. Ajouter du milieu pour stopper la digestion (au moins 2 \times le volume de trypsine).
6. Laver les cellules dans du milieu.
7. Centrifuger \odot 1 200 rpm – 5 min à 4 °C.
8. Resuspendre le culot de cellules dans de la solution de congélation : 5×10^6 cellules/mL. *B* garder les cellules sur la glace.
9. Aliquoter 1mL par cryotubes. *B* toujours sur la glace.
10. Stocker immédiatement les tubes à -80 °C.

C.3.2 Test d'invasion de lignées cellulaires

Solutions et matériel

- Penicilline Streptomycin : Pen Strep (10 000 units/mL Penicillin Streptomycin) (Gibco - Ref : 15140-122)
- L-Glutamine 200mM (100X) (Gibco - Ref : 25030-024)
- 0,25% Trypsin-EDTA (1X) (Gibco - Ref : 25200-056)
- FBS-Hi : Heat Inactivated Fetal Bovine Serum (Gibco - Ref : 10500-064)
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco - Ref : 41966-029)
- Collagène : Collagen Type I rat tail 100milligrams (Corning – Ref : 354236)
- P96 à fond plat : 96 well, Flat Bottom with low evaporation lid (Falcon – Ref : 353072)
- P96 à fond rond : 96 well, U Bottom with low evaporation lid (Falcon – Ref : 353077)
- Ibidi : μ Plate 96 well (Ibidi – Ref : 89626)
- PBS : Phosphate Buffered Saline pH 7,4 (1X) (Gibco - Ref : 10010-015)

- anti-UIS₄ : anticorps de chèvre (2mg/mL) (SicGen - Ref : AB0042-500)
- AlexaFluor594 anti-chèvre : AlexaFluor(R) 594 donkey anti-goat IgG (2mg/mL) (Life - Ref : A11058)

Milieu de culture : ⚠STERILE! à préparer sous un PSM.

Tableau C.7 | Milieu de culture ⚠STERILE!

DMEM	500 mL
Glu	5 mL
Pen/Strep	5 mL
FBS	50 mL

Jour 1 : Mise en plaque

- Préparer une plaque P96 et/ou Ibidi avec du collagène (cf protocole de culture cellulaire).
- Récupérer les cellules selon le protocole de culture cellulaire.
Laver les cellules une fois au PBS, puis incuber 5 min à 37 °C avec 0,25% de trypsine puis détacher les cellules et ajouter du milieu pour stopper la digestion.
- Compter les cellules :
 - Diluer les cellules au $\frac{1}{10^{eme}}$ dans un tube eppendorf (10 μ L de cellules dans 90 μ L de milieu).
 - Placer 10 μ L de cette dilution sur une cellule Neubauer.
 - Observer au microscope et compter le nombre de cellules dans les carrès (entourés en rouge sur la Fig.C.7).

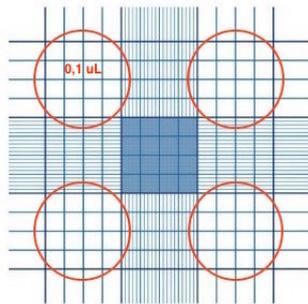


FIGURE C.7 | Représentation de la lame Neubauer. Les carrés entourés en rouge sont les zones dans lesquels il faut compter les cellules.

- Déterminer le nombre de cellules par millilitre grâce à la formule suivante :

$$\text{cellules/mL} = \frac{\text{cellules dans les 4 carrés} \times 10 \times 10000}{4} \quad (\text{C.2})$$

- Mettre les cellules en plaque :

Diluer les cellules à la concentration voulue (cf TableauC.8) et déposer 200 μ L par puits pour la plaque P96 ou 300 μ L par puits pour une plaque Ibidi.
Incuber à 37 °C avec 5% de CO₂ jusqu'au lendemain.

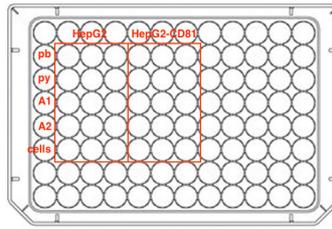


FIGURE C.8 | Exemple d'organisation de plaque P96.

Tableau C.8 | Mise en plaque des cellules HepG2 et HepG2-CD81 :

	Nombre de cellules	Volume de milieu	Préparer
P96	30 000 cellules	200 μ L	600 000 cellules dans 4 mL de milieu
Ibidi	50 000 cellules	300 μ L	1 000 000 cellules dans 6 mL de milieu

Jour 2 : infection des hépatocytes par les sporozoïtes

- Vérifier que les cellules ont bien poussé et ne sont pas contaminées.
- Préparer 3 \times 50 mL Falcon de milieu à conserver dans la glace.
- Refroidir la centrifugeuse (à tubes eppendorf) à 10 °C.

Dissection des moustiques et récupération des sporozoïtes

Récupérer les sporozoïtes comme détaillé au protocole sur les moustiques C.2.4.

Infection des cellules

1. Diluer les sporozoïtes à la concentration voulue (cf TableauC.9).

Tableau C.9 | Dilution des spozoïtes pour infection des cellules :

	Nombre de sporozoïtes	Volume de milieu	Préparer
P96 (pour analyse par FACS)	10 000 sporozoïtes	50 μ L	80 000 sporozoïtes dans 400 μ L de milieu
Ibidi (pour analyse par microscopie)	2 000 sporozoïtes	100 μ L	16 000 sporozoïtes dans 800 μ L de milieu

2. Aspirer le milieu au dessus des cellules et déposer 50 μ L de sporozoïtes.
3. Centrifuger \odot 2 000 rpm – 10 min – 10 °C – *SANS FREIN ou frein 3!* (amène les sporozoïtes contre les cellules).
4. Incuber la plaque \odot 3 heures à 37 °C avec 5% de CO₂.
5. Laver les puits 2 fois avec 200 μ L de milieu puis ajouter 200 μ L de milieu et incuber 21 heures à 37 °C avec 5% de CO₂ (afin de laisser se développer les parasites qui ont réussi à envahir les cellules).

Analyse de la plaque P96 au FACS

- Préparation des cellules pour passage au FACS :
Analyser l'invasion entre 24 et 48 heures post-infection.

1. Retirer le milieu et laver 2 fois avec du PBS (*pour retirer le serum qui inhibe la digestion trypsique*).
 2. Ajouter 50 μL de trypsine à 0,25%.
 3. Incuber \ominus 10 minutes à 37 °C.
 4. Ajouter 150 μL de milieu pour stopper la digestion trypsique. Pipetter une dizaine de fois de haut en bas pour détacher les cellules.
 5. Transférer les cellules dans une plaque P96 à fond rond.
 6. Centrifuger \odot 2 000 rpm – 1 min – 4 °C.
 7. Retirer le surnageant en faisant attention de ne pas aspirer le culot de cellules et ajouter 200 μL de tampon de FACS (PBS avec 3% de serum).
 \triangle Garder sur glace et analyser au FACS.
- Analyse FACS :
 1. Laver le FACS :

Lancer le programme "cleaning" (dans le menu "Essential tools")

 - (a) 500 μL Tampon de rinçage (filtré)
 - (b) 1 mL H₂O Gibco (filtrée)
 2. Ouvrir le logiciel InCyte et démarrer l'acquisition :
 - (a) Procéder à l'équilibration avec des cellules HepG2 ou HepG2-CD81 non infectées.
 - (b) Acquisition des différents taux d'infection.
 3. Laver de nouveau le FACS avant de quitter.

Analyse de la plaque Ibidi par marquage d'UIS4 et observation microscopique

1. Aspirer le milieu et laver avec 300 μL de PBS.
2. Aspirer le PBS et ajouter 100 μL de PFA à 4%.
Incuber \ominus 10 min à température ambiante.
3. Aspirer la PFA et laver une fois avec du PBS.
4. Ajouter 100 μL de Glycine 0,1 M
Incuber \ominus 15 min à température ambiante.
5. Ajouter 100 μL de Triton-X100 1% (0,5 mL de Triton-X100 dans 50 mL de PBS).
Incuber \ominus 5 min à température ambiante.
6. Laver 3 fois avec du PBS.
7. Ajouter l'anticorps anti-UIS4 1/500 (7 μL dans 3,5 mL de PBS).
Incuber \ominus 1 h à température ambiante.
8. Laver 3 fois avec du PBS.
9. Ajouter l'anticorps AlexaFluor594 anti-goat 1/1000 et Hoescht 1/1000 (3,5 μL de chaque dans 3,5 mL de PBS).
Incuber 1 h à température ambiante.
10. Laver 3 fois avec du PBS.
11. Observer au microscope.
NB : La plaque peut être conservée à 4 °C.

C.3.3 Préparation de sporozoïtes pour observations microscopiques

Solutions et matériel

- Poly-L-Lysine : Poly-L-lysine solution 0,1% (w/v) in H₂O (Sigma – Ref : P8920-500mL)
- Solution de montage : SlowFade™ Gold Antifade Mountant (ThermoFisher – Ref : S36937)
- Lamelles : Deckgläser 100 Nr1. 15mm (Marienfeld – Ref :)
- Lames : bords rodés 90° et surface dépolie et hydrophile (Ghäasel – Ref : BPBo37)
- Triton X-100 : Triton™ X-100 laboratory grade (Sigma – Ref : X100-500mL)
- Éthanol : Ethanol BioUltra for molecular biology ≥ 99,8% (Sigma – Ref : 51976-500mL-F)
- PBS : Phosphate Buffered Saline pH 7,4 (1X) (Gibco – Ref : 10010-015)
- lames sporozoïtes secs : Diagnostic microscope slides 18 wells 5mm epoxy autoclavable (Cel-Line – Ref : 10-943A-RED-CE24)

Préparation des lamelles Poly-L-Lysine

La Poly-L-Lysine permet d'améliorer l'adhérence des cellules sur un support.

1. Lavage des lamelles à l'acide :
 - (a) Incuber les lamelles avec 1M HCl pendant 6-8 heures à 50-60 °C.
 - (b) Laisser refroidir puis laver avec ddH₂O
 - (c) Rincer ensuite avec de l'éthanol à 75%.
 - (d) Laisser sécher complètement.
2. Coating à la Poly-L-Lysine :
 - (a) Placer les lamelles dans de la Poly-L-Lysine à 0,01% (diluer la solution stock (0,1%) 5mL dans 45mL ddH₂O).
 - (b) Incuber 15-30 min à température ambiante.
 - (c) Aspirer la Poly-L-Lysine et laver une fois à 75% d'EtOH.
 - (d) Laisser sécher complètement et stocker à 4 °C.

Fixation de sporozoïtes sur lamelle Poly-L-Lysine

1. Centrifuger les sporozoïtes à 6 000 rpm - 3 min.
2. Retirer le surnageant et resuspendre les sporozoïtes dans 75µL de PBS.
3. Déposer les sporozoïtes sur la lamelle et laisser incuber 30min à température ambiante.
4. Aspirer le surnageant.
5. Ajouter 100µL de PFA à 4% afin de fixer les parasites.
Incuber 15min à température ambiante.
6. Laver 2 fois au PBS (150µL).
7. Aspirer le PBS

Étude fonctionnelle et structurale des protéines d'invasion de *Plasmodium*

8. Déposer une goutte de solution de montage sur une lame de microscope et retourner délicatement la lamelle dessus.
Sceller la lamelle sur la lame à l'aide de vernis à ongle.
9. Laisser sécher puis stocker à 4 °C.

Sporozoïtes secs

1. Centrifuger \odot les sporozoïtes à 6 000 rpm - 3 min.
2. Retirer le surnageant et resuspendre les sporozoïtes dans 25 μ L de PBS.
3. Déposer les sporozoïtes sur la lame et laisser sécher complètement (généralement toute une nuit).
4. Stocker à -20 °C ou -80 °C.

D

BIOCHIMIE : PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES, ANALYSES ET TESTS D'INTERACTIONS

D.1 Techniques générales de Biochimie

D.1.1 Gels acrylamides : SDS-page et Natif

Solutions stock et matériel

- Préparer les solutions stock de Tris à 2M et à 0,6M ($M_{Tris} = 121,135$ g/mol).

Solutions	Tris 2M	Tris 0,6M
H ₂ O	200mL	100mL
Tris	48,4g	7,3g
pH	8,9	6,8

- Acrylamide 40% : Acrylamide (Purity 99.4%) / Bis-Acrylamide 40% Sol Ratio 37,5/1 (Euromedex - Ref : EU0062-C)
- SDS 10% : SDS (>99%) 10% (Euromedex - Ref : EU0760)
- Temed : (BioRad - Ref : 1610800EDU)
- APS : Ammonium Persulfate (BioRad - Ref : 1610700)

Gel SDS-PAGE

⚠ Attention l'acrylamide est cancérigène, mutagène et reprotoxique! ⚠

- Gel de séparation :

Tableau D.1 | SDS-Page – gel de séparation

	12% separating gel				18% separating gel		
	1 gel	2 gels	4-6 gels		1 gel	2 gels	4-6 gels
2 M Tris pH 8.9	940µL	1.88mL	3.8mL	2 M Tris pH 8.9	940µL	1.88mL	3.8mL
40% acrylamide	1.55mL	3.12mL	6.2mL	40% acrylamide	2.23mL	4.45mL	8.9mL
H ₂ O	2.5mL	5mL	10mL	H ₂ O	1.8mL	3.7mL	7.3mL
10% SDS	50µL	100µL	200µL	10% SDS	50µL	100µL	200µL
TEMED	6.25µL	12.5µL	25µL	TEMED	6.25µL	12.5µL	25µL
APS	50µL	100µL	200µL	APS	50µL	100µL	200µL
<i>V_{TOTAL}</i>	5mL	10mL	20mL	<i>V_{TOTAL}</i>	5mL	10mL	20mL

- Gel de *stacking* :

Tableau D.2 | SDS-Page – gel de *stacking*

	stacking gel		
	1 gel	2 gels	4-6 gels
0.6 M Tris pH 6.8	167.5µL	335µL	670µL
40% acrylamide	191µL	375µL	750µL
H ₂ O	1.49mL	3mL	6mL
10% SDS	15µL	30µL	60µL
TEMED	2.5µL	5µL	10µL
APS	30µL	60µL	120µL

Gel natif

⚠ Attention l'acrylamide est cancérigène, mutagène et reprotoxique! ⚠

- Separating Gel :

Tableau D.3 | Gel natif – Gel de séparation à gauche et de *stacking* à droite

acrylamide %	10%	12%	15%		1 gel	2 gels	4-6 gels
	0.375 M Tris-HCl pH 8.8	6.49mL	5.89mL		4.89mL	0.6 M Tris pH 6.8	167.5µL
30% acrylamide	3.4mL	4mL	5mL	40% acrylamide	191µL	375µL	750µL
10% APS	100µL	100µL	100µL	H ₂ O	1.49mL	3mL	6mL
TEMED	10µL	10µL	10µL	TEMED	2.5µL	5µL	10µL
				APS	30µL	60µL	120µL

D.1.2 Western Blot

Solutions stocks et matériel

- Tris : Tris base (Euromedex - Ref : 200923-A)
- NaCl : Sodium chloride (99,5%) (Euromedex - Ref : 1112-A)
- Glycine : Glycine for electrophoresis , $\geq 99\%$ (Sigma - Ref : G8898-1KG)
- SDS : Sodium Dodecyl Sulfate (Sigma - Ref : 11667289001)
- Glycérol : Glycerol RPE (Carlo Erba - Ref : 453752)
- β -mercaptoéthanol : 2-Mercaptoethanol $\geq 99\%$ (Sigma - Ref : M6250-100ML)
- Bleu de bromophénol : Bromophenol Blue (Sigma - Ref : B0126-25G)
- Rouge Ponceau : Ponceau S (Sigma - Ref : P3504-50G)
- Échelle : Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad - Ref : 1610374)
- Substrat HRP : Millipore Immobilon® Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck - Ref : WBKLS0500)

Tableau D.4 | TBS : Tris Buffered Saline (1L)

Tris	50mM	6.05 g
NaCl	150mM	8.76 g
<i>pH 7.4</i>		
<i>Stocker à 4 °C – 4 mois</i>		

Tableau D.5 | Tampon de SDS TrisGlycine 10× (1L)

Tris	1.25M	30.3 g
Glycine	9.60M	144 g
SDS	0.5 w/v	50 g
<i>pH 8.3</i>		

TBST : TBS + 1mL Tween-20.

Tableau D.6 | Tampon de transfert 10× (1 L)

Tris	1.25M	30.3 g
Glycine	9.60M	144 g

Tableau D.7 | Tampon de transfert 1× (1 L)

Tampon de transfert 10×	100mL
Méthanol <i>or éthanol</i>	200mL
H ₂ O	700mL
<i>Stocker à 4 °C.</i>	

Tableau D.8 | Solution de Laemmly 4× :

Tris 1M pH6.8	2.5mL
Glycerol	4 mL
SDS	0.8 g
β -mercaptoethanol	2 mL
Bleu de Bromophenol	0.01-0.02%

Migration des protéines sur gel acrylamide

1. Faire bouillir à 95 °C pendant \ominus 5-10 min les échantillons avec du tampon Laemmli.

2. Placer le gel dans la cuve et la remplir de tampon SDS.
3. Charger 5-20 μL par puit. Déposer 8 μL d'échelle.
4. Faire migrer jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel, cad 45-60min à 100V (ou 30-45min à 200V pour des gels commerciaux).

Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose

1. Découper la membrane de nitrocellulose à la taille du gel.
2. Incuber la membrane \ominus 10min dans du tampon de transfert \Rightarrow équilibration.
3. Imbiber les papiers filtres avec du tampon de transfert.
4. Rincer le gel dans du tampon de transfert.
5. Placer les papiers filtres, le gel et la membrane dans le système de transfert.

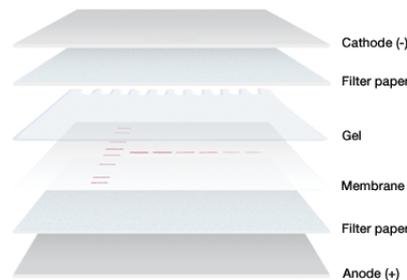


FIGURE D.1 | Gel and membrane set up for electrophoretic transfer.

6. 7 min – 15V – 0.2A *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System BioRad 1704150* OR 32 min – 15V – 0.2A.

NB : à adapter en fonction du poids des protéines à transférer.

Coloration au rouge Ponceau (optionnel)

NB : Le rouge Ponceau S est un colorant chargé négativement qui se fixe sur les charges positives des acides aminés et qui se lie de façon non covalente aux régions non polaire de la protéine. Le niveau de détection est de 100-250ng de protéine.

1. Incuber la membrane \ominus 5min dans la solution de rouge Ponceau à 0,1% + 1% d'acide acétique. (0,1g Ponceau + 1mL d'acide acétique dans 100mL H_2O).
2. Rincer à l'eau (ou à l'acide acétique 1%) et agiter jusqu'à ce que les bandes deviennent visibles.
3. Pour décolorer complètement rincer à l'eau (ou à l'acide acétique 1%) pendant \approx \ominus 15min.

Blockage

1. Laver la membrane dans du TBS-T pendant \ominus 5 min.
2. Incuber la membrane \ominus 1h à température ambiante (ou toute la nuit à 4 °C) dans une solution de blockage (5% de lait ou de BSA dans du TBS-T : 2g in 40mL).

Anticorps primaire

1. Placer la membrane dans une poche de plastique avec l'anticorps primaire.
Généralement l'anticorps est dilué au $\frac{1}{1000\text{ème}}$ \Rightarrow 1mL de solution de blockage + 1 μ L d'anticorps.
2. Incuber \ominus entre 1 heure et toute la nuit, à 4 °C avec oscillations.

Anticorps secondaire

1. Rincer la membrane 3 \times \ominus 10min dans du TBS-T.
2. Placer la membrane dans une poche de plastique avec l'anticorps secondaire.
Généralement l'anticorps est dilué au $\frac{1}{1000\text{ème}}$ \Rightarrow 1mL de solution de blockage + 1 μ L d'anticorps.
3. Incuber \ominus 1h à 4 °C avec oscillations.

Révélation

1. Rincer la membrane 3 \times \ominus 10min dans du TBS-T.
2. Incuber \ominus 2min dans 50% de réactif Luminol + 50% de solution de Peroxide.
3. Rincer et placer la membrane entre 2 feuilles de plastiques.

D.2 Production de protéines recombinantes

D.2.1 Préparation de bactéries compétentes – (Armelle Vigouroux)

Solutions et matériel

- LB : LB Broth base (Invitrogen - Ref : 12780052)
- CaCl₂ :
- Glycérol : Glycerol RPE (Carlo Erba - Ref : 453752)
- Lecteur de densité optique : BioPhotometer D30 230 V/50-60 Hz (Eppendorf – Ref : 6133000001)
- Source de chaleur :
- Incubateur : (Infors - Ref : Multitron Standard)

Préparation de la solution de calcium ($M_{CaCl_2} = 110,98\text{g/mol}$) à 50mM : diluer 1,39g dans 250mL dH₂O.

Jour 1 : Pré-culture

5 mL de milieu LB + 1 colonie \Rightarrow Incuber \ominus ON à 37 °C.

Jour 2 : Culture et perméabilisation membranaire

1. 100 mL de milieu LB + 2 mL de pré-culture \Rightarrow (DO₆₀₀=0,05).
2. Faire pousser à 37 °C jusqu'à une densité optique DO₆₀₀=0,5.
3. Séparer la culture dans des tubes stériles de 50mL et centrifuger \odot 8 000 rpm – 10 min – 4 °C
⚠ Attention à conserver toujours les bactéries dans la glace et en conditions stériles!!

4. Retirer le surnageant et ajouter $\frac{1}{2}$ du volume de CaCl_2 à 50mM préalablement refroidis dans la glace. ($M_{\text{CaCl}_2} = 110,98\text{g/mol} \Rightarrow 1.39\text{g}$ dans 250mL).
Bien resuspendre les cellules.
5. Incuber \ominus 45 min dans la glace (*au minimum*).
6. Centrifuger \odot 8 000 rpm – 10 min – 4 °C
7. Retirer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl_2 équivalent à 10 fois la DO_{600} de la culture (*ex : 5mL pour une DO_{600} de 0,5*).
8. Pour une utilisation immédiate, garder une heure dans la glace afin utilisation.
9. Pour les conserver ajouter 15% final de glycérol, aliquoter dans des tubes steriles et conserver à -80 °C.

D.2.2 Expression de protéines recombinantes en système bactérien – (Armelle Vigouroux)

Solutions et matériel

- Bactéries : produites grâce au protocole de précédent.
 - **BL21 (DE3)** : DE3 lambda lysogen \rightarrow system avec le promoteur T7 / Ion^- et ompT^- \rightarrow améliore la stabilité de la protéine.
 - **BL21Star (DE3)** : mutation de la RNaseE \rightarrow stabilise les ARNm et donc permet une meilleure expression.
 - **BL21Gold (DE3)** : phénotype Hte (high transformation efficiency) \rightarrow bactéries super compétentes.
 - **Rosetta** : Lon^- and ompT^- \rightarrow stabilité des protéines / plasmide pour les codons rares
 - **... PlysS** : expression du lysozyme T7 \rightarrow inhibition de la polymérase T7 et donc réduction des fuites d'expression de la protéine d'intérêt avant l'induction.
 - **C41** : mutations \rightarrow tolère les protéines toxiques.
 - **C43** : mutations \rightarrow tolère les protéines toxiques et permet la production de protéines membranaires.
- LB : LB Broth base (Invitrogen – Ref : 12780052)
- Ampicilline : Amipicillin sodium salt (Sigma – Ref : A9518)
- Kanamycine : Kanamycin Sulphate (Gibco – Ref : 11815-024)
- IPTG : IPTG $\geq 99\%$ (TLC) $\leq 0.1\%$ Dioxane (Sigma – Ref : I6758-10G)
- Incubateur : (Infors – Ref : Multitron Standard)
- Lecteur de densité optique : BioPhotometer D30 230 V/50-60 Hz (Eppendorf – Ref : 6133000001)
- Azote liquide :
- Bain-marie :
- Billes de Nickel : Ni Sepharose™6 Fast Flow (GE Healthcare – Ref : GE17-5318-01)
- Tampon de Leammly :
- Tris : Tris base (Euromedex – Ref : 200923-A)
- NaCl : Sodium chloride (99,5%) (Euromedex – Ref : 1112-A)
- Imidazole : (Sigma – Ref : I202-2kg)

- β -mercaptoethanol : 2-Mercaptoethanol $\geq 99\%$ (Sigma – Ref : M6250-100ML)

Tampon A :

Tableau D.9 | Tampon A :

	500mL	1L	2L
50mM Tris	3.029g	6.057g	12.114g
300mM NaCl	8.766g	17.532g	35.064g
20mM Imidazole	0.6808g	1.3616g	2.7232g

⚠ ajouter le β -mercaptoethanol (2mM) juste avant utilisation

pH 8 (⚠ doit avoir au moins 1 unité de différence avec le pI de la protéine afin d'éviter la précipitation)

Transformation

1. 50 μ L de bactéries + 1-3 μ L de plasmide ($[\approx 100\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}]$) (dans un tube de 2 mL).
2. Incuber ☉ 10-20 min à 4 °C (dans la glace).
3. Choc thermique ☉ 45-90 s à 42 °C (au bain marie).
4. +200 μ L de LB → Incuber ☉ 1h à 37 °C (au bain marie).
5. **TEST** : transférer 50 μ L de pré-culture + 1 mL de LB + 1 μ L d'antibiotique (1/1000) (tube en verre).
PROD : transférer 50 μ L de pré-culture + 50 mL LB + 50 μ L d'antibiotique (1/1000) (erlen de 250 mL).
→ Incuber ☉ ON – 37 °C – agitation 180 rpm.

NB : Faire des stock glycérol : 300 μ L de glycérol à 50% + 700 μ L de pré-culture ⇒ stocker à -80 °C.

Induction

Test

1. Dans un erlenmeyer de 250 mL :
10mL LB + 10 μ L d'antibioque (1/1000) + 200 μ L de pré-culture.
→ Incuber ☉ 2h – 37 °C – 180 rpm.
2. Mesurer la DO₆₀₀ si $\geq 0,4$ A → induire.
3. + 10 μ L IPTG → [0,5 mM]_{final}.
4. Incuber ☉ ON – 180 rpm – 20 °C **ou** ☉ 5h – 180 rpm – 28 °C **ou** ☉ 3h – 180 rpm – 37 °C.

Production

1. Dans un erlenmeyer de 2L :
1L LB + 1mL d'antibiotique (1/1000) + 12mL de pré-culture.
→ Incuber ☉ 2h – 37 °C – 180 rpm.
2. Mesurer la DO₆₀₀ si $\geq 0,4$ A → induire.
3. + 1mL IPTG → [0,5 mM]_{final}.
4. Incuber ☉ ON – 180 rpm – 20 °C **ou** ☉ 5h – 180 rpm – 28 °C **ou** ☉ 3h – 180 rpm – 37 °C.

Lyse et Purification

Test

1. Centrifuger la culture \odot 5 000 rpm – 8 min – 4 °C
2. Jeter le surnageant.
Resuspendre le culot dans 400 μ L de tampon A.
3. Faire 5 cycles de congélation/décongélation à l'azote puis au bain marie à 37 °C.
--> Prélever 5 μ L avant de centrifuger (= "Total") + 15 μ L H₂O + 5 μ L Laemmly 4x – 10min at 90 °C.
4. \odot 14 000 rpm – 30 min – 4 °C.
--> Prélever 5 μ L du culot (= "Culot") + 5 μ L Laemmly 4x – 10min 90 °C.
--> Prélever 5 μ L du surnageant (= "Surnageant") + 5 μ L Laemmly 4x – 10min 90 °C.
5. Laver des billes de nickel (\approx 10-15 μ L) 3 fois dans du tampon A.
Incuber le surnageant avec les billes de nickel \odot 4 °C – 10min – rotation.
6. Centrifuger \odot 5 000 rpm – 2 min – 4 °C.
7. Jeter le surnageant et ajouter 400 μ L A Buffer pour laver ce qui ne s'est pas accrocher aux billes.
 \odot V_{max} – few seconds – RT .
 \times 3 cycles.
8. Jeter le surnageant et ajouter 5 μ L Laemmly 4x – 10min 90 °C.
9. Analyser les échantillons recueillis sur gel SDS-page.

D.2.3 Protein Expression in Insect Cells Infected with Baculovirus – (Stéphane Petres)

- **Sf 9** : Ovarian cell line derived from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* – Recommended for transfection, amplification of viruses, and expression of recombinant proteins.
- **pAcGP67B** : Baculovirus transfer vector (*BD Biosciences*) for secreted protein expression. The cloned gene is under the control of the polh promoter and fused to the GP67 (envelope surface glycoprotein of AcNPV) secretion signal sequence to transport the recombinant protein into the secretory pathway.
- **Media** : Insect XPRESS protein free (*Lonza Cat.No. 12-730*). Complemented with 5% SVF and gentamycin ($c_f=50\mu\text{g/mL}$).

Solutions et matériel

- Bleu trypan : TC10 Trypan Blue Dye (BioRad - Ref : 145- 0021)
- Compteur de cellules : TC10 Automated Cell Counter (BioRad - Ref : 145-0001)
- Lame pour compteur de cellules : TC10 Counting Slides (BioRad - Ref : 145- 0015)
- Milieu IXP : Insect XPRESS protein free (Lonza - Ref :12-730)
- ADN baculogold : (*linearized Best Bac 2 (or Baculogold) virus DNA*)
- Cellfectine : Cellfectin™ II Reagent (ThermoFisher - Ref :10362100)
- Flasque T25 :

- Plaque p96 à font plat :
- Centrifugeuse (500mL) :
- Concentrateur : ÄKTAflux (Äkta - Ref : 29038437)

Culture en suspension de cellules Sf9 non infectées

1. Vérifier l'aspect des cellules au microscope.
2. Compter le nombre de cellules Sf9 en suspension : Mélanger 30µL cellules + 30µL bleu trypan et déposer sur une lame de comptage.
Analyser la lame dans le compteur de cellules BioRad → l'analyse donne le nombre de cellules et le pourcentage de cellules vivantes.
3. Diluer la culture en fonction du nombre de jours souhaité.

Jours 1-7 : Transfection de cellules Sf9 cells avec le vecteur d'expression

NB : Préparer un contrôle avec juste des cellules Sf9 et du milieu.

1. Dans une flasque T25 placer 3×10^6 cellules dans 1,5mL de milieu IXP.
Incuber ☉ 30min à température ambiante pour laisser les cellules adhérer.
→ Vérifier par microscopie que les cellules ont adhéré.
2. Préparer la solution de transfection dans un tube eppendorf :
 - 500µL de milieu IXP (*NB : IXP est un milieu sans protéine pour améliorer la transfection*).
 - 5µg d'ADN plasmidique.
 - 500-400ng d'ADN baculogold (5µL)
 - 9µL de cellfectine *NB : Bien homogénéiser la cellfectine avant utilisation*
3. Incuber 15-30min à température ambiante.
4. Lorsque les cellules ont adhéré retirer le surnageant.
Déposer goutte à goutte la solution de transfection dans la flasque et ajouter 1mL de milieu IXP.
5. Incuber ☉ 5h à 28 °C.
6. Jeter le surnageant et ajouter 5mL de milieu IXP avec serum et gentamycin (5% SVF + 50µg/mL gentamycine).
7. Incuber ☉ 7jours à 28 °C que le virus se développe.
8. Vérifier l'infection des cellules au microscope (*les cellules infectées sont plus grosses, plus brillantes et pigmentées*).
9. Collecter le surnageant dans un flacon 15mL.
Centrifuger ☉ 1 200g - 10min - 4 °C.
Transférer le surnageant dans un nouveau tube et jeter le culot.
10. Stocker le surnageant à 4 °C ⇒ Stock P₀.

Jours 7-14 : Amplification du virus

1. Ensemencer une flasque T25 avec 5×10^6 cellules Sf9 dans 2mL de milieu IXP.
Incuber ☉ 15-30min à température ambiante pour laisser les cellules adhérer.
2. Ajouter 100 μ L de virus (stock Po).
Incuber ☉ 1h30 à 28 °C.
3. Ajouter 2,9mL de milieu IXP avec serum et gentamycine (5% SVF + 50 μ g/mL gentamycine).
Incuber ☉ 7 jours à 28 °C.
4. Vérifier l'infection des cellules au microscope.
5. Collecter le surnageant dans un flacon 15mL.
Centrifuger ☉ 1 200g - 10min - 4 °C.
Transférer le surnageant dans un nouveau tube et jeter le culot.
6. Stocker le surnageant à 4 °C.

Jours 14-21 : Dilution limite

1. Préparer une dilution de cellules à 500 000 cellules/mL.
2. Dans 2 plaques P96 à font plat déposer 50 μ L de la solution de cellules (\rightarrow 25 000 cellules/puit).
3. Préparer les dilutions de virus :
 - (a) Préparer 8 tubes avec 5mL de milieu IXP avec serum et gentamycine (5% SVF + 50 μ g/mL gentamycine).
 - (b) Ajouter 500 μ L du stock de virus P1 dans le tube 1.
 - (c) Bien homogénéiser et prélever 500 μ L du tube 1 pour l'ajouter au tube 2.
 - (d) Répéter ainsi jusqu'au tube 8.
4. Ajouter 150 μ L de dilution de virus par puit selon le schéma D.2.
5. Incuber ☉ 7 jours à 28 °C en atmosphère humide (boite avec compresse imbibée d'eau).

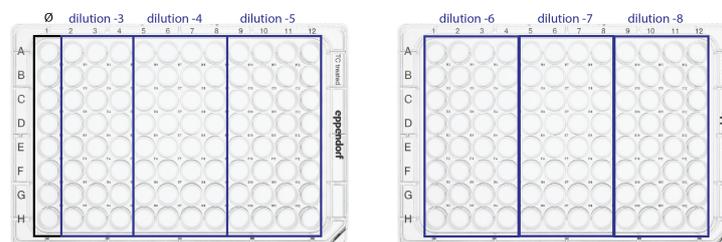


FIGURE D.2 | Organisation des plaques P96 lors de la dilution limite des cellules Sf9 infectées.

Jours 21-28 : Isolement de clones positifs et amplification

1. Observer au microscope et déterminer les puits infectés et où se fait la dilution limite.
2. Parmi les clones de la dilution limites choisir 4 puits où les virus ne semblent dériver que d'un clone.

3. Dans 4 flasques T25 déposer 5×10^6 cellules/flasque dans 2mL de milieu IXP.
Ajouter 100 μ L de virus par flasque (1 clone par flasque).
Incuber \oplus 1h30 à 28 °C.
4. Ajouter 3mL de milieu IXP avec serum et gentamycine par flasque (5% SVF + 50 μ g/mL gentamycine).
Incuber \oplus 7jours à 28 °C.
5. Vérifier l'infection des cellules au microscope.
6. Collecter le surnageant dans un flacon 15mL.
Centrifuger \odot 1 200g - 10min - 4 °C.
Transférer le surnageant dans un nouveau tube et jeter le culot.
7. Stocker le surnageant à 4 °C.

Jours 28-31 : Test de production de la protéine d'intérêt

À réaliser pour chaque clone.

1. Dans une flasque T25 ajouter 5×10^6 cellules Sf9 dans 1,5mL de milieu IXP.
Ajouter 500 μ L de virus.
Incuber \oplus 1h30 à 28 °C.
2. Ajouter 3mL de milieu IXP avec gentamycine (50 μ g/mL) (**SANS SERUM!**).
Incuber \oplus 3jours à 28 °C.
3. Vérifier l'infection des cellules au microscope.
4. Collecter le surnageant dans un flacon 15mL.
Centrifuger \odot 1 200g - 10min - 4 °C.
Transférer le surnageant dans un nouveau tube et jeter le culot.
5. Analyser sur gel acrylamide 20-30 μ L de surnageant et quelques μ L de culot par clone.
6. Réaliser un western-blot ciblant le tag de la protéine pour vérifier la présence de la protéine attendue.

Jours 32-39 : Première amplification viral d'un clone produisant la protéine ($V_{final}=25\text{mL}$)

1. Dans une flasque T150 ajouter 30×10^6 cellules Sf9 dans 7mL de milieu IXP.
Ajouter 200 μ L de virus.
Incuber \oplus 1h30 à 28 °C.
2. Ajouter 18mL de milieu IXP avec serum et gentamycine (5% SVF + 50 μ g/mL gentamycine).
Incuber \oplus 7jours à 28 °C.
3. Vérifier l'infection des cellules au microscope.
4. Collecter le surnageant dans un flacon 50mL.
Centrifuger \odot 1 200g - 10min - 4 °C.
Transférer le surnageant dans un nouveau tube et jeter le culot.
5. Stocker le surnageant à 4 °C \Rightarrow Stock P₁.

Jours 39-46 : Première amplification viral d'un clone produisant la protéine ($V_{final}=500\text{mL}$)

1. Centrifuger \odot $1,5 \times 10^9$ cellules Sf9 à 1 200rpm - 5min - 4 °C.
2. Jeter le surnageant et resuspendre les cellules dans 100mL de milieu IXP.
Ajouter 5mL de virus (stock P₁).
Incuber \ominus 1h30 à température ambiante avec agitation (\Rightarrow pour permettre aux virus d'infecter les cellules).
3. Transférer dans un erlenmeyer de 2L et compléter jusque 500mL avec du milieu IXP avec serum et gentamycine (5% SVF + 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycine).
Incuber \ominus 7jours à 28 °C.
4. Collecter le surnageant.
Centrifuger \odot 1 200g - 10min - 4 °C.
Transférer le surnageant dans un nouveau tube et jeter le culot.
5. Stocker le surnageant à 4 °C \Rightarrow Stock P₂.

Jours 46-53 : Titration du stock viral P₂

1. Préparer une dilution de cellules à 500 000 cellules/mL.
2. Dans 2 plaques P96 à font plat déposer 50 μL de la solution de cellules (\rightarrow 25 000 cellules/puit).
3. Préparer les dilutions de virus :
 - (a) Préparer 8 tubes avec 5mL de milieu IXP avec serum et gentamycine (5% SVF + 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycine).
 - (b) Ajouter 500 μL du stock de virus P₁ dans le tube 1.
 - (c) Bien homogénéiser et prélever 500 μL du tube 1 pour l'ajouter au tube 2.
 - (d) Répéter ainsi jusqu'au tube 8.
4. Ajouter 750 μL de dilution de virus par puit selon le schéma D.3.
5. Incuber \ominus 7jours à 28 °C en atmosphère humide (boite avec compresse imbibée d'eau).

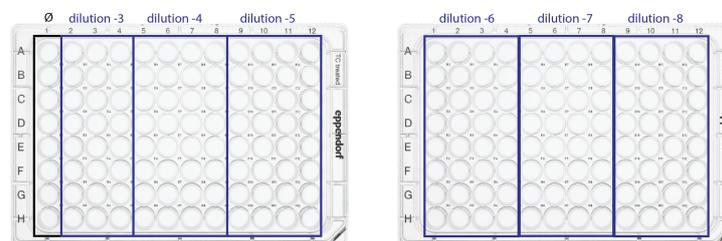


FIGURE D.3 | Organisation des plaques p96 lors de la titration des cellules Sf9 infectées.

6. Observer au microscope et déterminer les puits infectés et où se fait la dilution limite.
7. Calculer le titre du stock viral :

$$\text{Titre (pfu/mL)} = \frac{\text{nombre de puits positifs}}{\text{volume des 3 colonnes (= 3,6 mL)}} \times \text{dilution}$$

Production de la protéine recombinante (500mL)

1. Centrifuger \odot $1,5 \times 10^9$ cellules Sf9 à 1 200rpm - 5min - 4 °C.
2. Jeter le surnageant..
Ajouter $7,5 \times 10^9$ virus (stock P₂) \Rightarrow MOI = 5 virus/cellule.
Resuspendre les cellules.
Incuber \oplus 1h30 à température ambiante avec agitation (\Rightarrow pour permettre aux virus d'infecter les cellules).
3. Centrifuger \odot 1 200rpm - 5min - 4 °C (\Rightarrow pour retirer l'excédent de virus qui n'a pas infecté de cellule et le sérum).
4. Transférer dans un erlenmeyer de 2L et compléter jusque 500mL avec du milieu IXP et gentamycine (50µg/mL gentamycine) SANS SERUM.
Incuber \oplus 3jours à 28 °C avec 85rpm d'agitation.
5. Collecter le surnageant.
Centrifuger \odot 4 000rpm - 30min - 4 °C.
6. Récupérer le surnageant et le concentrer sur l'ÄktaFlux :
 - (a) Changer le filtre en fonction de la taille de la protéine.
 - (b) Équilibrer avec dH₂O 2×.
 - (c) Passer l'échantillon
 - (d) Nettoyer avec NaOH 1M puis dH₂O et enfin stocker en EtOH 20%.
7. Purifier ensuite la protéine en fonction de sont tag.

D.2.4 Expression de protéines recombinantes en E. coli de type Shuffle – (Arnaud Chenes)

Solutions et matériel

- Bactéries : SHuffle® Express Competent *E. coli* (NewEngland - Ref :C3028)
- Milieu LB :
- Milieu SOC : SOC medium Invitrogen™ (ThermoFisher - Ref : 15544034)
- Ampiciline :
- PBS : Phosphate Buffered Saline pH 7,4 (1X) (Gibco - Ref : 10010-015)

Préparation des boîtes de pétries :

\triangle Travailler dans un environnement stérile.

1. Faire fondre le LB-Agar au micro-onde.
2. Laisser le revenir à température ambiante puis ajouter l'antibiotique (diluer au 1/1000 la solution stock).
3. Couler le LB dans les boîtes 10-20mL par boîte de pétrie.
4. Laisser sécher jusqu'à solidification de l'agar en conditions stériles.
NB : les boîtes peuvent se conserver environ 1 mois à 4 °C

Transformation

⚠ Travailler dans un environnement stérile.

1. Décongeler *E.coli SHuffle* sur la glace.
2. Dans un tube eppendorf placer 50µL de bactéries.
Ajouter 100ng de plasmide.
Incuber ⊕ 30min sur la glace.
3. Choc thermique : ⊕ 45sec à 42 °C → puis placer immédiatement dans la glace pendant ⊕ 2min.
4. Ajouter 250µL de milieu SOC (sans antibiotiques).
Incuber ⊕ 1h à 30 °C.
5. Étaler sur une boîte de pétrie à l'aide de râpeaux.
Incuber ⊕ à 30 °C toute la nuit.
NB : Lorsque les colonies ont poussées, les boîtes peuvent être stockées à 4 °C.

Expression

⚠ Travailler dans un environnement stérile.

1. Repiquer une colonie dans 1mL de milieu LB + ampicilline.
Incuber ⊕ à 30 °C toute la nuit avec agitation.
2. Augmenter progressivement la culture (dilution 1/10 à chaque fois) dans du milieu LB + ampicilline jusqu'à 500mL. 1mL → 10mL → 100mL → 500mL.
Incuber à chaque fois à 30 °C avec agitation.
3. Lorsque la culture finale atteint une densité optique $DO_{600}=1,2 \Rightarrow$ induire avec 0,2mM d'IPTG.
Incuber ⊕ 16h à 20 °C avec agitation.
4. Centrifuger ⊖ 4 000 rpm - 20min - 4 °C.
5. Resuspendre le culot bactérien dans 40mL de PBS.
Stocker à -20 °C.

D.3 Purification de protéines recombinantes

D.3.1 Purification de protéines portant un tag 6 Histidines

Solutions et matériel

- Tris : Tris base (Euromedex - Ref : 200923-A)
- NaCl : Sodium chloride (99,5%) (Euromedex - Ref : 1112-A)
- Imidazole : (Sigma - Ref : I202-2kg)
- β-mercaptoethanol :
- inhibiteurs de protéases :
- EtOH :
- filtres : 0,22µm GP Millipore Express(R) PLUS Membrane 250mL (Merck - Ref : SCGPU02RE)

- sonicateur :
- Äkta : AKTA pure 25 M (GE Healthcare - Ref : 29-0182-26)
- colonne HisTRAP : HisTrap HP, 5 × 5 ml (GE Healthcare - Ref : 17-5248-02)
- colonne S200 : HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare - Ref : 28989336)

Tableau D.10 | Tampon A et Tampon B de purification sur colonne Nickel.

N'ajouter le β -mercaptoethanol que si la protéine contient des cystéines afin de limiter l'oxydation. Le pH du tampon doit avoir au moins une unité de différence avec le pI de la protéine.

Tampon A	Concentration	1L	2L	Tampon B	Concentration	500mL	1L
TrisHCl	50mM	6.057g	12.114g	TrisHCl	50mM	3.029g	6.057g
NaCl	300mM	17.532g	35.064g	NaCl	300mM	8.766g	17.532g
Imidazole	20mM	1.3616g	2.7232g	Imidazole	300mM	10.212g	20.424g
Δ Ajouter le β -mercaptoethanol juste avant utilisation				Δ Ajouter le β -mercaptoethanol juste avant utilisation			
β -mercaptoethanol (14M)	2mM	140μL	280 μ L	β -mercaptoethanol (14M)	2mM	70μL	140 μ L
Stocker à 4 °C				Stocker à 4 °C			

Lyse des bactéries et préparation de l'échantillon

1. Resuspendre le culot bactérien dans du tampon A (25-200mL en fonction de la taille du culot) sur de la glace.
2. Ajouter des inhibiteurs de protéases.
3. Sonication pour lyser les cellules :
Placer la solution bactérienne dans un bécher dans la glace.
Amplitude 35% – 6 min – Pulse ON \odot 10s – Pulse OFF \ominus 10s.
4. Centrifuger \odot 25 000 g – 30 min – 4 °C.
5. Filtrer le surnageant à 0,45 μ m.

Purification par affinité sur colonne HisTrap HP

Caractéristiques colonnes (de 5mL)l :

$P_{max} = 0,3MPa$

$Flux = 5mL/min$

$Flux_{Max} = 20mL/min$

1. Placer la pompe A dans le tampon A et la pompe B dans le tampon B et faire un lavage des pompes.
2. Équilibration de la colonne : faire passer 25mL (5 volume de colonne) de tampon A.
3. Lorsque le système est équilibrer (faire un AutoZéro).
Placer la pompe à échantillon dans le lysat bactérien.
Arrêter la pompe à tampon et activer la pompe à échantillon en basculant la vanne en mode charge. Activer le détecteur d'air.

4. Lorsque l'échantillon a été totalement chargé arrêter la pompe d'échantillon et relancer la pompe de tampon en tampon A.
Laver la colonne avec du tampon A jusqu'à ce que la ligne d'UV se stabilise entre 100 et 0 mAU.
5. Éluer la protéine avec le tampon B.
Si c'est la première purification, procéder à l'élution par étape (20% puis 40%, 80% et 100% de tampon B).
Sinon éluer directement à la concentration de tampon B adéquate.
Collecter les fractions lorsque la mesure de l'UV₂₈₀ commence à augmenter.
6. Stockage de la colonne :
 - (a) Rincer avec 25mL de dH₂O.
 - (b) Rincer avec 25mL d'EtOH 20% et stocker la colonne dans l'EtOH 20%.

Purification par exclusion de taille sur colonne Superdex 200 10/30

Caractéristiques colonnes :

$P_{max} = 1,5MPa$

$Flux = 2,6mL/min$

$Flux_{Max} = 4,4mL/min$

$V_{colonne} = 350mL$

1. Équilibrer la colonne avec 350mL de tampon A.
2. Charger la protéine (1,5 à 12,8μL) dans une seringue avec aiguille de charge.
Placer une boucle adaptée au volume de la protéine sur l'Äkta et mettre le système sur *Load*.
Injecter la protéine dans la boucle grâce à la seringue et laisser la seringue sur le système (*pour éviter les bulles d'air*).
3. Faire basculer le système sur *Inject* et faire passer 1mL de tampon A avant de repasser sur *Load*.
4. Surveiller l'apparition du pic d'UV₂₈₀ et collecter la protéine.
5. Analyser les différentes fractions collectées sur gel acrylamide.

D.3.2 Purification de protéines portant une étiquette Strep

Solutions et matériel

- Solution de Tris pH8 :
- Avidine :
- Filtre 0,22 : 0,22μm GP Millipore Express(R) PLUS Membrane 250mL (Merck - Ref : SCGPU02RE)
- TrisHCl :
- NaCl :
- EDTA :
- desthiobiotine :
- HABA :
- Äkta :
- StrepTRAP HP : (Ge Healthcare - Ref : 28-9075-46)

Tableau D.11 | Tampons pour purification StrepTag

A (sample)	B (elution)	R (regeneration)
10mM TrisHCl pH8	10mM TrisHCl pH8	-
150mM NaCl	150mM NaCl	-
1mM EDTA	1mM EDTA	-
-	2,5mM desthiobiotine	1mM HABA

Péparation de l'échantillon

1. Ajouter $\frac{1}{10^{ème}}$ de Tris pH8 ($\rightarrow C_f=100mM$).
2. Ajouter $1\mu L/1mL$ d'avidine ($C_i=15mg/mL$)
3. Centrifuger \odot 20 000rpm - 30min - 4 °C.
4. Filtrer le surnageant à $0,22\mu m$.

Purification par affinité sur colonne StrepTrap HP

Caractéristiques colonnes (1mL) :

$P_{max}= 0,5MPa$

$Flow = 1mL/min$

$Flow_{Max} = 4mL/min$

1. Placer la pompe A dans le tampon A et la pompe B dans le tampon B. Faire un lavage des pompes.
2. Équilibration de la colonne : faire passer 5mL de tampon A.
3. Lorsque le système est équilibrer (faire un AutoZéro).
4. Placer l'échantillon dans la pompe d'échantillon.
Charger l'échantillon à $0,5mL/min$ jusqu'à ce que le détecteur d'air se déclenche.
5. Laver la colonne avec du tampon A jusqu'à ce que la ligne d'UV se stabilise entre 100 et 0 mAU.
6. Éluer la protéine avec le tampon B.
Si c'est la première purification, procéder à l'élution par étape (20% puis 40%, 80% et 100% de tampon B).
Sinon éluer directement à la concentration de tampon B adéquate.
Collecter les fractions lorsque la mesure de l'UV₂₈₀ commence à augmenter.
7. Régénération de la colonne :
 - (a) Faire passer 10mL de Tampon R.
 - (b) Rincer avec 15-20mL d'EtOH 20% et stocker la colonne dans l'EtOH 20%.

D.3.3 Purification de protéines portant un tag MBP

Solutions et matériel

- PBS (10x) :
- Maltose :

- MBPTrap HP : MBPTrap HP, 5 x 1 ml (GE Healthcare - Ref :28918778)
- colonne Szoo : Superdex™ 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare - Ref : 28-9909-44)
- Äkta :
- French Press :
- Centrifugeuse :

Lyse des bactéries et préparation de l'échantillon

1. Préparer les tampons :
 - (a) Diluer 100mL de PBS 10 × dans 900mL H₂O.
 - (b) Pour préparer la solution de maltose à 10mM : dissoudre 0,72g de maltose dans 200mL de PBS.
2. Décongeler les bactéries au bain-marie à 37 °C.
3. Lyser les bactéries à la French Press :
 - (a) Brancher le système et le laver 2 × au PBS.
 - (b) Passer l'échantillon à 80bar 3×.
 - (c) Rincer le système 2 × avec de l'eau.
 - (d) Rincer le système 2 × avec de l'éthanol 20% et le laisser dans de l'éthanol. Débrancher le système.
4. Centrifuger \odot 14 000 rpm - 20min - 4 °C.
5. Filtrer le surnageant à 0,22µm.

Purification par affinité sur colonne MBPTrap HP

Caractéristiques colonnes :

$P_{max} = 0,3MPa$

$Flow = 1mL/min$

$Flow_{Max} = 4mL/min$

1. Placer la pompe A dans du PBS et la pompe B dans du maltose 10mM et faire un lavage des pompes.
2. Équilibration de la colonne : faire passer 5-10mL de PBS.
3. Lorsque le système est équilibrer (faire un AutoZéro).
Mettre sur pause et placer la pompe A dans l'échantillon à charger sur la colonne.
Remettre le système en route avec un débit de 0,5mL/min.
4. Lorsque l'échantillon a été totalement chargé remettre sur pause et replacer la pompe A dans du PBS.
Laver la colonne avec du PBS jusqu'à ce que la ligne d'UV se stabilise entre 100 et 0 mAU.

5. Éluer la protéine avec du maltose 10mM.
Si c'est la première purification, procéder à l'élution par étape (20% puis 40%, 80% et 100% de maltose 10mM).
Sinon éluer directement à la concentration de maltose adéquate.
Collecter les fractions lorsque la mesure de l'UV₂₈₀ commence à augmenter.
6. Régénération de la colonne :
 - (a) Faire passer 10mL de NaOH à 0,5M filtré à 0,22µm.
(△ vérifier que la soude n'a pas précipité avant utilisation)
 - (b) Rincer avec 15-20mL d'EtOH 20% et stocker la colonne dans l'EtOH 20%.

Purification par exclusion de taille sur colonne Superdex 200 10/30

Caractéristiques colonnes :

$P_{max} = 1,5MPa$

$Flow = 0,5mL/min$

$Flow_{Max} = 0,8mL/min$

$V_{colonne} = 24mL$

1. Équilibrer la colonne avec 25-30mL de PBS.
2. Charger la protéine (500µL) dans une seringue 1mL avec aiguille de charge.
Placer une boucle de 500µL sur l'Åkta et mettre le système sur *Load*.
Injecter la protéine dans la boucle grâce à la seringue et laisser la seringue sur le système (pour éviter les bulles d'air).
3. Faire basculer le système sur *Inject* et faire passer 1mL de PBS avant de repasser sur *Load*.
4. Surveiller l'apparition du pic d'UV₂₈₀ et collecter la protéine.
5. Analyser les différentes fractions collectées sur gel acrylamide.

D.3.4 Spectrométrie de masse : digestion trypsique et analyse par MALDI-TOF

Solutions et matériel

- AMBIC (Ammonium Bicarbonate) :
- matrice HCCA :
- $NH_4H_2PO_4$:
- EtOH :
- ACN :
- DTT :
- iodoacétamide :
- trypsine :
- TFA :
- scalpel :
- plaque :

- speed vac :
- hotte :
- MALDI-TOF

500mM AMBIC : 7,9 g d'AMBIC dans 200mL H₂O.

HCCA matrix : 0,7 mg/mL dans du tampon à matrice HCCA.

Tableau D.12 | Tampon à matrice HCCA

ACN	85%
H ₂ O	15%
TFA	0.1%
NH ₄ H ₂ PO ₄	1mM

Décoloration de gel coloré au Bleu de Coomassie

Allumer le bain marie à 60 °C.

1. Couper au scalpel la bande de gel contenant la protéine en cubes de 1-2 mm³.
2. Ajouter 100 µL de solution 50% EtOH/50 mM AMBIC (200µL AMBIC 500mM + 1mL EtOH 100% + 800µL H₂O).
Incuber ☉ 20min à 60 °C.
Répéter jusqu'à ce que la décoloration soit complète.
3. Retirer le surnageant et ajouter 100 µL ACN 100% puis vortexer.
Incuber ☉ 5min à température ambiante .
4. Retirer le surnageant.
Incuber ☉ 30min à température ambiante.

Réduction et alkylation

Allumer le bain marie à 56 °C.

1. Ajouter 100-150µL de solution de DTT 10mM /AMBIC 50mM (20µL DTT 500mM (ou 1.543g) + 100µL AMBIC 500mM + 880µL H₂O).
Incuber ☉ 30min à 56 °C.
2. Retirer le surnageant.
3. Ajouter 100 µL d'ACN 100% et vortexer (optional).
Incuber ☉ 5min à température ambiante .
4. Retirer le surnageant.
5. Ajouter 100-150µL d'iodoacetamide 50mM /AMBIC 50mM (9.3 g IAM + 100µL AMBIC 500mM + 900µL H₂O).
⚠ À protéger de la lumière et à préparer au dernier moment pour limiter la dégradation.
Incuber ☉ 30min à température ambiante dans l'obscurité!

6. Ajouter 100µL d'AMBIC 50mM et vortexer (*diluer au $\frac{1}{10^{ème}}$ AMBIC 500mM*).
Incuber ⊕ 10min à température ambiante.
Répéter 2 fois.
7. Retirer le surnageant.
8. Ajouter 100µL d'ACN 100% et vortexer.
Incuber ⊕ 5min à température ambiante.
9. Laisser sécher à l'air libre sous la hotte (*recouvrir de papier aluminium pour éviter les poussières*).
Incuber ⊕ 30min à température ambiante.
10. Retirer le surnageant.

Digestion trypsique

Allumer le bain marie à 37 °C.

1. Ajouter 20µL de trypsines (20ng/µL dans AMBIC 50mM/ACN 10% Δ préparer dans la glace et vérifier le pH \approx 8).
Incuber ⊕ 30min dans la glace.
2. Ajouter 10-50µL de solution AMBIC 50mM/ACN 5% (*20µL AMBIC 500mM + 10µL ACN 100% + 170µL H₂O*).
Incuber ⊕ sur la nuit à 37 °C (Δ Limiter l'évaporation).

Extraction des peptides

1. \odot Centrifuger brièvement.
2. Garder le surnageant (*contenant les peptides*) dans un nouveau tube.
3. Ajouter 50µL de solution ACN 60%/TFA 0.1% (*120µL 100% ACN + 2µL 10% TFA + 70µL H₂O*).
⊕ 10min – ultrasound.
4. Place the supernatant in the tube containing the peptides.
5. Concentrate the peptides using a speed-vac \approx 30min.
6. Resuspend the peptides with 5µL 30% ACN/ 0.1% TFA (*60µL 100% ACN + 2µL 10% TFA + 130µL H₂O*).

Drop off the sample on the chip

1. Put 1µL of sample on the AnchorChip (*MTP AnchorChip 800-384*).
2. Let it air-dry.
3. Put 1µL of HCCA matrix above the sample.
4. Let it air-dry.
5. When it is dry insert in the MALDI.

MALDI Analysis

FLEX CONTROL : MALDI control software.

- **STATUS** : laser wash control and various voltage.
- Chip recognition verification (MTP AnchorChip 800-384).
- **Method choice** :
 RP_900_4500Da.par ⇒ Positive Reflector, use for peptides between 900 and 4500 Da.
 RP_700_3500Da.par ⇒ Positive Reflector, use for peptides between 700 and 3500 Da.
 LP_5_20kDa.par ⇒ Positive Linear, use for whole protein between 5 and 20 kDa.
NB : If not enough signal → **Detection** Increase the Reflector gain (to be more sensitive) or Change the Sample rate (time between 2 images).
- **Spectrometer** : Matrix suppression → Suppress up to **650kDa** ⇒ Remove everything under 650kDa.
- **Set Up** : Laser attenuator, set 4-large ⇒ Laser width (avoid modification).
- **Sample Carrier** → **Advanced** :
 Random walk 50 shoots ⇒ Number of shoots by collection.
 Partial Sample ⊖ move around the position (use OFF to target a precise site).

1. Selectionne a method.
2. Click on the standard position, to go to this position.
3. **★Start** Collect a spectrum.
NB : If the laser is too strong, you will loose in resolution ($= \frac{\text{masse}}{\text{picwidthathalfheight}}$ ⇒ high resolution mean a thin peak.)
4. **+Add** Add a new spectrum to the previous.
 Repeat until you have enough signal.
5. **-[Σ]** : Add all the spectra.
6. Label peaks.
7. Show peak (click a little after the peak summit).
8. **Calibration** → **PeptideCalib Standard man** Correspond to peptide calibration 2 (-20 °C- drawer 2 - yellow box) → **Automatic asign** ⇒ In last fit **0.80 ppm** = precision (erreur compared to the theoretical mass).
NB : mode **Cubic enhanced** ok for peptides because enough measures, pass in linear mode if not enough measures (for ex for protein calibration).
9. **Apply**
10. **Save as**
11. Move the laser to the sample, and clear the precedent spectrum **+Clear Sum** .
12. Start a new spectrum.

FLEX ANALYSIS : MALDI analysis software.

1.  Find Mass List ⇒ Assign peaks.
2.  
 - Baseline Substraction  .
 - Smoothing  0.2m/z = smoothing window.
 - Mass List Find  for peptides, take into account the isotopic profil.
 - Signal/noise signal ajustement (6-3 is fine).

NB : Press enter to record the value.

BIOTOOLS : For Mascott analysis.

-  : Mascott.
 - Plasmodb 6.3.
 - Modif : Carbamidomethyl (C).
 - Modif : Oxidation (M).
 - Mass tool MS  (50 ppm of tolerance).
 - MH⁺.
 - monoisotopic .

 The error in ppm must be homogen.

 Do not have only 'Miss Cleavages'.

 When a peptide is oxydated, you should also have the non-oxydated.

D.3.5 ELISA

Solutions et matériel

- Plaque : Ultra high binding 4HBX flat bottom microtiter plate 96 well (Immunolon - Ref : 3855)
- Film : Polyethylene Adhesive Tape (Scapa - Ref : 1433)
- PBS : Phosphate Buffered Saline pH 7,4 (1X) (Gibco - Ref : 10010-015)
- Tween :
- BSA : Bovine Serum Albumin Fraction V (Roche - Ref : 10735094001)
- anticorps : anti-MBP(HRP) (Abcam - Ref : ab49923) ou anti-Fc(HRP) (Abcam - Ref : ab99759)
- TMB-P : TMB Peroxidase EIA Substrat Kit (BioRad - Ref : 172-1066)
- Lecteur de plaque : Microplate absorbance reader, DELFIA Platewash, PerkinElmer 1296-026

Coating

1. Diluer la protéines d'intérêt à 1µg/mL .
Homogénéiser la solution en vortexant doucement.
2. Ajouter 50-100 µL par puit.
3. Sceller la plaque et incuber ☉ toute la nuit à 4 °C.

Blocking

1. Laver 3 fois avec 250 μ L de tampon de lavage (PBS + 0,5% Tween20).
2. Ajouter 100 μ L de tampon de blockage (PBS + 2% BSA filtrée à 0,22 μ m).
3. Sceller la plaque et incuber \odot 1h à 37 °C.

Binding

1. Diluer les potentiels ligands dans du tampon de blockage (PBS + 2% BSA filtrée à 0,22 μ m). Préparer un rang de dilution de 1/2 commençant à 10 μ g/mL .
2. Ajouter 50-100 μ L par puit.
3. Sceller la plaque et incuber \odot 1h à température ambiante.

Antibody

1. Laver 3 fois avec 250 μ L de tampon de lavage (PBS + 0,5% Tween20).
2. Ajouter 50 μ L d'anticorps (1/2000 anti-MBP(HRP) ou 1/1000 anti-Fc (HRP)) dans du tampon de blockage (PBS + 2% BSA filtrée à 0,22 μ m).
3. Sceller la plaque et incuber \odot 1h à température ambiante.

Revelation

1. Laver 3 fois avec 250 μ L de tampon de lavage (PBS + 0,5% Tween20).
2. Mélanger 9mL de la solution A du kit TMB-P avec 1 mL de la solution B (\triangle protéger de la lumière).
3. Ajouter 100 μ L par puit de la solution de TMB-P obtenue, et agiter gentiment pendant le développement de la couleur pour homogénéiser le contenu des puits.
4. Développer jusqu'à l'obtention d'une couleur bleue intense. Lire la plaque à 655nm.

E

AMORCES

Tableau E.1 | Amorces utilisés lors du géotypage des parasites *Plasmodium yoelii* complémentés avec les gènes des protéines TSR de *Plasmodium berghei*.

Nom	Séquence	Tm
MGA1CTRP_For	CCA TCA AGT AGC AAA GAT TAT AAA AAG AGA AGC GGG C	63 °C
MGA1CTRP_Rev	GGA CAT GAC AGG TGT AGG CAT CCT TG	59 °C
MGA2TRAP_For	CAT TCC TAT TAA AGT TCC AGA TGT GCC	56 °C
MGA2TRAP_Rev	CAA CAA TAC CCT TTT CAT CAT CTG CC	56 °C
MGA3TLP_For	GTG GTT CTA CTA AGG ATA TTA TTA GTG C	54 °C
MGA3TLP_Rev	GCA ATA TCC TCT AAA CTT ATT ATT TTT TCG G	55 °C
MGA4MTRAP_For	CGA GTT ATT TTT GAT AAT CCT GAT TCT G	54 °C
MGA4MTRAP_Rev	CGT ACC CAT TCG ACT CAA ATG ATT CG	58 °C
MGA5CSP_For	ATT ACT TGC CGA TGC TCC CGA AGG	60 °C
MGA5CSP_Rev	AGC CAC AAC CAC AGC CAG G	55 °C
MGA6TRSP_For	TGT GCT CAA ATA ATC AAC CTG TTG C	55 °C
MGA6TRSP_Rev	GGA TCG GGT TAC TAC TAA CTC GTG	55 °C
MGA7SPATR_For	GTT TTC CAA TTG TTC TAC ACT CTG CCT C	58 °C
MGA7SPATR_Rev	TGT TTA TTA TCT ATA CAT GGT GTC CAA TCC	56 °C
MGA8TRAMP_For	TTA TTT AAT TTT AAC ATT TTA TAT TGA AGG CTT AAG	53 °C
MGA8TRAMP_Rev	AAG GAA ATT TTT TAT GCT CAG TTT GTG TGC	56 °C
MGA9SSP3_For	ATG AAA ATA AAT TGT ATC ATA GTG AAT ATA GAT CC	55 °C
MGA9SSP3_Rev	CCA TGC AAA AAT AAT AAA CGG TTC AAC C	55 °C

Tableau E.2 | Amorces utilisés lors de la construction des vecteurs permettant l'expression des protéines P36 chi-mériques.

Nom	Séquence
MG-B1_Bfor	ATT TTT TTT GCT CGA GAA AAT GAA ACA ATA TGA GTT CGC ACG CC
MG-B1_Brev	CCC TTT TAT ATA ATCACC TTC TAA ATC ATT ATT CAG CCC ATG TGC
MG-B2_Cfor	MG-Y2_Cfor
MG-B2_Crev	CCT TGC TCA CCT CGA GATC TTC TTT TGT GGA AAA AAT GTGATA TAT TGC
MG-Y1_Bfor	MG-B1_Bfor
MG-Y2_Crev	CCT TGC TCA CCT CGA GACT TGC TTT TGT GGA GAA AAT GCG
MG-Y1_Brev	CCC TTT TAT ATA ATCGCC TTC TAA ATC ATT ATT CAA TCC ATG TG
MG-Y2_Cfor	GAT TAT ATA AAA GGG TGC GAT TAT GG
MG-B2mutA_Brev	AGT ATA TTT TAC AGG TTT TGT TAA AAA TTG ATA TTT CCC TTT ATT GTT TCC
MG-B2mutA_Cfor	CCT GTA AAA TAT ACT AGT AAT CCC ATT TGT GAA ATA CAT GCA TAT CC
MG-B2mutB_Brev	ACG GGC GCC TTG CAT TTT AGT AGT ATA ATT ATT ACA ATT TAT TCC AAC
MG-B2mutB_Cfor	ATG CAA GGC GCC CGT TTA GAA CCA AAC AGT TGT TTT GGT ATG G
MG-Y2mutA_Brev	AGT ATA TTT TAT AGA TTT TGT TAA AAA TTT ATA TTT CCC TTG ATT GTT TCC
MG-Y2mutA_Cfor	TCT ATA AAA TAT ACT ATC GAT CCC ATT TGT GAA ATA GAT GCA TAT CC
MG-Y2mutB_Brev	ACT GAC GTC TTG TATTTT AGT AGT ATA ACT ATT ACA ATT TAT TCC AAC
MG-Y2mutB_Cfor	ATA CAA GAC GTC AGT TTA GAA CCA GAA GGT TGT TTT GCT ATG G

Tableau E.3 | Amorces utilisés lors du clonage des gènes optimisés pour l'expression en système bactérien de Pfp36, Pvp36, Pbp36 et Pyp36 dans le vecteur pET29.

Nom	Séquence
pbP36opti_pET29b_For	GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG CG
pbP36opti_pET29b_Rev	GGT GGT GGT GCT CGA GGT CTT CTT TCG TGG AGA AAA TAT GAT AG
pfP36opti_pET29b_For	AGA AGG AGA TAT ACA TAT GCG TAA AGT GAT CTA TTT CTT TCT GAT C
pfP36opti_pET29b_Rev	GGT GGT GGT GCT CGA GTG ATT CGA CGG TTT TAT TAA TGT TAA ACA GG
pvP36opti_pET29b_For	AGA AGG AGA TAT ACA TAT GCG TAA AGT GTT TTA TAG CCT GC
pvP36opti_pET29b_Rev	GGT GGT GGT GCT CGA GGA CTG CTT CAA CTG CGG CCG C
pyP36opti_pET29b_For	AGA AGG AGA TAT ACA TAT GCG TAA AGC ACT GTA CAG CCT GC
pyP36opti_pET29b_Rev	GGT GGT GGT GCT CGA GAG AGG CTT TGG TGC TGA AGA TGC G

Tableau E.4 | Amorces utilisés lors du clonage des gènes optimisés pour l'expression en système de cellules d'insectes infectées par baculovirus de Pfp36 et Pvp36 dans le vecteur pACgp67.

Nom	Séquence
pfP36pACgp67For	CCT TTG CGG CGG ATC GCA AGG TCA TCT AC
pvP36pACgp67For	CCT TTG CGG CGG ATC GCA AGG TGT TCT ACT CCC T
P36pACgp67Rev	GGC CGC TCC GGA ATT CTT ATT TTT CAA ACT GCG GAT GGC TCC AG

Tableau E.5 | Amorces utilisés lors du clonage des gènes optimisés pour l'expression en système bactérien de PfP36, PvP36, PbP36 et PyP36 dans le vecteur pMALc2X.

Nom	Séquence
pMALc2x-Pb36S_ For	AAG GAT TTC AGA ATT CAA AGA AAT CGA AGT TGG TAA CTA CTT CAT C
pMALc2x-Pb36L_ Rev	TTG CCT GCA GGT CGA CTT AGT CTT CTT TCG TGG AGA AAA TAT G
pMAL-pfP36_ For	AAG GAT TTC AGA ATT CAA AGA ACT GCA GGT TGG TAA CTA CTA CAT CTG C
pMAL-pfP36_ Rev	TTG CCT GCA GGT CGA CTT ATG ATT CGA CGG TTT TAT TAA TGT TAA ACA GGC CG
pMAL-pvP36_ For	AAG GAT TTC AGA ATT CAA AGA AAT TGA ACT GGG TAA CTA TTA CAT CTG C
pMAL-pvP36_ Rev	TTG CCT GCA GGT CGA CTT AGA CTG CTT CAA CTG CGG CCG C
pMAL-pyP36_ For	prendre le pbP36for
pMAL-pyP36_ Rev	TTG CCT GCA GGT CGA CTT AAG AGG CTT TGG TGC TGA AGA TGC G

Tableau E.6 | Amorces utilisés lors du séquençage des plasmides pMALc2X-P36.

Nom	Séquence
pMAL-TEV_ For	CGA ACA ACA ACA ACA ATA ACA ATA ACA ACA ACC TCG GGG AGA ATC TTT ATT TTC AGG GCA TTT CAC
pMAL-TEV_ Rev	AAT TGT GAA ATG CCC TGA AAA TAA AGA TTC TCC CCG AGG TTG TTG TTA TTG TTA TTG TTG TTG TTG TTG

F

GÈNES OPTIMISÉS POUR L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE P36

F.1 Gènes optimisés pour l'expression en système bactérien par Genscript

Les gènes ont été optimisés suivant la fréquence d'utilisation de codons par *E. coli* (figure F.1) puis produits par la société Genscript.

TTT 22.1(80995)	TCT 10.4(38027)	TAT 17.5(63937)	TGT 5.2(19138)
TTC 16.0(58774)	TCC 9.1(33430)	TAC 12.2(44631)	TGC 6.1(22188)
TTA 14.3(52382)	TCA 8.9(32715)	TAA 2.0(7356)	TGA 1.0(3623)
TTG 13.0(47500)	TCG 8.5(31146)	TAG 0.3(989)	TGG 13.9(50991)
CTT 11.9(43449)	CCT 7.5(27340)	CAT 12.5(45879)	CGT 20.0(73197)
CTC 10.2(37347)	CCC 5.4(19666)	CAC 9.3(34078)	CGC 19.7(72212)
CTA 4.2(15409)	CCA 8.6(31534)	CAA 14.6(53394)	CGA 3.8(13844)
CTG 48.4(177210)	CCG 20.9(76644)	CAG 28.4(104171)	CGG 5.9(21552)
ATT 29.8(109072)	ACT 10.3(37842)	AAT 20.6(75436)	AGT 9.9(36097)
ATC 23.7(86796)	ACC 22.0(80547)	AAC 21.4(78443)	AGC 15.2(55551)
ATA 6.8(24984)	ACA 9.3(33910)	AAA 35.3(129137)	AGA 3.6(13152)
ATG 26.4(96695)	ACG 13.7(50269)	AAG 12.4(45459)	AGG 2.1(7607)
GTT 19.8(72584)	GCT 17.1(62479)	GAT 32.7(119939)	GGT 25.5(93325)
GTC 14.3(52439)	GCC 24.2(88721)	GAC 19.2(70394)	GGC 27.1(99390)
GTA 11.6(42420)	GCA 21.2(77547)	GAA 39.1(143353)	GGA 9.5(34799)
GTG 24.4(89265)	GCG 30.1(110308)	GAG 18.7(68609)	GGG 11.3(41277)

FIGURE F.1 | Fréquence d'utilisation des codons par *E. coli*.

F.1.1 Optimisation du gène Pfp36

Optimisation de la séquence nucléotidique du gène P36 de *Plasmodium falciparum*

ATGCGTAAAGTGATCTATTTCTTTCTGATCATCTGCCTGCATTCTAACGTTGGCTGGCACCCGTTTT
 TCGTGTTTTTCTGCGGTGTGAGTGGCCTGTATGTGAAAGAACTGCAGGTTGGTAACTACTACATCTG
 CAACCTGAAAGATTACGCCAACGAAACGTGTACCGTGAACACTACGACTACAACAAAATGATCAAACCTG
 CTGTGCCCGATCAACAAAATCTTACGAAGAATACGATGACCGTTACTGTTTCAAATTCATCGGCATT
 GTGATCGCCTGGTGATCAACAATCAGGAAGAACCATTATGGACACGCTGCCGGGCATCATCATCGA
 AAACCTGAACATGTTTCGATCGCTACAACGTTGGTATTTATATGCCGTTCTACGTCAAAGAAGATATC
 ACGATTGTGTGCACCTGTGAAAGCTCTAAAGACTCCGAAAGCGATCACCCCGTACCTGAAAATCCATG
 TTAAAGCCAACAACCTCATTCAACAAAAGAAGGTGAATTTATCAAAGGTTGCGATTACGGCAACAATAA
 AGGTAAACACCAGTTTCTGACGAACACCCTGAAACAAGAAGAAAATTTCTGTGCGAAATTAACGCA
 AATCCGGGCGAAGTGGTTGGTATGAACTGTATCAACTCGAAGAATACACCACGACCACGACCATCA
 ACAACAAAAAGAAAAAACATCAGAATAAAAAACAACAAAAACAACCTTCGATGTTATCCAACCTGCGTCC
 GCCGCACTGTTTTTCGAACGTCAGTATTTCCATGTCAATTCCTGCGCGTGTGACGATGAATGTCAAC
 AATCTGCTGCCGGAAGCTAAATATTACCCGGAAGGTACAGCTTCCCAGAAAGATAAAAAATTCAGA
 AATACTCGACCATCAGCTACCTGTGGATTCCGAAACGTTCCGCATGACATTCTGTTTTACTGCCA
 CTGTAATTTCCCAGCAAGGCAAAGGTATCGGCCTGTTTAAACATTAATAAAAACCGTCAATCA

Séquence protéique de la région optimisée de la protéine P36 de *Plasmodium falciparum*

MRKVIYFFLIICLHNSVNGWHPFFVFCGVSGLYVKELQVGNYYICNLKDYANETCTVNYDYNKMIKL
 LCPINKSYEEYDDRYCFKFIGIRDRLVINNQEEMDITLPGIIENLNMFDRYNNGIYMPFYVKEDI
 TIVCTCESSKDSEAITPYLKIHKANNFNKEGEFIKGCDYGNKKGKHQFLTNTLKQEENFLCEINA
 NPGEVVMNCINFEEYTTTTINNKKKHQNKNNKNNFDVIQLRPPHCFSNVSISMSFLRVVTMNVN
 NLLPEAKYYPEVYSFPKDKKFQKYSTISYLWIPENVPHDILFYCHCNFPQGGKIGLFNINKTVES

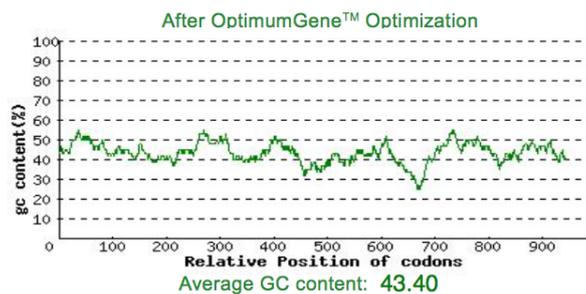


FIGURE F.2 | Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine P36. La valeur de 100 est attribuée au codon le plus utilisé par *E. coli* pour un acide aminé donné.

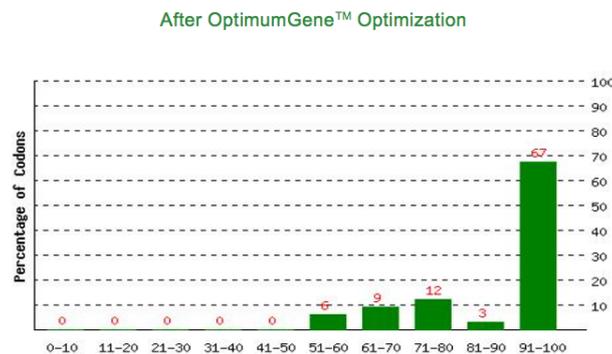


FIGURE F.3 | Ajustement de la teneur en guanosine et cytidine de la séquence de P36. Idéalement le pourcentage de GC doit être compris entre 30 et 70 %.

F.1.2 Optimisation du gène PvP36

Optimisation de la séquence nucléotidique du gène P36 de *Plasmodium vivax*

```

ATGCGTAAAGTGTTTTATAGCCTGCTGGTCTCTATTTACATCTGCCTGTGTGTGTATAGTCCGGTTT
ATTCCTGTACCTGAAAGAAATTGAACTGGGTAACATTACATCTGCAATCTGGATGACTATCCGCG
CGAATACTGTGTGGTTGATTATGACCCGAACAAAGTGATTAATTTCTGTGCCCGATCGTTCATAAT
GAAGGTGAAGAAATGAAAACCTATGATAGCTCTTACTGTTTCCGTTATAAAGGCATTAAGACCGCC
TGATTATCAGTAAACAATGAAGAACAGATCTACACCACGCTGCCGGGTATTATCCTGGAAAACCAAT
TCTGTATGATCGTTACAATCTGGGCATCTATCTGATGCCGCTGAAACTGGAAGAAGATATGTCTATT
GTCTGCGTGTGTGACACCAAGAAAAGAATACAAAGGTATCACGCCGTACATCAAAATCAACATTAATA
AATCTAACAAATCTGCTGGGCGCTGATTCTGCGGACCAGCATATTAAGGCTGCGATTTTGGTAACAA
TCAGGGCGAACACCAATTCCTGACCAACAGCCAATCTTATGAAGAAAATCTGGTGTGCGAAATTCAC
GCGAACCCGGGTGATATCGTTGGCATTAAATTGTATCAACTACAATGAAGGTGACCTGCAGAACTATG
AAGTGAAGACTGGAACCGTCAAATTTGTTTTTCGACCGTCAGTTTCTCCCTGTACACGCTGAGCTTCGT
TAAATGAACATCAACAACATCTTCCCGGATGCTCGTTATTACCCGAAAAGTTCGCGTTTCCGAAA
GACCCGAACTTCAAAAAATTCTCAACCACGTCGTACCTGTGGATTCCGGCCCATGTGCCGGAAGATT
TCTGTTTTTCTGCTCCTGTGCTACGCCAGGGCGAAGGTGTGCAATCTATCACGTGGGCTCATC
GGCGGCCGAGTTGAAGCAGTC
    
```

Séquence protéique de la région optimisée de la protéine P36 de *Plasmodium vivax*

```

MRKVFYSLVSIYICLCVYSPVYSLYLKEIELGNYYICNLDDYPREYCVVDYDPNKVIKFLCPIVHN
EGEEMKTYDSSYCFRYKGIKRLIISNNEEQIYTTLPGLIILENQILYDRYNLGIYLMPLKLEEDMSI
VCVCDTKKEYKGITPYIKINIKSNLLGADSADQHIKGCDFGNNQGEHQFLTNSQSYEENLVCEIH
ANPGDIVGINCINYNEDLQNYEVKLEPSNCFSTVSFSLYTLFSVKMNNINIFPDARYYPESSAFPK
DPNFKKFSTTSYLWIPAHVPEDFLFFCSCRYAQGEGVAIYHVGSSAAAVEAV
    
```

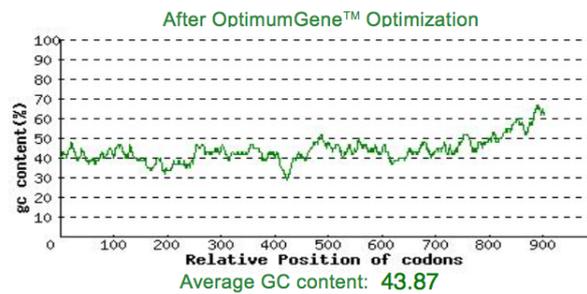


FIGURE F.4 | Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine PvP36. La valeur de 100 est attribuée au codon le plus utilisé par *E. coli* pour un acide aminé donné.

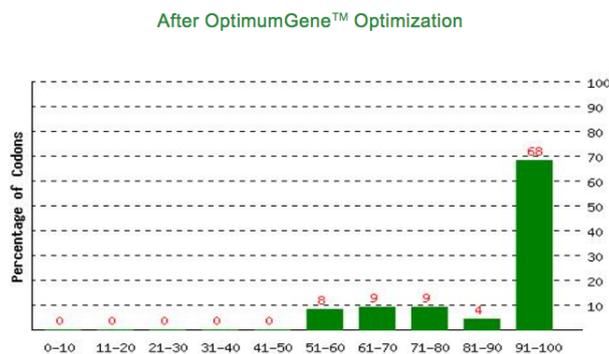


FIGURE F.5 | Ajustement de la teneur en guanosine et cytosine de la séquence de PvP36. Idéalement le pourcentage de GC doit être compris entre 30 et 70 %.

F.1.3 Optimisation du gène PbP36

Optimisation de la séquence nucléotidique du gène P36 de *Plasmodium berghei*

```

ATGCGTAAAGCACTGTACTCACTGCTGTTTTATATGTGCATCTGTCTGTACATCTACACCCCGGTGT
TCATGGCTTCGCTGAAAGAAATCGAAGTTGGTAACTACTTCATCTGCAACCTGAAAGATTATCCGAC
CGGCAACTGTTTCAGTGAATCATGACTACAACAAAACGATTAACACTGCTGTGCCCGATCATCCACAAC
AAAAACAACAGTGATAAAACCTATGACCCGTCCTACTGTTTTCAAATACGATGGTATCAAAGACGAAT
TCATCATCAACAACAAAACAGAACTACATTCATAACACCCTGCCGGGCGTTATCCTGAAAAGCCACAT
TGAAAATGATACGTACAACCTGTCTATTTATCCGCCGTTTCGTGGTTAAAGAAGATATTACCATCGTC
TGCATCTGTGACTCCGAAAAAGGCAATGAAGGTATCACGCCGTACCTGAAAATCAACATTAAGAAAAG
CGCATGGTCTGAACAATGATCTGGAAGGCGACTACATCAAAGGCTGCGATTATGGTAACAATAAAGG
CAAATACCAGTTCCTGACCAAAAAGCATCAAATACAGATCGATCCGATCTGCGAAATTCACGCCTAC
CCGGGTGACATCGTTGGCATCAACTGTAACAACACTACACCACGAAAAATCCAAGATGTCAGCCTGGAAC
CGAACTCTTGTTTTGGTATGGTGTATTTCTCTATTCTGACCATGGTCTTCGTGAAAACGAATGTTAA
CAATGTCATGCCGAACGCGAAATATTACCCGGATCTGGCCTCACATCACGGCAACCAAAAATTCGAAA
ATGTTTCTGACCCGCTACCTGCTGATCCCGAACGAAATGAACGCGATATTCTGATCTACTGCACCT
GTAGTTATAACGGCAATAAAGGTCTGGCCATCTATCATATTTTCTCCACGAAAGAAGAC
    
```

Séquence protéique de la région optimisée de la protéine P36 de *Plasmodium berghei*

```

MRKALYSLLFYMCICLYIYTPVFMASLKEIEVGNFYICNLKDYPTGNCSVNHDYNKTIKLLCPIIHN
KNSDKTYDPSYCFKYDGIKDEFIINNKNQYIHNLTLPVILKSHIENDTYNLSIYPPFVVKEDITIV
CICDSEKNEGITPYLKINIKKAHGLNNDLEGDYIKGCDYGNKNGKYQFLTYSIKYTIDPICEIHAY
PGDIVGINCNNTTKIQDVSLEPNSCFGMVYFSLTMVFKTNVNVMPNAKYYPDLASHHGNQNSK
MFLTAYLLIPNEIERDILYICTSYNGNKLAIYHIFSTKED
    
```

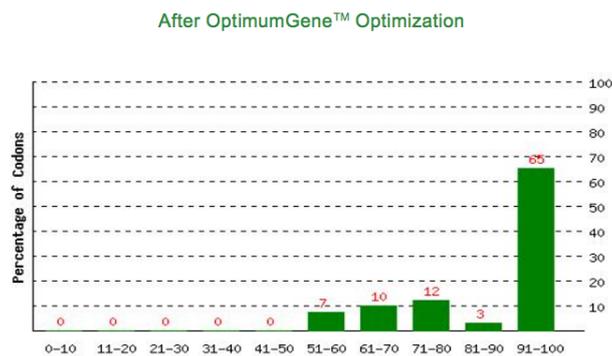


FIGURE F.6 | Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine PbP36. La valeur de 100 est attribuée au codon le plus utilisé par *E. coli* pour un acide aminé donné.

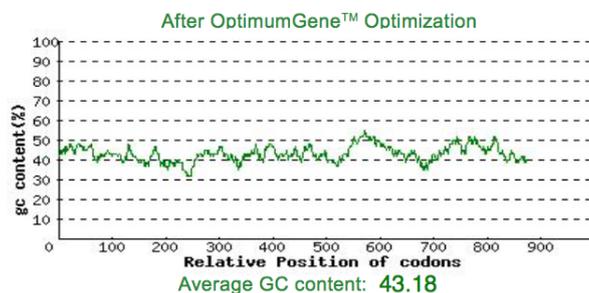


FIGURE F.7 | Ajustement de la teneur en guanosine et cytosine de la séquence de PbP36. Idéalement le pourcentage de GC doit être compris entre 30 et 70 %.

F.1.4 Optimisation du gène PyP36

Optimisation de la séquence nucléotidique du gène P36 de *Plasmodium yoeli*

```

ATGCGTAAAGCACTGTACAGCCTGCTGTTTTATATGTGCATTTGTCTGTACATCTACACCCCGGTGT
TCATGGCTAACCTGAAAGAAATCGAAGTTGGTAACTACTTCATCTGCAATCTGCGCGATTATCCGAC
GGGCAACTGTTCTGTTGATCATGACTACAACAAAACCATCAAACCTGCTGTGCCCGATCGTCAACAAC
AAAACAACTCAAAACAAAACCTACGACCCGTCGACTGTTTCAAATACGATGGTATCAAAGACGAAT
TCATCATCAACAACAAACAGGCATACATCCACAATACCCTGCCGGGCGTGATTCTGACGAACAATAT
CGAAAACGATACCTACAATCTGAGCATTATCCGCCGTTTCGTGGTTAAAGAAGATGTTACCATTGTC
TGCATCTGTGACTCTGAAAAAGGCAACGAAGGTATTACGCCGTACCTGAAAATCAACATTAAGAAAA
CCCATGGTCTGAAACAATGATCTGGAAGGCGACTACATCAAAGGCTGCGATTATGGTAACAATCAGGG
CAAATACAAATTTCTGACCAAACCGGTTAAATATACGAGTAATCCGATTTGCGAAATCGATGCCTAC
CCGGGTGACGTCGTGGGCATTAAGTGAATTCCTATACCACGAAAATGCAAGGTGCACGTCTGGAAC
CGGAAGGCTGTTTTGCTATGGTCTATTTCTCAATTCTGACCATGAAAATTCATCAAAACGAACGTGAA
CAACATCATGCCGAATGCGAAATATTACCCGGATCTGGCCTCGCACCCGGGTAACCAAAACAGTAAA
ATTTTTCTGACGTCCTACCTGCTGATCCCGAACGAAGTGGATCGTGACATTCTGATCTACTGCAATT
GTTTCATATAACGGCAATAAAGGTCTGGCGATTTATCGCATCTTCAGCACCAAAGCCTCT
    
```

Séquence protéique de la région optimisée de la protéine P36 de *Plasmodium yoeli*

```

MRKALYSLLFYMCICLYIYTPVFMANLKEIEVGNYFICNLRDYPTGNCSVDHDYDKTIKLLCPIVNN
KNNSNKTYDPSYCFKYDGIKDEFIINNKKQAYIHNTLPGVILTNNIENDTYNLSIYPPFVVKEDVTIV
CICDSEKNEGITPYLKNIKKTHGLNNDLEGDYIKGCDYGNQKGYKFLTKPKVYKTSNPICEIDAY
PGDVVGINCNSYTTKMQGARLEPEGCFAMVYFSLTMKFIKTNVNNIMPNAKYYPDLASHPGNQNSK
IFLTSYLLIPNEVDRDILIYCNSYNGNKGLAIYRIFSTKAS
    
```

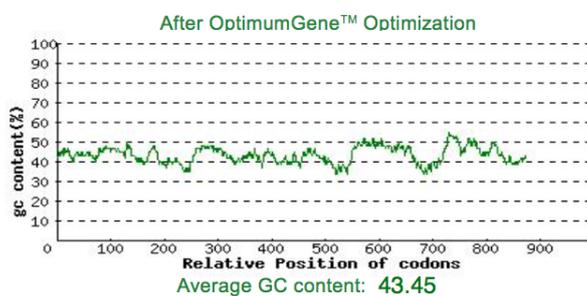


FIGURE F.8 | Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine PyP36. La valeur de 100 est attribuée au codon le plus utilisé par *E. coli* pour un acide aminé donné.

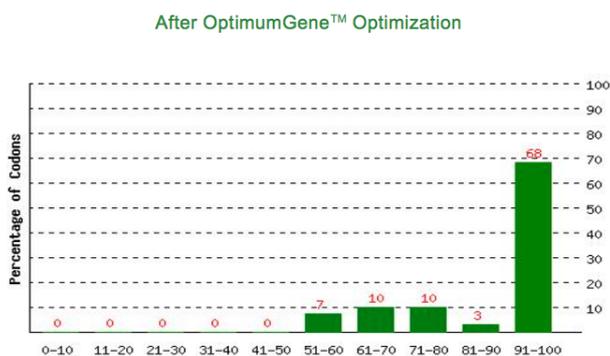


FIGURE F.9 | Ajustement de la teneur en guanosine et cytidine de la séquence de PyP36. Idéalement le pourcentage de GC doit être compris entre 30 et 70 %.

F.2 Gènes optimisés pour l'expression en système de cellules d'insectes par Genscript

Les gènes ont été optimisés suivant la fréquence d'utilisation de codons par les cellules d'insectes puis produits par la société Genscript.

F.2.1 Optimisation du gène Pfp36

Optimisation de la séquence nucléotidique du gène P36 de *Plasmodium falciparum*

```
ATGCGCAAGGTCATCTACTTCTTCTCCTGATCATCTGCCTGCACTCTAACGTCGGTTGGCACCCATTCT
TCGTGTTCTTCTGCGGTGTCTCAGGCCTGTACGTGAAGGAGCTGCAAGTCGGCAACTACTACATCTG
CAACCTGAAGGACTACGCTAACGAAGCCTGCACTGTGAAGTACGACTACAACAAGATGATCAAGCTG
CTGTGCCCTATCAACAAGGCTTACGAGGAATACGACGACCGCTACTGCTTCAAGTTCATCGGAATCC
GCGACCGTCTGGTCATCAACAACCAGGAGGAACCCATCATGGACACTCTGCCAGGCATCATCATCGA
GAACCTGAACATGTTTCGACAGGTACAACGTCGGAATCTACATGCCTTTTCTACGTGAAGGAGGACATC
ACTATCGTCTGCACCTGCGAGTCCAGCAAGGACTCCGAAGCTATCACCCCTACCTGAAGATCCACG
TCAAGGCTAACAAACGCCTTCAACAAGGAGGGCGAGTTCATCAAGGGATGCGACTACGGTAACAACAA
GGGCAAGCACCAGTTCTGACTAACACCCTGAAGCAGGAGGAAAACCTTCTGTGCGAGATCAACGCC
AACCCCGGAGAAGTGGTCGGTATGAACTGCATCAACTTCGAGGAATACACCACTACCACTACCATCA
ACAACAAGAAGAAGAAGCACCAGAACAAGAACAACAAGAACAACTTCGACGTGATCCAGCTGAGGCC
TCCCCACTGCTTCTCAACGTCGCTATCTCTATGTCATTCTGAGAGTGGTCACTATGAACGTGAAC
AACCTGCTGCCTGAGGCCAAGTACTACCCCGAAGTCTACAGCTTCCCAAAGGACAAGAAGTTCCAGA
AGTACTCCACCATCAGCTACCTGTGGATTCTGAGAACGTGCCTCACGACATCCTGTTCTACTGCCA
CTGCAACTTCCCTCAGGGCAAGGCATCGGACTGTTCAACATCAACAAGGCCGTCGAATCT
```

Séquence protéique de la région optimisée de la protéine P36 de *Plasmodium falciparum*

```
MRKVIYFFLIICLHSNVGWHPFFVFCGVSGLYVKELQVGNYYICNLKDYANEACTVNYDYNKMIKL
LCPINKAYEYDDRYCFKFIGIRDRLVINNQEEMDITLPGIIEENLNMFDRYNNGIYMPFYVKEDI
TIVCTCESSKDSEAITPYLKIHVKANNAFNKEGEFIKGCYGNKKGKHQFLTNTLKQEENFLCEINA
NPGEVVMNCINFEEYTTTTINNKKKHKQNKNNKNNFDVIQLRPPHCFNSVAISMSFLRVVTMNVN
NLLPEAKYYPEVYSFPKDKKFQKYSTISYLWIPENVPDILFYCHCNFPQGGIGLFINKAVES
```

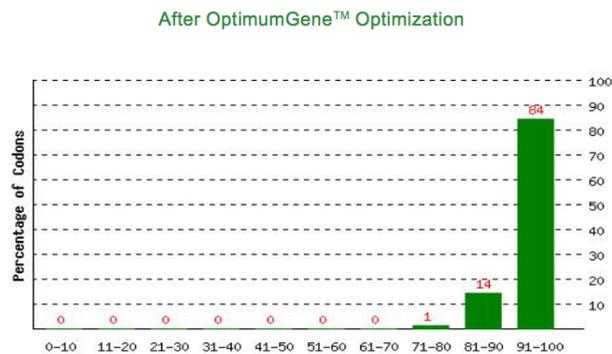


FIGURE F.10 | Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine Pfp36. La valeur de 100 est attribuée au codon le plus utilisé par les cellules d'insectes pour un acide aminé donné.

F.2.2 Optimisation du gène Pfp36

Optimisation de la séquence nucléotidique du gène P36 de *Plasmodium vivax*

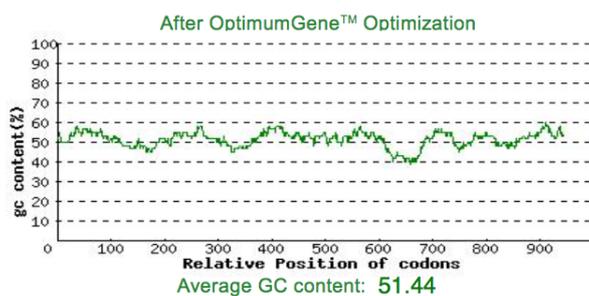


FIGURE F.11 | Ajustement de la teneur en guanosine et cytosine de la séquence de Pfp36. Idéalement le pourcentage de GC doit être compris entre 30 et 70 %.

ATGCGCAAGGTGTTCTACTCCCTGCTGGTCAGCATCTACATCTGCCTGTGCGTGTACTCTCCCGTCT
 ACTCACTGTACCTGAAGGAGATCGAACTGGGCAACTACTACATCTGCAACCTGGACGACTACCCAAG
 GGAGTACTGCGTGGTGGACTACGACCCTAACAAGTCAATCAAGTTCCTGTGCCCCATCGTCCACAAC
 GAAGGAGAGGAAATGAAAACCTACGACTCCTCCTACTGCTTCCGCTACAAGGGCATCAAGGACCGTC
 TGATCATCTCCAACAACGAGGAACAAATCTACACCACTCTGCCAGGCATCATCCTGGAGAACCAGAT
 CCTGTACGACCGCTACAACCTGGGAATCTACCTGATGCCTCTGAAGCTGGAGGAGGACATGAGCATC
 GTGTGCGTCTGCGACACCAAGAAGGAATACAAGGGAATCACTCCTTACATCAAGATCAACATCAAGA
 AGTCTAACAACTGCTGGGTGCCGACTCAGCTGACCAGCACATCAAGGGATGCGACTTCGGTAACAA
 CCAGGGCGAGCACCAGTTCCTGACTAACTCTCAGTCATACGAGGAAAACTGGTGTGCGAAAATCCAC
 GCCAACCTGGAGACATCGTCGGTATCAACTGCATCAACTACAACGAGGGTACCTGCAAACTACG
 AGGTGAAGCTGGAACCCTCCAACCTGCTTCAGCACCCTGCTCCTCAGCCTGTACACTCTGCTCCTCGT
 CAAGATGAACATCAACAACATCTTCCCCGACGCCAGTACTACCCAGAATCTTCAGCTTCCCTAAG
 GACCCCAACTTCAAGAAGTTCCTTACCCTTACATACCTGTGGATTCTGCCACGTCCTGAGGACT
 TCTGTCTTCTGCTCTTGCAGATACGCCAGGGTGAAGGCGTGGCTATCTACCACGTCGGTTCCTC
 CGCTGCTGCTGTGGAGGCTGTC

Séquence protéique de la région optimisée de la protéine P36 de *Plasmodium vivax*

MRKVFYSLVLSIYICLCVYSPVYSLYLKEIELGNYYICNLDDYPREYCVVDYDPNKVIKFLCPIVHN
 EGEMKTYDSSYCFRYKGIKDRLLIISNNEEQIYTTLPGLILENQILYDRYNLGIYLMPLKLEEDMSI
 VCVCDTKKEYKGITPYIKINIKSNLLGADSADQHIKGCDFGNNQGEHQFLTNSQS YEENLVCEIH
 ANPGDIVGINCINYNEDLQNYEVKLEPSNCFSTVSFSLYTLFVKMNNINIFPDARYYPESAFPK
 DPNFKFSTTSYLWIPAHVPEDFLFFCSRYAQGEVAIYHVGSSAAAVEAV

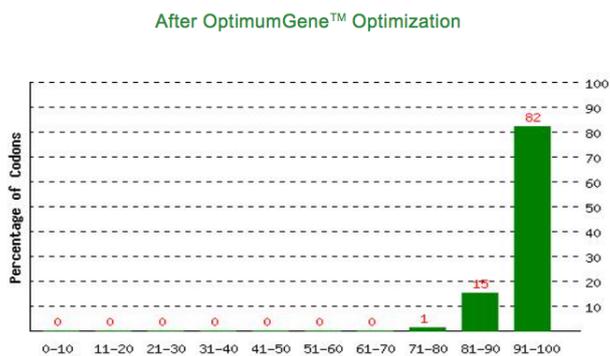


FIGURE F.12 | Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine Pfp36. La valeur de 100 est attribuée au codon le plus utilisé par les cellules d'insectes pour un acide aminé donné.

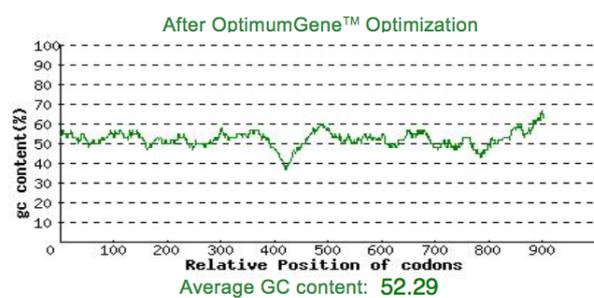


FIGURE F.13 | Ajustement de la teneur en guanosine et cytosine de la séquence de Pfp36. Idéalement le pourcentage de GC doit être compris entre 30 et 70 %.

BIBLIOGRAPHIE

- ACTON, S., RIGOTTI, A., LANDSCHULZ, K. T., XU, S., HOBBS, H. H. et KRIEGERT, M. (1996). Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science*, 271(5248):518–20.
- AIKAWA, M., ATKINSON, C. T., BEAUDOIN, L. M., SEDEGAH, M., CHAROENVIT, Y. et BEAUDOIN, R. (1990). Localization of CS and non-CS antigens in the sporogonic stages of *Plasmodium yoelii*. *Bulletin of the World Health Organization*, 68(Suppl):165–171.
- AIKAWA, M., MILLER, L. H., JOHNSON, J. et RABEGE, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *The Journal of Cell Biology*, 77(1):72–82.
- AKAZAWA, D., DATE, T., MORIKAWA, K., MURAYAMA, A., MIYAMOTO, M., KAGA, M., BARTH, H., BAUMERT, T. F., DUBUISSON, J. et WAKITA, T. (2007). CD81 Expression Is Important for the Permissiveness of Huh7 Cell Clones for Heterogeneous Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology*, 81(10):5036–5045.
- ALEXANDER, D. L., MITAL, J., WARD, G. E., BRADLEY, P. et BOOTHROYD, J. C. (2005). Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii* : A Collaboration between Distinct Secretory Organelles. *PLoS Pathogens*, 1(2):e17.
- AMINO, R., THIBERGE, S., MARTIN, B., CELLI, S., SHORTE, S., FRISCHKNECHT, F. et MÉNARD, R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, 12(2):220–224.
- ANANTHARAMAN, V., IYER, L. M., BALAJI, S. et ARAVIND, L. (2007). Adhesion Molecules and Other Secreted Host-Interaction Determinants in Apicomplexa : Insights from Comparative Genomics. *International Review Of Cytology*, 262:1–74.
- ANGEL, D. I., MONGUI, A., ARDILA, J., VANEGAS, M. et PATARROYO, M. A. (2008). The *Plasmodium vivax* Pv41 surface protein : Identification and characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(4):1113–1117.
- ANNOURA, T., PLOEMEN, I. H. J., SCHAIJK, B. C. L. V., SAJID, M., VOS, M. W., GEMERT, G.-j. V., CHEVALLEY-MAUREL, S., FRANKE-FAYARD, B. M. D., HERMSEN, C. C., GEGO, A., FRANETICH, J.-f., MAZIER, D., HOFFMAN, S. L., JANSE, C. J., SAUERWEIN, R. W. et KHAN, S. M. (2012). Assessing the adequacy of attenuation of genetically modified malaria parasite vaccine candidates. *Vaccine*, 30(16):2662–2670.
- ANNOURA, T., SCHAIJK, B. C. L. V., PLOEMEN, I. H. J., SAJID, M., LIN, J.-w., VOS, M. W., DINMOHAMED, A. G., INAOKA, D. K., RIJPMAN, S. R., GEMERT, G.-j. V., CHEVALLEY-MAUREL, S., KIE, S. M., SCHELTINGA, F., FRANKE-FAYARD, B., KLOP, O., HERMSEN, C. C., KITA, K., GEGO, A., FRANETICH, J.-f., MAZIER, D., HOFFMAN, S. L., JANSE, C. J., SAUERWEIN, R. W. et KHAN, S. M. (2014). Two *Plasmodium* 6-Cys family-related proteins have distinct and critical roles in liver-stage development. *The FASEB journal*, 28(5):2158–70.
- ARAVIND, L., IYER, L. M., WELLEMS, T. E. et MILLER, L. H. (2003). *Plasmodium* Biology : Genomic Gleanings. *Cell*, 115(7):771–785.
- ARISUE, N. et HASHIMOTO, T. (2015). Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitology International*, 64(3):254–259.
- ARREDONDO, S. A., CAI, M., TAKAYAMA, Y., MACDONALD, N. J., ANDERSON, D. E., ARAVIND, L., CLORE, G. M. et MILLER, L. H. (2012). Structure of the *Plasmodium* 6-cysteine s48/45 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17):6692–6697.
- ARREDONDO, S. A. et KAPPE, S. H. I. (2016). The s48/45 six-cysteine proteins : mediators of interaction throughout the *Plasmodium* life cycle. *International Journal for Parasitology*, 47(7):409–423.
- ARRIGHI, R. B. G. et HURD, H. (2002). The role of *Plasmodium berghei* ookinete proteins in binding to basal lamina com-

- ponents and transformation into oocysts. *International Journal for Parasitology*, 32(1):91–98.
- ASCH, A. S., BAMWELL, J., SILVERSTEIN, R. L. et NACHMAN, R. L. (1987). Isolation of the Thrombospondin Membrane Receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(4):1054–61.
- ASSOCIATION, A. M. C. (2014). Life cycle. Consulté le : 2016-04-28.
- ATAIDE, R., MAYOR, A. et ROGERSON, S. J. (2014). Malaria, primigravidae, and antibodies : knowledge gained and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 30(2):85–94.
- AURRECOECHEA, C., BARRETO, A., BASENKO, E. Y., BRESTELLI, J., BRUNK, P., CADE, S., CROUCH, K., DOHERTY, R., FALKE, D., FISCHER, S., GAJRIA, B., HARB, O. S., HEIGES, M., HERTZFOWLER, C., HU, S., IODICE, J., KISSINGER, J. C., LAWRENCE, C., LI, W., PINNEY, D. F., PULMAN, J. A., ROOS, D. S., SHANMUGASUNDRAM, A., SILVA-FRANCO, F., STEINBISS, S., STOECKERT, C. J., SPRUILL, D., WANG, H., WARRENFELTZ, S. et ZHENG, J. (2017). EuPathDB : the eukaryotic pathogenomics database resource. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):581–591.
- AURRECOECHEA, C., BRESTELLI, J., BRUNK, B. P., DOMMER, J., FISCHER, S., GAJRIA, B., GAO, X., GINGLE, A., GRANT, G., HARB, O. S., HEIGES, M., INNAMORATO, F., IODICE, J., KISSINGER, J. C., KRAEMER, E., LI, W., MILLER, J. A., NAYAK, V., PENNINGTON, C., PINNEY, D. F., ROOS, D. S., ROSS, C., STOECKERT JR, C. J., TREATMAN, C. et WANG, H. (2009). PlasmoDB : a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Research*, 37(October 2008):539–543.
- BANNISTER, L. H., HOPKINS, J. M., DLUZEWski, A. R., MARGOS, G., WILLIAMS, I. T., BLACKMAN, M. J., KOCKEN, C. H., THOMAS, A. W. et MITCHELL, G. H. (2000). *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *Journal of cell science*, 116:3825–3834.
- BANNISTER, L. H., HOPKINS, J. M., DLUZEWski, A. R., MARGOS, G., WILLIAMS, I. T., BLACKMAN, M. J., KOCKEN, C. H., THOMAS, A. W. et MITCHELL, G. H. (2003). *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *Journal of cell science*, 116(18):3825–3834.
- BANO, N., ROMANO, J. D., JAYABALASINGHAM, B. et COPPENS, I. (2007). Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. *International Journal for Parasitology*, 37(12):1329–1341.
- BARANOVA, I. N., VISHNYAKOVA, T. G., BOCHAROV, A. V., LEE-LAHAVANICHKUL, A., KURLANDER, R., CHEN, Z., SOUZA, A. C. P., YUEN, P. S. T., STAR, R. A., CSAKO, G., PATTERSON, A. P. et EGGERMAN, T. L. (2012). Class B scavenger receptor types I and II and CD36 mediate bacterial recognition and proinflammatory signaling induced by *Escherichia coli*, lipopolysaccharide, and cytosolic chaperonin 60. *The Journal of Immunology*, 188(3):1371–80.
- BARGIERI, D. Y., THIBERGE, S., TAY, C. L., PRADEL, G., LAVAZEC, C., ME, R., BARGIERI, D. Y., THIBERGE, S., TAY, C. L., CAREY, A. F., RANTZ, A. et HISCHEM, F. (2016). *Plasmodium* Merozoite TRAP Family Protein Is Essential for Vacuole Membrane Disruption and Gamete Egress from Erythrocytes. *Cell Host and Microbe*, 20(5):618–630.
- BARTHOLDSON, S. J., BUSTAMANTE, L. Y., CROSNIER, C., JOHN-SON, S., LEA, S., RAYNER, J. C. et WRIGHT, G. J. (2012). Semaphorin-7A Is an Erythrocyte Receptor for *P. falciparum* Merozoite-Specific TRAP Homolog, MTRAP. *PLoS Pathogens*, 8(11):e1003031.
- BARTOSCH, B., VITELLI, A., GRANIER, C., GOUJON, C., DUBUIS-SON, J., PASCALE, S., SCARSELLI, E., CORTESE, R. et NICOSIA, A. (2003). Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(43):41624–41630.
- BARUCH, D. I., GORMLEY, J. A., MA, C., HOWARD, R. J. et PASLOSKE, B. L. (1996). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8):3497–3502.
- BARUCH, D. I., MA, X. C., PASLOSKE, B., HOWARD, R. J. et MILLER, L. H. (1999). CD36 Peptides That Block Cytoadherence Define the CD36 Binding Region for *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *Blood*, 94(6):2121–2127.
- BAUM, J., RICHARD, D., HEALER, J., RUG, M., KRNAJSKI, Z., GILBERGER, T.-w., GREEN, J. L., HOLDER, A. A. et COWMAN, A. F. (2006). A Conserved Molecular Motor Drives Cell Invasion and Gliding Motility across Malaria Life Cycle Stages and Other Apicomplexan Parasites. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(8):5197–5208.
- BEIER, J. C., ONYANGO, F. K., KOROS, J. K., RAMADHAN, M., OGWANG, R., WIRTZ, R. A., KOECH, D. K. et ROBERTS, C. R. (1991). Quantitation of malaria sporozoites transmitted in vitro during salivation by wild Afrotropical *Anopheles*. *Medical and Veterinary Entomology*, 5(1):71–79.
- BELNOUE, E., COSTA, F. T. M., FRANKENBERG, T., VIGÁRIO, A. M., VOZA, T., LEROY, N., RODRIGUES, M. M., LANDAU, I., SNOUNOU, G. et RÉNIA, L. (2004). Protective T Cell Immunity against Malaria Liver Stage after Vaccination with Live Sporozoites under Chloroquine Treatment. *The Journal of Immunology*, 172(4):2487–95.

- BESTEIRO, S., DUBREMETZ, J.-f. et LEBRUN, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites : a key structure for invasion. *Cellular Microbiology*, 13(6):797–805.
- BESTEIRO, S., MICHELIN, A., PONCET, J., DUBREMETZ, J.-F. et LEBRUN, M. (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.
- BHANOT, P., SCHAUER, K., COPPENS, I. et NUSSENZWEIG, V. (2005). A Surface Phospholipase Is Involved in the Migration of *Plasmodium* Sporozoites through Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(8):6752–6760.
- BIOT, C., BOTTÉ, C. Y., DUBAR, F. et MARÉCHAL, É. (2012). Paludisme, Recherche de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'apicoplaste, un organite cellulaire d'origine algale. *médecine sciences*, 28(2):163–171.
- BITZEGER, J., BANKWITZ, D., HUEGING, K., HAID, S., BROHM, C., MIRJAM, B., HERRMANN, E., IKEN, M., OTT, M., BAUMERT, T. F. et PIETSMANN, T. (2010). Adaptation of Hepatitis C Virus to Mouse CD81 Permits Infection of Mouse Cells in the Absence of Human Entry Factors. *PLoS Pathogens*, 6(7):e1000978.
- BLACKLOCK, D. B. et GORDON, R. M. (1925). Malaria Infection as it Occurs in Late Pregnancy; Its Relationship to Labour and Early Infancy. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 19(3):327–364.
- BLANDIN, S., SHIAO, S.-h., MOITA, L. F., JANSE, C. J., WALTERS, A. P., KAFATOS, F. C. et LEVASHINA, E. A. (2004). Complement-Like Protein TEP1 Is a Determinant of Vectorial Capacity in the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *Cell*, 116:661–670.
- BORNSTEIN, P. et DEPARTMENTS, B. (1992). Thrombospondins : of expression. *The FASEB journal*, 6(14):3290–3299.
- BOSCH, J., BUSCAGLIA, C. A., KRUMM, B., INGASON, B. P., LUCAS, R., ROACH, C., CARDOZO, T., NUSSENZWEIG, V. et HOL, W. G. J. (2007). Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17):7015–20.
- BOUCHEIX, C. et RUBINSTEIN, E. (2014). Tetraspanins at a glance. *Journal of Cell Science*, 127(August):1–8.
- BOUCHER, L. E. et BOSCH, J. (2015). The apicomplexan glideosome and adhesins – Structures and function. *Journal of Structural Biology*, 190(2):93–114.
- BOYD, M. et KITCHEN, S. (1939). The demonstration of sporozoites in human tissues. *American Journal of Tropical Medicine*, 19(1):27–31.
- BOZDECH, Z., LLINA, M., PULLIAM, B. L., WONG, E. D., ZHU, J. et DERISI, J. L. (2003). The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum*. *Plos Biology*, 1(1):85–100.
- BROCK, T. (2008). Inflammation in atherosclerosis : Macrophage functions. consulté le 01/09/2017.
- BROOKS, S. R. et WILLIAMSON, K. C. (2000). Proteolysis of *Plasmodium falciparum* surface antigen, Pfs230, during gametogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 106:77–82.
- BRUNDERT, M., EWERT, A., HEEREN, J., BEHRENDT, B., RAMAKRISHNAN, R., GRETEN, H., MERKEL, M. et RINNINGER, F. (2005). Scavenger Receptor Class B Type I Mediates the Selective Uptake of High-Density Lipoprotein-Associated Cholesteryl Ester by the Liver in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(1):143–148.
- BUFFET, P. A., GAMAIN, B., SCHEIDIG, C., BARUCH, D., SMITH, J. D., HERNANDEZ-RIVAS, R., POUVELLE, B., OISHI, S., FUJII, N., FUSAI, T., PARZY, D., MILLER, L. H., GYSIN, J. et SCHERF, A. (1999). *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A : A receptor for human placental infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22):12743–12748.
- BULLEN, H. E., TONKIN, C. J., DONNELL, R. A. O., THAM, W.-h., PAPPENFUSS, A. T., GOULD, S., COWMAN, A. F., CRABB, B. S. et GILSON, P. R. (2009). A Novel Family of Apicomplexan Glideosome-associated Proteins with an Inner Membrane-anchoring Role. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(37):25353–25363.
- BURT, A. (2015). Heritable strategies for controlling insect vectors of disease. *Philosophical transactions of the Royal Society B*, 369(1645):20130432.
- BUSCAGLIA, C. A., COPPENS, I., HOL, W. G. J. et NUSSENZWEIG, V. (2003). Sites of Interaction between Aldolase and Thrombospondin-related Anonymous Protein in *Plasmodium*. *Molecular Biology of the Cell*, 14(12):4947–4957.
- CABRERA, A., NECULAI, D. et KAIN, K. C. (2014). CD36 and malaria : friends or foes ? A decade of data provides some answers. *Trends in parasitology*, 30(9):436–44.
- CALVO, D. et VEGA, M. A. (1993). Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(25):18929–35.
- CAO, G., GARCIA, C. K., WYNE, K. L., SCHULTZ, R. A., PARKER, K. L. et HOBBS, H. H. (1997). Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(52):33068–33076.
- CARRASCO-MARÍN, E., FERNANDEZ-PRÍETO, L., RODRIGUEZ-DEL RIO, E., MADRAZO-TOCA, F., REINHECKEL, T., SAFTIG,

- P. et ALVAREZ-DOMINGUEZ, C. (2011). LIMP-2 Links Late Phagosomal Trafficking with the Onset of the Innate Immune Response to *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(5):3332–3341.
- CARROLO, M., GIORDANO, S., CABRITA-SANTOS, L., CORSO, S., VIGÁRIO, A. M., SILVA, S., LEIRIÃO, P., CARAPAU, D., ARMAS-PORTELA, R., COMOGLIO, P. M., RODRIGUEZ, A. et MOTA, M. M. (2003). Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nature Medicine*, 9(11):1363–1369.
- CARRUTHERS, V. B. et SIBLEY, D. L. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European Journal of Cell Biology*, 73(2):114–23.
- CARTER, N., NAKAMOTO, T., HIRAI, H. et HUNTER, T. (2003). EphrinA1-induced cytoskeletal re-organization requires FAK and p130 cas. *Nature Cell Biology*, 4(8):565–73.
- CARTER, R., COULSON, A., BHATTI, S., TAYLOR, B. J. et ELLIOTT, J. F. (1995). Predicted disulphide-bonded structures for three uniquely related proteins of *Plasmodium falciparum*, Pfs230, Pfs48/45 and Pf12. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 71(2):203–210.
- CARTER, R. et MENDIS, K. N. (2002). Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4):564–594.
- CDC (2015). Malaria parasites. <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>. Dernière mise à jour le : 2015-10-27, Consulté le : 2016-02-04.
- CERAMI, C., FREVERT, U., SINNIS, P., TAKACS, B., CLAVIJO, P., SANTOS, M. J. et NUSSENZWEIG, V. (1992a). The Basolateral Domain of the Hepatocyte Plasma Membrane Bears Receptors for the Circumsporozoite Protein of *Plasmodium falciparum* Sporozoites. *Cell*, 70(6):1021–1033.
- CERAMI, C., KWAKYE-BERKO, F. et NUSSENZWEIG, V. (1992b). Binding of malarial circumsporozoite protein to sulfatides [Gal(3-SO₄)/31-Cer] and cholesterol-3-sulfate and its dependence on disulfide bond formation between cysteines in region II. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54(1):1–12.
- CHA, S.-j., PARK, K., SRINIVASAN, P., SCHINDLER, C. W., VAN ROOIJEN, N., STINS, M. et JACOBS-LORENA, M. (2015). CD68 acts as a major gateway for malaria sporozoite liver infection. *Journal of Experimental Medicine*, 212(9):1391–1403.
- CHAROENVIT, Y., LEEF, M. F., YUAN, L. F., SEDEGAH, M. et BEAUDOIN, R. L. (1987). Characterization of *Plasmodium yoelii* Monoclonal Antibodies Directed against Stage-Specific Sporozoite Antigens. *Infection and immunity*, 55(3):604–608.
- CHARRIN, S., LE NAOUR, F., SILVIE, O., MILHIET, P.-E., BOUCHEIX, C. et RUBINSTEIN, E. (2009a). Lateral organization of membrane proteins : tetraspanins spin their web. *Biochemical Journal*, 420(2):133–154.
- CHARRIN, S., MANIE, S., OUALID, M., BILLARD, M., BOUCHEIX, C. et RUBINSTEIN, E. (2002). Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions : role of palmitoylation. *FEBS letters*, 516:139–144.
- CHARRIN, S., YALAOUI, S., BARTOSCH, B., COCQUEREL, L., FRANETICH, J.-f., BOUCHEIX, C., MAZIER, D., RUBINSTEIN, E. et SILVIE, O. (2009b). The Ig Domain Protein CD9P-1 Down-regulates CD81 Ability to Support *Plasmodium yoelii* Infection. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(46):31572–31578.
- CHATTOPADHYAY, R., RATHORE, D., FUJIOKA, H., KUMAR, S., DE LA VEGA, P., HAYNES, D., MOCH, K., FRYAUFF, D., WANG, R., CARUCCI, D. J. et HOFFMAN, S. L. (2003). PfSPATR, a *Plasmodium falciparum* protein containing an altered thrombospondin Type I repeat domain is expressed at several stages of the parasite life cycle and is the target of inhibitory antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28):25977–25981.
- CHENG, Y., LU, F., TSUBOI, T. et HAN, E.-t. (2013). Characterization of a novel merozoite surface protein of *Plasmodium vivax*, Pv41. *Acta Tropica*, 126(3):222–228.
- COBURN, C. T., KNAPP, F. F., FEBBRAIO, M., BEETS, A. L., SILVERSTEIN, R. L. et ABUMRAD, N. A. (2000). Defective Uptake and Utilization of Long Chain Fatty Acids in Muscle and Adipose Tissues of CD36 Knockout Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(42):32523–32529.
- COHEN, J., NUSSENZWEIG, V., VEKEMANS, J., LEACH, A., COHEN, J., NUSSENZWEIG, V., VEKEMANS, J., LEACH, A., COHEN, J., NUSSENZWEIG, V., NUSSENZWEIG, R., VEKEMANS, J. et LEACH, A. (2010). From the circumsporozoite protein to the RTS,S/AS candidate vaccine. *Human vaccine*, 6(1):90–96.
- COMBE, A., MOREIRA, C., ACKERMAN, S., THIBERGE, S., TEMPLETON, T. J. et MÉNARD, R. (2009). TREP, a novel protein necessary for gliding motility of the malaria sporozoite. *International Journal for Parasitology*, 39(4):489–496.
- COPPI, A., NATARAJAN, R., PRADEL, G., BENNETT, B. L., JAMES, E. R., ROGGERO, M. A., CORRADIN, G., PERSSON, C., TEWARI, R. et SINNIS, P. (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):341–356.
- COPPI, A., TEWARI, R., BISHOP, J. R., BENNETT, B. L., LAWRENCE, R., ESKO, J. D., BILLKER, O. et SINNIS, P. (2007). Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to *Plasmodium* Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Host Cells. *Cell Host and Microbe*, 2(5):316–327.

- CORMIER, E. G., TSAMIS, F., KAJUMO, F., DURSO, R. J., GARDNER, J. P. et DRAGIC, T. (2004). CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19):7270–7274.
- COWAN, G., KRISHNA, S., CRISANTI, A. et ROBSON, K. J. H. (1992). Expression of thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Lancet*, 339(8806):1412–1413.
- CROMBIE, R. et SILVERSTEIN, R. (1998). Lysosomal Integral Membrane Protein II Binds Thrombospondin-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(9):4855–4863.
- DAME, J. B., WILLIAMS, J. L., MCCUTCHAN, T. F., WEBER, J. L., WIRTZ, R. A., HOCKMEYER, W. T., MALOY, W. L., HAYNES, J. D., SCHNEIDER, I., ROBERTS, D., SANDERS, G. S., REDDY, E. P., DIGGS, C. L. et MILLER, L. H. (1984). Structure of the Gene Encoding the Immunodominant Surface Antigen on the Sporozoite of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 225(4662):593–9.
- DANG, M., WANG, X., WANG, Q., WANG, Y., LIN, J., SUN, Y., LI, X., ZHANG, L., LOU, Z., WANG, J. et RAO, Z. (2014). Molecular mechanism of SCARB2-mediated attachment and uncoating of EV71. *Protein & Cell*, 5(9):692–703.
- DAO THI, V. L., GRANIER, C., ZEISEL, M. B., GUÉRIN, M., MANCIP, J., GRANIO, O., PENIN, F., LAVILLETTE, D., BARTENSCHLAGER, R., BAUMERT, T. F., COSSET, F.-L. et DREUX, M. (2012). Characterization of Hepatitis C Virus Particle Subpopulations Reveals Multiple Usage of the Scavenger Receptor BI for Entry Steps. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(37):31242–31257.
- DAVIS, S., GALE, N. W., ALDRICH, T. H., MAISONPIERRE, P. C., LHOTAK, V., PAWSON, T., GOLDFARB, M. et YANCOPOULOS, G. D. (1994). Ligands for EPH-Related Receptor Tyrosine Kinases That Require Membrane Attachment or Clustering for Activity. *Science*, 266(5186):816–9.
- DAWSON, D. W., PEARCE, S. F. A., ZHONG, R., SILVERSTEIN, R. L., FRAZIER, W. A. et BOUCK, N. P. (1997). CD36 Mediates the In Vitro Inhibitory Effects of Thrombospondin-1 on Endothelial Cells. *The Journal of Cell Biology*, 138(3):707–717.
- DE NIZ, M., HELM, S., HORSTMANN, S. et ANNOURA, T. (2015). In Vivo and In Vitro Characterization of a *Plasmodium* Liver Stage-Specific Promoter. *Plos One*, 10(4):1–17.
- DEBACKER, M. (2000). *Paludisme : historique, mythes, croyances et idées reçues*. Thèse de doctorat, Université Paris Val de Marne, Faculté de Médecine de Créteil.
- DELANDRE, C., PENABAZ, T. R., PASSARELLI, A. L., CHAPES, S. K. et CLEN, R. J. (2009). Mutation of juxtamembrane cysteines in the tetraspanin CD81 affects palmitoylation and alters interaction with other proteins at the cell surface. *Experimental Cell Research*, 315(11):1953–1963.
- DELUOL, A.-M., LEVILLAYER, H. et POIROT, J.-L. (1998). Diagnostic du paludisme. Consulté le : 04/09/2017.
- DESAI, M., KUILE, F. O., NOSTEN, F., MCGREADY, R., ASAMOA, K., BRABIN, B. et NEWMAN, R. D. (2007). Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infectious Diseases*, 7(2):93–104.
- DESSENS, J. T., BEETSMA, A. L., DIMOPOULOS, G., WENGELNIK, K., CRISANTI, A., KAFATOS, F. C. et SINDEN, R. E. (1999). CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *The EMBO journal*, 18(22):6221–6227.
- DHANASEKARAN, S., CHANDRA, N. R., CHANDRASEKHAR SAGAR, B. K., RANGARAJAN, P. N. et PADMANABAN, G. (2003). δ -Aminolevulinic Dehydrase From *Plasmodium Falciparum*-Indigenous Vs Imported. *J Biol Chem*.
- DIAZ, S. A., MARTIN, S. R., GRAINGER, M., HOWELL, S. A., GREEN, J. L. et HOLDER, A. A. (2014). *Plasmodium falciparum* aldolase and the C-terminal cytoplasmic domain of certain apical organellar proteins promote actin polymerization. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 197(1-2):9–14.
- DIAZ, S. A., MARTIN, S. R., HOWELL, S. A., GRAINGER, M., MOON, R. W., GREEN, J. L. et HOLDER, A. A. (2016). The Binding of *Plasmodium falciparum* Adhesins and Erythrocyte Invasion Proteins to Aldolase Is Enhanced by Phosphorylation. *PLOS ONE*, 11(9):e0161850.
- DOUD, M. B., KOKSAL, A. C., MI, L.-z., SONG, G., LU, C. et SPRINGER, T. A. (2012). Unexpected fold in the circumsporozoite protein target of malaria vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20):7817–7822.
- DROVER, V. A., AJMAL, M., NASSIR, F., DAVIDSON, N. O., NAULI, A. M., SAHOO, D., TSO, P. et ABUMRAD, N. A. (2005). CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5):1–1290–7.
- DRUMMER, H. E., WILSON, K. A. et POUIMBOURIOS, P. (2002). Identification of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Binding Site on the Large Extracellular Loop of CD81. *Journal of Virology*, 76(21):11143–11147.
- ECKER, A., BUSHELL, E. S. C., TEWARI, R. et SINDEN, R. E. (2008). Reverse genetics screen identifies six proteins important for malaria development in the mosquito. *Molecular Microbiology*, 70(1):209–220.
- EKSI, S., CZESNY, B., GEMERT, G.-j. V., SAUERWEIN, R. W., ELING, W. et WILLIAMSON, K. C. (2006). Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. *Molecular Microbiology*, 61(4):991–998.
- EKSI, S., SURI, A. et WILLIAMSON, K. C. (2008). Parasitology Sex- and stage-specific reporter gene expression

- in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(2):148–151.
- EKSI, S. et WILLIAMSON, K. C. (2002). Male-specific expression of the paralog of malaria transmission- blocking target antigen Pfs230, PfBo400w. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 122(2):127–130.
- ELDERING, M., MORLAIS, I., VAN GEMERT, G.-J., VAN DE VEGTE-BOLMER, M., GRAUMANS, W., SIEBELINK-STOTER, R., VOS, M., ABATE, L., ROEFFEN, W., BOUSEMA, T., LEVASHINA, E. A. et SAUERWEIN, R. W. (2016). Variation in susceptibility of African *Plasmodium falciparum* malaria parasites to TEP1 mediated killing in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Scientific Reports*, 6:20440.
- ELLIOTT, J. F., ALBRECHT, G. R., GILLADOGA, A., HANDUNNETTI, S. M., NEEQUAYE, J., LALLINGER, G., MINJAS, J. N. et HOWARD, R. J. (1990). Genes for *Plasmodium falciparum* surface antigens cloned by expression in COS cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(August):6363–6367.
- ELLIS, K. E. S., CLOUGH, B., SALDANHA, J. W. et WILSON, R. J. M. (2001). Nifs and Sufs in malaria. *Molecular Microbiology*, 41(5):973–981.
- EMSLEY, P. et COWTAN, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D*, 60(12 Part 1):2126–2132.
- ESCALANTE, A. A., FREELAND, D. E., COLLINS, W. E. et LAL, A. A. (1998). The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14):8124–9.
- ESVELT, K., SMIDLER, A. L., CATTERUCCIA, F. et CHURCH, G. M. (2014). Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *eLife*, 3:e03401.
- FELLER, T., THOM, P., KOCH, N., SPIEGEL, H., ADDAI-MENSAH, O., FISCHER, R., REIMANN, A., PRADEL, G., FENDEL, R., SCHILLBERG, S., SCHEUERMAYER, M. et SCHINKEL, H. (2013). Plant-Based Production of Recombinant *Plasmodium* Surface Protein Pf38 and Evaluation of its Potential as a Vaccine Candidate. *Plos One*, 8(11):e79920.
- FÉNÉANT, L., LEVY, S. et COCQUEREL, L. (2014). CD81 and Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Viruses*, 6:535–572.
- FERGUSON, D. J. P., BALABAN, A. E., PATZEWITZ, E.-m., WALL, R. J., HOPP, C. S., POULIN, B., MOHMED, A., MALHOTRA, P., COPPI, A., SINNIS, P. et TEWARI, R. (2014). The Repeat Region of the Circumsporozoite Protein is Critical for Sporozoite Formation and Maturation in *Plasmodium*. *PLOS ONE*, 9(12):e113923.
- FINN, R. D., COGGILL, P., EBERHARDT, R. Y., EDDY, S. R., MISTRY, J., MITCHELL, A. L., POTTER, S. C., PUNTA, M., QURESHI, M., SANGRADOR-VEGAS, A., SALAZAR, G. A., TATE, J. et BATEMAN, A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44(D1):279–285.
- FLINT, M., HAHN, T. V., ZHANG, J., FARQUHAR, M., JONES, C. T., BALFE, P., RICE, C. M., MCKEATING, J. A., AL, F. E. T. et IROL, J. V. (2006). Diverse CD81 Proteins Support Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology*, 80(22):11331–11342.
- FLINT, M., MAIDENS, C., LOOMIS-PRICE, L. D., SHOTTON, C., DUBUISSON, J., MONK, P., HIGGINBOTTOM, A., LEVY, S. et MCKEATING, J. A. (1999). Characterization of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Interaction with a Putative Cellular Receptor, CD81. *Journal of Virology*, 73(8):6235–6244.
- FLORENS, L., WASHBURN, M. P., RAINE, J. D., ANTHONY, R. M., GRAINGER, M., HAYNES, J. D., MOCH, J. K., MUSTER, N., SACCI, J. B., TABB, D. L., WITNEY, A. A., WOLTERS, D., WU, Y., GARDNER, M. J., HOLDER, A. A., SINDEN, R. E., YATES, J. R. et CARUCCI, D. J. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, 419(6906):520–526.
- FOQUET, L., HERMSEN, C. C., VERHOYE, L., van GEMERT, G.-J., CORTESE, R., NICOSIA, A., SAUERWEIN, R. W., LEROUX-ROELS, G. et MEULEMAN, P. (2015). Anti-CD81 but not anti-SR-BI blocks *Plasmodium falciparum* liver infection in a humanized mouse model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(6):1784–7.
- FREVERT, U., ENGELMANN, S., ZOUGBÉDÉ, S., STANGE, J., NG, B., MATUSCHEWSKI, K., LIEBES, L. et YEE, H. (2005). Intravital Observation of *Plasmodium berghei* Sporozoite Infection of the Liver. *Plos Biology*, 3(6):e192.
- FREVERT, U., SINNIS, P., CERAMI, C., SHREFFLER, W., TAKACS, B. et NUSSENZWEIG, V. (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.
- FRIED, M. et DUFFY, P. E. (1996). Adherence of *Plasmodium falciparum* to Chondroitin Sulfate A in the Human Placenta. *Science*, 272(5267):1502–4.
- FRIED, M. et DUFFY, P. E. (2015). Designing a VAR2CSA-based vaccine to prevent placental malaria. *Vaccine*, 33(52):7483–7488.
- FRIED, M. et DUFFY, P. E. (2017). Malaria during Pregnancy. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine* *Perspect Med*.
- FRISCHKNECHT, F. et MATUSCHEWSKI, K. (2017). *Plasmodium* sporozoite biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.

- GANTT, S. M., CLAVIJO, P., BAI, X., ESKO, J. D. et al., P. (1997). Cell Adhesion to a Motif Shared by the Malaria Circumsporozoite Protein and Thrombospondin Is Mediated by Its Glycosaminoglycan-binding Region and Not by CSVTCG. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(31):19205–19213.
- GANTZ, V. M., JASINSKIENE, N., TATARENKOVA, O., FAZEKAS, A., MACIAS, V. M., BIER, E. et al JAMES, A. A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(49):E6736–E6743.
- GARCÍA, J., CURTIDOR, H., PINZÓN, C. G., VANEGAS, M., MORENO, A. et al PATARROYO, M. E. (2009). Identification of conserved erythrocyte binding regions in members of the *Plasmodium falciparum* Cys 6 lipid raft-associated protein family. *Vaccine*, 27(30):3953–3962.
- GARDNER, M. J., CARUCCI, D. J., CUMMINGS, L. M., ARAVIND, L., KOONIN, E. V., SHALLOM, S., MASON, T., YU, K., FUJII, C., PEDERSON, J., SHEN, K., JING, J., ASTON, C., LAI, Z., SCHWARTZ, D. C., PERTEA, M., SALZBERG, S., ZHOU, L., SUTTON, G. G., CLAYTON, R., WHITE, O., SMITH, H. O., FRASER, C. M., ADAMS, M. D., VENTER, J. C. et al HOFFMAN, S. L. (1998). Chromosome 2 Sequence of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 282(5391):1126–1133.
- GARDNER, M. J., HALL, N., FUNG, E., WHITE, O., BERRIMAN, M., HYMAN, R. W., CARLTON, J. M., PAIN, A., NELSON, K. E., BOWMAN, S., PAULSEN, I. T., JAMES, K., EISEN, J. a., RUTHERFORD, K., SALZBERG, S. L., CRAIG, A., KYES, S., CHAN, M.-S., NENE, V., SHALLOM, S. J., SUH, B., PETERSON, J., ANGIUOLI, S., PERTEA, M., ALLEN, J., SELENGUT, J., HAFT, D., MATHER, M. W., VAIDYA, A. B., MARTIN, D. M. a., FAIRLAMB, A. H., FRAUNHOLZ, M. J., ROOS, D. S., RALPH, S. a., MCFADDEN, G. I., CUMMINGS, L. M., SUBRAMANIAN, G. M., MUNGALL, C., VENTER, J. C., CARUCCI, D. J., HOFFMAN, S. L., NEWBOLD, C., DAVIS, R. W., FRASER, C. M. et al BARRELL, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906):498–511.
- GASKINS, E., GILK, S., DEVORE, N., MANN, T., WARD, G. et al BECKERS, C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Cell Biology*, 165(3):383–393.
- GERLOFF, D. L., CREASEY, A., MASLAU, S. et al CARTER, R. (2005). Structural models for the protein family characterized by gamete surface protein Pfs230 of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38):13598–13603.
- GHOSH, A. K., DEVENPORT, M., JETHWANAY, D., KALUME, D. E., PANDEY, A., ANDERSON, V. E., SULTAN, A. a., KUMAR, N. et al JACOBS-LORENA, M. (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.
- GILSON, P. R., NEBL, T., VUKCEVIC, D., MORITZ, R. L., SARGEANT, T., SPEED, T. P., SCHOFIELD, L. et al CRABB, B. S. (2006). Identification and Stoichiometry of Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5(7):1286–1299.
- GOLD, D. A., KAPLAN, A. D., RASMUSSEN, R. L., SAEIJ, J. P. J., GOLD, D. A., KAPLAN, A. D., LIS, A., BETT, G. C. L., ROSOWSKI, E. E., CIRELLI, K. M., HAKIMI, M.-a., RASMUSSEN, R. L. et al SAEIJ, J. P. J. (2015). The *Toxoplasma* Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole. *Cell Host and Microbe*, 17(5):642–652.
- GOLDSTEIN, J. L., HO, Y. K., BASU, S. K. et al BROWN, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1):333–337.
- GOUNDIS, D. et al REID, K. B. M. (1988). Properdin, the terminal complement components, thrombospondin and the circumsporozoite protein of malaria parasites contain similar sequence motifs. *Nature*, 335(6185):82–5.
- GREEN, J. L., HINDS, L., GRAINGER, M., KNUEFFER, E. et al HOLDER, A. A. (2006). *Plasmodium* thrombospondin related apical merozoite protein (PTRAMP) is shed from the surface of merozoites by PfSUB2 upon invasion of erythrocytes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 150(1):114–117.
- GUEIRARD, P., TAVARES, J., THIBERGE, S., BERNEX, F., ISHINO, T., MILON, G., FRANKE-FAYARD, B., JANSE, C. J., MÉNARD, R. et al AMINO, R. (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):18640–18645.
- HAEFLIGER, J.-a., TSCHOPP, J., VIAL, N. et al JENNE, D. E. (1989). Complete Primary Structure and Functional Characterization of the Sixth Component of the Human Complement System. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(30):18041–18051.
- HALL, N., KARRAS, M., RAINE, J. D., CARLTON, J. M., KOOIJ, T. W. A., BERRIMAN, M., FLORENS, L., JANSSEN, C. S., PAIN, A., CHRISTOPHIDES, G. K., JAMES, K., RUTHERFORD, K., HARRIS, B., HARRIS, D., CHURCHER, C., QUAIL, M. A., ORMOND, D., DOGGETT, J., TRUEMAN, H. E., MENDOZA, J., BIDWELL, S. L., RAJANDREAM, M.-a., CARUCCI, D. J., YATES, J. R., KAFATOS, F. C., JANSE, C. J., BARRELL, B., TURNER, C. M. R., WATERS, A. P. et al SINDEN, R. E. (2005). A Comprehensive Survey of the *Plasmodium* Life Cycle by Genomic, Transcriptomic, and Proteomic Analyses. *Science*, 307:82–86.

- HAMMOND, A., GALIZI, R., KYROU, K., SIMONI, A., SINISCALCHI, C., KATSANOS, D., GRIBBLE, M., BAKER, D., MAROIS, E., RUSSELL, S., BURT, A., WINDBICHLER, N., CRISANTI, A. et NOLAN, T. (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*, 34(1):78–83.
- HANDUNNETTI, B. S. M., VAN SCHRAVENDIJK, M. R., HASLER, T., BARNWELL, J. W., GREENWALT, D. E. et HOWARD, R. J. (1992). Involvement of CD36 on Erythrocytes as a Rosetting Receptor for *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *Blood*, 80(8):2097–2104.
- HARUPA, A. (2015). *Identification and functional analysis of novel sporozoite surface proteins in the rodent malaria parasite Plasmodium yoelii*. Thèse de doctorat, Freie Universität Berlin.
- HARUPA, A., SACK, B., LAKSHMANAN, V., ARANG, N., DOUGLASS, A. N., OLIVER, B. G., STUART, A. B., SATHER, N., LINDNER, S. E., HYBISKE, K., TORII, M. et KAPPE, S. H. I. (2014). SSP3 is a novel *Plasmodium* sporozoite surface protein with a role in gliding motility. *Infection and immunity*, pages IAI.01800–14–.
- HAWASS, Z., GAD, Y., ISMAIL, S. et al (2010). Ancestry and pathology in king tutankhamun's family. *JAMA*, 303(7):638–647.
- HAYWARD, R. E., DERISI, J. L., KASLOW, D. C., BROWN, P. O. et RATHOD, P. K. (2000). Shotgun DNA microarrays and stage-specific gene expression in *Plasmodium falciparum* malaria. *Molecular Microbiology*, 35(1):6–14.
- HE, C. Y., SHAW, M. K., PLETCHER, C. H., STRIEPEN, B., TILNEY, L. G. et ROOS, D. S. (2001). A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO Journal*, 20(3):330–339.
- HEINTZELMAN, M. B. et SCHWARTZMAN, J. D. (1997). A Novel Class of Unconventional Myosins from *Toxoplasma gondii*. *Journal of Molecular Biology*, 271(1):139–146.
- HEISS, K., NIE, H., KUMAR, S., DALY, T. M., BERGMAN, L. W. et MATUSCHEWSKI, K. (2008). Functional characterization of a redundant *Plasmodium* TRAP family invasin, TRAP-like protein, by aldolase binding and a genetic complementation test. *Eukaryotic Cell*, 7(6):1062–1070.
- HELINSKI, M. E. H., PARKER, A. G. et KNOLS, B. G. J. (2009). Radiation biology of mosquitoes. *Malaria Journal*, 8 (Suppl2)(S6).
- HELM, S., LEHMANN, C., NAGEL, A., STANWAY, R. R., HORSTMANN, S., LLINAS, M. et HEUSSLER, V. T. (2010). Identification and characterization of a liver stage-specific promoter region of the malaria parasite *Plasmodium*. *PLoS ONE*, 5(10):e13653.
- HEMLER, M. E. (2001). Specific tetraspanin functions. *The Journal of Cell Biology*, 155(7):1103–1107.
- HEMLER, M. E. (2003). Tetraspanin Proteins Mediate Cellular Penetration, Invasion, and Fusion Events and Define a Novel Type of Membrane Microdomain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19:397–422.
- HERRERA, R., ANDERSON, C., KUMAR, K., MOLINA-CRUZ, A., NGUYEN, V., BURKHARDT, M., REITER, K., SHIMP, R., HOWARD, R. F., SRINIVASAN, P., NOLD, M. J., RAGHEB, D., SHI, L., DECOTIIS, M., AEBIG, J., LAMBERT, L., RAUSCH, K. M., MURATOVA, O., JIN, A., REED, S. G., SINNIS, P., BARILLAS-MURY, C., DUFFY, P. E., MACDONALD, N. J. et NARUM, L. (2015). Reversible Conformational Change in the *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, 83(10):3771–3780.
- HIGGINBOTTOM, A., QUINN, E. R., KUO, C.-c., FLINT, M., WILSON, L. H., BIANCHI, E., NICOSIA, A., MONK, P. N., MCKEATING, J. A. et LEVY, S. (2000). Identification of Amino Acid Residues in CD81 Critical for Interaction with Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *Journal of Virology*, 74(8):3642–3649.
- HOEBE, K., GEORGE, P., RUTSCHMANN, S., DU, X., MUDD, S., CROZAT, K., SOVATH, S., SHAMEL, L., HARTUNG, T., ZÄHRINGER, U. et BEUTLER, B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, 433(7025):523–527.
- HOFFMAN, S. L., GOH, L. M. L., LUKE, T. C., SCHNEIDER, I., LE, T. P., DOOLAN, D. L., SACCI, J., DE LA VEGA, P., DOWLER, M., PAUL, C., GORDON, D. M., STOUTE, J. A., CHURCH, L. W. P., SEDEGAH, M., HEPPNER, D. G., BALLOU, W. R. et RICHIE, T. L. (2002). Protection of Humans against Malaria by Immunization with Radiation-Attenuated *Plasmodium falciparum* Sporozoites. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(8):1155–1164.
- HOLLINGDALE, M. R., LELAND, P. et SCHWARTZ, A. L. (1983). In vitro cultivation of the exoerythrocytic stage of *Plasmodium Berghei* in a hepatoma cell line. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32(4):682–684.
- HOLNESS, C. L., SILVA, R. P., FAWCETT, J., GORDON, S. et SIMMONS, D. L. (1993). Macrosialin, a Mouse Macrophage-restricted Glycoprotein, Is a Member of the lamp/lgp Family. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(13):9661–9666.
- HOLT, G. D., PANGBURN, M. K. et GINSBURG, V. (1990). Properdin Binds to Sulfatide [Gal(3-SO₄β1-1Cer)] and Has a Sequence Homology with Other Proteins That Bind Sulfated Glycoconjugates. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(5):2852–2855.
- HOSSAIN, M. E., DHAWAN, S. et MOHAMMED, A. (2012). The cysteine-rich regions of *Plasmodium falciparum* RON2 bind with host erythrocyte and AMA1 during merozoite invasion. *Parasitology Research*, 110(5):1711–1721.

- HOSTETLER, J. B., SHARMA, S., BARTHOLDSON, S. J., WRIGHT, G. J., FAIRHURST, R. M. et RAYNER, J. C. (2015). A Library of *Plasmodium vivax* Recombinant Merozoite Proteins Reveals New Vaccine Candidates and Protein-Protein Interactions. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 9(12):e0004264.
- HSIEH, F.-I., TURNER, L., BOLLA, J. R., ROBINSON, C. V., LAVSTSEN, T. et HIGGINS, M. K. (2016). The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite. *Nature Communications*, 7(12837).
- HU, K., ROOS, D. S. et MURRAY, J. M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Cell Biology*, 156(6):1039–1050.
- HUANG, S., YUAN, S., DONG, M., SU, J., YU, C., ZHANG, S., PONTAROTTI, P. et XU, A. (2005). The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell–cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics*, 86:674–684.
- HUYNH, M.-h. et CARRUTHERS, V. B. (2006). *Toxoplasma* MIC2 Is a Major Determinant of Invasion and Virulence. *PLoS Pathogens*, 2(8):e84.
- ISHINO, T., CHINZEI, Y. et YUDA, M. (2005). Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Molecular Microbiology*, 58(5):1264–1275.
- ISHINO, T., YANO, K., CHINZEI, Y. et YUDA, M. (2004). Cell-Passage Activity Is Required for the Malarial Parasite to Cross the Liver Sinusoidal Cell Layer. *Plos Biology*, 2(1):77–84.
- ITANI, S., TORII, M., ISHINO, T. et PARASITOLOGY, M. (2014). Parasitology International concentration is the key factor facilitating liver stage maturation of *Plasmodium* D-Glucose. *Parasitology International*, 63(4):584–590.
- IWANAGA, S., KHAN, S. M., KANEKO, I., CHRISTODOULOU, Z., NEWBOLD, C., YUDA, M., JANSE, C. J. et WATERS, A. P. (2010). Functional Identification of the *Plasmodium* Centromere and Generation of a Plasmodium Artificial Chromosome. *Cell Host and Microbe*, 7(3):245–255.
- JACOT, D., TOSETTI, N., PIRES, I., STOCK, J., GRAINDORGE, A., HUNG, Y.-f., HAN, H., TEWARI, R., KURSULA, I. et SOLDATI-FAVRE, D. (2016). An Apicomplexan Actin-Binding Protein Serves as a Connector and Lipid Sensor to Coordinate Motility and Invasion. *Cell Host and Microbe*, 20(6):731–743.
- JANSE, C. J., FRANKE-FAYARD, B., MAIR, G. R., RAMESAR, J., THIEL, C., ENGELMANN, S., MATUSCHEWSKI, K., GEMERT, G. J. V., SAUERWEIN, R. W. et WATERS, A. P. (2006). High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145:60–70.
- JEWETT, T. J. et SIBLEY, L. D. (2003). Aldolase Forms a Bridge between Cell Surface Adhesins and the Actin Cytoskeleton in Apicomplexan Parasites. *Molecular Cell*, 11(4):885–894.
- JOHNSON, M. S. C., SVENSSON, P.-a., HELOU, K., BILLIG, H., LEVAN, G., CARLSSON, L. M. S. et CARLSSON, B. (1998). Characterization and Chromosomal Localization of Rat Scavenger Receptor Class B Type I, a High Density Lipoprotein Receptor with a Putative Leucine Zipper Domain and Peroxisomal Targeting Sequence. *Endocrinology*, 139(1):72–80.
- JOMAA, H., WIESNER, J., SANDERBRAND, S., ALTINCICEK, B., WEIDEMEYER, C., HINTZ, M., TURBACHOVA, I., EBERL, M., ZEIDLER, J., LICHTENTHALER, H., SOLDATI, D. et BECK, E. (1999). Inhibitors of the nonmelavonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, 285(September):1573–6.
- JUNG, C., LEE, C. Y. et GRIGG, M. E. (2004). The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *International Journal for Parasitology*, 34:285–296.
- KAISER, K., MATUSCHEWSKI, K., CAMARGO, N., ROSS, J. et KAPPE, S. H. I. (2004). Differential transcriptome profiling identifies *Plasmodium* genes encoding pre-erythrocytic stage-specific proteins. *Molecular Microbiology*, 51(5):1221–1232.
- KALANON, M. et MCFADDEN, G. I. (2010). Malaria, *Plasmodium falciparum* and its apicoplast. *Biochemical Society transactions*, 38(3):775–82.
- KAN, A., TAN, Y. H., ANGRISANO, F., HANSEN, E., ROGERS, K. L., WHITEHEAD, L., MOLLARD, V. P., COZIJNSEN, A., DELVES, M. J., CRAWFORD, S., SINDEN, R. E., MCFADDEN, G. I., LECKIE, C., BAILEY, J. et BAUM, J. (2014). Quantitative analysis of *Plasmodium* ookinete motion in three dimensions suggests a critical role for cell shape in the biomechanics of malaria parasite gliding motility. *Cellular Microbiology*, 16(5):734–750.
- KANEKO, O., TEMPLETON, T. J., IRIKO, H., TACHIBANA, M., OTSUKI, H., TAKEO, S., SATTABONGKOT, J., TORII, M. et TSUBOI, T. (2006). The *Plasmodium vivax* homolog of the ookinete adhesive micronemal protein, CTRP. *Parasitology International*, 55(3):227–231.
- KAPADIA, S. B., BARTH, H., BAUMERT, T., MCKEATING, J. A. et CHISARI, F. V. (2007). Initiation of Hepatitis C Virus Infection Is Dependent on Cholesterol and Cooperativity between CD81 and Scavenger Receptor B Type I. *Journal of Virology*, 81(1):374–383.
- KAPPE, S., BRUDERER, T., GANTT, S., FUJIOKA, H., NUSSENZWEIG, V. et MÉNARD, R. (1999). Conservation of a Gliding Motility and Cell Invasion Machinery in Apicomplexan Parasites. *The Journal of Cell Biology*, 147(5):937–943.

- KAPPE, S. H. I., BUSCAGLIA, C. A., BERGMAN, L. W., COPPENS, I. et NUSSENZWEIG, V. (2004a). Apicomplexan gliding motility and host cell invasion : overhauling the motor model. *Trends in Parasitology*, 20(1):13–16.
- KAPPE, S. H. I., BUSCAGLIA, C. A. et NUSSENZWEIG, V. (2004b). *Plasmodium* Sporozoite Molecular Cell Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20:29–59.
- KAPPE, S. H. I., GARDNER, M. J., BROWN, S. M., ROSS, J., MATUSCHEWSKI, K., RIBEIRO, J. M., ADAMS, J. H., QUACKENBUSH, J., CHO, J., CARUCCI, D. J., HOFFMAN, S. L. et NUSSENZWEIG, V. (2001). Exploring the transcriptome of the malaria sporozoite stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17):9895–9900.
- KARIU, T., ISHINO, T., YANO, K., CHINZEI, Y. et YUDA, M. (2006). CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Molecular Microbiology*, 59(5):1369–1379.
- KAUSHANSKY, A., AUSTIN, L. S., MIKOLAJCZAK, S. A., LO, F. Y., MILLER, J. L., DOUGLASS, A. N., ARANG, N., VAUGHAN, A. M., GARDNER, M. J. et KAPPE, H. I. (2015a). Susceptibility to *Plasmodium yoelii* Preerythrocytic Infection in BALB/c Substrains Is Determined at the Point of Hepatocyte Invasion. *Infection and Immunity*, 83(1):39–47.
- KAUSHANSKY, A., DOUGLASS, A. N., ARANG, N., VIDOROVICH, V., DAMBRAUSKAS, N., KAIN, H. S., AUSTIN, L. S., SATHER, N. et KAPPE, S. H. I. (2015b). Malaria parasites target the hepatocyte receptor EphA2 for successful host infection. *Science*, 350(6264):1089–1092.
- KEHRER, J., FRISCHKNECHT, F. et MAIR, G. R. (2016). Proteomic Analysis of the *Plasmodium berghei* Gametocyte Egressome and Vesicular bioID of Osmiophilic Body Proteins Identifies Merozoite TRAP-like Protein (MTRAP) as an Essential Factor for Parasite Transmission. *Molecular and Cellular Proteomics*, 15(9):2852–2862.
- KENNEDY, A. T., SCHMIDT, C. Q., JENNIFER, K., WEISS, G. E., TAECHALERTPAISARN, T., PAUL, R., BARLOW, P. N., CRABB, B. S., COWMAN, A. F., WEISS, G. E., TAECHALERTPAISARN, T., GILSON, P. R. et BARLOW, P. N. (2016). Recruitment of Factor H as a Novel Complement Evasion Strategy for Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Infection. *The Journal of Immunology*, 196(3):1239–48.
- KHAN, S. M., FRANKE-FAYARD, B., MAIR, G. R., LASONDER, E., JANSE, C. J., MANN, M. et WATERS, A. P. (2005). Proteome Analysis of Separated Male and Female Gametocytes Reveals Novel Sex-Specific *Plasmodium* Biology. *Cell*, 121(june 3):675–687.
- KINCH, M. S. et CARLES-KINCH, K. (2003). Overexpression and functional alterations of the ephA2 tyrosine kinase in cancer. *Clinical & Experimental Metastasis*, 20(1):59–68.
- KING, C. A. (1988). Cell Motility of Sporozoan Protozoa. *Parasitology Today*, 4(11):315–319.
- KISZEWSKI, A., MELLINGER, A., SPIELMAN, A., MALANEY, P., SACHS, S. E. et SACHS, J. (2004). A global index representing the satability of malaria transmission. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(5):486–498.
- KITADOKORO, K., BORDO, D., GALLI, G., PETRACCA, R., FALUGI, F., ABRIGNANI, S., GRANDI, G. et BOLOGNESI, M. (2001). CD81 extracellular domain 3D structure : insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *The EMBO journal*, 20(1):12–18.
- KLAR, A., BALDASSARE, M. et JESSELL, T. M. (1992). F-Spondin : A Gene Expressed at High Levels in the Floor Plate Encodes a Secreted Protein That Promotes Neural Cell Adhesion and Neurite Extension. *Cell*, 69(1):95–110.
- KLUG, D. et FRISCHKNECHT, F. (2017). Motility precedes egress of malaria parasites from oocysts. *eLife*, 6:e19157.
- KOCKEN, C. H. M., JANSEN, J., KAAAN, A. M., BECKERS, P. J. A., PONNUDURAI, T., KASLOW, D. C., KONINGS, R. N. H. et SCHOENMAKERS, J. G. G. (1993). Cloning and expression of the gene coding for the transmission blocking target antigen Pfs48/45 of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61(1):59–68.
- KÖHLER, S., DELWICHE, C., DENNY, P., TILNEY, L., WEBSTER, P., WILSON, R., PALMER, J., ROOS, D. S. et KOHLER, S. (1997). A Plastid of Probable Green Algal Origin in Apicomplexan Parasites. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5305):1485–1489.
- KONG, L., GIANG, E., NIEUSMA, T., KADAM, R. U., COGBURN, K. E., HUA, Y., DAI, X., STANFIELD, R. L., BURTON, D. R., WARD, A. B., WILSON, I. A. et LAW, M. (2013). Hepatitis c virus e2 envelope glycoprotein core structure. *Science*, 342(6162):1090–1094.
- KOUTSOUDAKIS, G., HERRMANN, E., KALLIS, S., BARTENSCHLAGER, R. et PIETSCHMANN, T. (2007). The Level of CD81 Cell Surface Expression Is a Key Determinant for Productive Entry of Hepatitis C Virus into Host Cells. *Journal of Virology*, 81(2):588–598.
- KRIEGER, M. (1999). Charting the Fate of the "Good Cholesterol" : Identification and Characterization of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-B1. *Annual Review of Biochemistry*, 68:523–558.
- KUBLIN, J. G., MIKOLAJCZAK, S. A., SACK, B. K., FISHBAUGHER, M. E., SEILIE, A., SHELTON, L., VONGOEDERT, T., FIRAT, M., MAGEE, S., FRITZEN, E., BETZ, W., KAIN, H. S., DANKWA, D. A., STEEL, R. W. J., VAUGHAN, A. M., SATHER, D. N., MURPHY, S. C. et KAPPE, S. H. I. (2017). Complete attenuation of genetically engineered *Plasmodium falciparum* sporozoites in human subjects. *Science Translational Medicine*, 9(371):eaad9099.
- KUMAR, A. K., GARCIA, C. R. S., CHANDRAN, V. R., VAN ROOIJEN, N., ZHOU, Y., WINZELER, E. et NUSSENZWEIG, V. (2007).

- Exposure of *Plasmodium* sporozoites to the intracellular concentration of potassium enhances infectivity and reduces cell passage activity. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 156(1):32–40.
- KUMAR, H., SATTLER, J. M., SINGER, M., HEISS, K., REINIG, M., HAMMERSCHMIDT-KAMPER, C., HEUSSLER, V., MUELLER, A.-k. et FRISCHKNECHT, F. (2016). Protective efficacy and safety of liver stage attenuated malaria parasites. *Scientific Reports*, 6:26824.
- KUMAR, N. (1987). Target antigens of malaria transmission blocking immunity exist as a stable membrane bound complex. *Parasite Immunology*, 9:321–335.
- KUMAR, N. et WIZEL, B. (1992). Further characterization of interactions between gamete surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 53:113–120.
- LABAIED, M., HARUPA, A., DUMPIT, R. F., COPPENS, I., MIKO-LAJCZAK, S. A. et KAPPE, S. H. I. (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):3758–3768.
- LAMARQUE, M., BESTEIRO, S., PAPOIN, J., ROQUES, M., NORMAND, B. V.-I., FAUQUENOY, S., TOMAVO, S., BART, W., MORLON-GUYOT, J., KOCKEN, C. H., THOMAS, A. W., BOULANGER, M. J. et BENTLEY, G. A. (2011). The RON2-AMA1 Interaction is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites. *PLoS Pathogens*, 7(2):e1001276.
- LAMARQUE, M. H., ROQUES, M., KONG-HAP, M., TONKIN, M. L., RUGARABAMU, G., MARQ, J.-b., PENARETE-VARGAS, D. M., BOULANGER, M. J., SOLDATI-FAVRE, D. et LEBRUN, M. (2014). Plasticity and redundancy among AMA–RON pairs ensure host cell entry of *Toxoplasma* parasites. *Nature Communications*, 5(4098).
- LANDSCHULZ, K. T., PATHAK, R. K., RIGOTTI, A., KRIEGER, M. et HOBBS, H. H. (1996). Regulation of Scavenger Receptor, Class B, Type I, a High Density Lipoprotein Receptor, in Liver and Steroidogenic Tissues of the Rat. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(4):984–995.
- LASONDER, E., JANSE, C. J., GEMERT, G.-j. V., MAIR, G. R., VERMUT, A. M. W., DOURADINHA, B. G., VAN NOORT, V., HUYNEN, M. A., LUTY, A. J., KROEZE, H., KHAN, S. M., SAUERWEIN, R. W., WATERS, A. P., MANN, M. et STUNNENBERG, H. G. (2008). Proteomic Profiling of *Plasmodium* Sporozoite Maturation Identifies New Proteins Essential for Parasite Development and Infectivity. *PLoS Pathogens*, 4(10):e1000195.
- LAVERAN, A. (1907). *Traité du paludisme*. Masson & co.
- LAVIE, M., GOFFARD, A. et DUBUISSON, J. (2006). HCV Glycoproteins : Assembly of a Functional E1–E2 Heterodimer. In TAN, S., éditeur : *Hepatitis C Viruses : Genomes and Molecular Biology*, chapitre 4, pages 121–150. Horizon bioscience édition.
- LAWLER, J. (1986). The Structural and Functional Properties of Thrombospondin. *Blood*, 67(5):1197–1209.
- LAWLER, J. et HYNES, R. O. (1986). The Structure of Human Thrombospondin , an Adhesive Glycoprotein with Multiple Calcium-binding Sites and Homologies with Several Different Proteins. *The Journal of Cell Biology*, 103(5):1635–48.
- LE ROCH, K. G., ZHOU, Y., BLAIR, P. L., GRAINGER, M., MOCH, J. K., HAYNES, J. D., DE VEGA, P., HOLDER, A. A., BATALOV, S., CARUCCI, D. J. et WINZELER, E. A. (2003). Discovery of Gene Function by Expression Profiling of the Malaria Parasite Life Cycle. *Science*, 301(5639):1503–1508.
- LEBRUN, M., MICHELIN, A., EL HAJJ, H., PONCET, J., BRADLEY, P. J., VIAL, H. et DUBREMETZ, J. F. (2005). The rhoptry neck protein RON4 relocalizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cellular Microbiology*, 7(12):1823–1833.
- LECLERC, M. C., HUGOT, J. P., DURAND, P. et RENAUD, F. (2004). Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans) : an 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitology*, 129:677–684.
- LEUNG-HAGESTEIJN, C., SPENCE, A. M., STERN, B. D., ZHOU, Y., SU, M.-w. et CULOTTI, J. G. (1992). UNG5, a Transmembrane Protein with Immunoglobulin and Thrombospondin Type 1 Domains, Guides Cell and Pioneer Axon Migrations in *C. elegans*. *Cell*, 71(2):289–299.
- LEVY, S. et SHOHAM, T. (2005). The Tetraspanin Web Modulates Immune-Signalling Complexes. *Nature*, 5(Febbruary):136–148.
- LEWIS, V., GREEN, S. A., MARSH, M., VIHKO, P., HELENIUS, A. R. I. et MELLMAN, I. R. A. (1985). Glycoproteins of the Lysosomal Membrane. *The Journal of Cell Biology*, 100(6):1839–47.
- LI, J., ITO, D., CHEN, J.-h., LU, F., CHENG, Y., WANG, B., HA, K.-s., CAO, J., TORII, M., SATTABONGKOT, J., TSUBOI, T. et HAN, E.-t. (2012). Parasitology International Pv12, a 6-Cys antigen of *Plasmodium vivax*, is localized to the merozoite rhoptry. *Parasitology International*, 61(3):443–449.
- LI, Y., KAKINAMI, C., LI, Q., YANG, B. et LI, H. (2013). Human Apolipoprotein A-I Is Associated with Dengue Virus and Enhances Virus Infection through SR-BI. *PLOS ONE*, 8(7):e70390.
- LIMVIROJ, W., YANO, K., YUDA, M., ANDO, K. et CHINZEI, Y. (2002). Immuno-electron microscopic observation of *Plasmodium berghei* CTRP localization in the midgut of the vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Journal of Parasitology*, 88(4):664–672.

- LIN, J.-w., ANNOURA, T., SAJID, M., CHEVALLEY-MAUREL, S., RAMESAR, J., KLOP, O., FRANKE-FAYARD, B. M. D., JANSE, C. J. et KHAN, S. M. (2011). A Novel 'Gene Insertion / Marker Out' (GIMO) Method for Transgene Expression and Gene Complementation in Rodent Malaria Parasites. *PLOS ONE*, 6(12):e29289.
- LIN, Y. G., HAN, L. Y., KAMAT, A. A., MERRITT, W. M., LANDEN, C. N., DEEVERS, M. T., FLETCHER, M. S., URBAUER, D. L., KINCH, M. S. et SOOD, A. K. (2007). EphA2 Overexpression Is Associated With Angiogenesis in Ovarian Cancer. *Cancer*, 109(2):332–340.
- LINDBERG, R. A. et HUNTER, T. (1990). cDNA Cloning and Characterization of eck, an Epithelial Cell Receptor Protein-Tyrosine Kinase in the ephlek Family of Protein Kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 10(12):6316–6324.
- LINDNER, S. E., SWEARINGEN, K. E., HARUPA, A., VAUGHAN, A. M., SINNIS, P., MORITZ, R. L. et KAPPE, S. H. I. (2013). Total and Putative Surface Proteomics of Malaria Parasite Salivary Gland Sporozoites. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(5):1127–1143.
- LISABETH, E. M., FALIVELLI, G. et PASQUALE, E. B. (2013). Eph Receptor Signaling and Ephrins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9):a009159.
- LOKE, Y. W. (1982). Transmission of Parasites Across the Placenta. *Advances in Parasitology*, 21:155–228.
- MACDONALD, N. J., NGUYEN, V., SHIMP, R., REITER, K., HERRERA, R., BURKHARDT, M., MURATOVA, O., KUMAR, K., AEBIG, J., RAUSCH, K., LAMBERT, L., DAWSON, N., SAT-TABONGKOT, J., AMBROGGIO, X., DUFFY, P. E., WU, Y. et NARUM, D. L. (2016). Structural and Immunological Characterization of Recombinant 6-Cysteine Domains of the Plasmodium falciparum Sexual Stage Protein Pfs230. 291(38):19913–19922.
- MACPHERSON, G. G., WARRELL, M. J., WHITE, N. J., LOO-REESUWAN, S. et WARRELL, D. A. (1985). Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *The American Journal of Pathology*, 119(3):385–401.
- MAHAIRAKI, V., VOYATZI, T., SID, I. et LOUIS, C. (2005). The *Anopheles gambiae* gamma1 laminin directly binds the *Plasmodium berghei* circumsporozoite- and TRAP-related protein (CTRP). *Molecular & Biochemical Parasitology*, 140(1):119–121.
- MAHAJAN, B., JANI, D., CHATTOPADHYAY, R., NAGARKATTI, R., ZHENG, H., MAJAM, V., WEISS, W., KUMAR, S. et RATHORE, D. (2005). Identification, Cloning, Expression, and Characterization of the Gene for *Plasmodium knowlesi* Surface Protein Containing an Altered Thrombospondin Repeat Domain. *Infection and Immunity*, 73(9):5402–5409.
- MALPEDE, B. M. et TOLIA, N. H. (2014). Malaria adhesins : Structure and function. *Cellular Microbiology*, 16(5):621–631.
- MANZONI, G., BRIQUET, S., RISCO-CASTILLO, V., GAULTIER, C., TOPÇU, S., IVĂNESCU, M. L., FRANETICH, J.-F., HOAREAU-COUDERT, B., MAZIER, D. et SILVIE, O. (2014). A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites. *Scientific Reports*, 4:1–10.
- MANZONI, G., MARINACH, C., BRIQUET, S., GRAND, M., TOLLE, M., GRANSAGNE, M., LESCOAR, J., ANDOLINA, C., FRANETICH, J.-F., ZEISEL, M. B., HUBY, T., RUBINSTEIN, E., SNOUNOU, G., MAZIER, D., NOSTEN, F., BAUMERT, T. F. et SILVIE, O. (2017). Plasmodium P36 determines host cell receptor usage during sporozoite invasion. *eLife*, 6:e25903.
- MATSUOKA, H., YOSHIDA, S., HIRAI, M. et ISHII, A. (2002). A rodent malaria, *Plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitology International*, 51(1):17–23.
- MATUSCHEWSKI, K., NUNES, A. C., NUSSENZWEIG, V. et ME, R. (2002a). Plasmodium sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *The EMBO journal*, 21(7):1597–1606.
- MATUSCHEWSKI, K., ROSS, J., BROWN, S. M., KAISER, K., NUSSENZWEIG, V. et KAPPE, S. H. I. (2002b). Infectivity-associated Changes in the Transcriptional Repertoire of the Malaria Parasite Sporozoite Stage. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(44):41948–41953.
- MCCUTCHAN, T. F., KISSINGER, J. C., TOURAY, M. G., ROGERS, M. J., LI, J. U. N., SULLIVAN, M., BRAGA, E. M., KRETRLI, A. U. et MILLER, L. H. (1996). Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarial parasites : Biological and phylogenetic implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21):11889–11894.
- MCFADDEN, G. I., REITH, M. E., MUNHOLLAND, J. et LANG-UNNASCH, N. (1996). Plastid in human parasites. *Nature*, 381:482.
- MCGILVRAY, I. D., SERGHIDES, L., KAPUS, A., ROTSTEIN, O. D. et KAIN, K. C. (2000). Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes : a role for CD36 in malarial clearance. *Blood*, 96(9):3231–3241.
- MCKEATING, J. A., ZHANG, L. Q., LOGVINOFF, C., FLINT, M., ZHANG, J., YU, J., BUTERA, D., HO, D. D., DUSTIN, L. B., RICE, C. M., BALFE, P., YORK, N. et YORK, N. (2004). Diverse Hepatitis C Virus Glycoproteins Mediate Viral Infection in a CD81-Dependent Manner. *Journal of Virology*, 78(16):8496–8505.
- MEANS, T. K., MYLONAKIS, E., TAMPAKAKIS, E., COLVIN, R. A., SEUNG, E., PUCKETT, L., TAI, M. F., STEWART,

- C. R., PUKKILA-WORLEY, R., HICKMAN, S. E., MOORE, K. J., CALDERWOOD, S. B., HACOHEM, N., LUSTER, A. D. et EL KHOURY, J. (2009). Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(3):637–653.
- MEISSNER, M., SCHLU, D. et SOLDATI, D. (2002). Role of *Toxoplasma gondii* Myosin A in Powering Parasite Gliding and Host Cell Invasion. *Science*, 298(5594):837–841.
- MÉNARD, R. (2001). Gliding motility and cell invasion by *Apicomplexa* : Insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cellular Microbiology*, 3(2):63–73.
- MÉNARD, R., SULTAN, A. a., CORTES, C., ALTSZULER, R., VAN DIJK, M. R., JANSE, C. J., WATERS, A. P., NUSSENZWEIG, R. S. et NUSSENZWEIG, V. (1997). Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature*, 385(6614):336–40.
- MÉNARD, R., TAVARES, J., COCKBURN, I. A., MARKUS, M., ZAVALA, F. et AMINO, R. (2013). Looking under the skin : the first steps in malarial infection and immunity. *Nature reviews*, 11(October):701–712.
- MENSAH, V. A., GUEYE, A., NDIAYE, M., EDWARDS, N. J., WRIGHT, D., ANAGNOSTOU, N. A., SYLL, M., NDAW, A., ABIOLA, A., BLISS, C., PETERSEN, I., OGWANG, C., DIEYE, T., NICOLA, K., LAWRIE, A. M., ROBERTS, R., NICOSIA, A., FAYE, B., GAYE, O., LEROY, O., IMOUKHUEDE, E. B., EWER, K. J., BEJON, P., HILL, A. V. S., CISSE, B. et GROUP, M. (2016). Safety, Immunogenicity and Efficacy of Prime-Boost Vaccination with ChAd63 and MVA Encoding ME-TRAP against *Plasmodium falciparum* Infection in Adults in Senegal. *PLOS ONE*, 11(12):e0167951.
- MEULEMAN, P., HESSELGESSER, J., PAULSON, M., VANWOLLEGHEM, T., DESOMBERE, I., REISER, H. et LEROUX-ROELS, G. (2008). Anti-CD81 Antibodies Can Prevent a Hepatitis C Virus Infection In Vivo. *Hepatology*, 48(6):1761–1768.
- MIAO, H., BURNETT, E., KINCH, M., SIMON, E. et WANG, B. (2000). Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nature Cell Biology*, 2(2):62–9.
- MIKOLAJCZAK, S. A., JACOBS-LORENA, V., MACKELLAR, D. C., CAMARGO, N. et KAPPE, S. H. I. (2007). L-FABP is a critical host factor for successful malaria liver stage development. *International Journal for Parasitology*, 37(5):483–489.
- MIKOLAJCZAK, S. A., LAKSHMANAN, V., FISHBAUGHER, M., CAMARGO, N., HARUPA, A., KAUSHANSKY, A., DOUGLASS, A. N., BALDWIN, M., HEALER, J., O'NEILL, M., PHUONG, T., COWMAN, A. et KAPPE, S. H. I. (2014). A Next-generation Genetically Attenuated *Plasmodium falciparum* Parasite Created by Triple Gene Deletion. *Molecular Therapy*, 22(9):1707–1715.
- MILLER, R. L., IKRAM, S., ARMELAGOS, G. J., WALKER, R., HARBERS, W. B., SHIFF, C. J., BAGGETT, D., CARRIGAN, M. et MARET, S. M. (1994). Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88:31–32.
- MINEO, C. et SHAUL, P. W. (2003). HDL Stimulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase A Novel Mechanism of HDL Action. *Trends Cardiovasc Medicine*, 13(6):175–178.
- MOLINA, S., CASTET, V., PICHARD-GARCIA, L., WYCHOWSKI, C., MEURS, E., PASCUSI, J.-m., SUREAU, C., FABRE, J.-m., SACUNHA, A., LARREY, D., DUBUISSON, J., COSTE, J., MCKEATING, J., MAUREL, P. et FOURNIER-WIRTH, C. (2008). Serum-Derived Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes Is Tetraspanin CD81 Dependent. *Journal of Virology*, 82(1):569–574.
- MOLINA-CRUZ, A. et BARILLAS-MURY, C. (2014). The remarkable journey of adaptation of the *Plasmodium falciparum* malaria parasite to New World anopheline mosquitoes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(5):662–667.
- MOLINA-CRUZ, A., CANEPA, G. E., KAMATH, N., PAVLOVIC, N. V., MU, J., RAMPHUL, U. N., RAMIREZ, J. L. et BARILLAS-MURY, C. (2015). *Plasmodium* evasion of mosquito immunity and global malaria transmission : The lock-and-key theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(49):15178–15183.
- MOLINA-CRUZ, A., GARVER, L. S., ALABASTER, A., BANGIOLO, L., HAILE, A., WINIKOR, J., ORTEGA, C., SCHAIJK, B. C. L. V., SAUERWEIN, R. W., TAYLOR-SALMON, E. et BARILLAS-MURY, C. (2013). The Human Malaria Parasite Pfs47 Gene Mediates Evasion Of The Mosquito Immune System. *Science*, 340(6135):984–987.
- MONGUI, A., ANGEL, D. I., GUZMAN, C., VANEGAS, M. et PATARROYO, M. A. (2008). Characterisation of the *Plasmodium vivax* Pv38 antigen. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 376(2):326–330.
- MONGUI, A., ANGEL, D. I., MORENO-PEREZ, D. A., VILLARREAL-GONZALEZ, S. et ALMONACID, H. (2010). Identification and characterization of the *Plasmodium vivax* thrombospondin-related apical merozoite protein. *Malaria Journal*, 9(1):283.
- MORDUE, D. G., HAKANSSON, S., NIESMAN, I. et SIBLEY, L. D. (1999). *Toxoplasma gondii* Resides in a Vacuole That Avoids Fusion with Host Cell Endocytic and Exocytic Vesicular Trafficking Pathways. *Experimental Parasitology*, 99(2):87–99.
- MOREIRA, C. K., TEMPLETON, T. J., LAVAZEC, C., HAYWARD, R. E., HOBBS, C. V., KROEZE, H., JANSE, C. J., WATERS, A. P., SINNIS, P. et COPPI, A. (2008). The *Plasmodium* TRAP/MIC2 family member, TRAP-Like Protein (TLP), is involved in tissue traversal by sporozoites. *Cellular Microbiology*, 10(7):1505–1516.

- MORENO-PÉREZ, D. A., AREIZA-ROJAS, R., FLÓREZ-BUITRAGO, X., SILVA, Y., PATARROYO, M. E. et PATARROYO, M. A. (2013). The GPI-anchored 6-Cys Protein Pv12 is Present in Detergent-resistant Microdomains of *Plasmodium vivax* Blood Stage Schizonts. *Protist*, 164(1):37–48.
- MOTA, M. M., HAFALLA, J. C. R. et RODRIGUEZ, A. (2002). Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nature Medicine*, 8(11):1318–22.
- MOTA, M. M., PRADEL, G., VANDERBERG, J. P., HAFALLA, J. C., FREVERT, U., NUSSENZWEIG, R. S., NUSSENZWEIG, V. et RODRÍGUEZ, A. (2001). Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science*, 291(5501):141–4.
- MOTTA, P. et PORTER, K. R. (1974). Structure of Rat Liver Sinusoids and Associated Tissue Spaces as Revealed by Scanning Electron Microscopy. *Cell Tiss. Res.*, 148:111–125.
- MUELLER, A.-k., CAMARGO, N., KAISER, K., ANDORFER, C., FREVERT, U., MATUSCHEWSKI, K. et KAPPE, S. H. I. (2005a). *Plasmodium* liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite – host interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8):3022–3027.
- MUELLER, A.-k., LABAIED, M., KAPPE, S. H. I. et MATUSCHEWSKI, K. (2005b). Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature*, 433(7022):164–7.
- MULLER, H.-m., RECKMANN, I., HOLLINGDALE, M. R., BUJARD, H., ROBSON, K. J. H., CRISANTI, A., PARASSITOLOGIA, I., ROMA, U. et MORO, L. S. P. A. (1993). Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *The EMBO journal*, 12(7):2881–2889.
- MÜNTER, S., SABASS, B., SELHUBER-UNKEL, C., KUDRYASHEV, M., HEGGE, S., ENGEL, U., SPATZ, J. P., MATUSCHEWSKI, K., SCHWARZ, U. S. et FRISCHKNECHT, F. (2009). *Plasmodium* Sporozoite Motility Is Modulated by the Turnover of Discrete Adhesion Sites. *Cell Host and Microbe*, 6(6):551–562.
- MURAO, K., TERPSTRA, V., GREEN, S. R., KONDRATENKO, N., STEINBERG, D. et QUEHENBERGER, O. (1997). Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(28):17551–17557.
- MYUNG, J. M., MARSHALL, P. et SINNIS, P. (2004). The *Plasmodium* circumsporozoite protein is involved in mosquito salivary gland invasion by sporozoites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 133(1):53–59.
- NAGARAJ, V. A., ARUMUGAM, R., CHANDRA, N. R., PRASAD, D., RANGARAJAN, P. N. et PADMANABAN, G. (2009). Localization of *Plasmodium falciparum* uroporphyrinogen III decarboxylase of the heme-biosynthetic pathway in the apicoplast and characterisation of its catalytic properties. *International Journal for Parasitology*, 39(5):559–568.
- NAGARAJ, V. A., ARUMUGAM, R., GOPALAKRISHNAN, B., JYOTHSNA, Y. S., RANGARAJAN, P. N. et PADMANABAN, G. (2008). Unique properties of *Plasmodium falciparum* porphobilinogen deaminase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1):437–444.
- NAGASAWA, H., PROCELL, P. M., ATKINSON, C. T., CAMPBELL, G. H., COLLINS, W. E. et AIKAWA, M. (1987). Localization of Circumsporozoite Protein of *Plasmodium ovale* in Midgut Oocystst. *Infection and immunity*, 55(12):2928–2932.
- NAITZA, S., SPANO, F., ROBSON, K. J. H. et CRISANTI, A. (1998). The Thrombospondin-related Protein Family of Apicomplexan Parasites : The Gears of the Cell Invasion Machinery. *Parasitology International*, 14(12):479–484.
- NAUDIN, C., SIRVENT, A., LEROY, C., LARIVE, R., SIMON, V., PANNEQUIN, J., BOURGAUX, J.-f., PIERRE, J., ROBERT, B., HOLLANDE, F. et ROCHE, S. (2014). SLAP displays tumour suppressor functions in colorectal cancer via destabilization of the SRC substrate EPHA2. *Nature communications*, 5:3159.
- NECULAI, D., SCHWAKE, M., RAVICHANDRAN, M., ZUNKE, F., COLLINS, R. F., PETERS, J., NECULAI, M., PLUMB, J., LOPPNAU, P., PIZARRO, J. C., SEITOVA, A., TRIMBLE, W. S., SAFTIG, P. et GRINSTEIN, S. (2013). Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature*, 504(7478):172–176.
- NEMETSKI, S. M., CARDOZO, T. J., BOSCH, G., WELTZER, R., MALLEY, K. O., EJIGIRI, I., KUMAR, K. A., BUSCAGLIA, C. A., NUSSENZWEIG, V. et SINNIS, P. (2015). Inhibition by stabilization : targeting the *Plasmodium falciparum* aldolase-TRAP complex. *Malaria Journal*, 14(324).
- NIEDERWIESER, I., FELGER, I. et BECK, H.-p. (2001). Limited Polymorphism in *Plasmodium falciparum* Sexual-Stage Antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64(1-2):9–11.
- NOBELPRIZE.ORG (1902). The nobel prize in physiology or medicine 1902. Consulté le : 2016-02-04.
- NOBELPRIZE.ORG (1907). The nobel prize in physiology or medicine 1907. Consulté le : 2016-02-04.
- NOBELPRIZE.ORG (1927). The nobel prize in physiology or medicine 1927. Consulté le : 2016-02-04.
- NOBELPRIZE.ORG (1948). The nobel prize in physiology or medicine 1948. Consulté le : 2016-02-04.
- NOBELPRIZE.ORG (2015). The nobel prize in physiology or medicine 2015. Consulté le : 2016-02-04.

- NUSSENZWEIG, R. S., VANDERBERG, J. P., MOST, H. et ORTON, C. (1967). Protective Immunity produced by the Injection of X-irradiated Sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*, 216(5111):160–2.
- OCKENHOUSE, C. F. et CHULAY, J. D. (1988). *Plasmodium falciparum* Sequestration : OKM5 Antigen (CD36) Mediates Cytoadherence of Parasitized Erythrocytes to a Myelomonocytic Cell Line. *The Journal of Infectious Diseases*, 157(3):584–587.
- OCKENHOUSE, C. F., KLOTZ, F. W., TANDON, N. N. et JAMIESON, G. A. (1991). Sequestrin, a CD36 recognition protein on *Plasmodium falciparum* malaria-infected erythrocytes identified by anti-idiotypic antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(April):3175–3179.
- OJUKA, P., BOUM, Y., DENOEU-NDAM, L., NABASUMBA, C., MULLER, Y., OKIA, M., MWANGA-AMUMPAIRE, J., DE BEAUDRAP, P., PROTOPOPOFF, N. et ETARD, J.-f. (2015). Early biting and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles* might compromise the effectiveness of vector control intervention in Southwestern Uganda. *Malaria Journal*, 14:148.
- OKAZAKI, I., HIMEMO, M., EZAKI, J., ISHIKAWA, T. et KATO, K. (1992). Purification and characterization of an 85 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *The Journal of Biochemistry*, 111(6):763–769.
- ONO, T., CABRITA-SANTOS, L., LEITAO, R., BETTIOL, E., PURCELL, L. A., DIAZ-PULIDO, O., ANDREWS, L. B., TADAKUMA, T., BHANOT, P., MOTA, M. M. et RODRIGUEZ, A. (2008). Adenylyl Cyclase a and cAMP Signaling Mediate *Plasmodium* Sporozoite Apical Regulated Exocytosis and Hepatocyte Infection. *PLoS Pathogens*, 4(2):e100008.
- OQUENDO, P., HUNDT, E., LAWLER, J. et SEED, B. (1989). CD36 Directly Mediates Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* Parasitized Erythrocytes. *Cell*, 58(1):95–101.
- OREN, R., TAKAHASHI, S., DOSS, C., LEVY, R. et LEVY, S. (1990). TAPA-1, the Target of an Antiproliferative Antibody, Defines New Family of Transmembrane Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 10(8):4007–4015.
- ORITO, Y., ISHINO, T., IWANAGA, S., KANEKO, I., KATO, T., MENARD, R., CHINZEI, Y. et YUDA, M. (2013). Liver-specific protein 2 : a *Plasmodium* protein exported to the hepatocyte cytoplasm and required for merozoite formation. *Molecular Microbiology*, 87(1):66–79.
- PACE, T., PONZI, M., DORE, E. et FRONTALI, C. (1987). Telomeric motifs are present in a highly repetitive element in the *Plasmodium berghei* genome. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 24(2):193–202.
- PALAEYA, V., LAU, Y. L., MAHMUD, R., CHEN, Y. et FONG, M. Y. (2013). Cloning , expression , and immunocharacterization of surface protein containing an altered thrombospondin repeat domain (SPATR) from *Plasmodium knowlesi*. *Malaria Journal*, 12(182).
- PARKER, M. L., PENG, F. et BOULANGER, M. J. (2015). The structure of *Plasmodium falciparum* blood-stage 6-cys protein Pf41 reveals an unexpected intra-domain insertion required for Pf12 coordination. *PLoS ONE*, 10(9):1–16.
- PASQUALE, E. B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6):462–75.
- PAUL, G., DESHMUKH, A., KAUR, I., RATHORE, S., DABRAL, S., PANDA, A., SINGH, S. K., MOHAMMED, A., THEISEN, M. et MALHOTRA, P. (2017). A novel Pfs38 protein complex on the surface of *Plasmodium falciparum* blood-stage merozoites. *Malaria Journal*, 16(1):1–15.
- PAYNE, D. (1987). Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*, 3(8):241–246.
- PEARCE, S. F. A., WU, J. et SILVERSTEIN, R. L. (1995). Recombinant GST/CD36 fusion proteins define a thrombospondin binding domain. Evidence for a single calcium-dependent binding site on CD36. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(7):2981–6.
- PELLETIER, J. et CAVENTOU, J. (1820). Suite : Des recherches chimiques sur les quinquinas. *Annales de Chimie et de Physique*, 15:337–365.
- PETRACCA, R., FALUGI, F., GALLI, G., NORAIS, N., ROSA, D., CAMPAGNOLI, S., BURGIO, V., STASIO, E. D. I., GIARDINA, B., HOUGHTON, M., ABRIGNANI, S., GRANDI, G., CESALPINO, F. A., CLINICA, I. I., SAPIENZA, L., I. P. U., FISICA, I. et CLINICA, C. (2000). Structure-Function Analysis of Hepatitis C Virus Envelope-CD81 Binding. *Journal of Virology*, 74(10):4824–4830.
- PHILLIPS, M. A., BURROWS, J. N., MANYANDO, C., VAN HUIJSDUIJNEN, R. H., VAN VOORHIS, W. C. et WELLS, T. N. C. (2017). Malaria. *Nature Reviews Disease Primers*, 3:17050EP.
- PILERI, P., UEMATSU, Y., CAMPAGNOLI, S., GALLI, G., FALUGI, F., PETRACCA, R., WEINER, A. J., HOUGHTON, M., ROSA, D., GRANDI, G. et ABRIGNANI, S. (1998). Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science*, 282(October):938–941.
- PLOEMEN, I. H. J., CROES, H. J., GEMERT, G.-j. J. V., WIJERSROUW, M., HERMSEN, C. C. et SAUERWEIN, R. W. (2012). *Plasmodium berghei* Δ p52&p36 Parasites Develop Independent of a Parasitophorous Vacuole Membrane in Huh-7 Liver Cells. *Plos One*, 7(12):1–5.
- PONNUDURAI, T., LENSEN, A. H. W., van GEMERT, G. J. A., BOLMER, M. G. et MEUWISSEN, J. H. E. T. (1991). Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected *Anopheles stephensi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(2):175–180.

- POSTHUMA, G., MEIS, J., JP., V., GIGENGACK S., Hollingdale, M., PONNUDURAI, T. et GEUZE, H. (1989). Immunogold determination of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in *Anopheles stephensi* salivary gland cells. *European Journal of Cell Biology*, 49(1):66–72.
- PRABHUDAS, M. R., BALDWIN, C. L., BOLLYKY, P. L., BOWDISH, D. M. E., DRICKAMER, K., FEBBRAIO, M., HERZ, J., KOBZIK, L., KRIEGER, M., LOIKE, J., MCVICKER, B., MEANS, T. K., MOESTRUP, S. K., POST, S. R., SAWAMURA, T., SILVERSTEIN, S., SPETH, R. C., TELFER, J. C., THIELE, G. M., WANG, X.-Y., WRIGHT, S. D. et KHOURY, J. E. (2017). A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *The Journal of Immunology*, 198(10):3775–3789.
- PRADEL, G. (2007). Proteins of the malaria parasite sexual stages : expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology*, 134(14):1911–1929.
- PRADEL, G. et FREVERT, U. (2001). Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology*, 33(5):1154–1165.
- PRADEL, G., GARAPATY, S. et FREVERT, U. (2002). Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Molecular Microbiology*, 45(3):637–651.
- PRADEL, G., HAYTON, K., ARAVIND, L., IYER, L. M., ABRAHAMSEN, M. S., BONAWITZ, A., MEJIA, C. et TEMPLETON, T. J. (2004). A Multidomain Adhesion Protein Family Expressed in *Plasmodium falciparum* Is Essential for Transmission to the Mosquito. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(11):1533–44.
- PRUDÊNCIO, M., RODRIGUEZ, A. et MOTA, M. M. (2006). The silent path to thousands of merozoites : the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews Microbiology*, 4(11):849–856.
- RAFFAELE, G. (1936). Presumibili forme iniziale di evoluzione di *Plasmodium relictum*. *Riv. Malariol.*, 15:318–324.
- RAMAKRISHNAN, C., DESSENS, J. T., ARMSON, R., PINTO, S. B., TALMAN, A. M., BLAGBOROUGH, A. M. et SINDEN, R. E. (2011). Vital functions of the malarial ookinete protein, CTRP, reside in the A domains. *International Journal for Parasitology*, 41(10):1029–1039.
- RAMIRO, R. S., KHAN, S. M., FRANKE-FAYARD, B., JANSE, C. J., OBBARD, D. J. et REECE, S. E. (2015). Hybridization and pre-zygotic reproductive barriers in *Plasmodium*. *Proceedings of the Royal Society Biology B : Biological Sciences*, 282(1806):20143027.
- RAMPHUL, U., GARVER, L. S., MOLINA-CRUZ, A., CANEPA, G. E. et BARILLAS-MURY, C. (2015). *Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(5):1273–1280.
- RECZEK, D., SCHWAKE, M., SCHRÖDER, J., HUGHES, H., BLANZ, J., JIN, X., BRONDYK, W., PATTEN, S. V., EDMUNDS, T. et SAFTIG, P. (2007). LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of beta-Glucocerebrosidase. *Cell*, 131(4):770–783.
- RENER, J., GRAVES, P. M., CARTER, R., WILLIAMS, J. L. et BURKOT, T. R. (1983). Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Experimental Medicine*, 158(3):976–981.
- REYNOLDS, G. M., HARRIS, H. J., JENNINGS, A., HU, K., GROVE, J., LALOR, P. F., ADAMS, D. H., MCKEATING, J. A., BALFE, P. et STEFAN, G. H. (2008). Hepatitis C Virus Receptor Expression in Normal and Diseased Liver Tissue. *Hepatology*, 47(2):418–427.
- RHAINDS, D. et BRISSETTE, L. (2004). The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking Defining the rules for lipid traders. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(1):39–77.
- RIBEIRO, J. M. C. et FRANCISCHETTI, I. M. B. (2003). Role of Arthropods Saliva In Blood Feeding : Sialome and Post-Sialome Perspectives. *Annual Review of Entomology*, 48(1):73–88.
- RICH, K. A., IV, F. W. G., LAW, J. L. et MARTIN, W. J. (1990). Cell-Adhesive Motif in Region II of Malarial Circumsporozoite Protein. *Science*, 249(4976):1574–7.
- RIDLEY, R. G. (2002). Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, 415(6872):686–93.
- RIGLAR, D. T., RICHARD, D., WILSON, D. W., BOYLE, M. J., DEKIWIADIA, C., TURNBULL, L., ANGRISANO, F., MARAPANA, D. S., ROGERS, K. L., WHITCHURCH, C. B., BEESON, J. G., COWMAN, A. F., RALPH, S. A. et BAUM, J. (2011). Super-Resolution Dissection of Coordinated Events during Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte. *Cell Host and Microbe*, 9(1):9–20.
- RIGLAR, D. T., WHITEHEAD, L., COWMAN, A. F., ROGERS, K. L. et BAUM, J. (2016). Localisation-based imaging of malarial antigens during erythrocyte entry reaffirms a role for AMA1 but not MTRAP in invasion. *The Company of Biologists*, 129(1):228–242.
- RISCO-CASTILLO, V., TOPÇU, S., MARINACH, C., MANZONI, G., BIGORGNE, A., BRIQUET, S., BAUDIN, X., LEBRUN, M. et SILVIE, O. (2015). Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. *Cell Host and Microbe*, 18(5):593–603.
- RISCO-CASTILLO, V., TOPÇU, S., SON, O., BRIQUET, S., MANZONI, G. et SILVI (2014). CD81 is required for rhoptry discharge during host cell invasion by *Plasmodium yoelii* sporozoites. *Cellular Microbiology*, 16(10):1533–1548.

- ROBSON, K. J. H., FREVERT, U., COWAN, G., BEIER, J., SCRAGG, I. G., TAKEHARA, K., BISHOP, D. H. L., PRADEL, G., SINDEN, R., SACCHIO, S., MULLER, H.-m. et CRISANTI, A. (1995). Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* : expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *The EMBO journal*, 14(16):3883–3894.
- ROBSON, K. J. H., HALL, J. R. S., JENNINGS, M. W., HARRIS, T. J. R., MARSH, K., NEWBLOD, C. I., TATE, V. E. et WEATHERALL, D. J. (1988). A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature*, 335(6185):79–82.
- ROCCASECCA, R., ANSUINI, H., VITELLI, A., MEOLA, A., SCARSELLI, E., ACALI, S., PEZZANERA, M., ERCOLE, B. B., MCKEATING, J., YAGNIK, A., LAHM, A., TRAMONTANO, A., CORTESE, R. et NICOSIA, A. (2003). Binding of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein to CD81 Is Strain Specific and Is Modulated by a Complex Interplay between Hypervariable Regions 1 and 2. *Journal of Virology*, 77(3):1856–1867.
- RODRIGUES, C. D., HANNUS, M., PRUDÊNCIO, M., MARTIN, C., GONÇALVES, L. A., PORTUGAL, S., EPIPHANIO, S., AKINC, A., HADWIGER, P., JAHN-HOFMANN, K., RÖHL, I., van GEMERT, G.-J., FRANETICH, J.-F., LUTY, A. J. F., SAUERWEIN, R., MAZIER, D., KOTELIANSKY, V., VORNLOCHER, H.-p., ECHEVERRI, C. J. et MOTA, M. M. (2008). Host Scavenger Receptor SR-BI Plays a Dual Role in the Establishment of Malaria Parasite Liver Infection. *Cell Host and Microbe*, 4(3):271–282.
- ROE, J. K. et PASVOL, G. (2009). New developments in the management of malaria in adults. *QJM*, 102(10):685–693.
- ROESTENBERG, M., TEIRLINCK, A. C., MCCALL, M. B. B., TEELEN, K., MAKAMDOP, K. N., WIERSMA, J., ARENS, T., BECKERS, P., van GEMERT, G. J., VAN DE VEGTE-BOLMER, M., VAN DER VEN, A. J. A. M., LUTY, A. J. F., HERMSEN, C. C. et SAUERWEIN, R. W. (2011). Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation : an open-label follow-up study. *Lancet*, 377(9779):1770–6.
- ROGERS, W., MALIK, A., MELLOUK, S., NAKAMURA, K., ROGERS, M. D., SZARFMANIL, A. N. A., GORDON, D. M., NUSSLERTT, A. K., AIKAWA, M. et HOFFMAN, S. L. (1992a). Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19):9176–9180.
- ROGERS, W. O., ROGERS, M. D., HEDSTROM, R. C. et HOFFMANN, S. L. (1992b). Characterization of the gene encoding sporozoite surface protein 2, a protective *Plasmodium yoelii* sporozoite antigen. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 53(1-2):45–52.
- ROSENBERG, R., WIRTZ, R. A., SCHNEIDER, I. et BURGE, R. (1990). An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2):209–212.
- ROSS, R. (1897). On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. *The British Medical Journal*, (december):1786–1788.
- ROWE, J. A., CLAESSENS, A., CORRIGAN, R. A. et ARMAN, M. (2009). Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells : molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert reviews in molecular medicine*, 11(May):e16.
- RUSSELL, P. F. et MOHAN, B. N. (1942). The Immunization of Fowls Against Mosquito-borne *Plasmodium gallinaceum* by Injections of Serum and of Inactivated Homologous Sporozoites. *The Journal of Experimental Medicine*, 76(5):477–95.
- RYEOM, S. W., SPARROW, J. R. et SILVERSTEIN, R. L. (1996). CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *Journal of Cell Science*, 109(2):387–395.
- SACKS, D. et SACKS, D. (2015). Gateway to deLiver : How malaria sporozoites cross the sinusoidal barrier. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(9):1340.
- SALA, K. A., NISHIURA, H., UPTON, L. M., ZAKUTANSKY, S. E., DELVES, M. J., IYORI, M., MIZUTANI, M., SINDEN, R. E., YOSHIDA, S. et BLAGBOROUGH, A. M. (2015). The *Plasmodium berghei* sexual stage antigen PSOP12 induces anti-malarial transmission blocking immunity both in vivo and in vitro. *Vaccine*, 33(3):437–445.
- SANDERS, P. R., CANTIN, G. T., GREENBAUM, D. C., GILSON, P. R., NEBL, T., MORITZ, R. L., YATES, J. R., HODDER, A. N. et CRABB, B. S. (2007). Identification of protein complexes in detergent-resistant membranes of *Plasmodium falciparum* schizonts. *Molecular And Biochemical Parasitology*, 154(2):148–157.
- SANDERS, P. R., GILSON, P. R., CANTIN, G. T., GREENBAUM, D. C., NEBL, T., CARUCCI, D. J., MCCONVILLE, M. J., SCHOFIELD, L., HODDER, A. N., YATES, J. R. et CRABB, B. S. (2005). Distinct Protein Classes Including Novel Merozoite Surface Antigens in Raft-like Membranes of *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(48):40169–40176.
- SAWMYNADEN, K., SAOUROS, S., MARCHANT, J., SIMPSON, P. et MATTHEWS, S. (2008). Complete NMR assignments for the second EGF domain of MIC6 from *Toxoplasma gondii* and re-assignment in complex with the galectin-like domain of MIC1. *Biomolecular NMR Assignments*, 2(2):187–9.
- SCARSELLI, E., ANSUINI, H., CERINO, R., ROCCASECCA, R. M., ACALI, S., FILOCAMO, G., TRABONI, C., NICOSIA, A., CORTESE, R. et VITELLI, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO Journal*, 21(19):5017–5025.

- SCHNEIDER, P., REECE, S. E., SCHAIJK, B. C. L. V., BOUSEMA, T., LANKE, K. H. W., MEADEN, C. S. J., GADALLA, A., RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. et BABIKER, H. A. (2015). Quantification of female and male *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcriptase quantitative PCR. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 199(1-2):29–33.
- SCHOLZ, M. S., SIMON, N., LAVAZEC, C., DUDE, M.-a., TEMPLETON, T. J. et PRADEL, G. (2008). Pf CCp proteins of *Plasmodium falciparum*: Gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. *International Journal for Parasitology*, 38(3-4):327–340.
- SEDER, R. A., CHANG, L.-j., ENAMA, M. E., ZEPHIR, K. L., SARWAR, U. N., GORDON, I. J., HOLMAN, L. A., JAMES, E. R., BILLINGSLEY, P. F., GUNASEKERA, A., RICHMAN, A., CHAKRAVARTY, S., MANOJ, A., VELMURUGAN, S., LI, M., RUBEN, A. J., LI, T., EAPPEN, A. G., STAFFORD, R. E., PLUMMER, S. H., HENDEL, C. S., NOVIK, L., COSTNER, P. J. M., MENDOZA, F. H., SAUNDERS, J. G., NASON, M. C., RICHARDSON, J. H., MURPHY, J., DAVIDSON, S. A., RICHIE, T. L., SEDEGAH, M., SUTAMIHARDJA, A., FAHLE, G. A., LYKE, K. E., LAURENS, M. B., ROEDERER, M., TEWARI, K., EPSTEIN, J. E., SIM, B. K. L., LEDGERWOOD, J. E., GRAHAM, B. S., HOFFMAN, S. L. et study TEAM, T. V. (2013). Protection Against Malaria by Intravenous Immunization with a Nonreplicating Sporozoite Vaccine. *Science*, 341(6152):1359–65.
- SEIGNEURET, M. (2006). Complete Predicted Three-Dimensional Structure of the Facilitator Transmembrane Protein and Hepatitis C Virus Receptor CD81: Conserved and Variable Structural Domains in the Tetraspanin Superfamily. *Biophysical Journal*, 90(January):212–227.
- SEIRADAKE, E., HARLOS, K., SUTTON, G., ARICESCU, A. R. et JONES, E. Y. (2010). An extracellular steric seeding mechanism for Eph-ephrin signaling platform assembly. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(4):398–402.
- SETTEMBRE, C., FRALDI, A., MEDINA, D. L. et BALLABIO, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5):283–296.
- SHAW, M. L., MCLAUCHLAN, J., MILLS, P. R., PATEL, A. H. et MCCRUDEN, E. A. B. (2003). Characterisation of the Differences Between Hepatitis C Virus Genotype 3 and 1 Glycoproteins. *Journal of Medical Virology*, 70(3):361–372.
- SHIMP, R. L., ROWE, C., REITER, K., CHEN, B., NGUYEN, V., AEBIG, J., RAUSCH, K. M., KUMAR, K., WU, Y., JIN, A. J., JONES, D. S. et NARUM, D. L. (2013). Development of a Pfs25-EPA malaria transmission blocking vaccine as a chemically conjugated nanoparticle. *Vaccine*, 31(28):2954–2962.
- SHIN, S. C. J., VANDERBERG, J. P. et TERZAKIS, J. A. (1982). Direct Infection of Hepatocytes by Sporozoites of *Plasmodium berghei*. *J. protozool.*, 29(3):448–454.
- SHORTT, H. E. et GARNHAM, P. C. C. (1948). The Pre-erythrocytic Development of *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium vivax*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(6):785–795.
- SHORTT, H. E., HAMILTON FAIRLEY, N., COVELL, G., SHUTE, P. G. et GARNHAM, P. C. C. (1951). The Pre-erythrocytic Stage of *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 44(4):405–419.
- SIDDIQUI, F. A., DHAWAN, S., SINGH, S., SINGH, B., GUPTA, P., PANDEY, A., MOHAMMED, A., GAUR, D. et CHITNIS, C. E. (2013). A thrombospondin structural repeat containing rhoptry protein from *Plasmodium falciparum* mediates erythrocyte invasion. *Cellular Microbiology*, 15(8):1341–1356.
- SIDJANSKI, S. et VANDERBERG, J. P. (1997). Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57(4):426–429.
- SIDJANSKI, S. P., VANDERBERG, J. P. et SINNIS, P. (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.
- SILVERSTEIN, R. L. et FEBBRAIO, M. (2009). CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Science Signaling*, 2(72):re3.
- SILVESTRINI, F., LASONDER, E., OLIVIERI, A., CAMARDA, G., SCHAIJK, B. V., SANCHEZ, M., YOUNIS, S. Y., SAUERWEIN, R., ALANO, P., SUPERIORE, I. et ELENA, V. R. (2010). Protein Export Marks the Early Phase of Gametocytogenesis of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(7):1437–1448.
- SILVIE, O., BOUCHEIX, C., RUBINSTEIN, E. et MAZIER, D. (2007). Alternative invasion pathways for *Plasmodium berghei* sporozoites. *International Journal for Parasitology*, 37(2):173–182.
- SILVIE, O., CHARRIN, S., BILLARD, M., FRANETICH, J.-f., CLARK, K. L., VAN GEMERT, G.-j., SAUERWEIN, R. W., DAUTRY, F., BOUCHEIX, C., MAZIER, D. et RUBINSTEIN, E. (2006a). Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *Journal of Cell Science*, 119(10):1992–2002.
- SILVIE, O., GRECO, C., FRANETICH, J. F., DUBART-KUPPERSCHMITT, A., HANNOUN, L., van GEMERT, G. J., SAUERWEIN, R. W., LEVY, S., BOUCHEIX, C., RUBINSTEIN, E. et MAZIER, D. (2006b). Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the *Plasmodium* species. *Cellular Microbiology*, 8(7):1134–1146.
- SILVIE, O., RUBINSTEIN, E., FRANETICH, J.-F., PRENANT, M., BELNOUE, E., RÉNIA, L., HANNOUN, L., ELING, W., LEVY,

- S., BOUCHEIX, C. et MAZIER, D. (2003). Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nature medicine*, 9(1):93–96.
- SIMON, N., KUEHN, A., WILLIAMSON, K. C. et PRADEL, G. (2016). Parasitology International Adhesion protein complexes of malaria gametocytes assemble following parasite transmission to the mosquito. *Parasitology International*, 65(1):27–30.
- SIMON, N., SCHOLZ, S. M., MOREIRA, C. K., TEMPLETON, T. J., KUEHN, A., DUDE, M.-a. et PRADEL, G. (2009). Sexual Stage Adhesion Proteins Form Multi-protein Complexes in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(21):14537–14546.
- SINDEN, R. E. (1974). Excystation by Sporozoites of Malaria Parasites. *Nature*, 252.
- SINDEN, R. E. (2010). A biologist's perspective on malaria vaccine development. *Human vaccine*, 6(1):3–11.
- SINDEN, R. E. et GARNHAM, P. C. C. (1973). A Comparative Study on the Ultrastructure of *Plasmodium* sporozoites within the oocyst and salivary glands, with particular reference to the incidence of the micropore. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(5):631–637.
- SINDEN, R. E. et STRONG, K. (1978). An ultrastructural study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(5):477–91.
- SINKA, M. E., BANGS, M. J., MANGUIN, S., COETZEE, M., MBOGO, C. M., HEMINGWAY, J., PATIL, A. P., TEMPERLEY, W. H., GETHING, P. W., KABARIA, C. W., OKARA, R. M., BOECKEL, T. V., GODFRAY, H. C. J., HARBACH, R. E. et HAY, S. I. (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasites & Vectors*, 3:e117.
- SINNIS, P., CLAVIJO, P., FENYT, D., CHAIT, B. T., CERAMI, C. et NUSSENZWEIG, V. (1994). Structural and Functional Properties of Region II-Plus of the Malaria Circumsporozoite Protein. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(1):297–306.
- SINNIS, P. et COPPI, A. (2007). A long and winding road: The *Plasmodium* sporozoite's journey in the mammalian host. *Parasitology International*, 56:171–178.
- SINNIS, P., COPPI, A., TOIDA, T., TOYODA, H., KINOSHITA-TOYODA, A., XIE, J., KEMP, M. M. et LINHARDT, R. J. (2007). Mosquito Heparan Sulfate and Its Potential Role in Malaria Infection and Transmission. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(35):25376–25384.
- SINNIS, P. et FEBBRAIO, M. (2002). *Plasmodium yoelii* Sporozoites Infect CD36-Deficient Mice. *Experimental Parasitology*, 78(2):897–901.
- SIRIMA, S. B., MORDMÜLLER, B., MILLIGAN, P., ATEBA, U., KIRONDE, F., ATUGUBA, F., TIONO, A. B., ISSIFOU, S., KADUMUKASA, M., BANGRE, O., FLACH, C., CHRISTIANSEN, M., BANG, P., CHILENGI, R., JEPSEN, S., KREMSNER, P. G., THEISEN, M. et GROUP, T. G. T. S. (2016). A phase 2b randomized, controlled trial of the efficacy of the GMZ2 malaria vaccine in African children. *Vaccine*, 34(38):4536–4542.
- SMITH, J. D., KYES, S., CRAIG, A. G., FAGAN, T., HUDSON-TAYLOR, D., MILLER, L. H., BARUCH, D. I. et NEWBOLD, C. I. (1998). Analysis of adhesive domains from the A4VAR *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 identifies a CD36 binding domain. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 97(1-2):133–148.
- SMITH, T. G., SERGHIDES, L., PATEL, S. N., FEBBRAIO, M., SILVERSTEIN, R. L. et KAIN, K. C. (2003). CD36-Mediated Nonopsonic Phagocytosis of Erythrocytes Infected with Stage I and IIA Gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, 71(1):393–400.
- SONG, G., KOKSAL, A. C., LU, C. et SPRINGER, T. a. (2012). Shape change in the receptor for gliding motility in *Plasmodium* sporozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(52):21420–5.
- SRINIVASAN, P., ABRAHAM, E. G., GHOSH, A. K., VALENZUELA, J., RIBEIRO, J. M. C., DIMOPOULOS, G., KAFATOS, F. C., ADAMS, J. H., FUJIOKA, H. et JACOBS-LORENA, M. (2004). Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* Transcripts during Oocyst Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7):5581–5587.
- SRINIVASAN, P., BEATTY, W. L., DIOUF, A., HERRERA, R., AMBROGGIO, X., MOCH, J. K., TYLER, J. S., NARUM, D. L., PIERCE, S. K., BOOTHROYD, J. C., HAYNES, J. D. et MILLER, L. H. (2011). Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32):13275–13280.
- SRIVASTAVA, A., GANGNARD, S., DECHAVANNE, S., AMIRAT, F., BENTLEY, A. L., BENTLEY, G. A. et GAMAIN, B. (2011). Var2CSA Minimal CSA Binding Region Is Located within the N-Terminal Region. *PLOS ONE*, 6(5):e20270.
- STEINBUECHEL, M. et MATUSCHEWSKI, K. (2009). Role for the *Plasmodium* sporozoite-specific transmembrane protein S6 in parasite motility and efficient malaria transmission. *Cellular Microbiology*, 11(2):279–288.
- STEWART, C. R., STUART, L. M., WILKINSON, K., GILS, J. M. V., DENG, J., HALLE, A., RAYNER, K. J., BOYER, L., ZHONG, R., FRAZIER, W. A., LACY-HULBERT, A., EL KHOURY, J., GOLENBOCK, D. T. et MOORE, K. J. (2009). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunology*, 11(2):155–161.

- STEWART, M. J., SCHULMAN, S. et VANDERBERG, J. P. (1985). Rhoptry Secretion of Membranous Whorls by *Plasmodium berghei* Sporozoites. *The Journal of Protozoology*, 32(2):280–283.
- STIPP, C. S., KOLESNIKOVA, T. V. et HEMLER, M. E. (2001). EWI-2 Is a Major CD9 and CD81 Partner and Member of a Novel Ig Protein Subfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44):40545–40554.
- STIPP, C. S., KOLESNIKOVA, T. V. et HEMLER, M. E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(2):106–112.
- SUAREZ-QUIAN, C. A. (1988). Differential cell surface expression of four lysosomal integral membrane proteins (LIMPs) in normal rat kidney cells. *Tissue & Cell*, 20(1):35–46.
- SULTAN, A. A., THATHY, V., FREVERT, U., ROBSON, K. J. H., CRISANTI, A., NUSSENZWEIG, V. et NUSSENZWEIG, R. S. (1997). TRAP Is Necessary for Gliding Motility and Infectivity of *Plasmodium* Sporozoites. *Cell*, 90(3):511–522.
- SWEARINGEN, K. E., LINDNER, S. E., SHI, L., SHEARS, M. J., HARUPA, A., HOPP, C. S., VAUGHAN, A. M., SPRINGER, T. A., MORITZ, L., KAPPE, S. H. I. et SINNIS, P. (2016). Interrogating the *Plasmodium* Sporozoite Surface : Identification of Surface-Exposed Proteins and Demonstration of Glycosylation on CSP and TRAP by Mass Spectrometry-Based Proteomics. *PLoS Pathogens*, 12(4):e1005606.
- TACHIBANA, M., SUWANABUN, N., KANEKO, O. et IRIKO, H. (2015). *Plasmodium vivax* gametocyte proteins , Pvs48/45 and Pvs47 , induce transmission-reducing antibodies by DNA immunization. *Vaccine*, 33(16):1901–1908.
- TAECHALERTPAISARN, T., CROSNIER, C., BARTHOLDSON, S. J., HODDER, A. N., THOMPSON, J., BUSTAMANTE, L. Y., WILSON, D. W., SANDERS, P. R., WRIGHT, G. J., RAYNER, J. C., COWMAN, A. F., GILSON, P. R. et CRABB, B. S. (2012). Biochemical and Functional Analysis of Two *Plasmodium falciparum* Blood-Stage 6-Cys Proteins : P12 and P41. *Plos One*, 7(7):e41937.
- TALMAN, A. M., LACROIX, C., MARQUES, S. R., BLAGBOROUGH, A. M., CARZANIGA, R., MÉNARD, R. et SINDEN, R. E. (2011). PbGEST mediates malaria transmission to both mosquito and vertebrate host. *Molecular Biology*, 82(2):462–474.
- TAN, K., DUQUETTE, M., LIU, J.-h., DONG, Y., ZHANG, R., JOACHIMIAK, A., LAWLER, J. et WANG, J.-h. (2002). Crystal structure of the TSP-1 type 1 repeats : a novel layered fold and its biological implication. *The Journal of Cell Biology*, 159(2):373–382.
- TAO, N., WAGNER, S. J. et LUBLIN, D. M. (1996). CD36 Is Palmitoylated on Both N- and C-terminal Cytoplasmic Tails. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(37):22315–22320.
- TAVARES, J., FORMAGLIO, P., THIBERGE, S., MORDELET, E., ROOIJEN, N. V., MEDVINSKY, A., MÉNARD, R. et AMINO, R. (2013). Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(5):905–915.
- TEMPLETON, T. J., IYER, L. M., ANANTHARAMAN, V., ENOMOTO, S., ABRAHANTE, J. E., SUBRAMANIAN, G. M., HOFFMAN, S. L., ABRAHAMSEN, M. S. et ARAVIND, L. (2004). Comparative Analysis of *Apicomplexa* and Genomic Diversity in Eukaryotes. *Genome Research*, 14(9):1686–1695.
- TEMPLETON, T. J. et KASLOW, D. C. (1999). Identification of additional members define a *Plasmodium falciparum* gene superfamily which includes Pfs48/45 and Pfs230. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 101(1-2):223–227.
- TEMPLETON, T. J., KASLOW, D. C. et FIDOCK, D. A. (2000). Developmental arrest of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* within the mosquito midgut via CTRP gene disruption. *Molecular Microbiology*, 36(1):1–9.
- TEWARI, R., SPACCAPELO, R., BISTONI, F., HOLDER, A. A. et CRISANTI, A. (2002). Function of Region I and II Adhesive Motifs of *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein in Sporozoite Motility and Infectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(49):47613–47618.
- THATHY, V., FUJIOKA, H., GANTT, S., NUSSENZWEIG, R., NUSSENZWEIG, V. et MÉNARD, R. (2002). Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. *The EMBO journal*, 21(7):1586–1596.
- THEISEN, M., SOE, S., BRUNSTEDT, K., FOLLMANN, F., BREDMOSE, L., ISRAELSEN, H., MADSEN, S. M. et DRUILHE, P. (2004). A *Plasmodium falciparum* GLURP–MSP3 chimeric protein ; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. *Vaccine*, 22(9-10):1188–1198.
- THOMPSON, J., COOKE, R. E., MOORE, S., ANDERSON, L. F., JANSE, C. J. et WATERS, A. P. (2004). PTRAMP ; a conserved *Plasmodium* thrombospondin-related apical merozoite protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 134(2):225–232.
- THOMPSON, J., JANSE, C. J. et WATERS, A. P. (2001). Comparative genomics in *Plasmodium* : a tool for the identification of genes and functional analysis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 118(2):147–154.
- TONKIN, M. L., ARREDONDO, S. A., LOVELESS, B. C., SERPA, J. J., MAKEPEACE, K. A. T., SUNDAR, N., PETROTCHENKO, E. V., MILLER, L. H., GRIGG, M. E. et BOULANGER, M. J. (2013). Structural and biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* 12 (Pf12) reveals a unique interdomain organization and the potential for an antiparallel arrangement with Pf41. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18):12805–12817.

- TONKIN, M. L., ROQUES, M., LAMARQUE, M. H., PUGNIÈRE, M., DOUGUET, D., CRAWFORD, J., LEBRUN, M. et BOULANGER, M. J. (2011). Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites : Insights from the Co-Structure of AMA1 with a RON2 Peptide. *Science*, 333(6041):463–7.
- TROTTEIN, F., TRIGLIA, T. et COWMAN, A. F. (1995). Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and Plasmodia. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 74(2):129–141.
- TU, Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*, 17(10):1217–1220.
- TUCKER, R. P. (2004). The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *The International Journal of Biochemistry*, 36(6):969–974.
- UKEGBU, C. V., GIORGALLI, M., YASSINE, H., RAMIREZ, J. L., TAXIARCHI, C., BARILLAS-MURY, C., CHRISTOPHIDES, G. K. et VLACHOU, D. (2017). Plasmodium berghei P47 is essential for ookinete protection from the Anopheles gambiae complement-like response. *Science Translational Medicine*, 7(6026).
- UMEMIYA, T., TAKEICHI, M. et NOSE, A. (1997). M-Spondin , a Novel ECM Protein Highly Homologous to Vertebrate F-Spondin , Is Localized at the Muscle Attachment Sites in the *Drosophila* Embryo. *Developmental Biology*, 186(2):165–176.
- URBAN, S., ZIESENIS, S., WERDER, M., HAUSER, H., BUDZINSKI, R. et ENGELMANN, B. (2000). Scavenger Receptor BI Transfers Major Lipoprotein-associated Phospholipids into the Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43):33409–33415.
- VAN DIJK, M. R., DOURADINHA, B., FRANKE-FAYARD, B., HEUSSLER, V., VAN DOOREN, M. W., SCHAIJK, B. V., van GEMERT, G.-J., SAUERWEIN, R. W., MOTA, M. M., WATERS, A. P. et JANSE, C. J. (2005). Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(34):12194–12199.
- VAN DIJK, M. R., JANSE, C. J., THOMPSON, J., WATERS, A. P., BRAKS, J. A. M., DODEMONT, H. J., STUNNENBERG, H. G., van GEMERT, G.-J., SAUERWEIN, R. W., ELING, W. et NIJMEGEN, E. D. (2001). A Central Role for P48/45 in Malaria Parasite Male Gamete Fertility. *Cell*, 104(1):153–164.
- VAN DIJK, M. R., VAN SCHAIJK, B. C. L., KHAN, S. M., VAN DOOREN, M. W., RAMESAR, J., KACZANOWSKI, S., VAN GEMERT, G.-j., KROEZE, H., STUNNENBERG, H. G., WIJNAND, M., SAUERWEIN, R. W., WATERS, A. P. et JANSE, C. J. (2010). Three Members of the 6-cys Protein Family of *Plasmodium* Play a Role in Gamete Fertility. *PLoS Pathogens*, 6(4):e1000853.
- VAN SCHAIJK, B. C. L., JANSE, C. J., van GEMERT, G.-J., VAN DIJK, M. R., GEGO, A., FRANETICH, F., VAN DE VEGTE-BOLMER, M., YALAOUI, S., SILVIE, O., STEPHEN, L., WATERS, A. P., MAZIER, D., SAUERWEIN, R. W. et KHAN, S. M. (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.
- VAN SCHAIJK, B. C. L., VAN DIJK, M. R., VEGTE-BOLMER, M. V. D., van GEMERT, G.-J., VAN DOOREN, M. W., EKSI, S., ROEFFEN, W. F. G., JANSE, C. J., WATERS, A. P. et SAUERWEIN, R. W. (2006). Pfs47, paralog of the male fertility factor Pfs48/45 , is a female specific surface protein in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149:216–222.
- VANBUSKIRK, K. M., NEILL, M. T. O., LA, P. D., MAIER, A. G., KRZYCH, U., WILLIAMS, J., DOWLER, M. G., SACCI, J. B., KANGWANRANGSAN, N., TSUBOI, T., KNETEMAN, N. M., HEPPNER, D. G., MURDOCK, B. A., MIKOLAJCZAK, S. A., ALY, A. S. I., COWMAN, A. F. et KAPPE, S. H. I. (2009). Preerythrocytic, live-attenuated *Plasmodium falciparum* vaccine candidates by design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31):13004–13009.
- VANDERBERG, J., RHODIN, J. et YOELI, M. (1967). Electron Microscopic and Histochemical Studies Of Sporozoite Formation in *Plasmodium berghei*. *The Journal of Protozoology*, 14(1):82–103.
- VANDERBERG, J. P. et FREVERT, U. (2004). Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *International Journal for Parasitology*, 34(9):991–996.
- VANDERBERG, J. P. et RHODIN, J. (1967). Differentiation of Nuclear and Cytoplasmic Fine Structure during Sporogonic Development Of *Plasmodium Berghei*. *The Journal of Cell Biology*, 32(3):7–10.
- VERGEER, M., KORPORAAL, S. J. A., FRANSSEN, R., MEURS, I., OUT, R., HOVING, KEES, G., HOEKSTRA, M., SIERTS, J. A., DALLINGA-TIE, G. M., MOTAZACKER, M. M., HOLLEBOOM, A., VAN BERKEL, T. J. C., KASTELEIN, J. J. P., VAN ECK, M. et KUIVENHOVEN, J. A. (2011). Genetic Variant of the Scavenger Receptor BI in Humans. *The New England Journal of Medicine*, 362(2):136–45.
- VERMEULEN, A. N., PONNUDURAI, T., BECKERS, P. J., VERHAVE, J. P., SMITS, M. A. et MEUWISSEN, J. H. (1985). Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *Journal of Experimental Medicine*, 162(5):1460–1476.
- VIÑALS, M., XU, S., VASILE, E. et KRIEGER, M. (2003). Identification of the N-Linked Glycosylation Sites on the High Density Lipoprotein (HDL) Receptor SR-BI and Assessment of Their Effects on HDL Binding and Selective Lipid

- Uptake. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(7):5325–5332.
- VLACHOU, D., SCHLEGELMILCH, T., RUNN, E., MENDES, A. et KAFATOS, F. C. (2006). The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current Opinion in Genetics & Development*, (16):384–391.
- VON BOHL, A., KUEHN, A., SIMON, N., NGONGANG, V. N., SPEHR, M., BAUMEISTER, S., PRZYBORSKI, J. M., FISCHER, R. et PRADEL, G. (2015). A WD40-repeat protein unique to malaria parasites associates with adhesion protein complexes and is crucial for blood stage progeny. *Malaria Journal*, 14(435).
- WALLER, R. F., KEELING, P. J., DONALD, R. G., STRIEPEN, B., HANDMAN, E., LANG-UNNASCH, N., COWMAN, a. F., BESRA, G. S., ROOS, D. S. et MCFADDEN, G. I. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21):12352–7.
- WANG, Q., FUJIOKA, H. et NUSSENZWEIG, V. (2005). Mutational analysis of the GPI-anchor addition sequence from the circumsporozoite protein of *Plasmodium*. *Cellular microbiology*, 7(11):1616–1626.
- WANG, Y., KECK, Z.-y. et FOUNG, S. K. H. (2011). Neutralizing Antibody Response to Hepatitis C Virus. *Viruses*, 3:2127–2145.
- WASMUTH, J., DAUB, J., PEREGRIN-ALVAREZ, J. M., FINNEY, C. A. M. et PARKINSON, J. (2009). The origins of apicomplexan sequence innovation. *Genome Research*, 19:1202–1213.
- WATERS, A. P., HIGGINS, D. G. et McCUTCHAN, T. F. (1991). *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(April):3140–3144.
- WENDELNIK, K., SPACCAPELO, R., NAITZA, S., ROBSON, K. J. H., JANSE, C. J., BISTONI, F., WATERS, A. P. et CRISANTI, A. (1999). The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO Journal*, 18(19):5195–5204.
- WERREN, J. H., BALDO, L. et CLARK, M. E. (2008). *Wolbachia* : master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10):741–51.
- WHITE, N. J. (2014). Malaria. In FARRAR, J., HOTEZ, P. J., JUNGHANS, T., KANG, G., LALLOO, D. et WHITE, N., éditeurs : *Manson's Tropical Infectious Diseases*, chapitre 43. Elsevier, 23rd edition édition.
- WHITE, N. J., PUKRITTAYAKAMEE, S., HIEN, T. T., FAIZ, A. M., MOKUOLU, O. A. et DONDROP, A. M. (2014). Malaria. *Lancet*, 383(February):723–35.
- WHO (2015). *World malaria report 2015*.
- WHO (2016). *World malaria report 2016*.
- WILLIAMSON, K. C., CRISCIO, M. D. et KASLOW, D. C. (1993). Cloning And Expression Of The Gene For *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Target Antigen, Pfs230. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58(2):355–358.
- WILLIAMSON, K. C., FUJIOKAB, H., AIKAWAB, M. et KASLOW, D. C. (1996). Stage-specific processing of Pfs230, a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 78:161–169.
- WILLIAMSON, K. C. et KASLOW, D. C. (1993). Strain polymorphism of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking target antigen Pfs230. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62:125–128.
- WINDBICHLER, N., MENICHELLI, M., PAPATHANOS, P. A., THYME, S. B., LI, H., ULGE, U. Y., HOVDE, B. T., BAKER, D., MONNAT JR, R. J., BURT, A. et CRISANTI, A. (2011). A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito. *Nature*, 473(7346):212–215.
- WISSE, E., BRAET, F., LUO, D., DE ZANGER, R., JANS, D., CRABBÉ, E. et VERMOESEN, A. (1996). Structure and Function of Sinusoidal Lining Cells in the Liver. *Toxicologic Pathology*, 24(1):100–111.
- WYKOSKY, J. et DEBINSKI, W. (2008). The EphA2 Receptor and EphrinA1 Ligand in Solid Tumors : Function and Therapeutic Targeting. *Molecular Cancer Research*, 6(12):1795–1807.
- YALAOUI, S., HUBY, T., FRANETICH, J.-F., GEGO, A., RAMETTI, A., MOREAU, M., COLLET, X., SIAU, A., van GEMERT, G.-J., SAUERWEIN, R. W., LUTY, A. J. F., VAILLANT, J.-c., HANNOUN, L., CHAPMAN, J., MAZIER, D. et FROISSARD, P. (2008a). Scavenger Receptor BI Boosts Hepatocyte Permissiveness to *Plasmodium* Infection. *Cell Host and Microbe*, 4(3):283–292.
- YALAOUI, S., ZOUGBÉDÉ, S., CHARRIN, S., SILVIE, O., ARDUISE, C., FARHATI, K., BOUCHEIX, C., MAZIER, D., RUBINSTEIN, E. et FROISSARD, P. (2008b). Hepatocyte permissiveness to *Plasmodium* infection is conveyed by a short and structurally conserved region of the CD81 large extracellular domain. *PLoS Pathogens*, 4(2):e1000010.
- YAMAYOSHI, S., YAMASHITA, Y., LI, J., HANAGATA, N., MINOWA, T., TAKEMURA, T. et KOIKE, S. (2009). Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nature Medicine*, 15(7):798–802.
- YANG, A. S. P., O'NEILL, M. T., JENNISON, C., LOPATICKI, S., ALLISON, C. C., ARMISTEAD, J. S., ERICKSON, S. M., ROGERS, K. L., ELLISDON, A. M., WHISSTOCK, J. C., TWEDELL, R. E., DINGLASAN, R. R., DOUGLAS, D. N., KNETEMAN, N. M. et BODDEY, J. A. (2017). Cell Traversal Activity Is Important

- for *Plasmodium falciparum* Liver Infection in Humanized Mice. *Cell Reports*, 18(13):3105–3116.
- YOSHIDA, N., NUSSENZWEIG, R. S., POTOCNJAK, P., NUSSENZWEIG, V. et AIKAWA, M. (1980). Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage malaria parasite. *Science*, 207(4426):71–73.
- YUDA, M., SAKAIDA, H. et CHINZEI, Y. (1999). Targeted Disruption of the *Plasmodium berghei* CTRP gene Reveals Its Essential Role in Malaria Infection of the Vector Mosquito. *Journal of Experimental Medicine*, 190(11):1711–1715.
- YUHANNA, I. S., ZHU, Y., COX, B. E., HAHNER, L. D., OSBORNE-LAWRENCE, S., LU, P., MARCEL, Y. L., ANDERSON, R. G. W., MENDELSON, M. E., HOBBS, H. H. et SHAUL, P. W. (2001). High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, 7(7):853–857.
- ZEISEL, M. B., KOUTSOUDAKIS, G., SCHNOBER, E. K., HABERSTROH, A., BLUM, H. E., WAKITA, T., JAECK, D., DOFFOEL, M., ROYER, C., SOULIER, E., SCHVOERER, E., SCHUSTER, C., BARTENSLAGER, R., PIETSCHMANN, T., BARTH, H. et BAUMERT, T. F. (2007). Scavenger Receptor Class B Type I Is a Key Host Factor for Hepatitis C Virus Infection Required for an Entry Step Closely Linked to CD81. *Hepatology*, 46(6):1722–1731.
- ZELINSKI, D. P., ZANTEK, N. D., STEWART, J. C., IRIZARRY, A. R. et KINCH, M. S. (2001). EphA2 Overexpression Causes Tumorigenesis of Mammary Epithelial Cells 1. *Cancer Research*, 61(5):2301–2306.
- ZHANG, J., RANDALL, G., HIGGINBOTTOM, A., MONK, P., RICE, C. M. et MCKEATING, J. A. (2004). CD81 Is Required for Hepatitis C Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection. *Journal of Virology*, 78(3):1448–1455.
- ZHANG, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(40).
- ZHAO, J., BHANOT, P., HU, J. et WANG, Q. (2016). A Comprehensive Analysis of *Plasmodium* Circumsporozoite Protein Binding to Hepatocytes. *PLOS ONE*, 11(8):e0161607.
- ZHU, D., WU, Y., MCCLELLAN, H., DAI, W., RAUSCH, K., JONES, D., AEBIG, J., BARNAFO, E., BUTLER, B., LAMBERT, L., NARUM, D. L. et DUFFY, P. E. (2017). Accelerated and long term stability study of Pfs25-EPA conjugates adjuvanted with Alhydrogel. *Vaccine*, 35(24):3232–3238.
- ZILVERSMIT, M. et PERKINS, S. (2008). *Plasmodium*. malaria parasites. Consulté le : 2016-04-04.
- ZUEGGE, J., RALPH, S., SCHMUKER, M., MCFADDEN, G. I. et SCHNEIDER, G. (2001). Deciphering apicoplast targeting signals - Feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins. *Gene*, 280(1-2):19–26.
- ŠLAPETA, J. et MORIN-ADELIN, V. (2011). Apicomplexa levine 1970. sporozoa leucart 1879. Consulté le : 2016-02-04.

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Spécificités de cycles des espèces plasmodiales infectant les humains	12
4.1	Similitudes entre les protéines ou les domaines TSR	102
4.2	Liste des vecteurs contenant des protéines à domaines TSR	104
6.1	Production des protéines à 6 cystéines dans différents systèmes	123
6.2	Avantages et inconvénients du système bactérien	125
6.3	Avantages et inconvénients du système de cellules d'insectes	127
6.4	Exemple de production et rendement obtenus pour différentes protéines P36	134
7.1	Comparaison du polymorphisme nucléotidique de P36 avec AMA1 et HSP70 de <i>P. falciparum</i>	140
7.2	Polymorphisme nucléotidique de P36 <i>Plasmodium falciparum</i>	142
7.3	Polymorphisme nucléotidique de P36 <i>Plasmodium vivax</i>	143
B.1	Digestion enzymatique ($V_{TOTAL}=40 \mu\text{L}$)	183
B.2	Enzymes (NEB) :	184
B.3	Caractéristiques de la colonne de purification :	184
B.4	Réaction de PCR ($V_{TOTAL}25 \mu\text{L}$) :	186
B.5	Thermocycler programme	186
B.6	Caractéristiques de la colonne de purification :	187
B.7	Préparation de la réaction de recombinaison par <i>InFusion</i>	187
C.1	Solution de dilution du Nycodenz :	192
C.2	Préparation de l'anesthésiant Ketamine/Xylazine :	193
C.3	Réaction de PCR	197
C.4	Programme du thermocycleur	198
C.5	Approximation du nombre de cellules HepG2 et HepG2-CD81 :	202
C.6	Volumes pour passage de cellules HepG2 et HepG2-CD81 :	203
C.7	Milieu de culture ΔSTERILE!	204
C.8	Mise en plaque des cellules HepG2 et HepG2-CD81 :	205
C.9	Dilution des spozoïtes pour infection des cellules :	205
D.1	SDS-Page – gel de séparation	210
D.2	SDS-Page – gel de <i>stacking</i>	210

D.3	Gel natif – Gel de séparation à gauche et de <i>stacking</i> à droite	210
D.4	TBS : Tris Buffered Saline (1L)	211
D.5	Tampon de SDS TrisGlycine 10× (1L)	211
D.6	Tampon de transfert 10× (1 L)	211
D.7	Tampon de transfert 1× (1 L)	211
D.8	Solution de Laemmly 4× :	211
D.9	Tampon A :	215
D.10	Tampon A et Tampon B de purification sur colonne Nickel. N'ajouter le β -mercaptoethanol que si la protéine contient des cystéines afin de limiter l'oxydation. Le pH du tampon doit avoir au moins une unité de différence avec le pI de la protéine.	223
D.11	Tampons pour purification StrepTag	225
D.12	Tampon à matrice HCCA	228
E.1	Amorces utilisés lors du géotypage complémentation TSR	233
E.2	Amorces pour la construction des vecteurs de protéines P36 chimériques	234
E.3	Amorces utilisés pour le clonage de P36 en pET29	234
E.4	Amorces utilisés pour le clonage de P36 en pACgp67	234
E.5	Amorces utilisés pour le clonage de P36 en pMALc2X	235
E.6	Amorces utilisés lors du séquençage des plasmides pMALc2X-P36	235

TABLE DES FIGURES

1.1	Dessins d'observation de <i>Plasmodium</i> réalisés par Alphonse Laveran	4
1.2	Arbre phylogénétique des <i>Apicomplexa</i>	5
1.3	Cycles de vie de différents <i>Apicomplexa</i>	5
1.4	Schéma d'un parasite <i>Apicomplexe</i> typique de l'embranchement	6
1.5	Origine endosymbiotique de l'apicoplaste	6
1.6	Répartition mondiale de <i>Plasmodium falciparum</i> et <i>Plasmodium vivax</i> en 2014	8
1.7	Arbre phylogénétique de <i>Plasmodium</i>	9
1.8	Répartition géographique des <i>Anopheles</i>	10
1.9	Cycle de vie du moustique	11
1.10	Cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	12
1.11	Taille relative de la population de <i>Plasmodium falciparum</i> au cours de son cycle de vie	13
1.12	Pays endémiques pour le paludisme en 2000 et 2016	13
1.13	Pays où la transmission du paludisme est active en 2013	14
1.14	Estimation de l'incidence et de la mortalité du paludisme entre 2000 et 2015	15
1.15	Résistance aux insecticides	16
1.16	Répartition de la résistance multiple aux antipaludiques dans la région du Grand Mékong	16
1.17	Manifestations du paludisme grave en fonction de l'âge	18
1.18	Paludisme chez la femme enceinte	20
1.19	Moyens de lutte contre le paludisme	22
1.20	Identification des différents stades et différentes espèces par microscopie	25
1.21	Palutop +4 tests de détection rapide de paludisme	25
1.22	Traitements antipaludiques actuellement sur le marché	27
1.23	Actions des antipaludiques au niveau d'un trophozoïte intra-érythrocytaire	28
1.24	Répartition mondiale de la résistance à la chloroquine et à la sulphadoxine/pyriméthamine	30
1.25	Les principaux vaccins en développement en 2017	31
2.1	Biologie du sporozoïte	36
2.2	Fonctions biologiques de l'apicoplaste	37
2.3	Représentation du moteur permettant la motilité de glissement chez les <i>Apicomplexa</i>	39
2.4	De l'oocyste au sporozoïte	40
2.5	Microscopie électronique d'un oocyste de <i>Plasmodium berghei</i>	41
2.6	Schémas de coupe transversale du proboscis de moustique	41
2.7	Migration des sporozoïtes du derme au foie	42

2.8	Modèle de la traversée par les sporozoïtes de l'épithélium des sinusoides hépatiques . . .	43
2.9	Traversée cellulaire des sporozoïtes au niveau des hépatocytes et invasion productive . .	44
2.10	Invasion productive des hépatocytes	45
2.11	Les étapes de l'invasion productive des hépatocytes par <i>Plasmodium</i>	46
2.12	Observations par microscopie électronique de la jonction mobile chez <i>Plasmodium knowlesi</i>	46
2.13	Complexe protéique mis en jeu dans la jonction mobile de <i>Plasmodium</i>	47
2.14	Modèle moléculaire de la jonction mobile des Apicomplexa	47
2.15	Les grandes familles de protéines d'adhérence au cours du cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	49
2.16	Alignement de protéines à domaine TSR et structure du domaine	50
2.17	Quelques protéines de la famille à domaine TSR	51
2.18	Protéines de <i>Plasmodium</i> à domaine TSR	51
2.19	Organisation structurale de la protéine CSP	52
2.20	Modèle des modifications biochimiques et biophysiques qui ont lieu au niveau de la CSP	52
2.21	Organisation structurale de la protéine TRAP	53
2.22	Alignement des domaines TSR	56
2.23	Le domaine à 6 cystéines et ses protéines chez <i>Plasmodium</i>	59
2.24	La famille des protéines à domaines 6 cystéines chez <i>Plasmodium</i>	60
2.25	Alignement de la protéine P36 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> . .	60
2.26	Alignement de la protéine P52 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> . .	61
2.27	Alignement de la protéine B9 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> . . .	62
2.28	Alignement de la protéine LISP2 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> .	63
2.29	Alignement de la protéine P12 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> . .	64
2.30	Structure de la protéine de <i>Plasmodium falciparum</i> P12 et interaction avec P41	65
2.31	Alignement de la protéine P12p chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> . .	66
2.32	Alignement de la protéine P41 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> . .	66
2.33	Structure de la protéine P41 chez <i>Plasmodium falciparum</i> et interaction avec P12	67
2.34	Alignement de la protéine P38 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> . .	67
2.35	Modèle du complexe protéique incluant P38 à la surface des érythrocytes	68
2.36	Alignement de la protéine P92 chez <i>Plasmodium falciparum</i> et <i>vivax</i>	69
2.37	Alignement de la protéine P92 chez <i>Plasmodium falciparum</i> et <i>vivax</i>	69
2.38	Alignement de la protéine P230 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> . .	70
2.39	Représentation du complexe P230 et P48/45 chez les gamétocytes et les macrogamètes .	71
2.40	Alignement de la protéine P230p chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> .	72
2.41	Alignement de la protéine P48/45 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> .	73
2.42	Alignement de la protéine P47 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i> . .	73
2.43	Alignement de la protéine PSOP12 chez <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>vivax</i> , <i>berghei</i> et <i>yoelii</i>	74
2.44	Organisation structurale des tétraspanines	76
2.45	Structure du récepteur CD81	77
2.46	Cycle de vie du virus de l'hépatite C	78
2.47	Acides aminés du récepteur CD81 et de la protéine virale E2	80
2.48	Les différentes classes de récepteurs <i>scavenger</i> exprimés chez les mammifères	84
2.49	Représentation schématique du récepteur CD36	85
2.50	Structure de l'interaction mise en jeu entre CD36 et le domaine CIDR α de PfEMP1	86
2.51	Représentation schématique du récepteur SR-B1	88
2.52	Structure de la boucle de hLIMP-2 exposée dans le lysosome	90
2.53	Conformations ouverte et fermée de la région apicale de hLIMP-2	91
2.54	Organisation des domaines des récepteurs à éphrine	93

2.55	Organisation et structure du récepteur EphA2	93
4.1	Voies CD81-dépendante et CD81-indépendante lors de l'invasion des hépatocytes.	99
4.2	Voies CD81-dépendante ou CD81-indépendante et utilisation de SR-B1	100
4.3	Modélisation du récepteur de CD36 et homologues avec SR-B1	101
4.4	Protéines de <i>Plasmodium</i> à domaine TSR	102
4.5	Domaines TSR des protéines thrombospondin, CSP et TRAP	102
4.6	Stratégie mise en place pour l'étude des protéines de la famille TSR	103
4.7	Chromosomes artificiels pour la complémentation avec les protéines TSR	105
4.8	Schéma représentant le protocole de transfection de parasites de rongeurs	105
4.9	Résultat des PCR de génotypage des parasites complémentés avec les gènes TSR	106
4.10	Cellules HepG2 ou HepG2/CD81 infectées par les différents parasites complémentés	107
4.11	P52 et P36 sont nécessaires à l'invasion productive des hépatocytes par <i>Plasmodium</i>	108
4.12	La protéine PbP36 permet l'utilisation de la voie CD81-indépendante par les sporozoïtes	109
4.13	L'expression de PbP36 permet l'infection des cellules n'exprimant pas CD81	110
5.1	Modèle clé-serrure de P36 et P52 lors de l'invasion des hépatocytes par <i>Plasmodium</i>	111
5.2	Alignement de la région N-terminale de P36 de 12 espèces plasmodiales différentes	112
5.3	Protéomique pour la protéine P36 de <i>Plasmodium falciparum</i> et <i>Plasmodium yoelii</i>	113
5.4	Représentation schématique de l'organisation de la protéine P36.	113
5.5	Comparaison des séquences de la protéine P36 chez différentes espèces de <i>Plasmodium</i>	114
5.6	Modélisation par I-Tasser de la protéine P36 de <i>Plasmodium berghei</i>	115
5.7	Acides aminés des boucles A et B de <i>Plasmodium berghei</i> et <i>Plasmodium yoelii</i>	115
5.8	Protéines chimériques de P36 utilisées pour la complémentation	116
5.9	Vecteur utilisé pour la complémentation avec des protéines chimériques de P36	117
5.10	Microscopie à fluorescence des sporozoïtes complémentés avec les différentes constructions chimériques	118
5.11	Le second domaine de Pb36 permet l'utilisation de la voie CD81-indépendante	119
5.12	Immunofluorescence des parasites ayant infecté les cellules HepG2 et HepG2/CD81	119
5.13	Invasion des cellules HepG2/CD81 et HepG2 par PbP36 Δ complémentés avec P36 dont les boucles ont été changés	120
5.14	Immunofluorescence des parasites ayant infectés les cellules HepG2 et HepG2/CD81	120
5.15	Nouveau modèle clé-serrure de P36 et P52 lors de l'invasion des hépatocytes par <i>Plasmodium</i>	121
6.1	Principe de production de protéine recombinante en bactérie <i>E. coli</i>	124
6.2	Protocole de production de protéines recombinantes en système bactérien <i>E. coli</i>	125
6.3	Production de protéine recombinante en cellules d'insectes	126
6.4	Protocole de production de protéines recombinantes en système de cellules d'insectes	127
6.5	Représentation du vecteur pET29 contenant le gène optimisé codant la protéine P36	128
6.6	Représentation des vecteurs pACgp67 avant et après insertion du gène P36	130
6.7	Tests d'expression des protéines PfP36 et PvP36 chez différents clones viraux	131
6.8	Tests d'optimisation de la production de la protéine PfP36	131
6.9	Suivi de l'absorbance à 280 nm lors de la purification de PfP36 sur colonne StrepTRAP	132
6.10	Gel et western blot des différentes étapes et fractions de la purification de PfP36	132
6.11	Représentation du vecteur pMALc2x contenant le gène optimisé codant la protéine P36	133
6.12	Suivi de l'absorbance à 280 nm lors de la purification de PfP36 sur colonne MBP-TRAP	133
6.13	Suivi de l'absorbance à 280 nm lors de la purification de PfP36 sur colonne S200 10/300	134
6.14	Gel SDS-Page des différentes fractions obtenues lors de la purification de PfP36	134

6.15	Identification de la protéine PbP36-MBP par spectrométrie de masse	135
6.16	Schéma représentant l'organisation de la plaque d'ELISA	136
6.17	Résultats des tests ELISA	136
6.18	Résultats des tests de SPR	137
7.1	Organisation des gènes P52 et P36 chez différentes espèces de <i>Plasmodium</i>	140
7.2	Répartition des SNPs des protéines AMA1, HSP70 et P36 de <i>P. falciparum</i>	141
7.3	Représentation des variations de séquence protéique résultant des SNPs sur le modèle de Pfp36	142
7.4	Représentation des variations de séquence protéique résultant des SNPs sur le modèle de Pvp36	143
7.5	Répartition des SNPs (<i>Single Nucleotide polymorphisms</i>) de P36 de <i>Plasmodium vivax</i>	144
7.6	Alignement des séquences protéique de P36 de <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> et positionnement des SNPs	144
C.1	191
C.2	Isolement des schizontes de la culture sanguine	194
C.3	Dissection des estomacs.	199
C.4	Préparation des moustiques avant dissection des glandes salivaires.	200
C.5	Dissection des glandes salivaires	201
C.6	Représentation de la lame Neubauer	201
C.7	Représentation de la lame Neubauer.	204
C.8	Exemple d'organisation de plaque P96.	205
D.1	Gel and membrane set up for electrophoretic transfer.	212
D.2	Organisation des plaques P96 lors de la dilution limite des cellules Sf9 infectées.	218
D.3	Organisation des plaques p96 lors de la titration des cellules Sf9 infectées.	220
F.1	Fréquence d'utilisation des codons par <i>E. coli</i>	237
F.2	Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine Pfp36	238
F.3	Ajustement de la teneur en guanosine et cytidine de la séquence de Pfp36	238
F.4	Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine Pvp36	239
F.5	Ajustement de la teneur en guanosine et cytidine de la séquence de Pyp36	239
F.6	Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine Pbp36	240
F.7	Ajustement de la teneur en guanosine et cytidine de la séquence de Pbp36	240
F.8	Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine Pyp36	241
F.9	Ajustement de la teneur en guanosine et cytidine de la séquence de Pyp36	241
F.10	Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine Pfp36	242
F.11	Ajustement de la teneur en guanosine et cytidine de la séquence de Pfp36	243
F.12	Fréquences des codons optimaux de la séquence optimisée du gène codant la protéine Pfp36	243
F.13	Ajustement de la teneur en guanosine et cytidine de la séquence de Pfp36	244

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	v
Liste des abréviations	vii
Sommaire	xi
I Introduction	1
1 Plasmodium : parasite responsable du paludisme	3
1.1 Généralités	3
1.1.1 Le paludisme : histoire ancienne et avancées majeures	3
1.1.2 Le phylum des <i>Apicomplexa</i>	4
1.1.3 Caractéristiques structurales du phylum des <i>Apicomplexa</i>	4
1.2 Un parasite aux multiples visages : cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	7
1.2.1 <i>Plasmodium</i>	7
1.2.2 Une maladie parasitaire essentiellement transmise par le moustique	9
1.2.3 Cycle de vie et variété de formes adoptées par <i>Plasmodium</i>	10
1.3 Épidémiologie : une maladie tropicale en régression	13
1.3.1 Répartition géographique inégale du paludisme	13
1.3.2 Régression de la morbidité du paludisme et émergence de résistances	14
Régression du paludisme depuis 15 ans	14
Émergence de résistances des <i>Anopheles</i> aux insecticides	15
Émergence de résistances chez <i>Plasmodium</i> aux anti-paludiques	15
1.4 Signes cliniques : des symptômes non spécifiques au risque vital	16
1.4.1 Des populations plus à risque	16
1.4.2 Paludisme simple	17
Période d'incubation	17
Primo-Infection	17
Accès palustre à fièvre périodique	17
1.4.3 Paludisme grave	18
Neuropaludisme	19

	Anémie	19
	Lésions rénales aiguës	19
	Détresse respiratoire et acidose	19
	Hypoglycémie	19
	Ictère	20
1.4.4	Paludisme chez les femmes enceintes	20
1.5	Moyens de lutte et aspects thérapeutiques	21
1.5.1	Prévention	21
	Lutte antivectorielle	21
	Prophylaxie	23
1.5.2	Tests de diagnostic	24
	Diagnostic par microscopie	24
	Test de diagnostic rapide (TDR)	24
	Diagnostic de biologie moléculaire	26
	Test de sérologie	26
1.5.3	Traitements médicamenteux	26
	Antipaludiques de type quinoléine	26
	Artémisinine et ses dérivés	27
	Antifolates	28
	Atovaquone/Proguanil	29
	Antibiotiques	29
1.5.4	Lents progrès vers une protection vaccinale efficace	29
	Vaccins sous-unitaires	30
	Vaccins de parasites entiers atténués	32
2	Sporozoïtes et invasion hépatique	35
2.1	Biologie du sporozoïte	35
2.1.1	Des organites variés assurant le métabolisme et l'invasion	35
	Noyau	35
	Apicoplaste	36
	Rhoptries	37
	Micronèmes	37
	Granules denses	37
	Glideosome	38
2.1.2	Un moteur d'actine/myosine assure une motilité de glissement chez les sporozoïtes	38
2.2	Développement des sporozoïtes chez le moustique et invasion d'un nouvel hôte	39
2.2.1	Sporogonie : de la maturation de l'oocyste à l'invasion des glandes salivaires	39
2.2.2	Migration des sporozoïtes du derme au foie	41
2.2.3	Traversée cellulaire de la barrière sinusoidale et des hépatocytes	43
	Traversée de la barrière endothéliale des sinusoides hépatiques	43
	Traversée des hépatocytes : préparation de l'invasion productive	43
2.2.4	Invasion des hépatocytes et formation de la vacuole parasitophore	45
	Attachement initial et réorientation du parasite	45
	Établissement d'une jonction mobile entre le parasite et la surface de l'hépatocyte	46
	Formation de la vacuole parasitophore	47
2.3	Protéines impliquée dans l'invasion par <i>Plasmodium</i>	48
2.3.1	Les protéines à domaine TSR	48

	CSP (<i>Circumsporozoïte protein</i>)	50
	TRAP (<i>Thrombospondin Related Anonymous Protein</i>)	53
	TRSP (<i>Thrombospondin-related sporozoïte protein</i>)	54
	TLP (<i>Trap-like protein</i>)	54
	TREP (<i>TRAP-related protein</i>)	55
	SPATR (<i>Secreted protein with altered thrombospondin repeat domain</i>)	55
	SSP3 : la <i>Surface sporozoïte protein 3</i> et la motilité du sporozoïte	55
	TRP1 (<i>Thrombospondin-related protein 1</i>)	56
	MTRAP (<i>Mérozoïte-TRAP</i>)	56
	TRAMP (<i>Thrombospondin-related apical membrane protein</i>)	57
	CTRP (<i>Circumsporozoïte-and TRAP-related protein</i>)	57
	Récapitulatif sur les protéines à domaine TSR de <i>Plasmodium</i>	58
2.3.2	Les protéines à domaines 6-cystéines	58
	P36 : une protéine de sporozoïte essentielle dans l'invasion des hépatocytes	60
	P52 : une protéine impliquée dans l'invasion des hépatocytes	61
	B9 : une protéine importante pour l'intégrité de la vacuole parasitophore	62
	LISP2 est importante pour la schizogonie hépatique	63
	P12 : une protéine exprimée à la surface des mérozoïtes	64
	P12p : paralogue de P12 peu caractérisée	65
	P41 : une protéine associée à P12 à la surface des mérozoïtes	65
	P38 : protéine des stades sanguins sexués et asexués ainsi que du sporozoïte	67
	P92 : protéine impliqué dans l'évasion immunitaire	68
	P230 : une protéine jouant un rôle important chez le gamète mâle	69
	P230p : une protéine redondante vis à vis de P230?	71
	P48/45 : une protéine impliquée dans la formation du zygote chez le moustique	72
	P47 : elle joue un rôle dans la fertilité et l'évasion immunitaire	73
	PSOP12 : une protéine exprimée lors des stades sexués	74
	Récapitulatif sur les protéines à domaine 6 cystéines de <i>Plasmodium</i>	75
2.4	Récepteurs hépatocytaires	75
2.4.1	CD81 : un récepteur de la famille des tétraspanines	76
	Famille des tétraspanines et structure de la protéine CD81	76
	CD81 joue un rôle majeur dans l'invasion des hépatocytes	78
	Implication de CD81 dans l'infection par <i>Plasmodium</i>	80
2.4.2	Les récepteurs <i>scavenger</i> de type B, des protéines de la superfamille de CD36	83
	CD36 : cluster de différenciation 36	84
	Scavenger Receptor, class B, member 1 (SR-B1)	87
	LIMP-2 : <i>Lysosome membrane protein 2</i>	89
2.4.3	Le récepteur d'éphrine A2 (EphA2)	92
	Famille des récepteurs à éphrines et structure de la protéine EphA2	92
	Les cellules riches en récepteurs EphA2 seraient préférentiellement envahies	93
2.4.4	CD74 et CD68 également mis en jeu lors de l'invasion du foie	94
	CD68 déterminant de l'entrée des sporozoïtes dans les cellules de Kupffer	94
	Les sporozoïtes envahissent préférentiellement les cellules riches en CD74	94
3	Objectifs	95
3.1	Identifier les facteurs parasitaires impliqués dans les voies d'invasion	95
3.2	Caractériser les déterminants structuraux des facteurs parasitaires	95

II	Résultats	97
4	Criblage génétique à la recherche de facteurs parasitaires	99
4.1	Contexte et objectifs	99
4.2	Complémentation des parasites <i>Plasmodium yoelii</i> avec les gènes TSR de <i>Plasmodium berghei</i>	103
4.2.1	Objectif : Identification des facteurs parasitaires mis en jeu lors de l'utilisation de la voie SR-B1	103
4.2.2	Obtention de chromosomes artificiels permettant l'expression de protéines TSR de <i>Plasmodium berghei</i>	104
4.2.3	Transfection des parasites <i>Plasmodium yoelii</i> avec les chromosomes artificiels et vérification de la présence des gènes TSR de <i>Plasmodium berghei</i> chez les parasites transfectés	104
4.2.4	Génotypage des parasites <i>Plasmodium yoelii</i> ayant été transfectés avec les chromosomes artificiels permettant l'expression des protéines TSR de <i>Plasmodium berghei</i>	106
4.3	Résultats des tests d'invasion	106
4.3.1	Résultats des tests d'invasion des cellules HepG2 et HepG2CD81 par les parasites <i>Plasmodium yoelii</i> complémentés avec les gènes TSR de <i>Plasmodium berghei</i>	106
4.3.2	Identification des protéines à 6 cystéines P36 et P52 comme facteurs parasitaires impliquées dans les voies d'entrées SR-B1 et CD-81 dépendantes	107
	Les protéines parasitaires P36 et P52 sont nécessaires lors de l'invasion des hépatocytes	108
	P36 joue un rôle clé lors de l'utilisation des voies d'entrée CD81 et SR-B1	109
5	Étude de l'implication des différents domaines de P36	111
5.1	Contexte et objectif :	111
5.2	Modélisation et analyse structurale de la protéine P36	112
5.2.1	Comparaison des séquences de P36 entre différentes espèces plasmodiales	112
5.2.2	Analyse de la structure de P36	112
	Organisation générale de la protéine P36	112
	Alignement des protéines P36 de différentes espèces plasmodiales	113
	Modélisation et organisation structurale de la protéine P36	114
5.3	Stratégie de complémentation de Pb Δ P36 avec les protéines chimériques de P36	116
5.3.1	Production des vecteurs	116
5.3.2	Transfection et sélection	117
5.3.3	Tests d'invasion des cellules HepG2 et HepG2/CD81	118
5.4	Résultats	118
5.4.1	Validation de la complémentation des parasites	118
5.4.2	Tests d'invasion des cellules HepG2 et HepG2/CD81 par les sporozoïtes PbGFP Δ P36 complémentés avec les protéines P36 chimériques	118
	Parasites dont la protéine P36 permettant la complémentation possède des domaines de la même espèce ou d'espèces différentes	119
	Parasites dont la protéine P36 permettant la complémentation possède une boucle de la protéine P36 de l'autre espèce	120
	Le second domaine à 6 cystéines de <i>Plasmodium berghei</i> est la clé de l'utilisation de la voie CD81-indépendante	121

6	Production de la protéine P36 et tests d'interactions	123
6.1	Contexte	123
6.2	Production de la protéine P36	128
6.2.1	Test de la production de P36 en système bactérien	128
	Construction des vecteurs d'expression pET29	128
	Tests de production de P36 en système bactérien (BL21, Rosetta, C41, Origami)	129
6.2.2	Test de la production de P36 en cellules d'insectes Sf9 infectées par un baculovirus	130
	Construction des vecteurs d'expression de PfP36 et PvP36	130
	Tests de production	130
6.2.3	Test de la production de P36 en bactéries Shuffle avec étiquette MBP (<i>Maltose Binding Protein</i>)	132
	Construction des vecteurs pMAL contenant les gènes optimisés de P36	132
	Production de la protéine P36 en bactéries Shuffle	133
	Lyse des bactéries et purification de P36	133
6.3	Tests	135
6.3.1	Test d'interaction entre PbP36 et différents récepteurs hépatocytaires par ELISA	135
6.3.2	Test d'interaction entre PbP36 et différents récepteurs hépatocytaires par SPR	135
7	Étude des variations génétiques de la protéine P36	139
7.1	Étude des polymorphismes	139
7.1.1	Orthologues	139
7.1.2	La protéine P36 de <i>Plasmodium falciparum</i> possède peu de polymorphisme	139
	La variation génétique de P36 est semblable à celle de la protéine HSP70 dont le rôle est essentiel pour <i>Plasmodium</i>	139
	Le domaine 1 de PfP36 possède plus de SNPs que le domaine 2	141
7.1.3	PvP36	142
III	Discussion	145
8	Discussion	147
8.1	Identification des facteurs parasitaires mis en jeu lors de l'invasion des hépatocytes	147
8.2	Structure de P36 et identification du second domaine comme déterminant structural	148
8.3	Interactions mises en jeu par les protéines à 6 cystéines	150
8.4	Production de la protéine P36	153
8.5	Conclusion	154
	Annexes	155
A	Article publié	157
B	Clonage : construction de plasmides	183
B.1	Construction des plasmides	183
B.1.1	Digestion enzymatique et purification du vecteur	183
	Restriction enzymatique	183
	Purification du vecteur digéré (<i>MinElute® Gel Extraction Kit (Qiagen)</i>)	183
B.1.2	Amplification par PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) et purification des fragments à insérer dans le vecteur	185

	PCR à haute fidélité	185
	Purification des produits de PCR (<i>PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen)</i>)	186
B.1.3	Ligation par la technique <i>In-fusion®</i>	187
B.2	Amplification du vecteur	188
B.2.1	Transformation bactérienne en vue d'isoler des clones :	188
	Préparation des solutions stock d'antibiotiques :	188
	Préparation des boites de Petri	188
	Transformation bactérienne	189
B.2.2	Miniprep (<i>PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit</i>)	189
	Jour 1 : Culture bactérienne	189
	Jour 2 : Extraction de l'ADN plasmidique	189
C	Biologie cellulaire et parasitologie	191
C.1	Production de parasites génétiquement modifiés et de sporozoïtes	191
C.1.1	Transfection de parasites de rongeurs : <i>Plasmodium berghei</i> ou <i>Plasmodium yoelii</i> – (Adapté de Janse <i>et al.</i> [2006])	191
	Solutions et matériel :	192
	4 jours auparavant : infection des souris	193
	Jour 1 : Culture des parasites	193
	Jour 2 : Transfection	194
C.2	Analyse de la transfection par génotypage des parasites	195
	Solutions et matériel :	195
C.2.1	Isolement des parasites	196
C.2.2	Extraction de l'ADN (<i>PureLink™ Genomic DNA Kit</i>)	197
C.2.3	PCR de génotypage	197
C.2.4	Infection de moustiques et production de sporozoïtes	198
	Solutions et matériel	198
	Élevage des moustiques	198
	4 jours avant l'infection des moustiques : infecter les souris	198
	Jour 1 : Infection des moustiques	199
	Jour 7-21 : Dissection des moustiques	199
	Lavage des sporozoïtes	200
C.3	Culture cellulaire et test d'invasion	201
C.3.1	Culture cellulaire des lignées HepG2 et HepG2-CD81	201
	Solutions et matériel	201
	<i>Coating</i> de flasques ou de plaques	202
	Décongélation de cellules	202
	Passage des cellules	202
	Congélation de cellules	203
C.3.2	Test d'invasion de lignées cellulaires	203
	Solutions et matériel	203
	Dissection des moustiques et récupération des sporozoïtes	205
	Infection des cellules	205
	Analyse de la plaque P96 au FACS	205
	Analyse de la plaque Ibidi par marquage d'UIS4 et observation microscopique	206
C.3.3	Préparation de sporozoïtes pour observations microscopiques	207
	Solutions et matériel	207

	Préparation des lamelles Poly-L-Lysine	207
	Fixation de sporozoïtes sur lamelle Poly-L-Lysine	207
	Sporozoïtes secs	208
D	Biochimie : production de protéines recombinantes, analyses et tests d'interactions	209
D.1	Techniques générales de Biochimie	209
D.1.1	Gels acrylamides : SDS-page et Natif	209
	Solutions stock et matériel	209
	Gel SDS-PAGE	210
	Gel natif	210
D.1.2	Western Blot	211
	Solutions stocks et matériel	211
	Migration des protéines sur gel acrylamide	211
	Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose	212
	Coloration au rouge Ponceau (optionnel)	212
	Blockage	212
	Anticorps primaire	213
	Anticorps secondaire	213
	Révélation	213
D.2	Production de protéines recombinantes	213
D.2.1	Préparation de bactéries compétentes – (Armelle Vigouroux)	213
D.2.2	Expression de protéines recombinantes en système bactérien – (Armelle Vigouroux)	214
	Solutions et matériel	214
	Transformation	215
	Induction	215
	Lyse et Purification	216
D.2.3	Protein Expression in Insect Cells Infected with Baculovirus – (Stéphane Petres)	216
	Solutions et matériel	216
	Culture en suspension de cellules Sf9 non infectées	217
	Jours 1-7 : Transfection de cellules Sf9 cells avec le vecteur d'expression	217
	Jours 7-14 : Amplification du virus	218
	Jours 14-21 : Dilution limite	218
	Jours 21-28 : Isolement de clones positifs et amplification	218
	Jours 32-39 : Première amplification viral d'un clone produisant la protéine ($V_{final}=25\text{mL}$)	219
	Jours 39-46 : Première amplification viral d'un clone produisant la protéine ($V_{final}=500\text{mL}$)	220
	Jours 46-53 : Titration du stock viral P ₂	220
	Production de la protéine recombinante (500mL)	221
D.2.4	Expression de protéines recombinantes en E. coli de type Shuffle – (Arnaud Chenes)	221
	Solutions et matériel	221
	Préparation des boites de pétries :	221
	Transformation	222
	Expression	222
D.3	Purification de protéines recombinantes	222
D.3.1	Purification de protéines portant un tag 6 Histidines	222
	Solutions et matériel	222

	Lyse des bactéries et préparation de l'échantillon	223
	Purification par affinité sur colonne HisTrap HP	223
	Purification par exclusion de taille sur colonne Superdex 200 10/30	224
D.3.2	Purification de protéines portant une étiquette Strep	224
	Solutions et matériel	224
	Préparation de l'échantillon	225
	Purification par affinité sur colonne StrepTrap HP	225
D.3.3	Purification de protéines portant un tag MBP	225
	Solutions et matériel	225
	Lyse des bactéries et préparation de l'échantillon	226
	Purification par affinité sur colonne MBPTrap HP	226
	Purification par exclusion de taille sur colonne Superdex 200 10/30	227
D.3.4	Spectrométrie de masse : digestion trypsique et analyse par MALDI-TOF	227
D.3.5	ELISA	231
	Solutions et matériel	231
	Coating	231
	Blocking	232
	Binding	232
	Antibody	232
	Revelation	232
E	Amorces	233
F	Gènes optimisés pour l'expression de la protéine P36	237
F.1	Gènes optimisés pour l'expression en système bactérien par Genscript	237
F.1.1	Optimisation du gène PfP36	237
F.1.2	Optimisation du gène PvP36	238
F.1.3	Optimisation du gène PbP36	239
F.1.4	Optimisation du gène PyP36	240
F.2	Gènes optimisés pour l'expression en système de cellules d'insectes par Genscript	242
F.2.1	Optimisation du gène PfP36	242
F.2.2	Optimisation du gène PpP36	242
	Bibliographie	245
	Liste des tableaux	268
	Table des figures	272
	Table des matières	278