



HAL
open science

Analyse fonctionnelle de protéines des organites apicaux chez les sporozoïtes de Plasmodium

Manon Loubens

► **To cite this version:**

Manon Loubens. Analyse fonctionnelle de protéines des organites apicaux chez les sporozoïtes de Plasmodium. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT: 2021SORUS245 . tel-03679722

HAL Id: tel-03679722

<https://theses.hal.science/tel-03679722>

Submitted on 27 May 2022

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.

Sorbonne Université

École doctorale Complexité Du Vivant

Thèse de Doctorat de Biologie

Analyse fonctionnelle de protéines des organites apicaux chez les sporozoïtes de *Plasmodium*

Par **Manon LOUBENS**

Sous la direction d'Olivier SILVIE

Présentée et soutenue publiquement le 25 novembre 2021

Devant un jury composé de :

M. SEZONOV, Guennadi	Professeur des Universités	Président du jury
Mme LEBRUN, Maryse	Directrice de Recherche	Rapporteuse
M. AMINO, Rogerio	Directeur de Recherche	Rapporteur
Mme FLORENT, Isabelle	Professeure des Universités	Examinatrice
Mme MARION, Sabrina	Maître de Conférences	Examinatrice
M. SILVIE, Olivier	Directeur de Recherche	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Olivier Silvie, non seulement pour son encadrement mais également pour m'avoir offert la chance de découvrir le monde du paludisme en première année de master. Son invitation à présenter mes travaux dans un congrès en Australie a représenté une incroyable expérience en plus de me donner la possibilité d'avoir des échanges scientifiques de qualité. De plus sa disponibilité, sa patience, sa réactivité et ses encouragements ont été d'une grande utilité au cours de ces années.

Je remercie le rapporteur et la rapportrice de cette thèse, Rogerio Amino et Maryse Lebrun, pour avoir accepté ce rôle et pour leur investissement. Je remercie également l'ensemble des membres de mon jury de thèse, Guennadi Sezonov, Sabrina Marion et Isabelle Florent, pour leur participation.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Stéphane Delmas et Benoit Gamain qui m'ont suivie pendant ces quatre années et ont permis d'apporter des regards extérieurs et des suggestions enrichissantes.

Je remercie les collègues avec lesquels j'ai travaillé sur mes projets : Carine qui m'a réconcilié avec les western-blot, Sylvie qui m'a initié à la biologie moléculaire et Laetitia qui a passé du temps avec moi au microscope et avec qui j'ai partagé ce road-trip incroyable en Australie. Votre gentillesse à toutes a été un grand soutien au cours de ces années.

A special acknowledgment in english to my former colleague Priyanka, for helping me a lot for experiments during my PhD and for the numerous hours spent together in the animal facility.

Un grand merci à l'ensemble de mes collègues pour leur aide et leurs conseils, ainsi que pour les bons moments passés ensemble : Loïse, Ludivine, Pierre, Éric, Stéphanie, Rokhaya, Nadia, Shahin, Kutub, Yé, Anne-Claire, Chriss'Even, Mallaury, Catherine, Dominique et tous les stagiaires qui sont passés par le laboratoire. Un merci particulier à Valérie qui m'a initialement mis en contact avec l'équipe et qui m'a permis de découvrir l'encadrement des TP et TD à la fac, ce qui a été une super expérience. Je veux également remercier mes collègues en charge de l'insectarium, sans qui mes projets n'auraient pas lieu d'être : Jean-François, Maurel et Thierry.

J'aimerais également remercier les collaborateurs Philippe Bun et David Akbar qui ont contribué à l'avancement des projets et m'ont de plus fait aimer la microscopie.

Merci de tout cœur à mes amis, Audrey, Antoine, Louise, Melissa, Lucie, Guillaume, Jonathan et tous les DAPSeurs pour leur présence au long de ces années, et leur capacité à faire oublier les mauvais côtés de la vie le temps d'une soirée. Je te souhaite tout le courage possible pour ta thèse Audrey !

Un grand merci à Sofiane pour le soutien quotidien malgré sa propre thèse à gérer. Ses conseils et ses encouragements se sont révélés essentiels pour garder l'enthousiasme et la motivation nécessaires au bon déroulé de la thèse.

Enfin, je remercie de tout cœur ma famille pour son soutien inconditionnel au cours de ses années, et pour m'avoir permis de tenir le coup et d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions possibles.

RÉSUMÉ

Analyse fonctionnelle de protéines des organites apicaux chez les sporozoïtes de *Plasmodium*

L'infection par *Plasmodium*, le parasite responsable du paludisme, débute par l'inoculation de ses formes invasives (sporozoïtes) par un moustique Anopheles femelle lors d'un repas sanguin. Les sporozoïtes infectent des cellules du foie pour s'y développer en mérozoïtes qui une fois libérés dans la circulation sanguine vont entamer un cycle de reproduction asexuée dans les globules rouges. L'invasion des cellules implique la sécrétion d'organites apicaux, les micronèmes et les rhoptries, et la formation d'une structure particulière appelée jonction mobile conduisant à l'internalisation du parasite au sein d'une vacuole parasitophore, essentielle pour son développement. Les mécanismes moléculaires précis impliqués dans l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes restent cependant méconnus. Les organites sécrétoires apicaux contiennent des protéines spécifiquement exprimées chez le sporozoïte, dont des protéines à domaine 6-cystéines comme P36 et P52, et des protéines également exprimées chez les mérozoïtes, comme AMA1, les RONs ou CLAMP, impliquées dans la formation de la jonction mobile. Nos travaux ont révélé le rôle essentiel d'une nouvelle protéine à domaine 6-cystéines, B9, dans l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes. L'utilisation d'une stratégie de mutagenèse conditionnelle nous a également permis de démontrer le rôle d'AMA1, RON2, RON4 et CLAMP chez les sporozoïtes, non seulement pour l'invasion des hépatocytes chez l'hôte mammifère mais aussi pour la colonisation des glandes salivaires chez le moustique. Nos résultats confortent l'hypothèse d'une compartimentation fonctionnelle des protéines des micronèmes chez les sporozoïtes de *Plasmodium*. Ce travail contribue à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes et identifie de nouvelles cibles potentielles pour bloquer l'invasion du foie par *Plasmodium*.

Mots clés : paludisme, *Plasmodium*, sporozoïte, invasion, mutagenèse conditionnelle, DiCre, CLAMP, AMA1, B9

ABSTRACT

Functional analysis of apical organelle proteins in *Plasmodium* sporozoites

Infection with *Plasmodium*, the parasite responsible for malaria, begins with the inoculation of invasive forms called sporozoites by a female Anopheles mosquito during a blood meal. Sporozoites infect liver cells and develop into merozoites which, once released into the bloodstream, undergo asexual multiplication cycles in red blood cells. Host cell invasion involves the secretion of apical organelles, the micronemes and the rhoptries, and the formation of a unique structure called moving junction that leads to the internalization of the parasite within a parasitophorous vacuole, essential for its development. However, the precise molecular mechanisms involved during invasion of hepatocytes by sporozoites remain unknown. Apical secretory organelles contain proteins specifically expressed in sporozoites, including 6-cysteine domain proteins such as P36 and P52, and proteins also expressed in merozoites, such as AMA1, RONs or CLAMP, which are involved in the formation of the moving junction. Our work revealed the essential role of a novel 6-cysteine domain protein, B9, in the invasion of hepatocytes by sporozoites. Using a conditional mutagenesis strategy, we also demonstrated the role of AMA1, RON2, RON4 and CLAMP in sporozoites, not only for hepatocyte invasion in the mammalian host but also for salivary gland colonization in the mosquito. Our results support the hypothesis of a functional compartmentalization of microneme proteins in *Plasmodium* sporozoites. This work contributes to a better understanding of the molecular mechanisms involved during infection of hepatocytes and identifies new potential targets to block malaria liver infection.

Keywords : malaria, *Plasmodium*, sporozoite, invasion, conditional mutagenesis, DiCre, CLAMP, AMA1, B9

LISTE DES ABRÉVIATIONS

abréviation	nom complet
5-FC	5-fluorocytosin
ACT	artemisinin combined therapy
ADN	acide désoxyribonucléique
ALIX	ALG2-interacting protein
AMA1	apical membrane antigen 1
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
Ap	apicoplast
APR	apical polar ring
ARN	acide ribonucléique
Arp2/3	actin related protein 2/3
BLAST	basic local alignment search tool
BLT	blocker of lipid transport
BSG	basigin
Cas9	CRISPR associated protein 9
CD2AP	CD2-associated protein
CD81	cluster of differentiation 81
CeTOS	cell traversal protein for ookinetes and sporozoites
CFP	cyan fluorescent protein
CIN85	CBL-interacting Protein
CLAMP	claudin-like apicomplexa micronemal protein
CR1	complement receptor 1
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CSP	circumsporozoite protein
CSPBP	CSP-binding protein
VSPG	chondroitin sulfate proteoglycans
CTRP	circumsporozoite and TRAP-related protein
CyRPA	cystein-rich protective antigen
Cys	cysteine
DG	dense granule
DiCre	dimerisable recombinase Cre
EBL	erythrocyte-binding like
EGF	epidermal growth factor
ELC1	essential light chain 1
Eph	ephrin receptor

ER	endoplasmic r eticulum
FABP	liver- f atty a cid b inding p rotein
FACS	f luorescent a ctivated c ell s orting
FAT	f atty a cid t ransporter
FIV	f eline i mmunodeficiency v irus
G6PD	g lucose 6 - p hosphate d éshydrogénase
GAC	g lidéosome-associated c onector
GAPDH	g lyceraldéhyde-3- p hosphate d éshydrogénase
GAG	g lycoaminoglycane
GAP	g liding-associated p rotein
GAPMs	g liding-associated p rotein with multiple m embrane spans
GEST	g amete e gress and s porozoïte t raversal
GFP	g reen f luorescent p rotein
GOMO	g ene o ut m arker o ut
GPI	g lycosyl p hosphatidylinositol
GRA	dense g ranule p roteins
HCV	h epatitis C v irus
HDL	h igh d ensity l ipoprotein
HGF	h epatocyte g rowth f actor
HIV-1	h uman i mmunodeficiency v irus 1
HSPG	h eparan sulfate p roteoglycans
IMC	i nnner m embrane c omplex
IP	i mmunoprecipitation
kb	k ilobase
kDa	k ilodalton
LAMTOR1	late endosomal/lysosomal a daptor M APK and m TOR a ctivator 1
LC3	microtubule-associated protein 1 l ight chain 3
LDL	l ow d ensity l ipoprotein
LEL	l arge e xtracellular l oop
LIMP	lysosomal i ntegral m embrane p rotein
M2AP	M IC2- associated p rotein
MAEBL	m embrane associated e rythrocyte b inding-like p rotein
MAC/PF	m embrane- a ttack c omplex/ p erforin
Mic	m icroneme
MIC2AP	M IC2-associated p rotein
Mito	m itochondrion
MLC1	m yosin l ight c hain 1
MSPs	m erozoite s urface p roteins
MT	m icrotubule
MTIP	m yosin A t ail domain i nteracting p rotein
MTRAP	m erozoite T RAP

MyoA	myosin A
NPC	nuclear pore complex
OMS / WHO	organisation mondiale de la santé / world health organization
pb	paire de bases
PDGFR β	platelet derived growth factor receptor β
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PL	phospholipase
PLP1	perforin-like protein 1
PM	membrane plasmique
PPR	proximal polar ring
PV	parasitophorous vacuole
PVM	PV membrane
rapa	rapamycin
Rh	reticulocyte-binding like homolog
Rho	rhoptries
Ripr	Rh5 interacting protein
RNaseH2B	ribonuclease H2 sous-unité B
ROM	rhomboid protein
RON	rhoptry neck protein
ROP	rhoptry bulb protein
SAG	surface antigen
SAM	sterile alpha-motif
SEL	small extracellular loop
SPECT	sporozoite protein essential for cell traversal
SR-B1	scavenger receptor class B type 1
SRS	SAG1-related sequences
Spz	sporozoites
STED	stimulated emission depletion microscopy
TAPA-1	target of an antiproliferative antibody
TEM	tetraspanin enriched microdomain
TLP	TRAP-like protein
TRAP	thrombospondin-related anonymous protein
TREP	TRAP-related protein
TSG101	tumour susceptibility gene 101 protein
TSR	thrombospondin type I repeats
TV	transient vacuole
UIS	upregulated in infectious sporozoites
UOS	upregulated in oocyst sporozoites
vWA	von Willebrand factor A

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	i
RÉSUMÉ / ABSTRACT	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	iv
SOMMAIRE	vii
PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION	1
I. Généralités sur le paludisme et <i>Plasmodium</i>	2
II. Biologie des sporozoïtes de <i>Plasmodium</i>	30
III. Acteurs moléculaires de l'invasion productive des cellules par les sporozoïtes de <i>Plasmodium</i>	69
OBJECTIFS	89
MÉTHODOLOGIE	92
DEUXIÈME PARTIE : RÉSULTATS	96
I. Identification de B9 comme acteur de l'invasion productive par les sporozoïtes	97
II. Étude des protéines essentielles à l'invasion chez les mérozoïtes et les sporozoïtes de <i>Plasmodium</i>	148
TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION	244
I. B9, nouvel acteur de l'invasion productive par les sporozoïtes de <i>Plasmodium</i>	245
II. Une nouvelle fonction des protéines AMA1 et RONs chez le sporozoïte	248
III. CLAMP, un nouvel acteur impliqué dans la motilité des sporozoïtes de <i>P. berghei</i>	253
IV. Apport des approches génétiques conditionnelles pour les études fonctionnelles chez les sporozoïtes	254
V. Hétérogénéité fonctionnelle des micronèmes	255
VI. Conclusion	259
ANNEXES	261
BIBLIOGRAPHIE	300
LISTE DES FIGURES	357
TABLE DES MATIÈRES	358

PREMIÈRE PARTIE
INTRODUCTION

I. Généralités sur le paludisme et *Plasmodium*

1. Historique de la maladie

Le paludisme, ou malaria dans les pays anglophones, est une maladie parasitaire causée par un eucaryote unicellulaire du genre *Plasmodium* et transmis par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Bien qu'il existe des traitements, cette maladie reste de nos jours la parasitose la plus répandue et la plus mortelle. Malgré de nombreux efforts internationaux mis en place, le paludisme reste en 2020 un problème de santé majeur dans de nombreux pays, affectant majoritairement l'Afrique sub-saharienne.

(1) Hypothèses sur l'origine

Le paludisme affecterait les humains depuis le pléistocène supérieur (-100000 à -10000 ans) et aurait commencé à se répandre sur la surface de la Terre à cette période, profitant de la dispersion de l'humanité depuis l'Afrique vers les autres continents (Joy et al., 2003; Laval et al., 2019; Tanabe et al., 2010). La maladie se serait cependant particulièrement répandue il y a 10000 ans en profitant de l'apparition de l'agriculture et donc de la sédentarisation des humains (Joy et al., 2003; Laval et al., 2019). Les études aboutissant à ces théories sont basées sur l'analyse de la diversité génétique des parasites contemporains et ne restent donc que des hypothèses.

Les plus vieilles traces du parasite ont été mises en avant par des études bio-anthropologiques qui ont révélées la présence de protéines et de matériel génétique spécifiques de *Plasmodium falciparum* dans la peau ou les tissus osseux et musculaires de momies égyptiennes dont les plus anciennes ont été datées à 3200 ans avant J.-C. (Miller et al., 1994), et notamment dans celle du roi Toutânkhamon (environ -1300 avant J.-C.) (Hawass et al., 2010).

Les premiers écrits concernant le paludisme viennent d'Asie et sont imputés à Nei Chi qui, dès 2700 avant J.-C., écrit à l'empereur Huang Ti afin de faire le rapprochement entre les fièvres tierces et quartes et la splénomégalie caractéristiques de la maladie. A cette époque la maladie est représentée dans la mythologie chinoise sous forme de trois démons représentant les principaux symptômes du paludisme : les démons sont munis d'un marteau, d'un seau d'eau froide ou d'un four brûlant symbolisant les céphalées, les frissons et la fièvre. Au cours de l'histoire de nombreux écrits feront référence à la maladie, la plupart du temps sous la forme de descriptions de fièvres intermittentes (Debacker, 2000).

(2) Dates clés

L'expansion coloniale de l'Europe au cours du 19^{ème} siècle, notamment française au nord de l'Afrique et britannique en Asie a poussé les scientifiques occidentaux à s'intéresser de plus près à cette maladie auparavant considérée comme « exotique ». C'est au cours de la seconde moitié du 19^{ème} siècle que les scientifiques se penchent sur la recherche de l'agent responsable du paludisme, en parallèle du développement de la microbiologie et des instruments optiques d'observation.

L'origine parasitaire de la maladie a été montrée pour la première fois en 1881 par Laveran, médecin militaire envoyé à Constantine en Algérie. C'est par l'observation au microscope du sang d'un soldat atteint de fièvre intermittente que Laveran identifie les parasites : « on trouvait [...] d'autres éléments allongés ou arrondis, pigmentés, très réguliers, qui ne ressemblaient nullement à des leucocytes chargés de pigment. Je soupçonnais depuis quelque temps que ces éléments étaient d'origine parasitaire, lorsque, le 6 novembre 1880, en examinant un des corps arrondis et pigmentés dans une préparation de sang frais, je constatai avec étonnement qu'il existait à la périphérie de cet élément une série de filaments grêles et très transparents qui se mouvaient avec une grande agilité et dont la nature animée n'était pas contestable » (Laveran, 1881). Il nomme ce parasite *Oscillaria malariae*. La découverte en 1891 d'une coloration à l'éosine bleu de méthylène permettant la coloration des parasites en bleu et rouge a grandement facilité leur étude (Cox, 2010). Camillo Golgi, plus connu pour avoir obtenu le prix Nobel de physiologie pour ses études sur la structure du système nerveux, a grandement participé à la recherche sur *Plasmodium*. En 1886, en étudiant les stades du parasite dans le sang de patients infectés, il distingue les fièvres tierces (tous les 3 jours) des fièvres quartes (tous les 4 jours) et les attribue à des espèces distinctes de parasites. En 1890, trois espèces infectant l'homme ont été distinguées selon la périodicité des fièvres : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae*.

L'implication du moustique dans le développement de la maladie a longtemps été supposée sans être démontrée. La découverte en 1877 que la transmission d'un filaire se faisait par le moustique et l'accumulation d'évidences vont ancrer la théorie de la transmission du paludisme par le moustique. Ronald Ross, un médecin militaire travaillant en Inde sur le paludisme aviaire, observera pour la première fois des parasites au niveau de l'estomac de moustiques gorgés sur des oiseaux infectés en 1897 (Ross, 1897). Des expériences de challenge de volontaires sains par des piqûres de moustiques s'étant gorgés sur des malades permettent dans les années 1900

de confirmer la transmission de la maladie par piqûre de moustiques. S'ensuivent de nombreuses études sur le parasite, le vecteur moustique et les moyens de lutte contre la maladie. L'hypothèse d'une phase pré-érythrocytaire de la maladie a été émise en 1901 par Grassi afin d'expliquer la période séparant l'inoculation des parasites par les moustiques du début de la maladie chez l'hôte vertébré. Le parasite n'est alors pas trouvable dans le sang. Le passage du parasite par le foie des hôtes a été démontrée en 1948 pour la première fois, par observation de foies de macaques Rhésus infectés par un grand nombre de parasites (Hawking, 1948; Shortt & Garnham, 1948).

C'est la même année que le premier parasite murin, *P. berghei*, a été identifié et isolé dans des rats au Katanga. Son adaptation aux souris et autres modèles couramment utilisés en laboratoire a grandement facilité l'étude du parasite.

L'équipe ayant démontré la présence des parasites dans le foie va également être à l'origine de l'observation en 1982 de formes dormantes du parasite dans le foie, responsables des rechutes de la maladie et nommées hypnozoïtes (Krotoski, 1982, 1985).

Cent ans auront donc été nécessaires depuis la découverte du parasite causant le paludisme pour en décrypter le fonctionnement global, et les efforts se poursuivent aujourd'hui encore afin de comprendre plus finement le parasite et lutter contre la maladie.

2. Le phylum des Apicomplexa

Plasmodium fait partie du complexe des Apicomplexes, qui comporte les Coccidies, les Cryptosporidies, les Grégarines et les Hématozoaires. Les apicomplexes sont formés d'organismes eucaryotes unicellulaires, parasites obligatoires. Le groupe des apicomplexes a évolué depuis un ancêtre photosynthétique non parasite du genre des Chromérides.

Ils sont responsables de nombreuses maladies chez l'humain mais également chez les animaux, ayant de réelles conséquences économiques lorsqu'il s'agit d'animaux d'élevage. La toxoplasmose, transmise par un parasite *Toxoplasma* de la sous-classe des Coccidies, est relativement inoffensive pour la plupart des gens mais peut représenter une menace importante pour les personnes immunodéprimées et pour les femmes enceintes. Un tiers de la population mondiale serait porteur du parasite (Montoya & Liesenfeld, 2004). La cryptosporidiose (causée par *Cryptosporidium*) provoque des diarrhées sévères et une faiblesse générale chez les ovins, les bovins mais également chez l'Homme. Les Grégarines présentent un intérêt purement zoologique puisqu'ils s'attaquent exclusivement aux insectes, crustacés et vers (Dastre, 1901). Le parasite responsable du paludisme, *Plasmodium*, fait quant à lui partie des Hématozoaires.

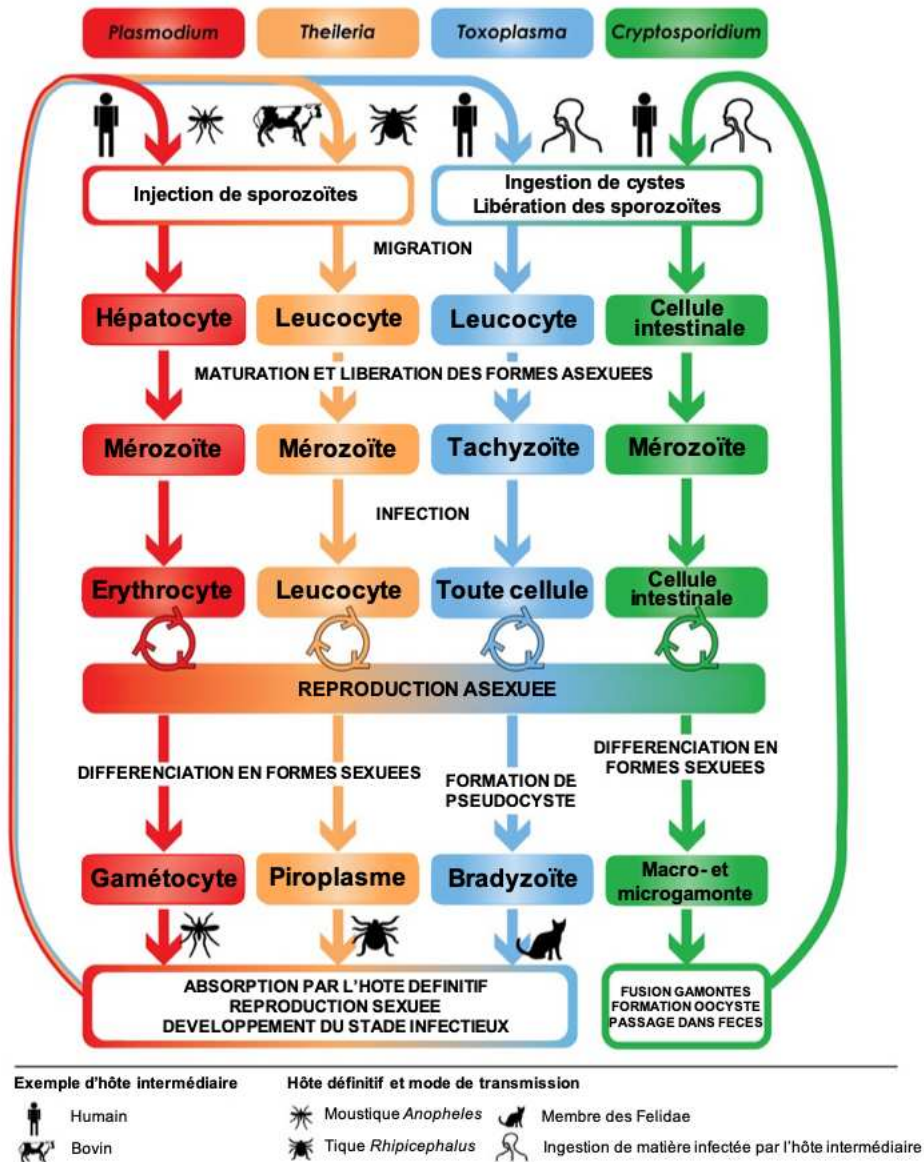


Figure 1 : Cycle de vie des différents apicomplexes. Les membres des apicomplexes partagent un cycle de vie général mais chaque espèce s'est spécialisée dans l'invasion d'hôtes et de tissus particuliers. La reproduction sexuée de *Plasmodium* et *Theileria* ne peut avoir lieu que dans un hôte insecte et ils ciblent des cellules du sang chez l'hôte mammifère. *Cryptosporidium* est capable de réinfecter le même hôte et cible les cellules du système digestif. *Toxoplasma* nécessite un hôte félin pour sa reproduction sexuée et ses formes asexuées infectieuses peuvent envahir un grand nombre de type de cellules. (adapté de Wasmuth et al., 2009)

Le cycle de vie basique des apicomplexes consiste en une alternance entre 4 formes : zygote, sporozoïte, mérozoïte (ou tachyzoïte chez certains organismes) et gamète. L'union de gamètes haploïdes va former un zygote diploïde qui va subir une division méiotique et former les formes invasives haploïdes : les sporozoïtes. Ces sporozoïtes vont envahir des cellules spécifiques et former des mérozoïtes / tachyzoïtes haploïdes qui vont subir de nombreuses divisions asexuées

menant à la formation d'autres mérozoïtes / tachyzoïtes et de gamétocytes, précurseurs des gamètes. La différence entre les différents groupes d'apicomplexes réside dans le nombre d'hôtes impliqués et dans le type de cellules envahies (**Figure 1**). Les Cryptosporidies n'envahissent qu'un seul hôte et ont une phase hors de l'hôte alors que les Hématozoaires dont fait partie *Plasmodium* ont besoin de deux hôtes et ne se retrouvent jamais hors de ceux-ci. Les cellules ciblées par les formes invasives du parasite varient également selon les groupes, allant des globules rouges et des hépatocytes chez *Plasmodium* aux leucocytes chez *Theileria* en passant par les cellules du système digestif chez *Cryptosporidium* (**Figure 1**).

3. Les différentes espèces de *Plasmodium*

(1) Espèces infectant l'homme

Le genre *Plasmodium* comporte plus 150 espèces capables d'infecter différents vertébrés, allant de l'oiseau au reptile en passant par les rongeurs et les primates. Parmi celles-ci, seules 5 espèces sont capables d'infecter l'homme, se différenciant par leur répartition géographique et des critères biologiques et cliniques :

- *P. falciparum* : Cette espèce est la plus répandue sur le globe et est responsable de la majorité des formes cliniques mortelles. Elle se retrouve dans les régions tropicales et sub-tropicales et prédomine en Afrique. La multiplication rapide du parasite dans le sang (48h) entraîne de fortes anémies et une forme sévère de la maladie. Ce parasite a la capacité de boucher des petits vaisseaux sanguins avec les globules rouges infectés, résultant en une complication souvent mortelle lorsque cela arrive dans le cerveau (paludisme cérébral). Elle cause une fièvre dite tierce (du fait d'une périodicité des recrudescences fébriles tous les deux jours). En France, plus de 80% des cas de paludisme d'importation (contracté en zone endémique mais se révélant après le retour en zone non endémique) sont dus à *P. falciparum*.

- *P. vivax* : Cette espèce est retrouvée majoritairement en Amérique latine et en Asie. Elle est également retrouvée en Afrique de l'Est et dans les îles de l'océan Indien (Comores, Madagascar). Elle cause également une fièvre tierce. Pendant longtemps il a été admis que cette espèce n'était pas capable d'envahir les globules rouges ne possédant pas le récepteur Duffy, expliquant l'absence du parasite d'Afrique Centrale et de l'Ouest où les populations sont majoritairement Duffy-négatives. Cependant il a été montré en 2010 que *P. vivax* se retrouve dans des populations Duffy-négatives en Afrique (Menard et al., 2010; Popovici et al., 2020;

Zimmerman, 2017). Cette espèce est capable de former dans le foie de l'hôte des stades dormants, appelés hypnozoïtes, qui peuvent causer des rechutes de la maladie après réactivation des mois ou des années après l'infection initiale.

- *P. ovale* : Cette espèce se retrouve en Afrique intertropicale du centre et de l'Ouest ainsi que dans certaines régions du Pacifique (Papouasie-Nouvelle Guinée, Philippines). Elle ressemble morphologiquement à *P. vivax*. Elle provoque également des fièvres tierces et est capable de former des hypnozoïtes causant des rechutes.

- *P. malariae* : Cette espèce se retrouve sur les trois continents tropicaux (Amérique du Sud, Afrique et Asie). Elle provoque une fièvre quarte (avec multiplication du parasite dans le sang toutes les 72h). Il existe des cas de recrudescence très tardive (jusqu'à 40 ans après l'infection primaire) mais les mécanismes sont mal connus bien que le phénomène ne semble pas dû à la présence d'hypnozoïtes comme c'est le cas pour *P. vivax* et *P. ovale* (Grande et al., 2019).

- *P. knowlesi* : Cette espèce, initialement décrite chez le macaque crabier (*Macaca fascicularis*), a récemment été détectée chez l'Homme (B. Singh et al., 2004). Elle est présente en Asie du Sud-Est, dans les zones communes de répartition des macaques et du vecteur commun au singe et à l'Homme. Initialement détectée chez l'Homme en Malaisie, elle s'étend maintenant au reste de l'Asie du Sud-Est. Le cycle au stade sanguin dure 24h, provoquant des fièvres quotidiennes et des anémies pouvant causer des formes sévères.

(2) Espèces modèles en laboratoire

En laboratoire, des espèces infectant d'autres animaux sont souvent utilisées comme modèles d'étude : *P. cynomolgi* chez les primates non-humains, *P. yoelii* et *P. berghei* chez les rongeurs et *P. gallinaceum* chez les volailles notamment. Bien que les caractéristiques du développement du parasite diffèrent entre les espèces, les espèces modèles présentent l'avantage de pouvoir travailler en routine avec le cycle de vie complet du parasite (excepté pour *P. cynomolgi* qui ne peut être maintenu en culture et dont l'étude dépend donc de l'apport en échantillons de sang infecté). Les parasites de rongeur *P. berghei* et *P. yoelii* présentent de nombreux avantages, le premier étant que leur cycle complet peut être reproduit au laboratoire et de plus, les modifications génétiques par transfection sont relativement faciles chez ces parasites (Janse et al., 2011). Au stade hépatique ces deux espèces utilisent des voies d'entrée différentes dans les

hépatocytes, reflétant les voies utilisées par *P. falciparum* et *P. vivax* (Manzoni et al., 2017 – voir partie III-1 de l'introduction : "Facteurs de l'hôte impliqués dans l'invasion"). De plus *P. berghei* est notamment utilisé comme modèle de neuropaludisme dans certains modèles de souris bien que l'utilisation de modèles rongeurs pour l'étude des formes sévères de la maladie soit controversée, ses détracteurs pointant des différences dans la physiopathologie du neuropaludisme chez l'homme et la souris (Craig et al., 2012).

4. Cycle de vie du parasite

Le parasite traverse au cours de son cycle de vie quatre niches très différentes en termes de conditions physiologiques : l'estomac du moustique, les glandes salivaires du moustique, les cellules hépatiques de l'hôte vertébré et son flux sanguin.

Plasmodium possède un cycle de vie à deux hôtes : l'anophèle femelle comme hôte définitif et vecteur de transmission et un hôte intermédiaire vertébré (**Figure 2**). En effet, par définition, l'hôte définitif d'un parasite est celui au sein duquel la reproduction sexuée a lieu.

Lors de son repas sanguin, un moustique femelle du genre *Anopheles* va injecter une dizaine de parasites sous forme de sporozoïtes à l'hôte vertébré. Ces sporozoïtes mobiles vont migrer activement à travers la peau pour rejoindre le foie par la circulation sanguine afin d'entamer la première étape de l'infection : c'est la phase initiale de multiplication du parasite, asymptomatique et obligatoire au cours de l'infection, dite phase schizogonique exo-érythrocytaire (**Figure 2**). Après 2 à 15 jours de multiplication selon les espèces, des dizaines de milliers de formes haploïdes du parasite, appelées mérozoïtes, sont générées et libérées dans la circulation sanguine, où elles entament l'infection érythrocytaire symptomatique de la maladie. Dans une hématie, le mérozoïte va donner un trophozoïte qui va maturer en schizonte puis libérer des mérozoïtes qui vont infecter d'autres hématies : c'est la phase schizogonique érythrocytaire (**Figure 2**). Les mérozoïtes au sein de l'hématie peuvent échapper à ce cycle de réplication asexuée et donner des formes sexuées, les gamétocytes.

Ce sont ces formes sexuées qui vont permettre de compléter le cycle de vie du parasite chez le moustique. Après ingestion de parasites lors d'un repas sanguin, les gamétocytes vont subir au sein de l'estomac du moustique une gamétogénèse aboutissant à la libération des gamètes mâles et femelles. Le gamète mâle va fertiliser le gamète femelle, aboutissant à la formation d'un zygote qui va se développer en ookinète (**Figure 2**). Cet ookinète mobile va traverser la paroi de l'estomac pour se différencier en oocyste sur la paroi externe de l'estomac. Au sein de ces oocystes, la sporogonie a lieu, à la fin de laquelle des milliers de sporozoïtes nouvellement

formés sont libérés dans l'hémolymphe du moustique. Ils sont ensuite transportés passivement jusqu'aux glandes salivaires du moustique qu'ils vont envahir. Lors du prochain repas sanguin, le moustique va injecter de la salive au moment de la piqûre et ainsi les sporozoïtes se retrouvent dans l'hôte vertébré, complétant son cycle de vie (**Figure 2**).

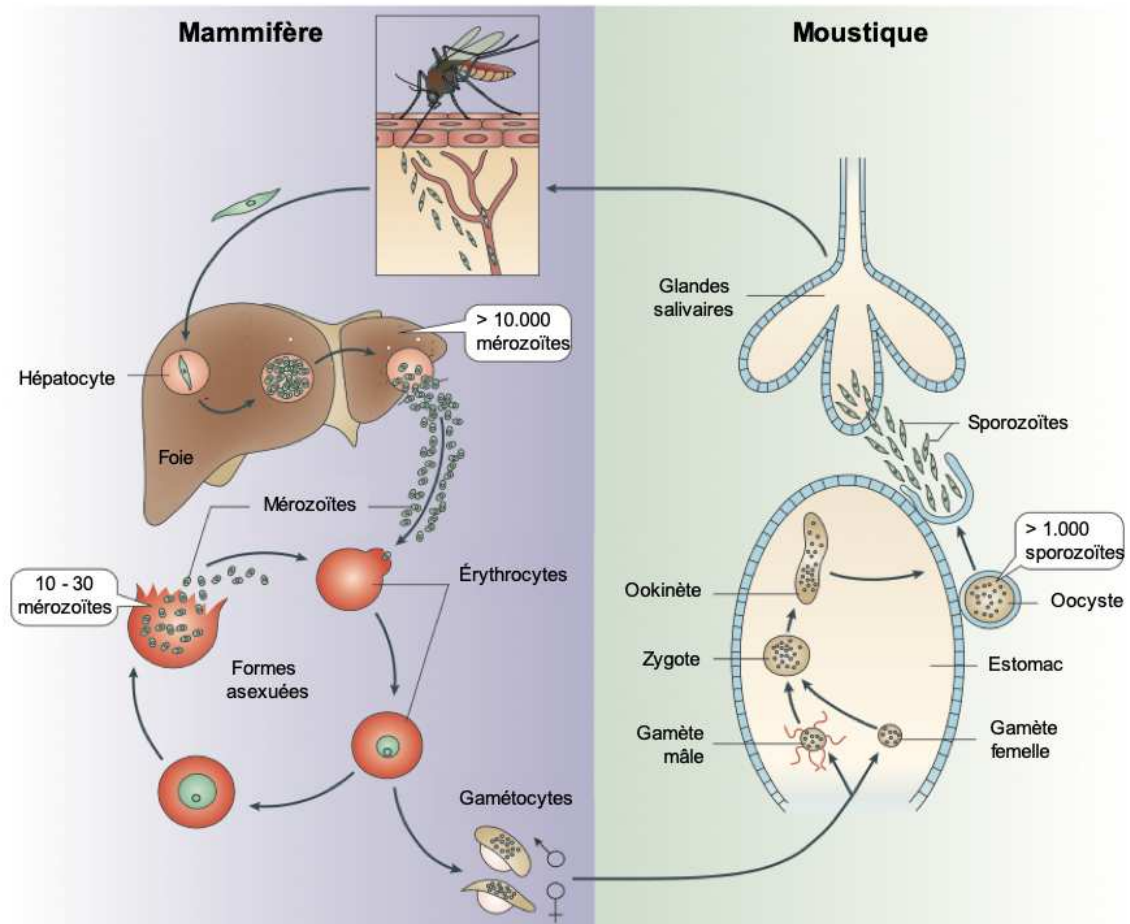


Figure 2 : Cycle de vie de *Plasmodium*. (adapté de Ménard et al., 2013)

5. Épidémiologie

(1) Répartition géographique

En 2019, 229 millions de personnes ont été touchées par le paludisme et 409.000 en sont mortes à travers 87 pays. Ces chiffres représentent une diminution par rapport à l'année 2000 où on dénombrait 238 millions de cas pour 736.000 morts dans 108 pays (WHO, world malaria report 2020). Quasiment la moitié de la population mondiale vit dans des zones endémiques (**Figure 3**). Les pays touchés par cette maladie sont majoritairement situés en Afrique, en Asie du sud-est, en Amérique centrale et du sud et dans les régions intertropicales (**Figure 3 - rouge**).

L'Afrique est le continent le plus touché par le paludisme et surtout par sa mortalité, notamment en Afrique sub-saharienne. En effet le Nigéria, la République Démocratique du Congo, la Tanzanie, le Burkina Faso, le Mozambique et le Niger concentrent la moitié de la mortalité annuelle liée au paludisme en 2019. L'Asie est également touchée, notamment par *Plasmodium vivax*, mais il est encourageant de noter que la Chine et Taïwan n'ont pas recensés de cas de paludisme depuis 3 ans. La répartition du paludisme est hétérogène en Océanie où les îles les plus au sud (Australie, Nouvelle-Zélande, Polynésie française...) sont épargnées alors que des îles comme la Nouvelle-Guinée ou les Iles Salomon sont atteintes. L'Amérique du Nord a éradiqué le paludisme depuis les années 1950 mais il est toujours présent en Amérique centrale et du sud bien que le Salvador et le Costa Rica ne présentent plus de cas depuis 3 ans et le Belize depuis 1 an. Les Caraïbes sont épargnées à l'exception de la République Dominicaine et d'Haïti. L'Europe a récemment éradiqué le paludisme pour la seconde fois après une première éradication dans les années 1970. Une résurgence dans les années 2010 en Grèce et en Turquie liée à l'import depuis des pays endémiques a rapidement été contenue.

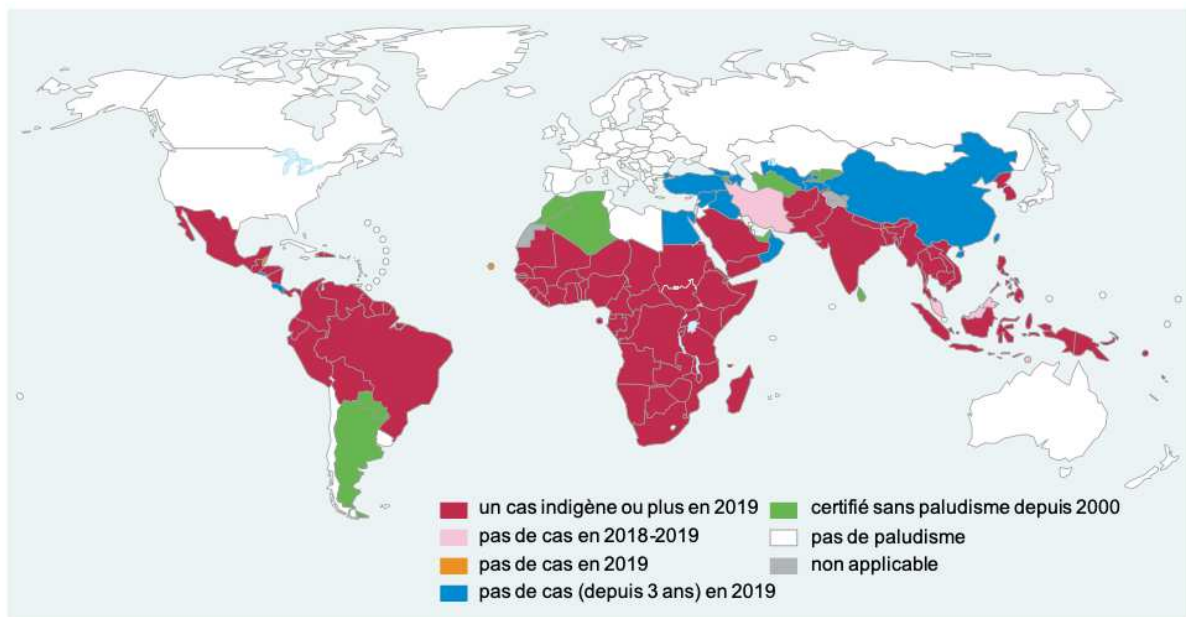


Figure 3 : Carte mondiale de répartition du paludisme. Pays présentant des cas indigènes en 2000 et leur statut en 2019. (adapté de WHO, world malaria report 2020)

(2) Populations à risque de paludisme sévère

L'immunité acquise à *Plasmodium* s'acquiert par l'exposition continue au parasite et est donc développée dans les zones à forte transmission du parasite. Elle s'acquiert lentement et n'est pas stérilisante (elle n'empêche pas une nouvelle infection et ne permet pas de se débarrasser

du parasite). Cependant, elle empêche progressivement la survenue de formes sévères du paludisme. Elle est transmissible aux nouveau-nés et n'est pas définitive. C'est cette immunité acquise qui protège les adultes en zone de forte transmission des accès graves. En revanche, certaines catégories de la population sont particulièrement vulnérables aux formes graves, notamment à cause d'une absence ou d'une diminution de cette immunité acquise (Doolan et al., 2009).

i. Femmes enceintes

Le paludisme représente un risque pour les femmes enceintes et leur enfant. Les complications sont variables selon le niveau d'immunité acquise de la mère. Les parasites au stade sanguin se retrouvent au niveau du placenta (paludisme placentaire) et peuvent entraîner des anémies chez la mère ainsi que des poids de naissance plus faibles, corrélés à une mortalité infantile plus forte. Dans les zones à forte transmission du parasite où les mères ont un fort taux d'immunité acquise, les symptômes sont généralement modérés bien que plus prononcés au cours d'une première grossesse. Dans les zones à faible transmission du parasite où les femmes n'ont pas ou peu d'immunité acquise, le paludisme placentaire se révèle plus grave avec un risque accru d'accès sévère qui peut mener à une fausse-couche ou à une mortinaissance.

ii. Nourrissons

Les nourrissons de moins d'un an sont également très vulnérables à la maladie. En effet ils n'ont pas eu le temps de développer d'immunité acquise et celle héritée de leur mère disparaît vers 3 mois. Ils sont particulièrement sujets aux formes sévères et aux anémies. Les accès sévères à *P. vivax* semblent particulièrement toucher cette catégorie de personnes à risque.

iii. Enfants de moins de cinq ans

Les enfants de moins de cinq ans sont les plus vulnérables à la maladie et représentent 67% des décès en 2019, soit 274000 décès (WHO, 2020). Ils sont particulièrement sujets aux formes sévères et présentent en particulier des anémies, des hypoglycémies et un paludisme cérébral souvent mortel.

iv. *Individus séropositifs (VIH)*

Un nombre non négligeable d'individus présentent une co-infection VIH / *Plasmodium*, compliquant la gestion de la maladie chez ces individus. En effet il semble que les échecs thérapeutiques soient plus fréquents chez les patients séropositifs. De plus il faut prendre en compte le traitement contre le VIH dans le cadre du traitement contre le paludisme, afin d'éviter les interactions médicamenteuses. En parallèle de la complexité accrue du traitement, les patients séropositifs souvent immunodéprimés sont ainsi plus facilement sujets à développer des formes graves du paludisme.

v. *Voyageurs*

Les voyageurs et les migrants retournant en zone endémique sont très vulnérables aux formes sévères, n'ayant jamais développé d'immunité acquise ou l'ayant perdu avec le temps. En effet un individu émigrant vers une zone sans paludisme va perdre sa protection en 2/3 ans, ce qui explique les formes sévères observées chez les étudiants ou les migrants retournant en zone endémique après un temps sans exposition.

6. Signes cliniques

Les signes cliniques du paludisme sont très variés et ne sont pas spécifiques dans les formes non sévères, ce qui complique le diagnostic et explique le besoin de recourir à des examens en laboratoire. Classiquement on classe le paludisme en deux formes cliniques, simple et sévère, selon les symptômes observés. Les accès simples correspondent aux symptômes causés par l'anémie et la réplication du parasite dans le sang. Les accès sévères correspondent à l'aggravation de la maladie, avec notamment l'atteinte grave de différents organes causée par la présence du parasite dans le sang et ils sont la cause de la majorité des décès liés au paludisme (Ashley et al., 2018; Bartoloni & Zammarchi, 2012; White et al., 2014).

(1) *Forme simple*

Les symptômes de la forme simple du paludisme sont non spécifiques et incluent : fièvre, céphalées, toux, diarrhées, douleurs musculaires, frissons... Ils peuvent être confondus avec les symptômes de la grippe.

La fièvre est généralement irrégulière au début puis devient périodique, avec une périodicité des accès palustres dépendante de l'espèce de *Plasmodium* impliquée. Les accès palustres correspondent à la triade de symptômes décrits depuis longtemps : frissons, fièvre puis sueur. Durant la première phase, le malade a froid, frissonne et sa peau est froide à l'examen. Cette phase dure environ 1h puis la température augmente graduellement jusqu'à la seconde phase de pic fébrile durant laquelle des convulsions peuvent être observées, surtout chez les enfants. La température peut dépasser 40°C, la peau est sèche et brûlante à l'examen et cette phase s'accompagne souvent de céphalées. Cette phase dure 3/4h. Enfin, la température redescend et le malade entre en phase de sueur abondante et générale, qui dure 2 à 4h. Les accès palustres durent en général entre 6 et 10h et laissent le malade épuisé. Entre deux pics fébriles, le patient se sent généralement bien. La répétition de ces accès palustres s'accompagne d'une anémie et d'une thrombopénie (diminution de nombre de plaquettes dans le sang) croissantes. De plus, une splénomégalie est souvent observée (augmentation du volume de la rate), liée à la participation de cet organe dans le tri des globules rouges infectés.

C'est donc la durée du cycle érythrocytaire du parasite qui va déterminer le rythme des accès palustres. Ainsi la schizogonie en 48h de *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* conduit à des accès palustres tous les 2 jours (appelés fièvres tierces) tandis que la schizogonie en 72h de *P. malariae* conduit à des accès palustres tous les 3 jours (appelés fièvres quarts).

(2) Formes graves

On ne peut prédire l'évolution de la maladie vers une forme sévère et les symptômes peuvent évoluer en quelques heures à peine. Les formes sévères sont principalement observées dans le cas d'infections à *P. falciparum* mais *P. vivax* et *P. knowlesi* peuvent également en causer. Les populations à risque sont plus sujettes à développer une forme sévère.

Les formes sévères correspondent en fait à une aggravation de l'état général due à des défaillances d'organes ou des troubles métaboliques. Les signes cliniques incluent notamment prostration, confusion, détresse respiratoire, convulsions, état de choc, œdème pulmonaire, jaunisse, vomissements répétés et coma (**Figure 4**). Ces signes se traduisent en général par une acidose, une anémie, une hémoglobinurie (présence d'hémoglobine dans les urines), une hypoglycémie et une parasitémie élevée. La plupart de ces manifestations sont directement ou indirectement liées à la destruction des globules rouges mais également au phénomène de séquestration des globules rouges infectés dans les vaisseaux sanguins. En effet cette cytoadhérence des globules rouges infectés entraîne à la fois un ralentissement du flux sanguin

mais aussi une réaction inflammatoire tissulaire cytokinique. Ces manifestations dépendent de l'âge du malade : les anémies sévères, les acidoses et les convulsions sont plus courantes chez les enfants tandis que les atteintes pulmonaires, rénales et par la jaunisse (**Figure 4**).

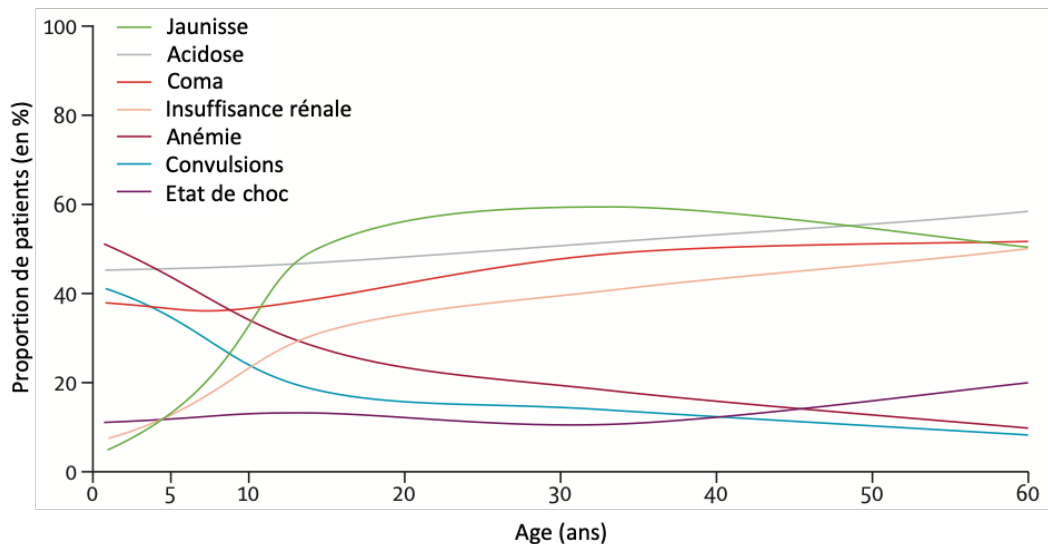


Figure 4 : Symptômes d'accès sévères à *Plasmodium falciparum* selon l'âge. (adapté de White et al., 2014)

La cytoadhérence des globules rouges infectés au niveau des vaisseaux cérébraux entraîne un paludisme dit cérébral, ou neuropaludisme. Il en résulte des troubles neurologiques tels que des convulsions, une confusion généralisée et peut aller jusqu'au coma. Non traité, le neuropaludisme est mortel en 2 ou 3 jours. Même dans le cas d'une prise en charge rapide, environ 10% des enfants ayant développé un neuropaludisme en gardent des séquelles neurologiques, plus rares chez les adultes. Le phénomène de séquestration des globules rouges infectés peut avoir lieu au niveau du placenta chez les femmes malades enceintes, occasionnant un paludisme placentaire mettant en jeu la vie de la mère et de l'enfant à naître.

7. Diagnostic

Le diagnostic précis et surtout rapide du paludisme est indispensable pour une prise en charge adaptée du malade et conditionne fortement le pronostic de la maladie. Le diagnostic clinique est le plus abordable mais les premiers symptômes du paludisme sont multiples et non-spécifiques, c'est pourquoi a émergé rapidement un réel besoin en techniques de diagnostic

rapides et précises. Il existe à ce jour différentes méthodes de diagnostic en laboratoire, à partir d'échantillons de sang de patients (Tangpukdee et al., 2009).

(1) Microscopie

L'étude microscopique du sang remonte à la découverte du parasite par Laveran et reste à ce jour un des moyens les plus utilisés dans le diagnostic du paludisme. La découverte de différents colorants du parasite (Giemsa, bleu de toluidine, colorant de Wright...) a permis de faciliter sa détection. C'est de plus une méthode qui reste relativement abordable, ne nécessitant que du colorant et l'accès à un microscope optique classique.

	Anneaux	Trophozoïtes	Schizontes	
<i>P. falciparum</i>				<ul style="list-style-type: none"> • Globules rouges infectés (GRi) non élargis • GR contenant des trophozoïtes matures séquestrés dans les vaisseaux • Biomasse totale du parasite = parasites circulants + parasites séquestrés • Peut atteindre une forte parasitémie causant des invasions multiples de GR
<i>P. vivax</i>				<ul style="list-style-type: none"> • Préférence pour les jeunes GR • GRi élargis • Tous les stades présents dans le sang périphérique
<i>P. malariae</i>				<ul style="list-style-type: none"> • Préférence pour les GR âgés • GRi non élargis • Trophozoïtes en forme de bande • Tous les stades présents dans le sang périphérique
<i>P. ovale</i>				<ul style="list-style-type: none"> • GRi légèrement élargis, de forme ovale • Tous les stades présents dans le sang périphérique
<i>P. knowlesi</i>				<ul style="list-style-type: none"> • GRi non élargis • Pigments visibles dans le cytoplasme des GR infectés par les trophozoïtes • Invasion multiple et forte parasitémie possibles • Tous les stades présents dans le sang périphérique

Figure 5 : Planches d'analyse microscopique des différentes espèces de *Plasmodium* infectant l'humain. Un frottis sanguin suivi d'une analyse en microscopie de discriminer les différentes espèces grâce à leur forme dans les globules rouges. GR : Globule rouge. (adapté de Ashley et al., 2018)

L'étude microscopique nécessite le prélèvement d'une goutte de sang au bout du doigt du malade. Cette goutte peut être déposée sur une lame de microscopie en goutte épaisse ou bien être étalée en frottis. La goutte épaisse permet d'observer un grand nombre de globules rouges par champ et donc de détecter rapidement les parasites. Le frottis présente une mono-couche de

globules rouges et permet donc d'analyser la morphologie du parasite et de confirmer l'espèce présente (**Figure 5**). Le colorant le plus utilisé est le Giemsa qui va colorer le parasite d'une manière très spécifique : le noyau en grenat, le cytoplasme en bleu (excepté chez le gamétocyte mâle où il est violet) et les inclusions pigmentaires ressortent en points de couleur foncée. Un des désavantages de la microscopie dans le diagnostic de la maladie venait du temps nécessaire (au moins 1h pour la préparation de l'échantillon et son analyse) mais depuis les colorants et protocoles de coloration ont été optimisés et permettent maintenant une coloration en 5mn des échantillons (Jager et al., 2011).

Une méthode de détection par microscopie à fluorescence est également utilisée bien qu'elle nécessite plus de matériel et soit donc plus coûteuse (QBC pour Quantitative Buffy Coat). Elle consiste à utiliser l'orange acridine qui se fixe aux acides nucléiques du parasite et émet une fluorescence verte après excitation (Adeoye & Nga, 2007). Le sang est récupéré et mélangé à l'orange acridine avant d'être centrifugé et observé sous microscope à épi-fluorescence. Les parasites sont alors facilement détectés par fluorescence. Le test QBC est plus sensible que les frottis colorés au Giemsa pour les faibles parasitémies.

(2) Test de diagnostic rapide

Les tests de diagnostic rapide sont basés sur la détection dans le sang d'antigènes spécifiques à *Plasmodium*. Le premier RDT commercialisé est le test ParaSight *F*[®] permettant la détection de *P. falciparum* uniquement (Shiff et al., 1993). Il existe actuellement sur le marché plus de 200 RDT, fonctionnant sur le même principe : une immuno-chromatographie sur membrane. Des anticorps marqués spécifiques d'un antigène donné vont former un complexe avec l'antigène et migrer jusqu'à une bande « test » constituée d'anticorps de capture spécifiques du complexe. S'il n'y a pas d'antigène et donc pas de complexe, les anticorps marqués libres migrent jusqu'à la bande « contrôle » des tests. Le test ne nécessite qu'une goutte de sang prélevée au bout du doigt, mélangée à un tampon de lyse pour libérer les antigènes parasitaires, et appliquée sur le test. La plupart des RDT sur le marché se basent sur la reconnaissance de HRP2 (Histidine Rich Protein 2) ou de la Lactate DesHydrogénase (LDH) pour la reconnaissance de *P. falciparum* (Tangpukdee et al., 2009). Il existe également des tests de détection d'infection multiple basés sur la reconnaissance d'antigènes spécifiques aux différentes espèces de *Plasmodium* infectant les humains.

La sensibilité des RDT est comparable à l'analyse microscopique mais ils présentent l'avantage d'être très rapide et de ne nécessiter aucune qualification particulière pour être utilisés.

Néanmoins, un contrôle qualité strict est nécessaire dans les étapes de production et de stockage des tests. Ils sont très avantageux dans les zones ayant un accès limité aux laboratoires mais leur coût est le facteur limitant leur expansion. Ils permettent un résultat en 5 à 15mn.

(3) Sérologie

Les tests sérologiques sont souvent utilisés dans les études épidémiologiques. En effet ils ne permettent pas de diagnostiquer une infection en cours mais de déterminer si un individu a déjà été exposé au parasite. Ils reposent sur le principe d'analyse des anticorps présents dans le sérum d'un individu et de déterminer si des anticorps présents reconnaissent des antigènes du parasite. La détection des anticorps dans le sérum des individus peut se faire par immunofluorescence (IFA) ou par réaction immuno-enzymatique (ELISA pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Pour l'IFA, le sérum du patient (utilisé comme anticorps primaire), est mis à incuber avec une culture de sang contenant des parasites. Des anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués par un fluorophore sont ensuite utilisés pour révéler la fixation des anticorps primaires. Si le sérum contient des anticorps spécifiques du parasite, ces derniers vont être marqués et révélés en microscopie à fluorescence. Pour l'ELISA, le sérum de l'individu est mis en présence de différents antigènes du parasite fixés sur une plaque et le test révèle la présence d'une interaction entre les antigènes fixés et les anticorps du sérum. S'il y a interaction, cela révèle la présence dans le sérum d'anticorps dirigés spécifiquement contre le parasite.

(4) Amplification d'acides nucléiques

Les tests d'amplification des acides nucléiques sont tous basés sur le principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction). En utilisant des oligonucléotides spécifiques du génome du parasite, il est possible d'amplifier et donc de détecter des portions de ce génome. Le gène codant pour l'ARN ribosomal 18S est le plus souvent ciblé dans les PCR, car il permet notamment la distinction entre les cinq espèces de *Plasmodium* infectant l'homme (Morassin et al., 2002). De nombreuses méthodes dérivées de la PCR classique sont utilisées : qPCR (quantitative), PCR nichée (réduit les produits non spécifiques), RT-PCR (détection des ARN)... (Tangpukdee et al., 2009)

Il existe d'autres méthodes moins utilisées et qui doivent faire l'objet de plus d'études afin de déterminer à quel point elles peuvent être utiles et facilement mises en place sur le terrain (Erdman & Kain, 2008). Il y a notamment la méthode LAMP (Loop-mediated isothermal

Amplification) qui utilise une polymérase particulière dont les produits vont se replier en boucles, troublant la réaction. La mesure de la turbidité permet une analyse semi-quantitative. Cette méthode revient moins cher qu'une PCR classique. Une autre technique isotherme a été utilisée dans la détection de *P. falciparum*, la méthode QT-NASBA (Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification). Elle permet l'amplification de l'ARN cible du parasite et s'est révélée plus rapide et facile à mettre en œuvre qu'une PCR classique (Schneider et al., 2005). Ces deux méthodes sont isothermes et nécessitent du matériel basique, ce qui est un avantage dans la prise en compte du coût des méthodes de diagnostic. La détection d'acides nucléiques du parasite a également déjà été tentée en utilisant des micropuces (Palacios et al., 2007). Cette technique est encore en développement mais présente de grands espoirs dans le diagnostic rapide si elle peut être miniaturisée et automatisée.

Les tests basés sur l'amplification d'acides nucléiques sont les plus sensibles en cas de faible parasitémie. Cependant ils nécessitent l'accès à un laboratoire et à du matériel spécifique et nécessitent certaines qualifications. Leur gros défaut est le temps nécessaire au test, sensiblement supérieur à celui des autres techniques. Ils sont donc souvent utilisés en seconde ligne, pour confirmer un diagnostic d'espèce ou confirmer un diagnostic chez un individu présentant des symptômes mais dont les premiers tests par RDT ou microscopie se seraient révélés négatifs. Ils peuvent également apporter des informations complémentaires comme la détection des mutations impliquées dans la résistance aux traitements ou encore si les parasites détectés dans le sang proviennent d'une réinfection ou d'une résurgence.

(5) Spectrométrie de masse

Un pigment présent dans les globules rouges infectés, spécifique de *Plasmodium*, appelé l'hémozoïne peut être détecté par spectrométrie de masse (LDMS pour Laser Depletion Mass Spectrometry) (Scholl et al., 2004). Cette méthode a montré une détection plus précoce des parasites dans le sang que par microscopie. Cependant l'hémozoïne peut encore être détectée dans le sang après disparition du parasite.

C'est une méthode pour le moment coûteuse et qui nécessite une bonne expertise et du matériel. En revanche c'est une technique extrêmement rapide (moins d'une minute par échantillon).

(6) Cytométrie en flux

Des monocytes ayant phagocyté de l'hémozoïne peuvent être détectés en cytométrie en flux.

C'est une méthode dont la sensibilité varie beaucoup, qui n'est pas quantitative et qui ne permet pas de distinguer les espèces de *Plasmodium* (Erdman & Kain, 2008). En revanche, elle pourrait être couplée aux analyses en cytométrie en flux de formule sanguine complète (FSC) de patients, de façon systématique. Une étude ayant appliqué cette détection à toutes les analyses de sang effectuées durant 2 semaines dans un hôpital au Portugal en 1999 a permis de détecter 3 cas de paludisme n'ayant pas été détectés car non recherchés spécifiquement au vu des signes cliniques (Hänscheid et al., 1999). Un programme spécifique pour la détection du parasite pourrait être intégré aux analyseurs d'hématologie. C'est une technique très rapide (moins d'une minute par échantillon).

(7) Détection de composés volatiles

La détection de composés volatiles est une technique de diagnostic non invasive qui est encore au stade de recherche et n'a été que récemment envisagée comme outil de diagnostic pour le paludisme (Stanczyk et al., 2019). Basée sur l'hypothèse que le parasite modifie les composés volatiles sécrétés par le patient infecté (Berna et al., 2015; de Boer et al., 2017; A. Robinson et al., 2018), elle consiste à identifier des composés spécifiques d'une infection dans le souffle ou sur la peau des patients.

8. Moyens de lutte

La lutte contre le paludisme consiste à la fois en la lutte contre les aspects cliniques de la maladie mais également contre sa transmission. L'émergence des résistances aussi bien aux antipaludiques qu'aux insecticides souligne le fait que le contrôle de la maladie doit être envisagé de façon multifactorielle. La lutte contre la maladie implique deux domaines majeurs : le traitement des cas et la prévention (y compris par la vaccination).

(1) Traitements

Le paludisme est une maladie curable si elle est diagnostiquée et traitée à temps. L'objectif principal des traitements est l'élimination du parasite du sang des malades avant la progression de la maladie vers une forme sévère ou chronique. Du point de vue de la santé publique, le traitement des individus a pour objectif la réduction de la transmission aux autres individus (par

réduction du réservoir infectieux) et la prévention de l'émergence de résistances aux antipaludiques.

Différentes molécules naturelles ou synthétiques présentent une activité antipaludique et ont été utilisés dans le traitement de la maladie. La plupart des molécules ciblent le stade sanguin de l'infection, donc le stade symptomatique. Dans les cas d'infection à *P. vivax* ou *P. ovale*, un traitement supplémentaire ciblant les stades dormants hépatiques doit être envisagé.

Les principales molécules utilisées dans les traitements antipaludiques sont regroupées en 4 grandes classes : les dérivés quinoléiques, les antifolates, les antibiotiques ainsi que l'artémisinine et ses dérivés (Tse et al., 2019; WHO, guidelines for the treatment of malaria., 2015; WHO, model list of essential medicines., 2019). À l'heure actuelle les dérivés de l'artémisinine constituent le traitement de première ligne du paludisme.

i. Artémisinine et dérivés

L'artémisinine a été isolée en 1971 par Tu Youyou à partir d'une plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise depuis plus de 2000 ans, l'*Artemisia annua*. Son isolement a conduit à la remise d'un prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2015 pour « les découvertes concernant une nouvelle thérapie contre le paludisme ». Le premier cas de résistance à l'artémisinine a été reporté en 2008 au Cambodge et en 2018 il a été reporté plus de 30 cas indépendants de résistance à l'artémisinine en Asie du Sud. Le mode d'action n'est pas encore bien défini mais le modèle prévalent est que la molécule est activée dans la vacuole digestive par l'hème, produit par la digestion de l'hémoglobine par le parasite, générant des radicaux libres qui vont endommager des protéines essentielles à la survie du parasite. L'artémisinine et ses dérivés causent peu d'effets secondaires indésirables, ils sont de nos jours la base des traitements les plus utilisés et les plus efficaces : les ACT (Artemisinin Combination Therapy). Afin d'éviter l'émergence de résistances, l'OMS essaie d'éradiquer l'utilisation de monothérapies à base d'artémisinine. L'artémisinine a en effet une demi-vie courte dans l'organisme, et doit être associée à une autre molécule à action plus prolongée.

Différents dérivés semi-synthétiques de l'artémisinine ont été développés et lui sont maintenant préférés pour leurs différentes caractéristiques pharmacologiques : l'artéméther, l'artenusate, l'arteéther, la dihydroartémisinine...

ii. *Autres molécules anti-paludiques*

Les autres molécules, souvent utilisées en combinaison avec l'artémisinine, sont majoritairement classées en 3 groupes dont les modes d'action divergent : les dérivés quinoléiques, les anti-folates et les antibiotiques.

La quinoléine est un composé organique aromatique et hétérocyclique. Alcaloïde présent majoritairement chez les plantes, il en existe de nombreux dérivés ayant une action contre les stades sanguins du parasite. Le parasite se développe au stade sanguin en dégradant l'hémoglobine présente dans les globules rouges. Cette digestion libère des hèmes ferreux toxiques, que le parasite va agglomérer en une molécule d'hémozoïne non toxique pour lui et secrétée dans la vacuole digestive du parasite. Les drogues de type quinoléines agissent par disruption des mécanismes de digestion de l'hémoglobine et de détoxification de l'hème du parasite au stade sanguin mais les mécanismes précis ne sont pas connus.

La quinine a été isolée de l'écorce d'un arbuste d'Amérique du Sud, le quinquina, en 1820. Les premières résistances ont été reportées dans les années 1980 et depuis 2006 la quinine n'est plus utilisée comme traitement de première ligne contre le paludisme, sauf dans les cas de paludisme sévère dans des zones où l'artémisinine n'est pas disponible. Elle possède de nombreux effets secondaires indésirables : céphalées, irrégularités du rythme cardiaque, bourdonnements, troubles de la vision... Ses dérivés comme la méfloquine, l'halofantrine ou la lumefantrine sont utilisés de nos jours en combinaison avec des dérivés d'artémisinine.

La chloroquine a été synthétisée en 1936 lors de la recherche de dérivés moins toxiques de la quinine. Les premières résistances sont apparues dans les années 1950. C'est toujours le traitement prioritaire dans les infections à *P. vivax* dans les régions où la résistance ne s'est pas encore développée. On retrouve dans ses dérivés l'amodiaquine et la piperaquine.

La primaquine a été synthétisée dans les années 1920 en Allemagne. Elle a un effet parasiticide sur les formes asexuées sanguines mais aussi sur les formes sexuées de *P. falciparum*. Pour cette caractéristique elle est utilisée à faible dose dans le traitement d'individus infectés à *P. falciparum* afin d'éviter la transmission dans les zones à faible transmission. Elle permet également d'éliminer les formes dormantes hépatiques dans le cas d'infections à *P. vivax* ou *P. ovale* et est donc utilisée dans les traitements radicaux contre ces espèces (traitement destiné à éliminer le parasite du sang et à éviter les rechutes). Cela nécessite la prise de primaquine sur 14 jours. Le défaut de cette molécule est qu'elle provoque des anémies hémolytiques chez les individus présentant un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Un dépistage

de ce déficit est donc nécessaire avant l'administration de cette molécule (sauf en faible dosage pour bloquer la transmission dans le cas d'infection à *P. falciparum*). Un dérivé, la tafénoquine, présente l'avantage de pouvoir être utilisé en dosage unique dans le traitement radical de *P. vivax*.

Les anti-folates sont des molécules dont le mécanisme d'action est mieux décrit. Par inhibition enzymatique, ils vont altérer le mécanisme de synthèse des pyrimidines chez le parasite. Ce sont des antimétabolites schizonticides à action lente. La résistance des parasites se traduit par une mutation des gènes codant pour les enzymes cibles, elle apparaît rapidement et impose l'utilisation de ces médicaments en combinaison (proguanil / atovaquone et pyriméthamine / sulfadoxine). Le proguanil et l'atovaquone sont utilisés en combinaison en prophylaxie dans les zones à chloroquinorésistance et en traitement des accès non sévères à *P. falciparum* (sous le nom MalaroneTM).

Différents antibiotiques inhibant la synthèse protéique des procaryotes se sont révélés efficaces dans le traitement du paludisme, notamment la tétracycline, la doxycycline, l'azithromycine et la clindamycine. La présence d'effets indésirables conséquents (toxicité hépatique et photosensibilité notamment) décourage l'utilisation à long terme en prophylaxie et ils sont utilisés en curatif en dernière ligne et dans les zones de fortes résistances aux autres antipaludiques classiques. La doxycycline fait néanmoins toujours partie des médicaments essentiels recommandés par l'OMS dans le traitement du paludisme (WHO, model list of essential medicines., 2019)

iii. Sur le terrain

Le choix d'un traitement en particulier est multi-factoriel et le médecin doit prendre en compte de nombreux facteurs : zone de résistance aux antipaludiques, individu ayant été ou non sous prophylaxie, espèce(s) de *Plasmodium* impliquée(s), antécédents médicaux de l'individu, forme simple ou sévère, grossesse...

Dans le cas d'accès simples à *P. falciparum*, l'OMS recommande maintenant l'utilisation d'ACT combinant un dérivé de l'artémisinine à un autre antipaludique avec un mode d'action différent. Dans sa liste des médicaments essentiels de 2019 (WHO, model list of essential medicines., 2019), l'OMS classe 5 ACT dans le traitement contre le paludisme : arteméther + lumefantrine, artenusate + amodiaquine, artenusate + mefloquine, artenusate + pyronaridine

tetraphosphate et dihydroartémisinine + pipéraquline phosphate. Dans le cas d'accès graves, l'OMS recommande le traitement par arténusate en intraveineux pendant 24h suivi d'une ACT. Dans le cas d'accès simples causés par d'autres espèces de *Plasmodium*, le traitement de première ligne est la chloroquine, ou bien une ACT dans les zones de résistance à la chloroquine. Si l'infection est causée par *P. vivax* ou *P. ovale*, de la primaquine ou de la tafénoquine doivent être administrées en complément si le patient ne présente pas de déficit en G6PD.

Il est à noter qu'un problème majeur qui se pose sur le terrain est la présence de médicaments contrefaits, avec sous-dosage du principe actif, production dans des conditions non contrôlées, voire mensonge sur la nature même du médicament. Ces pratiques profitent de la difficulté d'accès à certains médicaments et ont un réel impact sur le terrain : en plus de mettre en danger les individus les utilisant, ils participent à l'émergence de résistance, notamment via l'utilisation de médicaments sous-dosés (Karunamoorthi, 2014).

(2) Prévention

La lutte contre la maladie passe notamment par la prévention dans le but de diminuer l'incidence de la maladie. Dans ce cadre, l'OMS recommande le contrôle du vecteur moustique ainsi que la chimio-prévention pour les populations à risque.

i. Lutte anti-vectorielle

En ce qui concerne le contrôle du vecteur, les recommandations de l'OMS visent à réduire le nombre de piqûres de moustique chez les populations exposées. Il s'agit d'une prévention à l'échelle individuelle qui ne peut assurer une protection totale et doit être appliquée en parallèle de la chimio-prophylaxie.

Une des grandes stratégies encouragées par l'OMS est l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (ITN pour Insecticide Treated Nets et LLINs pour Long-Lasting Insecticide-treated Nets) chez les populations à risque. Des études ont montré que l'utilisation croissante de ces moustiquaires a eu un réel impact, diminuant d'un tiers la mortalité due au paludisme (Lengeler, 2004; Pryce et al., 2018). Une autre stratégie impliquant les insecticides consiste en l'imprégnation des surfaces dans les habitations (IRS pour Indoor Residual Spraying). L'IRS a plus une action préventive contre la transmission du paludisme, n'empêchant pas les piqûres mais tuant les moustiques plutôt après leur repas sanguin,

lorsqu'ils se reposent dans les habitations. L'IRS utilisant le DDT (insecticide organochloré) a été une des mesures majeures prises à partir de 1955 dans le cadre d'un programme mondial d'éradication du paludisme (Global Malaria Eradication Campaign 1955-1969) à l'initiative de l'OMS. L'émergence de résistance au DDT et la mise en avant de ses propriétés toxiques sur l'organisme et l'environnement ont ralenti l'utilisation de l'IRS au profit des ITN et LLINs dont l'accès est également plus facile (Hemingway, 2014).

L'OMS recommande l'utilisation de 5 classes chimiques pour l'IRS : les pyréthroïdes, les organochlorés, les carbamates, les néonicotinoïdes et les organophosphates. Les pyréthroïdes ont été majoritairement utilisés mais l'émergence de résistances a accru l'utilisation des organophosphates. L'OMS a lancé en 2012 un plan de management de l'émergence de résistance aux insecticides (GPIRM) qui conseille notamment d'alterner l'utilisation des différents insecticides.

D'autres méthodes de prévention ne font pas partie des recommandations de l'OMS à grande échelle à cause de manque de données sur leur efficacité mais sont envisagées : utilisation de répulsifs topiques ou diffusés dans les habitations, utilisation de vêtements imprégnés d'insecticides... (WHO, guideline for malaria vector control., 2019)

Une autre méthode de prévention consiste à contrôler des populations de vecteur. Ce contrôle s'effectue au niveau des populations de larves de moustique (LSM pour Larval Source Management) de différentes façons : modification de l'environnement permettant de limiter la présence d'eau stagnante, utilisation de larvicides ou encore introduction de prédateurs naturels des larves de moustique (carpes, vairons...). L'impact de telles méthodes est encore à confirmer et elles doivent être considérées comme de la prévention supplémentaire, à combiner aux ITN et à l'IRS.

Une autre stratégie consiste à modifier les populations de moustiques directement, via l'introduction de vecteurs modifiés génétiquement et réfractaires aux infections ou bien en réduisant la population de moustique par l'introduction de mâles stériles (Burt, 2014).

ii. Prophylaxie

Pour les voyageurs en zone de transmission du paludisme, population à risque, une chimioprophylaxie doit être mise en place avec un médecin avant le voyage. Les traitements les plus utilisés sont la chloroquine, la doxycycline, la méfloquine, la primaquine ou bien une

combinaison atovaquone-proguanil. Le traitement est généralement à débiter avant le voyage dans la zone à risque, à prendre durant tout le voyage et à continuer après le retour.

La chimioprophylaxie est également utilisée dans les zones de transmission du paludisme, chez les populations à risque, afin d'éviter au maximum la survenue de formes sévères de la maladie dans ces populations.

Les thérapies préventives impliquent l'utilisation d'antipaludiques chez les femmes enceintes et les nourrissons durant les périodes de risque maximal de transmission. Elles sont basées sur l'utilisation de traitements préventifs intermittents (IPT) administrés que la personne soit infectée ou non. Chez la femme enceinte en zone de transmission modérée à forte, l'OMS recommande l'injection d'au moins 3 doses de sulfadoxine-pyriméthamine à partir du second trimestre de grossesse. Chez les nourrissons dans les zones de forte transmission, l'OMS recommande 3 injections d'antipaludiques au cours de la première année.

Une autre stratégie chimio-préventive est appliquée chez les enfants dans les zones de transmission saisonnière du paludisme (notamment dans la région sub-Saharienne), dont le but est de maintenir dans le sang une concentration constante d'antipaludiques pendant la période la plus à risque (SMC pour Seasonal Malaria Chemoprevention). L'OMS recommande l'utilisation de sulfadoxine-pyriméthamine et d'amodiaquine de façon intermittente comme pour les IPT.

iii. Vaccins

Un des autres grands axes de la lutte contre le paludisme est la vaccination, qui permettrait de lutter à la fois contre la maladie et la transmission. Il semble peu probable que la maladie puisse être éradiquée sans le recours aux vaccins. A ce jour il n'existe malheureusement aucun vaccin commercialisé mais de nombreux vaccins candidats sont en essai clinique. Les recherches en cours sur le sujet s'articulent autour de trois grandes cibles : le stade sanguin, le sporozoïte et la transmission (**Figure 6**) (Draper et al., 2018; Mahmoudi & Keshavarz, 2018; Zheng et al., 2019).

Vaccins ciblant le stade érythrocytaire

Les vaccins ciblant le stade sanguin ont pour but de stopper la reproduction asexuée du parasite dans les globules rouges et/ou d'éviter les formes sévères de la maladie. La plupart sont des

vaccins de type sous-unitaires c'est-à-dire qui se basent sur la présentation d'un antigène du parasite. La recherche de candidats vaccinaux est une priorité et pour le moment quelques antigènes de surface des merozoïtes ou érythrocytes infectés sont à l'étude. Il s'agit notamment d'AMA1 (Apical Membran Antigen 1), de MSP1 (Merozoite Surface Protein 1) et de Rh5 (Reticulocyte-binding protein Homologue 5). Le polymorphisme de ces antigènes est cependant un frein au succès des essais vaccinaux (Remarque et al., 2008). *P. falciparum* possède un récepteur présenté à la surface des érythrocytes permettant leur adhésion au placenta (antigène VAR2CSA). Des portions de cet antigène sont actuellement les cibles de vaccins en développement dont certains ont fait l'objet d'essais cliniques en Allemagne, au Bénin, en France et au Burkina Faso (Pehrson et al., 2017).

Des essais de vaccination avec des globules rouges infectés chez un individu sous chimioprophylaxie ont montré des résultats encourageants mais sont encore en étude (Pombo et al., 2002; Raja et al., 2017).

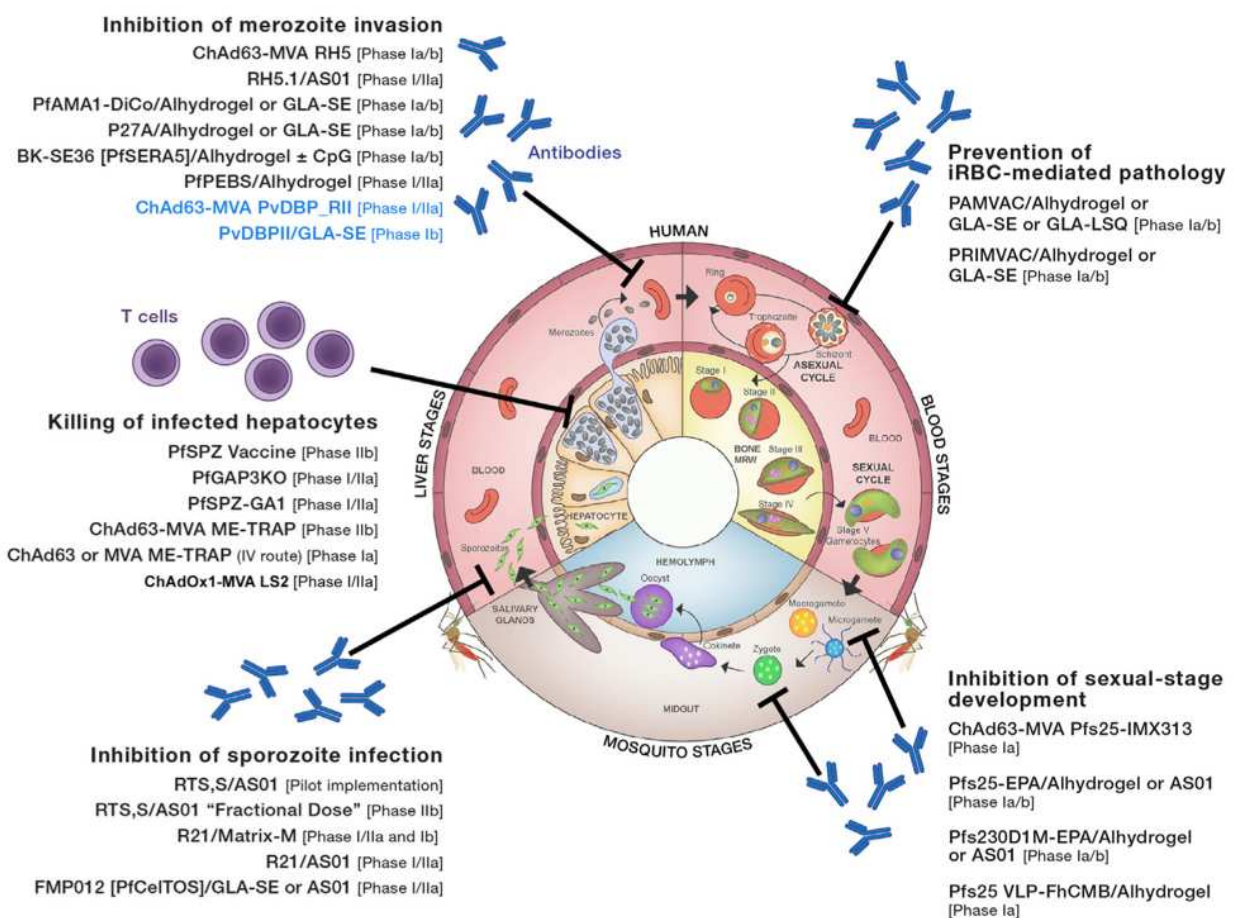


Figure 6 : Vaccins candidats contre le paludisme et les stades ciblés. Les vaccins contre *P. vivax* sont indiqués en bleu. (Draper et al., 2018)

Vaccin ciblant la transmission

Les vaccins bloquant la transmission (TBV) sont des vaccins ciblant les stades sexués du parasite afin de bloquer la transmission au moustique. Ils sont dits « altruistes » car ils n'empêchent pas l'infection ni le développement des symptômes chez l'individu vacciné. En revanche ils pourraient être très utiles en zones endémiques afin de diminuer la transmission de la maladie.

Les principaux candidats vaccinaux sont des protéines de surfaces des gamétocytes ou des zygotes de *Plasmodium* (notamment Pfs25, Pfs48/45, P47 et Pfs230). Des vaccins candidats ont été utilisés dans des essais cliniques au Mali et aux États-Unis (Talaat et al., 2016; Wu et al., 2008). Les résultats sont encourageants mais il n'y a pas d'avancée pour le moment dans le développement de ces vaccins.

Vaccin ciblant les stades pré-érythrocytaires

Les vaccins ciblant les stades exo-érythrocytaires permettraient de prévenir l'infection des hépatocytes et ainsi aboliraient totalement la phase sanguine symptomatique de la maladie. Cette étape est très intéressante d'un point de vue vaccinal puis qu'elle ne fait intervenir qu'un petit nombre de parasites : entre 10 et 100 injectés lors d'une piqûre de moustique contre des millions au stade sanguin. De plus le voyage du sporozoïte de la peau jusqu'aux hépatocytes en fait une bonne cible potentielle pour l'immunité humorale de l'hôte. Certains vaccins sont sous-unitaires mais l'utilisation d'organismes vivants atténués est également une stratégie très étudiée.

Les vaccins sous-unitaires ciblant le sporozoïte sont majoritairement basés sur la protéine de surface du sporozoïte (CSP). Le plus développé actuellement est le vaccin RTS,S/AS01 (Mosquirix) combinant une partie de la CSP à un antigène de surface du virus de l'hépatite B (Cohen et al., 2010). Une étude clinique de phase 3 s'est finie en 2015 et portait sur des enfants de moins de deux ans répartis dans 7 pays d'Afrique sub-saharienne en zone endémique. Les résultats sont modestes par rapport aux attentes puisque la protection induite est chez environ 30% des enfants et disparaît après un an (RTS,S Clinical Trials Partnership members, 2015). De plus aucune protection contre les formes graves du paludisme n'a été observée. Deux groupes consultatifs de l'OMS se sont prononcés en 2015 sur l'implémentation pilote du vaccin au Ghana, au Malawi et au Kenya en tant que phase d'étude 4 permettant d'évaluer l'efficacité du vaccin à plus grande échelle. Un autre vaccin basé sur la CSP du parasite (R21/MM) est

actuellement en phase 2 d'étude clinique au Burkina Faso (zone à paludisme saisonnier) et présente des résultats encourageants avec environ 75% d'efficacité qui se maintient sur une année (Dattoo et al., 2021). La phase 2 est encore en cours dans la même zone géographique pour observer les effets d'un rappel sur une nouvelle saison à risque de transmission et un essai de phase 3 est prévu dans 5 zones africaines (Dattoo et al., 2021).

Les vaccins basés sur les parasites entiers offrent l'avantage de présenter de multiples antigènes du parasite au système immunitaire. L'atténuation de la virulence du parasite peut se faire génétiquement, par irradiation ou par traitement médicamenteux. Le problème de cette stratégie est son application à grande échelle puisqu'il n'existe aucun moyen de production de sporozoïtes hors des moustiques ce qui implique leur élevage et la purification manuelle des sporozoïtes.

L'irradiation des sporozoïtes n'inhibe pas l'invasion des hépatocytes mais bloque le développement du parasite. C'est d'autant plus intéressant que le parasite va ainsi pouvoir exprimer les antigènes de ses formes hépatiques précoces, permettant une plus grande variété d'antigènes exposés. Les vaccins à base de sporozoïtes atténués ont évolué depuis l'immunisation via la piqûre de milliers de moustiques irradiés (Hoffman et al., 2002) à des formes purifiées, cryopréservées et injectables en intraveineux (vaccins PfSPZ) conférant une bonne protection dans des études sur l'homme (Lyke et al., 2017; Seder et al., 2013).

La modification génétique est également une voie intéressante par l'atténuation de la virulence des parasites. Le vaccin basé sur ce principe le plus avancé à ce jour est le vaccin GAP3KO basé sur des sporozoïtes délétés pour 3 gènes essentiels à l'invasion des hépatocytes (P36, P52, SLARP/SAP1). Il a fait ses preuves chez les rongeurs et 10 volontaires humains exposés à 200 piqûres de moustiques infectés par des sporozoïtes GAP3KO n'ont pas développé de formes sanguines et présentaient des anticorps anti-sporozoïtes (Kublin et al., 2017). Un autre vaccin de ce type est en cours d'évaluation chez l'homme et repose sur des parasites KO pour deux autres gènes (SLARP et B9) (Roestenberg et al., 2020; van Schaijk et al., 2014). Il doit encore faire ses preuves chez l'humain mais une phase 1/2a d'étude clinique a déjà souligné son innocuité et l'induction d'anticorps anti-sporozoïtes chez des volontaires (Roestenberg et al., 2020).

L'atténuation par traitement médicamenteux consiste à injecter des sporozoïtes infectieux chez des personnes sous couverture médicamenteuse. Des études ont été menées chez l'humain et révèlent une bonne protection induite par traitement avec de la chloroquine ou de la pyriméthamine agissant respectivement sur les formes hépatiques et sanguines (Bijker et al.,

2013; Mwakingwe-Omari et al., 2021). L'avantage de l'utilisation de la chloroquine repose sur l'élimination du parasite dès sa sortie du foie et son entrée dans le sang, lui permettant néanmoins un développement complet dans les hépatocytes et l'exposition d'un maximum d'antigènes au système immunitaire.

II. Biologie des sporozoïtes de *Plasmodium*

1. Structure cellulaire des sporozoïtes

(1) Organites communs aux apicomplexes

Le phylum des Apicomplexes est caractérisé par la présence d'un complexe apical retrouvé au pôle antérieur de certains stades du parasite, notamment chez les formes invasives. Ce complexe apical est composé d'éléments structuraux (un conoïde et un anneau polaire qui servent de centre organisateur des microtubules) ainsi que d'organites sécrétoires (les rhoptries et les micronèmes) (**Figure 7**).

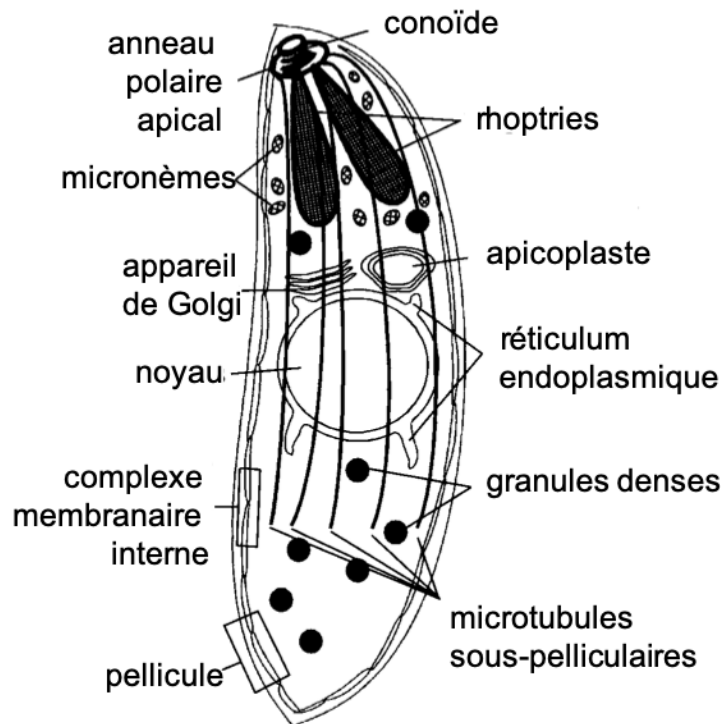


Figure 7 : Représentation schématique de la morphologie des Apicomplexes. (adapté de Morrissette & Sibley, 2002)

Le conoïde est formé de deux anneaux polaires et de fibres de tubulines spiralées formant un type de polymère particulier. Le conoïde peut s'allonger et se rétracter d'une manière calcium-dépendante afin de produire une forme de mouvement (Hu et al., 2002). Il est vestigial chez certains Hématozoaires, dont *Plasmodium*, chez qui on retrouve des constituants du conoïde au niveau du pôle apical, formant un dérivé de conoïde dont la structure est moins complexe que

chez *Toxoplasma* et varie dans les différents stades du parasite (Bertiaux et al., 2021; Koreny et al., 2021; Wall et al., 2016).

Les micronèmes sont de petites vésicules sécrétoires enrichies au niveau du pôle apical du parasite. Ils ont été décrits pour la première fois dans les années 1960 grâce à la microscopie électronique sur *Toxoplasma gondii* (Garnham et al., 1962). La forme et l'abondance des micronèmes varie beaucoup entre les différents apicomplexes et même au cours du cycle de vie d'un même organisme. Ils sont par exemple en forme de bâtonnet chez *Toxoplasma* et en forme de bouteilles chez *Plasmodium*, chez qui ils sont nombreux aux stades ookinète et sporozoïte mais présents en petit nombre chez le mérozoïte. Les micronèmes contiennent une large gamme de protéines impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques comme la motilité, l'adhésion, l'invasion des cellules hôtes et l'échappement des vacuoles (Dubois & Soldati-Favre, 2019).

Les rhoptries sont également des vésicules sécrétoires, plus grosses que les micronèmes mais moins nombreuses. Elles sont en forme de club de golf et à l'instar des micronèmes, leur nombre varie entre les différents apicomplexes et au cours du cycle de vie d'un parasite (Sam-Yellowe, 1996). Les rhoptries contiennent des protéines impliquées dans l'invasion et notamment la formation de la jonction mobile (voir partie II-5-2 de l'introduction : " Invasion productive "). Les rhoptries possèdent deux zones, le collet et le bulbe, qui semblent impliquées dans des phénomènes spécifiques (Boothroyd & Dubremetz, 2008).

Les granules denses sont distribués dans tout le cytosol et seraient impliqués dans le remodellement et la maturation de la vacuole parasitophore et la reprogrammation de la cellule hôte. Leur nombre au sein des apicomplexes varie de quelques-uns chez certains organismes à une vingtaine chez *Toxoplasma* (Mercier et al., 2005).

Un autre élément caractéristique des apicomplexes est la présence d'un apicoplaste, plastide vestigial (**Figure 7**) (McFadden et al., 1996). Les apicoplastes chez les apicomplexes proviennent d'une double endosymbiose : une première endosymbiose a eu lieu entre un eucaryote unicellulaire et une cyanobactérie capable de photosynthèse (donnant le groupe des *Archaeplastidia*). Une seconde symbiose a entraîné l'intégration d'une algue rouge (*Archaeplastidia*) chez un protiste, formant le groupe des *Chromalveolates* dont fait partie *Plasmodium*. Les fonctions de l'apicoplaste sont surtout métaboliques, avec notamment un rôle dans la synthèse des acides gras et il est indispensable à la survie des apicomplexes, bien qu'absent chez *Cryptosporidium* (Lim & McFadden, 2010).

Les apicomplexes appartiennent au supergroupe des Alvéolates caractérisés par la présence de vésicules membranaires (alvéoles) localisées sous la membrane plasmique des organismes. Chez les apicomplexes, cette structure à double-membrane est appelée complexe membranaire interne (IMC pour Inner Membrane Complex) et forme avec la membrane plasmique ce qu'on appelle la pellicule délimitant le parasite (**Figure 7**). L'IMC est constituée de vésicules aplaties dérivées du réticulum endoplasmique qui s'étendent tout au long du parasite et jouent un rôle crucial dans la motilité du parasite (Kono et al., 2013).

(2) Spécificités des sporozoïtes de *Plasmodium*

Le sporozoïte est une cellule allongée en forme de croissant, de 10-15 μ m de long pour 1-2 μ m de large (les dimensions variant légèrement selon les espèces) (**Figure 8**).

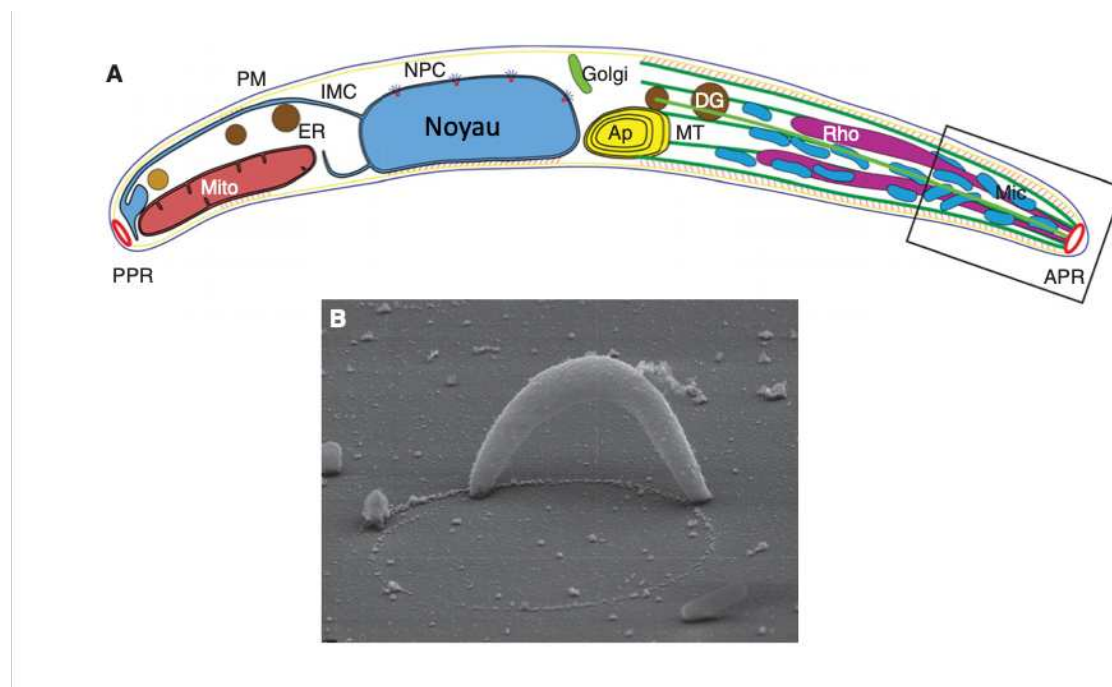


Figure 8 : Structure subcellulaire et forme du sporozoïte de *Plasmodium*. A) Représentation schématique d'un sporozoïte soulignant les différents organites et leur taille et position. PPR : Anneau polaire proximal; Mito : Mitochondrie; PM : Membrane plasmique; ER : Réticulum endoplasmique; IMC : Complexe membranaire interne; NPC : Complexe de pores nucléaires; Ap : Apicoplaste; MT : Microtubules; DG : Granules denses; Rho : Rhoptries; Mic : Micronèmes; APR : Anneau polaire apical. B) Photomicrographie en microscopie électronique à balayage d'un sporozoïte de *Plasmodium berghei* montrant la forme courbée du parasite ainsi que le matériel parasitaire relâché sur le substrat durant sa locomotion. (adapté de Frischknecht & Matuschewski, 2017)

Le maintien de l'architecture du sporozoïte est assuré par la pellicule (formée par la juxtaposition

de la membrane plasmique et de l'IMC) et par un réseau de microtubules situés sous l'IMC (**Figure 8 – traits verts**).

Le noyau du parasite, ovale, est situé à peu près au centre du parasite, légèrement plus proche du pôle postérieur (**Figure 8 – gros ovale bleu**). Il n'est pas le seul organite à contenir du matériel génétique puisqu'on en retrouve également dans l'apicoplaste (**Figure 8 - jaune**) et dans la mitochondrie (**Figure 8 - rouge**).

Le pôle apical du parasite est surtout caractérisé par la présence des vésicules sécrétoires impliquées dans l'invasion et d'un anneau polaire apical. Les rhoptries sont au nombre de 2 chez les sporozoïtes de *Plasmodium* et mesurent 2-3µm de long pour 300nm à la partie la plus large du bulbe (**Figure 8 - violet**). Le bulbe contient des protéines (ROP) qui vont servir à la mise en place de la vacuole parasitophore tandis que le collet contient plutôt les protéines impliquées dans l'invasion (RON) (Boothroyd & Dubremetz, 2008). L'excrétion des protéines de rhoptries se fait par un phénomène de relargage direct via le collet des rhoptries relié au pôle apical du sporozoïte, en contact avec la cellule hôte lors de l'invasion. Les rhoptries sont d'ailleurs décrites comme vides et plus petites après contact avec des cellules (Lebrun et al., 2005; Paredes-Santos et al., 2012). La biogenèse et les mécanismes de décharge des rhoptries sont résumés dans Ben Chaabene et al., 2021 et Lebrun et al., 2020. Les micronèmes sont en forme de bouteilles de 150nm de long pour 80nm de large lorsqu'elles sont matures (**Figure 8 – petits ovales bleus**). Ils dérivent de proto-micronèmes arrondis immatures observés dans les stades précoces du développement du sporozoïte (Schrevel et al., 2008). Les micronèmes sont très nombreux chez le sporozoïte de *Plasmodium* et sont localisés au pôle apical au moment de l'invasion. La biogenèse et les mécanismes de décharge des micronèmes sont résumés dans Dubois et al., 2019.

2. Développement des sporozoïtes chez le moustique

(1) De l'hôte vertébré à l'estomac du moustique

Les formes sexuées du parasite circulant dans le sang, appelées gamétocytes, vont être ingérées par le moustique femelle lors d'un repas sanguin. Les changements physiologiques inhérents au passage du sang d'un vertébré à l'estomac d'un moustique vont permettre au parasite d'effectuer la gamétogenèse. L'induction de la gamétogenèse nécessite une chute de la température de 5 degrés et la présence d'acide xanthurénique, un produit du métabolisme du tryptophane, provenant du moustique ou présent dans le repas sanguin (Arai et al., 2001; Billker et al., 1997, 1998). Les gamétocytes mâles vont subir 3 réplifications de leur génome et produire

puis relâcher 8 microgamètes chacun via un évènement appelé exflagellation observable au microscope. Très mobiles, les microgamètes mâles vont aller fertiliser les macrogamètes femelles par fusion des membranes, résultant en la formation d'un zygote ayant hérité de la membrane plasmique du gamète maternel, de son cytoplasme et de ses organites (**Figure 9**).

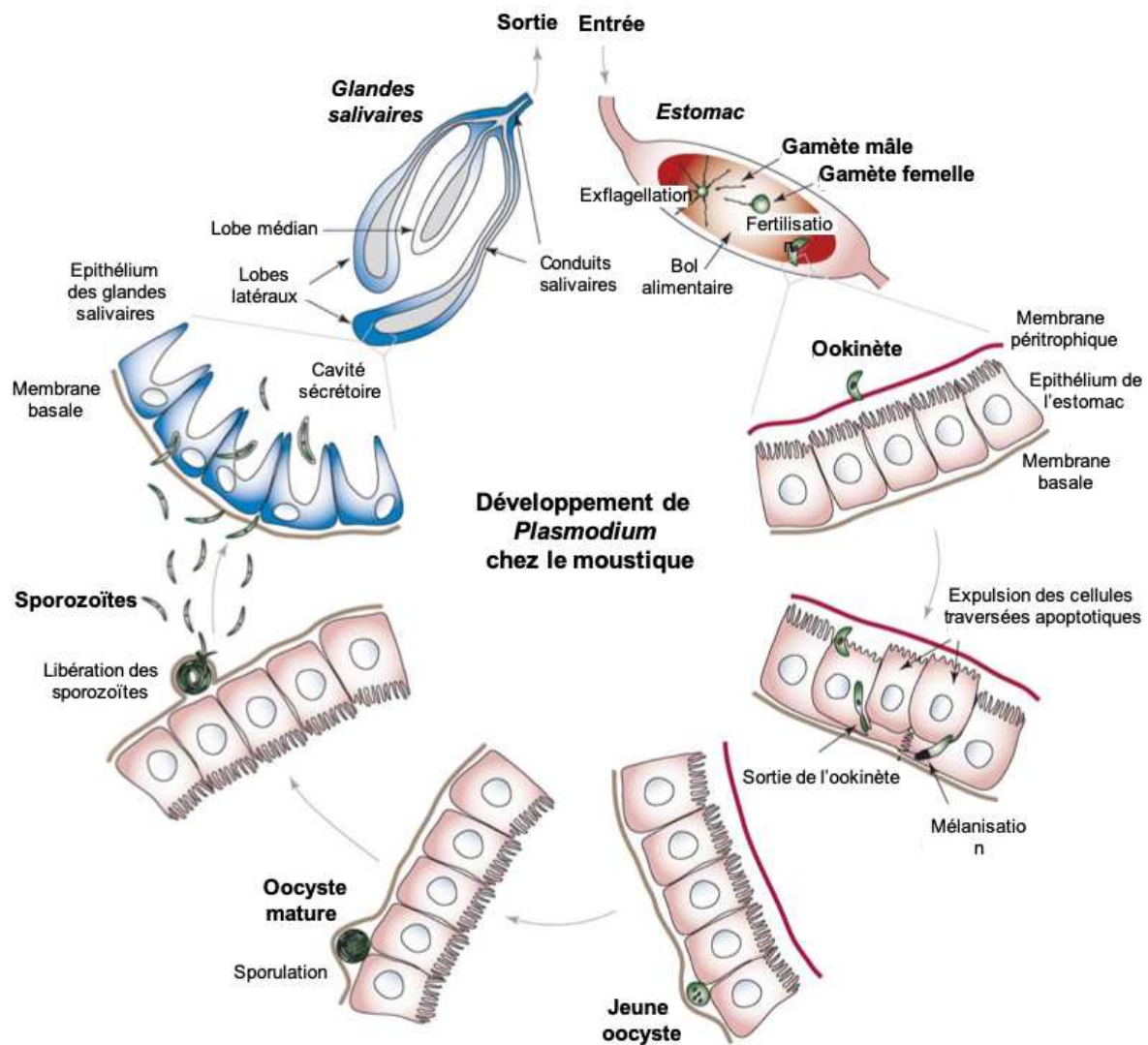


Figure 9 : Représentation schématique du développement de *Plasmodium* chez le moustique. (adapté de Vlachou et al., 2006)

Peu après sa formation, le zygote se différencie en ookinète, forme mobile du parasite qui va traverser la membrane péritrophique entourant le bol alimentaire dans l'intestin des insectes avant de pénétrer dans l'épithélium de l'intestin par le pôle apical des cellules (**Figure 9**). Selon les espèces, le mécanisme de traversée de l'épithélium semble différent. Il semblerait que chez *P. berghei*, les ookinètes traversent les cellules épithéliales de l'intestin en formant un pore,

endommageant les cellules épithéliales (Angrisano et al., 2012; Kadota et al., 2004). Chez *P. falciparum*, le parasite semble emprunter une voie majoritairement inter-cellulaire ne causant pas de dommages à l'épithélium pour atteindre sa lame basale (Barillas-Mury & Kumar, 2005; Meis, 1989). Ce mécanisme de traversée cellulaire ne semble pas accompagné de la formation de vacuole. Le parasite va ensuite atteindre le côté basal de l'épithélium et se fixer dans l'espace entre la lame basale et l'épithélium (Kariu et al., 2006).

(2) Développement dans l'oocyste

L'interaction avec certains composants de la membrane basale comme le collagène de type IV et la laminine vont permettre au parasite d'initier sa transformation en oocyste, unique stade extracellulaire du cycle de vie du parasite (Adini & Warburg, 1999; Vlachou et al., 2001; Warburg & Miller, 1992). Une étude a infirmé la précédente hypothèse avançant que la répartition des oocystes le long de l'intestin des moustiques était dépendante de la gravité, en rapport à la position « tête-en-haut » qu'adoptent les moustiques femelles après un repas sanguin (Kan et al., 2014). L'étude met en avant une répartition aléatoire des oocystes dans l'estomac des insectes en restreignant les moustiques dans une position donnée (tête en haut ou tête en bas).

C'est au sein des oocystes que la sporogonie a lieu, résultant en la libération de milliers de sporozoïtes dans l'hémocoel (**Figure 9**). L'oocyste va subir une méiose puis une série de divisions mitotiques avec un décalage temporel entre la caryokinèse et la cytokinèse (il y a division du noyau mais pas du cytoplasme, résultant en un organisme poly-nucléé). La membrane plasmique de l'oocyste va ensuite s'invaginer et former des lobes, appelés sporoblastes, dans lesquels les noyaux vont subir leurs dernières divisions mitotiques (Sinden & Strong, 1978; Vanderberg et al., 1967). Les centres organisateurs de microtubules se regroupent sous la membrane plasmique des sporoblastes au niveau des sites de bourgeonnement d'où vont émerger les sporozoïtes et organisent l'incorporation du noyau et de divers organites dans les sporozoïtes naissants (Thathy et al., 2002; Vanderberg & Rhodin, 1967). Le bourgeonnement des sporozoïtes est asynchrone et semble se dérouler par vagues successives. Un oocyste mature mesure 50 à 60 μm de diamètre et contient donc des milliers de sporozoïtes haploïdes attendant d'être relâchés dans l'hémolymphe du moustique (Meis et al., 1992). La sortie des sporozoïtes des oocystes a d'abord été décrite comme un phénomène passif, les sporozoïtes sortant par les trous formés par la déformation de la membrane des oocystes due à l'accroissement du nombre de sporozoïtes (Sinden, 1974). Des études plus

récentes ont montré la nécessité de certaines protéases du parasite pour que les sporozoïtes puissent sortir de l'oocyste, indiquant un phénomène actif du parasite sur la membrane de l'oocyste (Aly & Matuschewski, 2005). Il semblerait que le mécanisme de sortie des oocystes soit espèce-dépendant et diffère entre les parasites humains et murins (Orfano et al., 2016). La sortie des oocystes a été visualisée chez *P. berghei* et révèle un nouveau mode de sortie par bourgeonnement des oocystes en des vésicules appelées sporosomes (Klug & Frischknecht, 2017).

(3) L'invasion des glandes salivaires

Les sporozoïtes issus des oocystes sont ensuite transportés passivement par les mouvements de l'hémolymphe dans le système circulatoire ouvert du moustique et vont coloniser les glandes salivaires (**Figure 9**). Seuls 10 à 20% des sporozoïtes sortis des oocystes vont envahir les glandes salivaires, le reste étant détruit au cours du voyage par le système immunitaire du moustique, notamment par phagocytose (Hillyer et al., 2007).

i. Reconnaissance des glandes salivaires

Les glandes salivaires de moustique sont localisées dans le thorax de l'insecte et au nombre de deux. Chaque glande est formée d'un lobe central et de deux lobes latéraux plus longs formant des cavités sécrétoires et qui se rejoignent au point d'origine du canal salivaire (Wright, 1969). Les parasites envahissent les glandes salivaires préférentiellement par les portions distales des lobes latéraux (Pimenta et al., 1994; Simonetti, 1996). Les parasites présents dans l'hémolymphe reconnaissent spécifiquement les glandes salivaires bien que les mécanismes précis ne soient pas connus.

Une étude de la motilité des sporozoïtes en présence ou non d'extraits de glandes salivaires a montré que les sporozoïtes réagissent spécifiquement à des extraits de glandes salivaires et pas d'autres organes du moustique. De plus ce changement de motilité est aboli en présence d'extraits de glandes salivaires chauffés, dans lesquels les protéines sont dénaturées, soulignant un phénomène d'attraction chimiotactique des glandes salivaires sur les sporozoïtes. Ce phénomène n'est observé que chez les sporozoïtes de l'hémolymphe ou des oocystes, et pas chez les sporozoïtes de glandes salivaires (Akaki & Dvorak, 2005). Ces résultats n'ont cependant jamais été validés par d'autres études similaires. En revanche la théorie d'une reconnaissance ou d'un attachement grâce à des interactions ligand / récepteur est de plus en

plus admise et différentes études ont permis de définir des facteurs parasitaires et du moustique ayant un rôle dans l'invasion des glandes salivaires (Kojin & Adelman, 2019). Les premières expériences menées pour identifier les mécanismes d'invasion des glandes salivaires par le parasite ont consisté en la transplantation de glandes salivaires d'une espèce de moustique à une autre (Rosenberg, 1985). Ces expériences ont montré que les parasites n'envahissent que les glandes salivaires d'une espèce sensible à l'infection, même si celles-ci sont transplantées dans une espèce réfractaire à l'infection de ses glandes salivaires. Ces premières observations ont suggéré des interactions spécifiques ligand/récepteur entre le parasite et les glandes salivaires du moustique.

Du côté du parasite, des protéines ont été identifiées comme essentielles à l'invasion des glandes salivaires de moustique car leur délétion entraîne une réduction du nombre de parasite retrouvés dans les glandes salivaires pour un nombre d'oocystes normal. Il s'agit de protéines généralement localisées au pôle apical des parasites au niveau des organites sécrétoires. Certaines de ces protéines sont connues pour être impliquées dans la motilité du parasite (CSP, TRAP, S6/UOS3/TREP et LIMP) et d'autres protéines n'ont pas de rôle connu dans la motilité (MAEBL et RON2) (Ghosh & Jacobs-Lorena, 2009; Kojin & Adelman, 2019). Les mécanismes précis de reconnaissance, d'attachement et d'invasion sont encore à élucider.

Du côté du moustique, des expériences d'inhibition compétitive et des tests d'interaction ont permis de mettre en évidence l'importance de certains protéoglycanes, notamment les HSPG (Heparan Sulfate ProteoGlycans) et les CSPG (Chondroitin Sulfate ProteoGlycans) dans l'invasion des glandes salivaires par le parasite (Kojin & Adelman, 2019). En parallèle, d'autres études ont souligné l'implication de glycoprotéines (protéines possédant des fragments de carbohydrates, notamment des N-acetylglucosamines et des mannosyles) dans l'invasion (Kojin & Adelman, 2019).

Deux protéines en particulier ont été identifiées comme récepteur potentiel de ligands parasitaires. Il s'agit de Saglin, récepteur potentiel de la protéine TRAP de *Plasmodium* et de CSPBP (CSP-Binding Protein) qui serait un récepteur potentiel de la CSP. La Saglin a été identifiée lors d'un criblage de peptides inhibant l'invasion des parasites chez le moustique (Ghosh et al., 2001). La protéine a été identifiée en spectrométrie de masse comme partenaire d'un peptide bloquant la transmission (Ghosh et al., 2009). Cette étude a confirmé l'interaction des sporozoïtes avec la Saglin et a démontré une interaction entre Saglin des régions recombinantes de la protéine parasitaire TRAP (qui a la même conformation que le peptide bloquant la transmission). L'étude initiale ayant identifiée Saglin avait également précisé sa localisation au niveau régions distales des lobes latéraux des glandes salivaires (par

immunofluorescence et microscopie électronique en utilisant les anticorps ayant permis d'identifier la protéine) (Brennan et al., 2000). Cependant une étude récente a remis en question ces résultats (O'Brochta et al., 2019). En utilisant le même anticorps que dans l'étude initiale, ils montrent ici par immunofluorescence une absence d'expression de Saglin au niveau des sites d'invasion préférentiels du parasite. De plus une surexpression de la protéine au niveau de ces régions distales des lobes latéraux n'induit pas d'augmentation de l'infection des glandes salivaires par le parasite, questionnant son rôle putatif dans l'invasion. La CSPBP a été identifiée lors d'un criblage des protéines d'*Anopheles gambiae* exprimées chez des levures par une version marquée d'une protéine CSP recombinante et a donc été nommée en conséquence (J. Wang et al., 2013). L'inhibition de l'expression de son gène ou des anticorps dirigés contre la protéine entraînent une diminution du nombre de sporozoïtes dans les glandes salivaires, indiquant un rôle dans ce processus qui reste cependant à définir (Kojin & Adelman, 2019; J. Wang et al., 2013). Pour CSPBP et Saglin, aucune interaction directe avec le ligand prédit natif du parasite n'a encore été démontrée. Les mécanismes par lesquels ces molécules agissent au niveau de l'invasion ne sont pas bien connus et leur rôle pourrait être indirect (Ghosh & Jacobs-Lorena, 2009; Kojin & Adelman, 2019). L'avancement dans les méthodes de modification génétique chez le moustique, et notamment le développement du système CRISPR/Cas9, ouvre la possibilité d'études plus poussées sur les protéines du moustique, permettant d'avancer dans la compréhension des facteurs du moustique impliqués dans son invasion par *Plasmodium* (Dong et al., 2018).

ii. Invasion des glandes salivaires

Une fois l'invasion des glandes salivaires initiée par le sporozoïte, ce dernier va pénétrer dans l'épithélium par le pôle basal des cellules (donc à l'inverse de l'invasion de l'épithélium de l'intestin) (**Figure 9, Figure 10**). Une étude chez *P. gallinaceum* a révélé en microscopie électronique la formation d'une vacuole par invagination de la membrane plasmique des cellules épithéliales autour du parasite entrant, le pôle apical du parasite semblant être en contact avec cette vacuole via une jonction. La vacuole disparaît peu après l'invasion (Pimenta et al., 1994). Chez *P. falciparum* et *P. berghei*, des études en microscopie électronique n'ont pas détecté d'invagination de la membrane plasmique autour du parasite et révèlent qu'ils envahissent les glandes via la formation de pores dans la membrane basale des cellules des glandes salivaires (Ando et al., 1999; Meis et al., 1992; Posthuma et al., 1989). Une étude plus récente d'immunofluorescence chez *P. berghei* a révélé la présence autour du sporozoïte d'un

halo de matériel cytoplasmique formant comme une vacuole transitoire autour du parasite, disparaissant peu après l'invasion (Wells & Andrew, 2019). Ces différentes études soulignent à quel point le mécanisme d'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes de l'hémolymph sont encore peu connus.

Le parasite va ensuite traverser la couche épithéliale et ressortir du côté apical pour se retrouver dans les cavités sécrétoires des glandes salivaires. Aux premiers stades d'invasion des glandes salivaires, les sporozoïtes sont majoritairement localisés dans les cavités sécrétoires des glandes puis vont coloniser le canal salivaire (Ghosh & Jacobs-Lorena, 2009; Pimenta et al., 1994) (**Figure 10**). Ils sont ainsi prêts à être injectés dans l'hôte secondaire lors du prochain repas sanguin du moustique, au moment de la salivation de ce dernier.

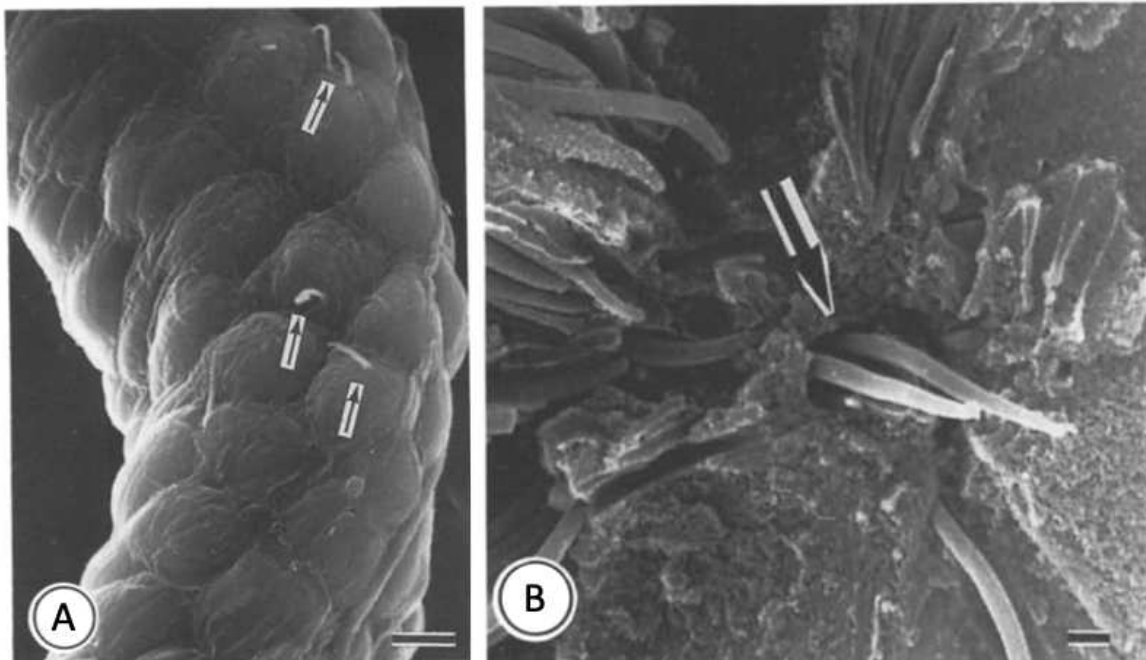


Figure 10 : Analyse microscopique de l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes. Analyse en microscopie électronique à balayage de glandes salivaires d'*Anopheles stephensi* infectés par *Plasmodium falciparum*. A) Photomicrographie de l'extérieur de glandes salivaires. Les flèches pointent des sporozoïtes accrochés ou envahissant les glandes. Barre d'échelle : 10 μ m. B) Photomicrographie d'une coupe au niveau de la partie proximale de glandes salivaires infectées. La flèche pointe vers le canal salivaire. Les cellules entourant le canal sont également remplies de sporozoïtes. Barre d'échelle : 1 μ m. (adapté de Meis et al., 1992)

3. La motilité du parasite : le gliding

(1) La motilité du sporozoïte

La motilité des apicomplexes le long d'un substrat est assurée par un mécanisme appelé glissement (gliding), qui n'implique pas de modification de la forme du parasite (Keeley &

Soldati, 2004; King, 1988; Ménard, 2001; Morrissette & Sibley, 2002). Ce mode de locomotion repose sur une machinerie impliquant des adhésines de surface liées au cytosquelette du parasite et consiste en la translocation de ces adhésines du pôle antérieur du parasite au pôle postérieur grâce au moteur actine/myosine. La liaison des adhésines au substrat ou à des récepteurs cellulaires confère ainsi un mouvement de glissement vers l'avant au parasite (King, 1988). L'historique des découvertes sur ce processus ainsi que les différents acteurs et mécanismes impliqués sont rassemblés dans Fréchal et al., 2017.

Les sporozoïtes de *Plasmodium* se déplacent à une vitesse de 1-3µm/s (Amino et al., 2006; Ejigiri et al., 2012). Une étude de la motilité de sporozoïtes sur différents substrats *in vitro* et *in vivo* semble suggérer que la vitesse de déplacement des parasites représente un compromis idéal entre l'énergie requise pour le mouvement et l'efficacité de dispersion (Hellmann et al., 2011). Le mouvement du parasite *in vitro* sur un substrat lisse consiste en un glissement circulaire durant lequel le parasite laisse derrière lui une trainée de matériel cellulaire, depuis identifié comme les parties clivées des adhésines impliquées dans la locomotion (Ménard, 2000; Vanderberg, 1974). *In vivo* dans le derme, les sporozoïtes suivent un chemin tortueux et qui semble aléatoire jusqu'à ce qu'ils atteignent un vaisseau sanguin (Amino et al., 2006).

(2) La machinerie responsable de la motilité des apicomplexes : le glidéosome

La machinerie des apicomplexes responsable de la motilité est appelée le glidéosome et est majoritairement située dans l'espace cortical localisé entre la membrane plasmique du parasite et son complexe membranaire interne (IMC) (**Figure 11**). La machinerie repose sur la présence d'un acteur actine/myosine comportant une classe de myosine spécifique des apicomplexes, les myosines de classe XIV, non conventionnelles de par leur structure (Heintzelman & Schwartzman, 1997). Les myosines sont généralement composées de 3 domaines : tête, cou et queue. Les myosines de classe XIV présentent un domaine « cou » dégénéré, domaine généralement impliqué dans l'interaction avec la chaîne légère et la régulation de l'activité de la myosine. La myosine A est composée d'une chaîne lourde MyoA associée à deux chaînes légères MLC1 (Myosin Light Chain 1) (Herm-Gotz et al., 2002) et ELC1 (essential light chain) (Nebl et al., 2011) et est responsable du mouvement du tachyzoïte de *Toxoplasma* en interagissant avec les filaments d'actine (**Figure 11**) (Heintzelman & Schwartzman, 1997; Pinder et al., 1998). L'homologue chez *Plasmodium* de MLC1 est appelé MTIP (Bergman et al., 2003).

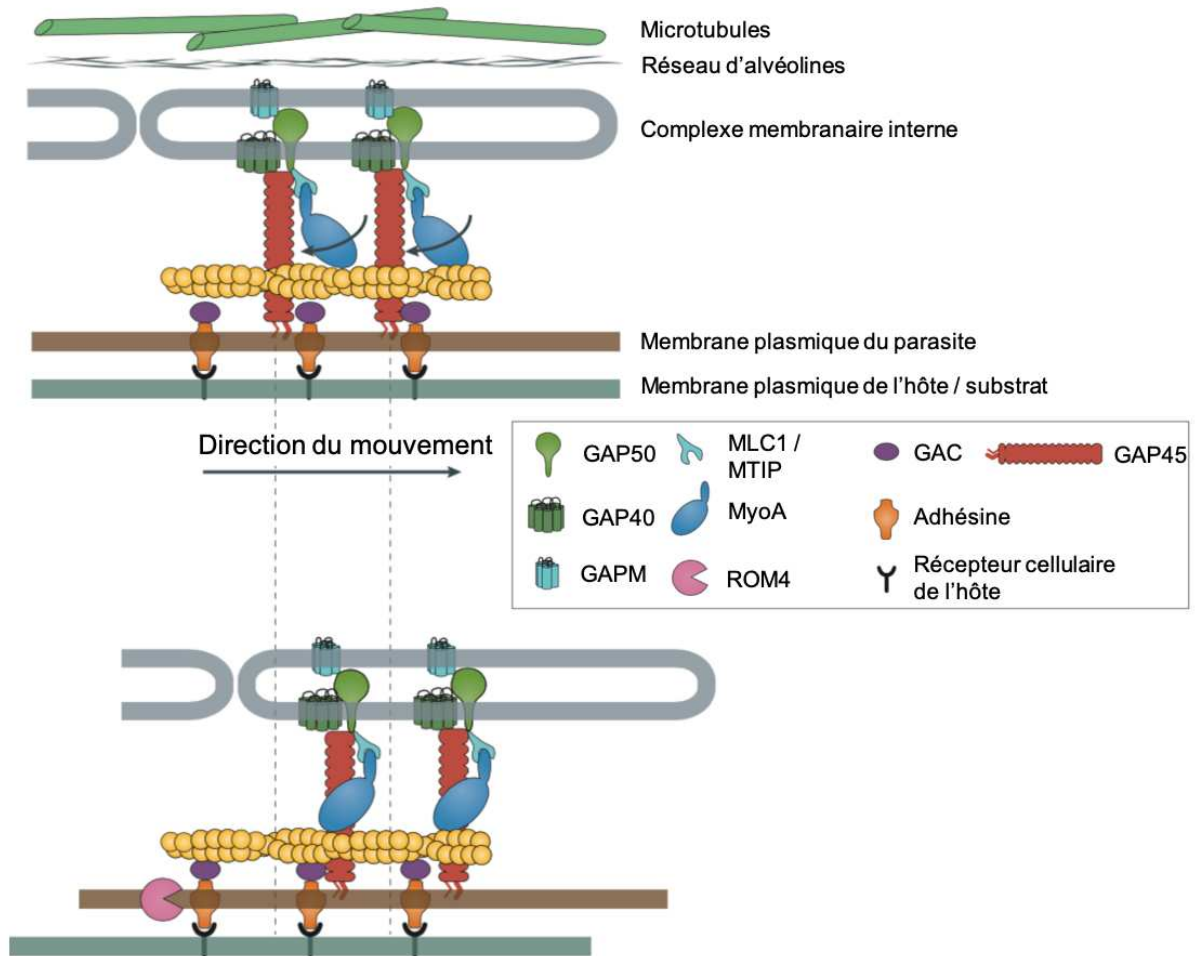


Figure 11 : Représentation schématique des différents constituants du glidésome des Apicomplexes. (adapté de Frénal et al., 2017)

Le moteur est inséré dans la membrane externe de l'IMC par les protéines transmembranaires GAP (Gliding-Associated Protein) et GAPMs (Gliding-Associated Protein with Multiple Membrane spans) (Bullen et al., 2009; Frénal et al., 2010; Gaskins et al., 2004). GAP40 interagit avec la chaîne légère de la myosine MLC1 et ancre le complexe à l'IMC via une interaction avec GAP50, glycoprotéine insérée à la membrane externe de l'IMC (Gaskins et al., 2004). Le complexe est relié au cytosquelette interne du parasite via les GAPMs qui seraient insérées dans la membrane interne de l'IMC et ont été décrites comme interagissant avec des éléments du cytosquelette et avec GAP50 (Bullen et al., 2009). MLC1 interagit également avec la partie C-terminale d'une autre protéine GAP, GAP45, ancrée à la membrane externe de l'IMC (**Figure 11**) (Frénal et al., 2010). En plus de son rôle d'ancrage à l'IMC, GAP45 est également insérée dans sa partie N-terminale à la membrane plasmique du parasite et jouerait un rôle dans le maintien de la structure de la pellicule en agissant comme « ressort » entre la

membrane plasmique et l'IMC. En effet, on observe chez des parasites délétés pour cette protéine un détachement de l'IMC de la membrane plasmique, impactant la motilité du parasite. De plus en son absence MLC1 et MyoA ne sont plus observées à la membrane, suggérant un rôle essentiel de GAP45 dans le recrutement des éléments du moteur (Fréchal et al., 2010).

Il a initialement été décrit que les adhésines insérées dans la membrane plasmique étaient reliées aux filaments d'actine et donc au moteur via des tétramères d'aldolase (Buscaglia et al., 2003; Jewett & Sibley, 2003). Cependant la déplétion de l'aldolase chez *Toxoplasma*, n'impacte pas la motilité du parasite mais conduit à l'accumulation de composés toxiques en présence de glucose, suggérant un rôle de l'aldolase dans le métabolisme du parasite (B. Shen & Sibley, 2014). Plus récemment, la protéine GAC (Glideosome-Associated Connector) a été identifiée comme interagissant avec l'actine et avec la queue d'une adhésine chez *Toxoplasma* et sa déplétion rend les parasites non motiles, suggérant que c'est bien cette protéine et non l'aldolase qui sert de lien entre le moteur actine/myosine et les adhésines de surface du parasite (Jacot et al., 2016).

(3) TRAP, protéine de surface des sporozoïtes impliquée dans la motilité

La première adhésine identifiée comme ayant un rôle dans la motilité est la protéine micronémale TRAP chez *Plasmodium berghei*. TRAP (Thrombospondin-Related Anonymous Protein) est une protéine transmembranaire de type I possédant une queue cytoplasmique et une région extracellulaire avec un domaine A ou I (vonWillebrand factor-like) et un domaine TSR (Kappe et al., 1999) (**Figure 12**). Elle est représentative de la famille de protéines TRAP caractérisées par la présence de ces domaines ainsi que d'une queue cytoplasmique acide contenant et un résidu tryptophane conservé (Morahan et al., 2009). Elle a été la première protéine identifiée avec un rôle dans la motilité des sporozoïtes (Sultan et al., 1997). Des parasites délétés pour le gène codant cette protéine se révèlent non invasifs chez le moustique et dans les hépatocytes et sont non motiles (Ménard, 2001; Münter et al., 2009; Sultan et al., 1997). Son homologue chez *Toxoplasma gondii*, TgMIC2 est sécrété en complexe hexamérique avec MIC2-Associated Protein (MIC2AP) et possède la même fonction (Huynh et al., 2003, 2015; Huynh & Carruthers, 2006; Jewett & Sibley, 2003; Starnes et al., 2006). La queue cytoplasmique de TRAP est essentielle pour sa fonction dans la motilité et la fonctionnalité de ce domaine est conservée parmi les apicomplexes (Kappe et al., 1999; Starnes et al., 2006). Depuis, d'autres adhésines ont été identifiées chez *Plasmodium* dont la délétion impacte la

motilité des sporozoïtes : TREP/S6/UOS3 (Combe et al., 2009; Steinbuechel & Matuschewski, 2008), LIMP (Santos et al., 2017), CeLTOS (Steel et al., 2018) et TLP (Hegge et al., 2010).

i. Les domaines fonctionnels des protéines de la famille TRAP

Les domaines TSR (Thrombospondine type I) ont été initialement identifiés dans la glycoprotéine thrombospondine I et leur structure a été résolue par cristallographie (Tan et al., 2002). Chaque domaine TSR est composé de trois brins antiparallèles maintenus ensemble par des ponts disulfures et une disposition en couches superposées des chaînes latérales de résidus tryptophane et arginine (Tan et al., 2002). Les domaines TSR sont divisés en deux groupes selon les liens entre leurs brins : dans le groupe 1 les brins 2 et 3 sont reliés par un pont disulfure et le brin 2 est relié à l'extrémité N-terminale par 2 liaisons hydrogène tandis que dans le groupe 2 un pont disulfure relie directement le brin 3 à l'extrémité N-terminale (Tan et al., 2002). Le domaine a été identifié dans de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire ou transmembranaires impliquées dans la régulation de l'organisation de la matrice, l'interaction cellule-cellule ou encore la migration de cellules du système nerveux (Tucker, 2004). Le domaine vonWillebrand Factor-like A (domaine A) a été initialement identifié dans la glycoprotéine plasmatique von Willebrand factor impliquée dans l'homéostasie (Morahan et al., 2009). Chaque domaine adopte une conformation caractéristique en pli Rossmann (feuillet beta parallèle entouré d'hélices alpha amphipathiques). Le domaine contient en général un site d'adhésion dépendants d'ions métalliques (motif MIDAS) nécessaire à la liaison aux ligands.

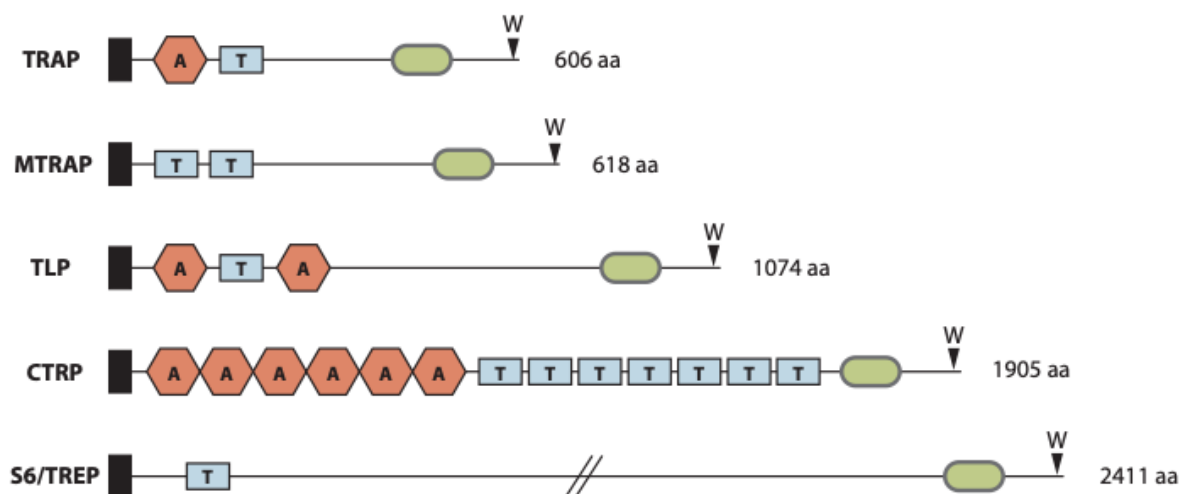


Figure 12 : Domaines fonctionnels des protéines de la famille TRAP. Rectangle noir : Peptide signal; A : Facteur de Von Willebrand type-A; T : TSR; ovale vert : domaine transmembranaire; W : résidu tryptophane conservé. (Klug & Frischknecht, 2017)

ii. Le rôle de TRAP chez les sporozoïtes

TRAP est stockée dans les micronèmes des sporozoïtes puis sécrétée en surface au pôle antérieur et transloquée vers le pôle postérieur, donnant au parasite son mouvement en avant essentiel pour sa motilité et pour l'invasion des cellules (Silvie et al., 2004). Son rôle consiste à lier le moteur actine/myosine du parasite via sa queue cytoplasmique et à lier le parasite au substrat extérieur par sa portion extracellulaire (Ménard, 2000).

Il a été rapidement démontré le lien entre les domaines A et TSR de TRAP et l'invasion des hépatocytes et des glandes salivaires par les sporozoïtes. En effet un résidu tryptophane conservé dans le brin 1 du domaine TSR est essentiel pour l'invasion des glandes salivaires et des hépatocytes mais pas dans la motilité, probablement impliqué dans la liaison de TRAP aux résidus glucidiques sulfatés à la surface des cellules (Matuschewski, 2002; Müller et al., 1993). De plus le domaine A de TRAP a été identifié comme ligand de l'héparine sur les lignées hépatocytaires, liaison ne dépendant pas du motif MIDAS (Akhouri et al., 2004; McCormick et al., 1999). Ce domaine semble également impliqué dans l'interaction avec la saglin, récepteur présent en surface des glandes salivaires du moustique (Ghosh et al., 2001, 2009). Une étude récente a montré que ce domaine peut être remplacé chez *P. falciparum* par celui d'homologues chez d'autres apicomplexes, suggérant que TRAP pourrait agir comme ligand poly-spécifique permettant au sporozoïte de migrer à travers les nombreux tissus qu'il va rencontrer (Klug et al., 2020). Deux études récentes proposent un rôle de TRAP dans la migration dans le derme après la découverte de son interaction avec l'intégrine $\alpha\beta3$ et PDGFR β (Platelet derived growth factor receptor β) (Dundas, Shears, Sun, et al., 2018; Steel et al., 2021). La structure de l'ectodomaine a été résolue et révèle que TRAP adopte une conformation fermée jusqu'à la liaison avec un ligand ce qui va générer une force étirant TRAP en conformation ouverte (Song et al., 2012).

La queue cytoplasmique de TRAP est quant à elle impliquée dans la motilité du parasite puisque sa délétion inhibe sa motilité et donc l'invasion tandis que des mutations ciblées dans la queue cytoplasmique entraînent une modification de la motilité des parasites (Kappe et al., 1999; Sultan et al., 1997). La queue cytoplasmique semble également impliquée dans le trafic de TRAP aux micronèmes puisque la délétion d'un motif de la queue cytoplasmique perturbe l'adressage de TRAP aux micronèmes et en surface et donc impacte la motilité et l'invasion (Bhanot et al., 2003). Le rôle de la queue cytoplasmique est de lier TRAP au moteur actine/myosine du parasite mais une telle interaction n'a jamais été démontrée *in vivo*. Il a initialement été décrit que la région C-terminale de TRAP interagissait avec l'aldolase servant

de lien avec l'actine (Buscaglia et al., 2003; Jewett & Sibley, 2003) mais une étude plus récente chez *Toxoplasma* montre que la délétion de l'aldolase n'affecte pas la motilité (B. Shen & Sibley, 2014), ce qui remet en cause son rôle chez les sporozoïtes de *Plasmodium*. Il est intéressant de noter que ces derniers expriment la protéine GAC (Hamada et al., 2021) qui sert de lien entre le moteur actine/myosine et les adhésines de surface chez *Toxoplasma* (Jacot et al., 2016), mais aucune interaction de GAC avec TRAP n'a été montrée à ce jour chez *Plasmodium*.

Le mouvement du parasite résulte de la translocation des adhésines du pôle apical vers le pôle postérieur du parasite (Russell & Sinden, 1981; Vanderberg, 1974) mais une étape importante reste le clivage de ces adhésines au pôle postérieur afin de rompre les interactions parasite / substrat et permettre le glissement en avant. Les deux protéines majeures de surface des sporozoïtes de *Plasmodium* (CSP et TRAP) sont retrouvées dans des trainées laissées par le parasite derrière lui (Ménard, 2000), suggérant un clivage de ces protéines. La protéase rhomboïde ROM4 a été identifiée chez *Toxoplasma* et chez *Plasmodium* comme impliquée dans le clivage de TRAP / MIC2 puisqu'en son absence la motilité du parasite est impactée et on observe une accumulation de l'adhésine en surface du parasite (Baker et al., 2006; Buguliskis et al., 2010; Ejigiri et al., 2012). Cependant des mécanismes indépendants des ROM semblent également impliqués et sont à étudier plus en détail (B. Shen et al., 2014).

iii. Autres protéines de la famille TRAP

TLP (TRAP-Like Protein) contient un domaine TSR entouré de deux domaines A ainsi qu'une extrémité C-terminale caractéristique de la famille TRAP (**Figure 12**). Son domaine transmembranaire possède un site de clivage par ROM4 (Baker et al., 2006) et sa queue cytoplasmique peut compléter fonctionnellement celle de TRAP et interagir avec l'aldolase (Heiss et al., 2008). Exprimée chez les sporozoïtes, son rôle n'est pas encore bien défini mais elle semble impliquée dans la motilité du sporozoïte en modulant l'organisation des filaments d'actine (Hegge et al., 2010; Quadt et al., 2016), sa délétion impactant l'infectiosité du parasite *in vivo* en impactant sa capacité à traverser les cellules (Lacroix & Ménard, 2008; Mishra et al., 2012; Moreira et al., 2008).

TREP (TRAP-RElated Protein), appelée aussi S6 ou UOS3 est exprimée chez les sporozoïtes (Kaiser, Matuschewski, et al., 2004) et possède les caractéristiques de l'extrémité C-terminale spécifiques des protéines de la famille TRAP ainsi qu'un domaine TSR dans sa région

extracellulaire (**Figure 12**). La délétion du gène impacte la motilité du sporozoïte ainsi que l'invasion des glandes salivaires du moustique et des souris (Combe et al., 2009; Steinbuechel & Matuschewski, 2008). Son rôle semble cependant différent de celui de TRAP car des parasites délétés pour ces gènes présentent une motilité affectée différemment, suggérant une interaction fonctionnelle avec l'actine différente pour chaque protéine (Hegge et al., 2012).

Deux autres protéines appartiennent à la famille TRAP mais sont exprimées et jouent un rôle à d'autres stades que le stade sporozoïte : CTRP (Circumsporozoite and TRAP-Related Protein) et MTRAP (Merozoite TRAP) exprimées respectivement chez l'ookinète et les mérozoïtes. CTRP est impliquée dans le passage de la barrière de l'estomac du moustique par les ookinètes (Nacer et al., 2008; Yuda et al., 1999) tandis que MTRAP joue un rôle dans la sortie des mérozoïtes des globules rouges infectés (Bargieri et al., 2016). MTRAP possède deux domaines TSR alors que CTRP possède 6 domaines A et 7 domaines TSR et les deux protéines possèdent les caractéristiques de l'extrémité C-terminale spécifiques des protéines de la famille TRAP (**Figure 12**).

4. Invasion de l'hôte : de la peau à l'hépatocyte

(1) De l'injection à la circulation sanguine : la phase cutanée

i. La transmission du moustique à l'hôte vertébré

Le moustique femelle, hématophage, utilise ses pièces buccales afin de percer la peau et accéder aux vaisseaux sanguins de l'hôte. Le moustique dispose d'une trompe complexe appelée proboscis, composées de stylets enveloppées dans une « lèvre » souple, le labium, qui se replie au moment de la piqûre et de canaux permettant la salivation et l'ingestion de sang. Les stylets sont composés des mandibules et des maxilles qui ont évolués en appendices perforateurs permettant au moustique de percer la peau. Le canal alimentaire délimité par le labre permet l'aspiration du sang et le canal salivaire, délimité par l'hypopharynx, permet l'injection de la salive vasodilatatrice (et des sporozoïtes dans le cas de moustiques infectés) (G. Robinson, 1939). L'observation directe en microscopie du proboscis d'un moustique lors d'une piqûre sur de la peau de souris a permis de révéler plus en détails les mécanismes par lesquels le moustique cherche un vaisseau sanguin et aspire le sang avec ses pièces buccales (Choumet et al., 2012). L'estimation du nombre de sporozoïtes par inoculum a longtemps été tentée mais il est difficile d'en estimer le nombre exact et ce nombre dépend largement de la souche de *Plasmodium* et d'*Anopheles* utilisées ainsi que de la méthodologie appliquée pour dénombrer les parasites

(Beier et al., 1991; Engelmann et al., 2006; Medica & Sinnis, 2005; Ponnudurai et al., 1991; Rosenberg et al., 1990).

Les études impliquant des moustiques infectés expérimentalement surestiment surement le nombre de sporozoïtes injectés par rapport à des conditions naturelles car l'infection des moustiques est optimisée en laboratoire. On estime qu'un peu moins d'une centaine de parasites sont injectés par le moustique lors d'une piqûre en conditions naturelles. Une étude a également montré que la motilité du parasite dans les glandes salivaires était importante puisque seule une fraction des sporozoïtes bien localisés dans le canal salivaire sont éjectés lors de la salivation (Frischknecht et al., 2004).

ii. *Du site d'injection au flux sanguin*

Il a longtemps été cru que les sporozoïtes passaient directement dans la lumière d'un capillaire sanguin lors du repas d'un moustique afin d'atteindre le foie. Cependant de nouvelles observations ont renforcé la théorie de l'existence d'une phase cutanée dans l'invasion de l'hôte vertébré par *Plasmodium* (Aly et al., 2009; Matsuoka et al., 2002; Ménard et al., 2013; Yamauchi et al., 2007). La salivation du moustique commence dès qu'il commence à percer la peau et continue jusqu'à ce qu'il commence à ingérer le sang, les parasites sont ainsi déposés dans la peau au niveau du derme et non inoculés directement dans la circulation sanguine. Pour atteindre le foie, le sporozoïte doit donc commencer par atteindre un vaisseau sanguin. La preuve a récemment été faite que les sporozoïtes ne sont pas transportés directement du site d'injection au foie mais restent un certain temps sur place. En effet différentes études ont rapporté qu'exciser la partie autour du site d'injection (l'oreille ou le bout de la queue d'une souris) cinq minutes après la piqûre permet de réduire voire d'inhiber le développement de la parasitémie au stade sanguin, suggérant un délai entre la piqûre et l'arrivée des sporozoïtes au niveau du foie (Matsuoka et al., 2002; Sidjanski et al., 1997). De plus, un traitement local par la chaleur du site d'injection peu après la piqûre permet également d'abolir le développement d'une parasitémie, suggérant la destruction des parasites par la chaleur (Matsuoka et al., 2002). Cette étude a également permis de montrer que des souris sur lesquelles des moustiques ont été autorisés à piquer mais ont été retirés avant d'avoir pu commencer l'ingestion de sang développent quand même une parasitémie, permettant de montrer pour la première fois que l'invasion chez la souris peut être déclenchée en injectant les sporozoïtes dans la peau, les muscles ou le péritoine et pas exclusivement en intraveineux comme c'était l'usage avant.

Le développement des techniques d'imagerie et des méthodes de modification génétique du parasite ont par la suite permis l'observation de sporozoïtes fluorescents *in vivo* dans la peau de souris anesthésiées (Amino et al., 2006, 2007). Cette étude a permis d'observer le devenir des sporozoïtes après leur injection dans la peau. Ils traversent les cellules dans le derme à une vitesse d'environ 1 à 2 $\mu\text{m/s}$ et commencent à perdre en vitesse au bout de 30mn. Lorsqu'ils rencontrent un vaisseau sanguin, les sporozoïtes se mettent à *glider* le long de ce dernier avec une vitesse réduite avant de pénétrer sa paroi puis d'être emportés par le flux de sang. D'autres sporozoïtes ont été observés pénétrant la paroi de vaisseaux lymphatiques et être entraînés par le flux de lymphe, exhibant une motilité différente (*lateral drifting*) (Amino et al., 2007). Ces sporozoïtes se retrouvent en très grande majorité dans le ganglion lymphatique le plus proche et sont pris en charge par les cellules dendritiques présentes et dégradés mais certains arrivent à envahir et commencer à se développer dans les cellules endothéliales des ganglions lymphatiques, avant que leur développement ne soit stoppé. En termes de quantité, environ la moitié des sporozoïtes injectés restent dans le derme au niveau du site d'injection, 35% vont passer dans le flux sanguin et 15% vont passer dans le système lymphatique (Amino et al., 2006). Sur les sporozoïtes restants au site d'injection, environ 10% vont commencer à se développer dans les cellules épithéliales et il a été rapporté que certains parasites arrivent à compléter le développement jusqu'à produire des mérozoïtes invasifs au stade sanguin, bien que ce phénomène n'ait été observé qu'avec des parasites de rongeurs et *ex vivo* (Gueirard et al., 2010). Cette étude a également révélé la persistance de parasites au niveau des follicules pileux 2 semaines après l'injection. Les follicules pileux représentent un site privilégié pour le parasite, avec une forte immunosuppression, et pourraient donc servir de réservoir à des parasites quiescents qui pourraient causer des rechutes plus tard, bien que cela ne reste qu'une théorie pour le moment.

Au final, il existe une véritable phase cutanée dans l'infection de l'hôte par *Plasmodium*, qui a une grande importance dans l'enclenchement de la réponse immunitaire de l'hôte contre le parasite (Aliprandini et al., 2018; Chakravarty et al., 2007; Flores-Garcia et al., 2018).

(2) La séquestration dans le foie

Le parasite va ensuite rejoindre le foie via la veine porte et l'artère hépatique jusqu'aux sinusoides hépatiques. Les sinusoides hépatiques sont formés de cellules endothéliales fenestrées délimitant le vaisseau. Le parenchyme hépatique est séparé des sinusoides par l'espace de Disse rempli de matrice extracellulaire sécrétée par les cellules stellaires. On

retrouve également au niveau de la couche endothéliale des cellules particulières : les cellules de Kupffer qui sont des macrophages résidents du foie (**Figure 13**) (Wisse et al., 1996).

i. Reconnaissance de ligands spécifiques du sinusoiide hépatique

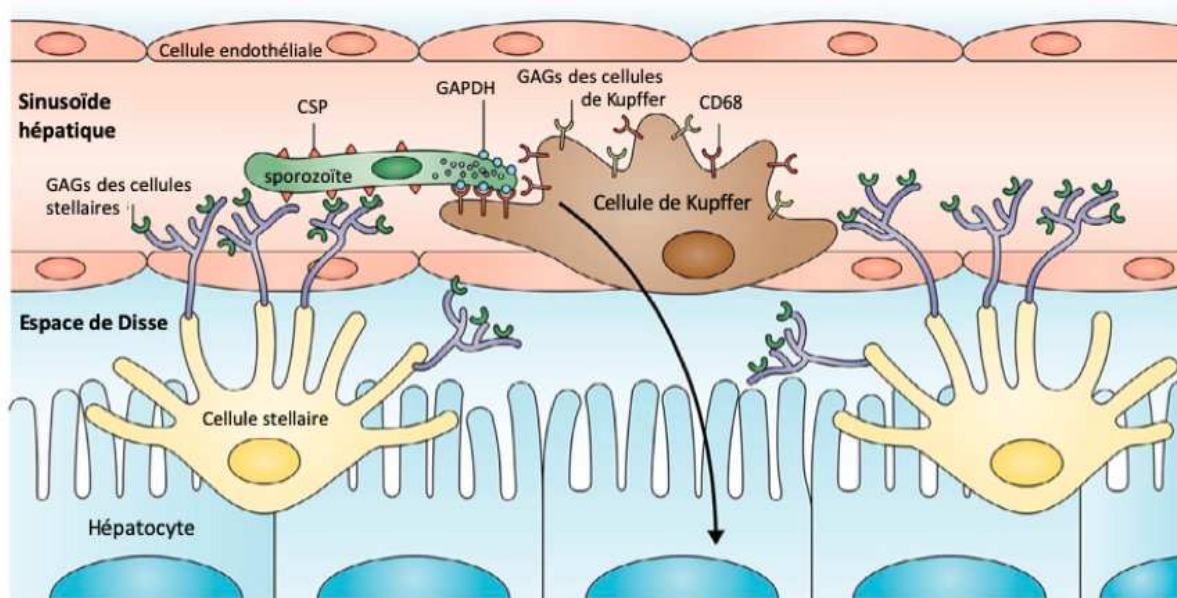


Figure 13 : Modèle des interactions ligands-récepteurs permettant la séquestration dans le sinusoiide hépatique des sporozoïtes. L'interaction de la CSP de surface des sporozoïtes avec les chaînes de glycoaminoglycane permet l'arrêt initial du sporozoïte dans le sinusoiide hépatique. L'interaction de la GAPDH du parasite avec le récepteur CD68 de surface des cellules de Kupffer initie la traversée des cellules pour atteindre les hépatocytes. GAGs : chaînes de GlycoAminoGlycane; CSP : Circumsporozoite Protein. (*adapté de Sacks, 2015*)

A l'instar de l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes de l'hémolymphe, un phénomène d'interaction ligand / récepteur est impliqué dans la reconnaissance spécifique des sinusoiides hépatiques par les sporozoïtes. Des protéines de surface du sporozoïte (CSP et TRAP) vont interagir avec les HSPG (Heparan Sulfate ProteoGlycans) présents sur la face luminale de l'endothélium des sinusoiides (Cerami et al., 1992; Frevert, 1994; Frevert et al., 1993; Matuschewski, 2002; Sinnis & Coppi, 2007). C'est le haut degré de O- et de N-sulfatation des HSPG du foie qui les différencie de ceux présents sur les cellules d'autres organes (Lyon et al., 1994), et il a été montré que la CSP interagit préférentiellement avec des cellules exprimant des HSPG hautement sulfatées (Coppi et al., 2007; Pinzon-Ortiz et al., 2001; Pradel et al., 2002). Ces molécules, interagissant avec les sporozoïtes dans la lumière du sinusoiide, sont produites par les cellules stellaires dans l'espace de Disse et leurs longues chaînes de

glycoaminoglycanes (GAG) dépassent via les fenestrations des cellules endothéliales (**Figure 13**) (Pradel et al., 2002; Pradel, Garapaty, et al., 2004).

Une fois que le sporozoïte a spécifiquement reconnu les sinusoides hépatiques, il va quitter la circulation sanguine en traversant la barrière sinusoidale afin de pénétrer le parenchyme hépatique.

ii. Importance de l'antigène de surface du sporozoïte, la CSP, dans la séquestration hépatique

La CSP (CircumSporozoite Protein) est la protéine de surface la plus abondante des sporozoïtes, relâchée derrière le parasite lors de son déplacement (Stewart & Vanderberg, 1991). Elle possède un domaine TSR et est ancrée en surface des sporozoïtes par une ancre GPI. Sa région extracellulaire contient un domaine TSR ainsi qu'un motif de répétitions en tandem spécifique à chaque espèce, flanqué d'un domaine appelé région I contenant un motif KLKQP invariable et d'un autre domaine appelé région III. La structure du domaine TSR et de la région III a été résolue et révèle qu'ils se replient en une seule unité renommée domaine α TSR qui présente une poche hydrophobe absente des domaines TSR classiques (Doud et al., 2012).

La CSP recouvre les sporozoïtes dès leur formation dans les oocystes (Posthuma et al., 1988) et se retrouve dans les micronèmes et en surface des sporozoïtes en développement dans les glandes salivaires (Posthuma et al., 1989). Chez le moustique, la CSP est essentielle pour le développement des sporozoïtes dans l'oocyste (Ménard et al., 1997; Thathy et al., 2002), des délétions du motif de répétition inhibant leur formation et leur maturation (Ferguson et al., 2014). De plus des mutations introduites dans une partie du domaine TSR (appelée région II-plus) n'impactent pas le développement des sporozoïtes mais empêchent leur sortie des oocystes (Q. Wang et al., 2005). Un rôle additionnel de la CSP dans l'invasion des glandes salivaires est souligné par l'identification d'un ligand potentiel exprimée en surface des glandes salivaires et interagissant avec une version recombinante de la CSP, la CSPBP (J. Wang et al., 2013).

Chez l'hôte mammifère, il a rapidement été montré que la CSP interagit avec les HSPG hépatiques et permettrait à la fois la reconnaissance du foie et l'interaction initiale avec les hépatocytes (**Figure 13, Figure 14**) (Frevert et al., 1993; Tewari et al., 2002). En effet la protéine recombinante CSP est en compétition avec les ligands physiologiques des HSPG, comme les résidus de lipoprotéines, pour l'assimilation dans le foie. De plus la présence de ces ligands dans le sang retarde l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes *in vitro* (Sinnis et al.,

1996). Deux régions distinctes de la CSP interagissent avec les hépatocytes : un domaine en N-terminal de la protéine (Rathore et al., 2002) et un domaine TSR impliqué dans l'adhésion cellulaire en C-terminal de la protéine (nommée région II-plus) (Cerami et al., 1992; Sinnis et al., 1994). Des études génétiques plus récentes ont permis de montrer que la CSP adopte deux conformations différentes selon le contexte : une conformation « inactive » avec le domaine N-terminal de la protéine recouvrant le domaine TSR et une conformation « active » avec le domaine TSR exposé (Figure 14). Durant le développement dans l'oocyste, le sporozoïte expose le domaine TSR puis ce dernier est masqué par le domaine N-terminal au moment de la sortie de l'oocyste. Les sporozoïtes présentent ensuite la CSP avec le domaine N-terminal exposé jusqu'à l'invasion des hépatocytes qui se fait après clivage du domaine N-terminal de la protéine, exposant à nouveau le domaine TSR (Coppi et al., 2007, 2011; Herrera et al., 2015). C'est donc le domaine N-terminal de la CSP qui interagirait avec les HSPG pour la reconnaissance initiale du tissu hépatique puis, après clivage, le domaine TSR serait impliqué au niveau de l'invasion des hépatocytes (Figure 14).

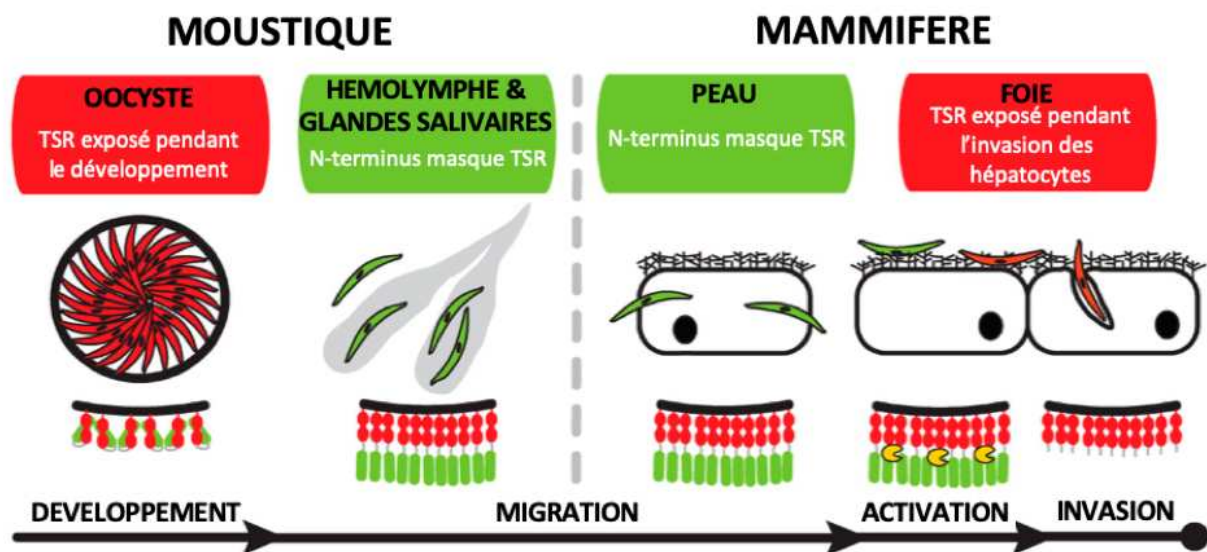


Figure 14 : Modèle des différentes conformations de la CSP chez le sporozoïte, du développement chez le moustique à l'invasion des hépatocytes de l'hôte mammifère. (adapté de Coppi et al., 2011)

Il est à noter que le vaccin antipaludique dont le développement est actuellement le plus avancé, RTS/S, est basé sur la région de répétitions centrale et le domaine α TSR de la CSP (Agnandji et al., 2015). Le vaccin pourrait notamment agir dès l'injection des sporozoïtes dans la peau puisque des anticorps anti-CSP ont été montrés bloquant les sporozoïtes au site d'injection (Flores-Garcia et al., 2018; Stewart et al., 1986).

(3) Le passage de la barrière sinusoidale

Il a initialement été proposé que les sporozoïtes quittaient le flux sanguin via les fenestrations entre les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques bien qu'aucune observation directe n'ait été faite de ce phénomène (Shin et al., 1982). Différentes observations ont ensuite appuyé l'hypothèse d'une entrée des sporozoïtes dans le parenchyme hépatique via les cellules de Kupffer (Baer, Roosevelt, et al., 2007; Frevert et al., 2006, 2008; Meis et al., 1983; Pradel & Frevert, 2001). L'utilisation de parasites fluorescents a permis l'observation de l'invasion des cellules de Kupffer par les sporozoïtes (Frevert et al., 2005). Le parasite reconnaît spécifiquement les sinusoides hépatiques grâce à l'interaction entre ses protéines de surface et les HSPG spécifiques de ces sinusoides et commence à glisser le long de la paroi du sinusoides jusqu'à rencontrer une cellule de Kupffer qu'il va envahir. L'invasion se fait par la formation d'une vacuole et le parasite arrive à prévenir l'acidification de cette vacuole par le macrophage, échappant à la destruction (Meis et al., 1983). Plus récemment, un récepteur des cellules de Kupffer, CD68, a été identifié comme nécessaire à l'invasion du foie par les sporozoïtes *in vitro* et *in vivo*, soulignant l'importance des cellules dans le passage de la barrière sinusoidale par les sporozoïtes (Cha et al., 2015; Sacks, 2015). La même équipe a identifié un ligand parasitaire de CD68, la GAPDH, présente en surface des sporozoïtes (**Figure 13**) (Cha et al., 2016). Cependant, une étude par microscopie a permis de montrer que le parasite est également capable de passer la barrière des sinusoides via les cellules endothéliales (Tavares et al., 2013). De plus, des parasites incapables de traverser les cellules gardent une capacité résiduelle à infecter les hépatocytes (Ishino, Chinzei, et al., 2004; Ishino, Yano, et al., 2004; Tavares et al., 2013), possiblement liée à un phénomène de traversée de la barrière sinusoidale paracellulaire (entre les cellules). Une fois la barrière sinusoidale franchie, le parasite se retrouve dans l'espace de Disse et peut accéder aux hépatocytes.

5. Invasion des hépatocytes

Une fois dans l'espace de Disse, les sporozoïtes ont directement accès au parenchyme hépatique où ils vont traverser plusieurs hépatocytes avant d'en infecter un de façon productive, c'est-à-dire au sein d'une vacuole parasitophore dans laquelle le parasite va se développer en mérozoïtes. Au contraire de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes ou même du développement des sporozoïtes chez le moustique, l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes n'a pas encore pu être visualisée avec une résolution suffisante pour en observer

les mécanismes précis (De Niz et al., 2017). Cependant le développement des techniques d'imagerie et de modifications génétiques a permis de commencer à décrypter les différentes étapes de l'invasion.

(1) La traversée cellulaire

i. *Importance de la traversée cellulaire chez les apicomplexes*

Le mécanisme de traversée cellulaire est un mécanisme conservé parmi les apicomplexes. La première observation de traversée cellulaire par les sporozoïtes de *Plasmodium* a été faite dans des macrophages où le parasite est capable d'entrer et de sortir des cellules, induisant parfois leur mort (Vanderberg et al., 1990). Les sporozoïtes de *Toxoplasma gondii* ont été décrits capables de traverser des cellules endothéliales (Speer et al., 1997). Des sporozoïtes d'*Eimeria* ont également été imagés entrant dans des cellules épithéliales via la formation d'un trou dans la membrane (Danforth et al., 1992) et sont observés dans le cytoplasme des cellules sans vacuole les entourant (Roberts et al., 1971). Il a également été montré chez *Babesia* que le parasite traverse les cellules épithéliales de l'estomac des tiques après le repas sanguin (Chauvin et al., 2009). De la même façon, les ookinètes de *Plasmodium* doivent traverser les cellules épithéliales de l'estomac du moustique afin d'atteindre le côté basal des cellules et se transformer en oocystes (Angrisano et al., 2012). Si la traversée cellulaire est conservée parmi les différentes espèces d'apicomplexes, elle est néanmoins observée seulement avec les stades sporozoïtes et ookinètes chez *Plasmodium*. Ce sont justement ces formes du parasite qui vont être confrontées à différentes barrières cellulaires avant d'atteindre leur site de réplication, expliquant le recours à un mécanisme de traversée cellulaire.

C'est un mécanisme nécessaire à l'infectiosité des sporozoïtes de *Plasmodium in vivo*, puisque des mutants impactés dans ce mécanisme présentent des défauts sévères de migration notamment au niveau du derme et du sinusoiide hépatique, réduisant nettement leur infection dans des conditions naturelles d'infection (Amino et al., 2008; Ishino, Chinzei, et al., 2004; Ishino, Yano, et al., 2004; Yang, O'Neill, et al., 2017). La traversée cellulaire se révèle donc particulièrement importante chez le sporozoïte pour la phase cutanée et le passage de la barrière sinusoiidale (voir partie II-4 de l'introduction : "Invasion de l'hôte : de la peau à l'hépatocyte").

ii. *Mécanisme de traversée des hépatocytes par les sporozoïtes*

Au niveau du foie, les sporozoïtes de *Plasmodium* n'envahissent pas le premier hépatocyte

qu'ils rencontrent mais commencent par en traverser un certain nombre (Mota et al., 2001). La traversée cellulaire correspond à une invasion non productive d'une cellule par le parasite puisque ce dernier va entrer dans la cellule, traverser rapidement son cytoplasme et rompre la membrane plasmique pour sortir, induisant éventuellement l'apoptose de la cellule (Frevert et al., 2005; Mota et al., 2001; Mota & Rodriguez, 2001; Yuda & Ishino, 2004). Le phénomène a initialement été observé grâce à l'utilisation de composés fluorescents qui ne peuvent entrer dans les hépatocytes que si un trou est formé dans leur membrane (Mota et al., 2001).

Les sporozoïtes de *P. berghei* et *P. yoelii* mis en contact de cellules *in vitro* ne commencent à envahir productivement les cellules qu'après un délai de 30-90min (Manzoni et al., 2017; Risco-Castillo et al., 2015). Une étude a montré que la traversée des hépatocytes se fait à travers la formation de vacuoles transitoires (TV) qui diffèrent des vacuoles parasitophores par leur composition (Risco-Castillo et al., 2015). Ces vacuoles sont la cible des lysosomes de la cellule hôte et il semblerait que leur acidification déclenche la sortie des sporozoïtes (Bindschedler et al., 2021; Risco-Castillo et al., 2015). D'après les observations, le parasite entre dans l'hépatocyte en formant une vacuole dite transitoire, sans sécrétion des protéines de rhoptries impliquées dans l'invasion productive (**Figure 15**). Après acidification de la vacuole par les lysosomes, le parasite sort de la vacuole et rompt la membrane plasmique de la cellule pour sortir. Une autre option est que le parasite romprait la membrane de la vacuole transitoire avant même qu'elle ne soit entièrement formée, ce qui rompt la membrane plasmique de l'hépatocyte dès l'entrée du parasite (**Figure 15**). Des parasites déficients pour la traversée cellulaire sont observés bloqués dans les vacuoles transitoires et deviennent la cible des lysosomes de l'hôte dont la fusion avec la membrane de la vacuole entraîne la dégradation du parasite (**Figure 15**).

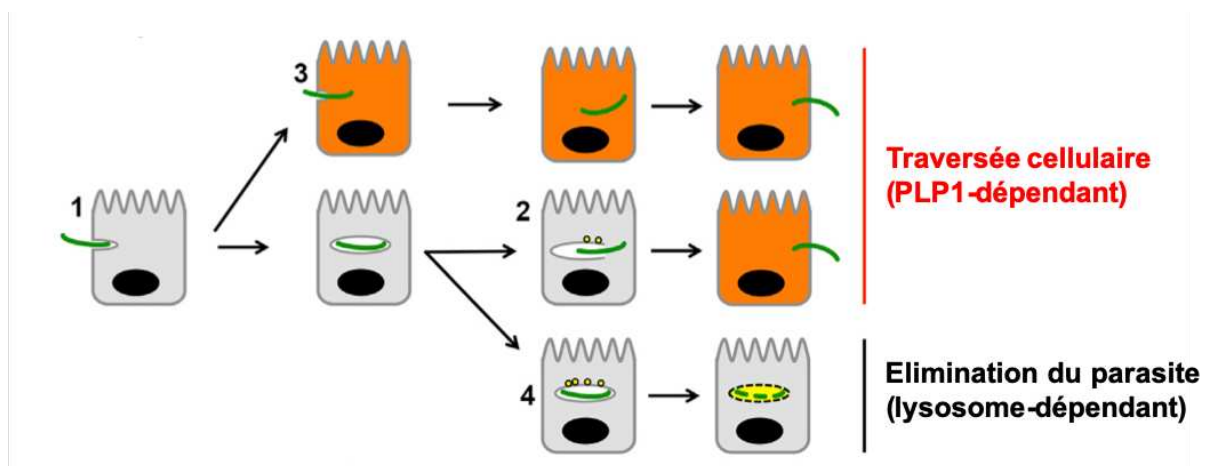


Figure 15 : Modèle de la traversée des hépatocytes par les sporozoïtes. 1. Entrée dans l'hépatocyte par formation d'une vacuole transitoire. 2. Rupture de la vacuole transitoire, médiée par PLP1. 3. Rupture précoce de la vacuole avant sa formation complète. 4. Dégradation par les lysosomes de parasites bloqués dans les vacuoles transitoires. (*adapté de Risco-Castillo 2015*)

iii. Rôle de la traversée des hépatocytes

Les parasites déficients en traversée cellulaire restent néanmoins capables d'infecter les hépatocytes *in vitro* (Ishino, Chinzei, et al., 2004; Ishino, Yano, et al., 2004; Kariu et al., 2006; Risco-Castillo et al., 2015; Yang, O'Neill, et al., 2017), mais présentent des défauts de migration dans la peau et dans le sinusöide hépatique, impactant leur infectiosité *in vivo*. La traversée cellulaire chez les sporozoïtes semble donc jouer un rôle dans le passage des barrières cellulaires afin d'atteindre les hépatocytes mais ne pas être nécessaire pour l'invasion productive des hépatocytes. Le rôle de la traversée des hépatocytes n'a pas encore été élucidé mais des hypothèses, non exclusives, ont émergé.

Une première théorie serait que la traversée des hépatocytes « active » les sporozoïtes en un mode invasif (Mota et al., 2002; Yang & Boddey, 2017). En effet une étude a montré que le contact passif des sporozoïtes avec les cellules n'était pas suffisant pour déclencher l'exocytose des vésicules apicales, nécessaire à l'invasion. De plus, des sporozoïtes ayant été en contact avec des cellules vont envahir plus rapidement que des sporozoïtes n'ayant pas été en contact avec des cellules (Mota et al., 2002).

Une seconde théorie postule que la traversée des hépatocytes relâche dans le milieu extracellulaire des facteurs rendant les hépatocytes environnants plus sensibles à l'infection. Cette hypothèse s'appuie sur l'observation que des cellules incubées en présence de milieu « activé », c'est à dire ayant déjà été en contact avec des hépatocytes et des sporozoïtes sont plus envahies qu'en présence de milieu classique. Le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) a été identifié dans cette étude comme le facteur relâché par les hépatocytes traversés et ayant un rôle dans l'invasion (Carrolo et al., 2003). Cependant cette étude, confirmée par une étude plus récente, a montré que si l'HGF active le récepteur tyrosine kinase MET des hépatocytes, ce processus joue un rôle dans le développement précoce du stade hépatique et non dans l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes (Bando et al., 2019).

Une troisième théorie (Mota & Rodriguez, 2001) repose sur l'observation des trainées de matériel parasitaire relâchées derrière le parasite lors de son déplacement. La CSP est par exemple retrouvée dans le cytosol de cellules après incubation avec des sporozoïtes (Frevet et al., 1998). Les protéines cytosoliques pouvant être présentées en surface des cellules pour reconnaissance par le système immunitaire, la traversée des hépatocytes pourrait permettre de créer des « fausses cibles » et conférer au parasite un avantage pour échapper à la réponse immune de l'hôte.

La dernière théorie implique que la traversée cellulaire n'est en fait pas utile dans les

hépatocytes et serait désactivée après contact avec les hépatocytes exprimant des HSPG hautement sulfatés (voir partie II-4-2 de l'introduction : "La séquestration dans le foie" - Coppi et al., 2007). Elle résulterait donc de l'importance de la traversée cellulaire *in vivo* pour atteindre les hépatocytes puis serait désactivée au contact des hépatocytes afin de passer à un mode invasif. Cette théorie n'explique cependant pas le délai observé *in vitro* avant l'invasion des hépatocytes, à moins qu'un délai soit nécessaire pour inactiver la machinerie de traversée après contact avec les HSPG (Risco-Castillo et al., 2015).

iv. Facteurs parasitaires impliqués

La première protéine parasitaire ayant un rôle dans la traversée cellulaire identifiée a été SPECT (Sporozoite Protein Essential for Cell Traversal) (Ishino, Yano, et al., 2004). En absence de cette protéine les parasites présentent un défaut de traversée des hépatocytes *in vitro* et sont impactés dans leur infectiosité *in vivo*, ce qui n'est pas observé chez des rats déplétés pour les cellules de Kupffer (Ishino, Yano, et al., 2004; Yang, O'Neill, et al., 2017).

Une étude a identifié 5 gènes conservés chez *Plasmodium* et codant pour des protéines secrétées possédant un domaine type MAC/PF (Membrane-Attack Complex/PerForin) (Kaiser, Matuschewski, et al., 2004). Les domaines MAC/PF sont associés à la déstabilisation des membranes via l'oligomérisation de monomères formant un pore dans les membranes (Wade & Tweten, 2015). Une de ces protéines mise en avant est PLP1 (Perforin-Like-Protein 1), protéine micronémale dont la délétion entraîne le même phénotype que la délétion de SPECT (Ishino, Chinzei, et al., 2004; Risco-Castillo et al., 2015; Tavares et al., 2013; Yang, O'Neill, et al., 2017). Elle est également nommée SPECT2 en conséquence.

La protéine CelTOS (Cell Traversal protein for Ookinetes and Sporozoïtes) est également essentielle pour la traversée des hépatocytes et de la barrière sinusoidale (Kariu et al., 2006). CelTOS interagit spécifiquement avec les phospholipides présents sur la face interne des membranes plasmiques et forme des pores dans les membranes, qui faciliteraient la traversée des sporozoïtes (Jimah et al., 2016). Une étude plus récente a confirmé ce rôle et révélé un rôle additionnel de la protéine dans la motilité des sporozoïtes (Steel et al., 2018).

La PhosphoLipase (PL) a été identifiée chez *P. berghei* comme impliquée dans la traversée des cellules épithéliales de la peau puisque des parasites délétés pour cette protéine envahissent normalement le foie lorsqu'ils sont injectés directement dans le sang mais pas lorsqu'ils sont injectés par piqûre de moustique (Bhanot et al., 2005). De plus la protéine présente une activité

lytique et elle partage 55% de similarité avec une sérine lipase capable d'hydrolyser les acides gras pour les transférer au cholestérol (Bhanot et al., 2005).

La protéine GEST (Gamete Egress and Sporozoite Traversal) est également impliquée dans la traversée des hépatocytes et l'infectiosité *in vivo* après injection dans la peau (Talman et al., 2011).

La protéine MAEBL a initialement été décrite comme essentielle pour l'invasion des glandes salivaires (Kariu et al., 2002; Saenz et al., 2008) mais un rôle supplémentaire dans la traversée des hépatocytes a été révélé plus récemment (Yang, Lopaticki, et al., 2017).

La protéine TLP (TRAP-Like Protein) partageant des similarités de structure avec TRAP semble également jouer un rôle dans la traversée cellulaire (Moreira et al., 2008) mais une autre étude semble lui attribuer un rôle plutôt dans la motilité du parasite (Heiss et al., 2008). En effet, la queue cytoplasmique de TLP interagit avec l'aldolase *in vitro* et peut remplacer celle de TRAP *in vivo*, ce qui avec la structure de la protéine suggère un rôle d'adhésine impliquée dans le glidéosome. Le rôle précis de TLP chez le sporozoïte doit encore être élucidé (Lacroix & Ménard, 2008).

(2) Invasion productive

Les apicomplexes possèdent un mode d'invasion qui leur est propre, impliquant la sécrétion séquentielle des organites apicaux (Carruthers & Sibley, 1997) conduisant à la formation d'une jonction mobile à travers laquelle le parasite va se tracter dans la cellule hôte (Bargieri et al., 2014). Il y a un attachement initial du parasite, puis sa réorientation pour présenter son pôle apical à la membrane et enfin invagination de la membrane plasmique de la cellule hôte autour du parasite. La membrane se scelle ensuite derrière le parasite, aboutissant à un parasite encapsulé dans sa vacuole parasitophore et une membrane de la cellule intacte (Cowman et al., 2017; Fréchal et al., 2017). C'est l'observation de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* et de mérozoïtes de *Plasmodium* qui a initialement permis de décrire les différentes étapes de l'invasion d'une cellule par ces parasites (Aikawa et al., 1977, 1978). Le développement des méthodes de modifications génétiques a ensuite permis de commencer à déchiffrer les acteurs moléculaires impliqués dans ce processus. C'est par analogie avec ces modèles que l'on pense actuellement que le sporozoïte utilise le même processus d'entrée dans les hépatocytes mais les preuves restent indirectes.

i. Les mécanismes d'invasion productive chez les apicomplexes

Dans cette partie seront exposés les mécanismes et facteurs parasitaires impliqués dans les différentes étapes de l'invasion productive et identifiés chez les tachyzoïtes de *Toxoplasma* et les mérozoïtes de *Plasmodium*. Les bases moléculaires de l'invasion des cellules par les mérozoïtes et les tachyzoïtes sont résumées respectivement dans Cowman et al., 2017 et Lebrun et al., 2020.

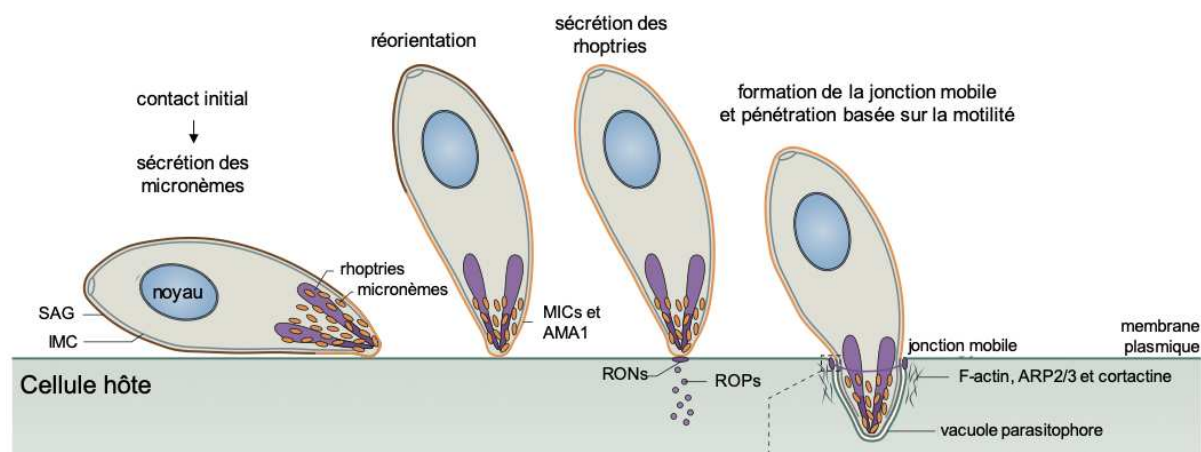


Figure 16 : Modèle de l'invasion productive d'une cellule hôte par les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. L'interaction initiale grâce aux protéines de surface du parasite (SAG) est suivie de la sécrétion des micronèmes permettant la réorientation du parasite. La sécrétion des rhoptries permet ensuite la formation de la jonction mobile, supportant l'internalisation du parasite grâce à sa motilité. (adapté de Fréchal et al., 2017)

L'attachement et la réorientation

L'attachement du parasite à la cellule cible est médié par des interactions entre des protéines de surface des parasites et des récepteurs à la surface des cellules. Chez *Toxoplasma*, les protéines de surface impliquées dans l'attachement initial sont les protéines SAG (Surface Antigen Gene) (Boothroyd et al., 1998) (**Figure 16**) tandis que les mérozoïtes de *Plasmodium* sont recouverts d'antigènes de surface appelés MSPs (Merozoite Surface Proteins) (**Figure 17**). Il existe une vingtaine de protéines SAG exprimées en surface du tachyzoïte et la délétion de certaines comme SAG3 réduit drastiquement l'attachement des parasites aux cellules, bien que son récepteur n'ait pas encore été identifié (Lekutis et al., 2001). Les MSPs ont été proposés comme impliqués dans l'attachement initial des mérozoïtes par analogie avec les protéines SAG de *Toxoplasma*. Une étude a par ailleurs montré un rôle de MSP-1 dans l'interaction avec le cytosquelette de l'érythrocyte au moment de la sortie des mérozoïtes (Das et al., 2015). Il existe

d'autres protéines MSPs dont le rôle est pour le moment inconnu et qui pourraient être impliquées dans l'attachement du parasite.

Ces protéines seraient impliquées dans des interactions faibles, réversibles avec des récepteurs présents en surface de la cellule (pour le moment inconnus), ce qui permettrait au parasite de parcourir la surface des cellules jusqu'à trouver un site d'invasion optimal.

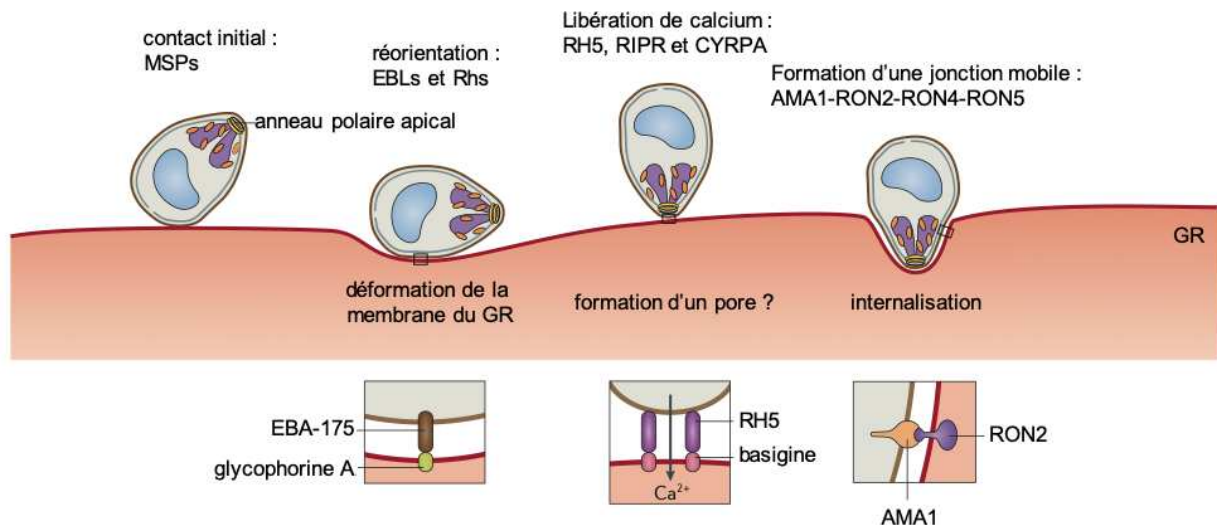


Figure 17 : Modèle de l'invasion productive d'une cellule hôte par les mérozoïtes de *Plasmodium*. L'interaction initiale grâce aux protéines de surface du parasite (MSPs) est suivie de l'interaction des facteurs parasitaires EBA et Rh avec leurs ligands, causant une déformation de la membrane de l'érythrocyte permettant la réorientation du parasite. Un flux calcique va entraîner la sécrétion des rhoptries et la formation d'une jonction mobile permettant l'internalisation du parasite. GR : globule rouge. (adapté de Fréchal et al., 2017)

Après l'interaction initiale, le parasite va se réorienter pour présenter son pôle apical au niveau de la membrane de la cellule hôte. Chez *Toxoplasma*, cette réorientation repose sur la sécrétion des protéines micronémales MICs en réponse à un signal calcique (**Figure 16**) (Carruthers et al., 1999; Carruthers & Sibley, 1999). Les protéines MICs possèdent de nombreux domaines conservés impliqués dans les interactions protéine-protéine ou protéine-glycoprotéine et fonctionnent en complexes (Carruthers & Tomley, 2008). La protéine MIC2 a été identifiée chez *Toxoplasma* comme adhésine de surface liée au glidéosome et impliquée dans le déplacement du parasite en étant transloquée du pôle apical vers le pôle postérieur du parasite avant d'être clivée par une rhomboprotéase (Buguliskis et al., 2010; Huynh & Carruthers, 2006; Starnes et al., 2006). La protéine MIC2 et son partenaire M2AP sont essentielles à l'invasion par les tachyzoïtes (Huynh et al., 2003; Huynh & Carruthers, 2006) puisque leur délétion

perturbe la motilité du parasite. Les autres protéines MICs jouent des rôles dans l'invasion, que ce soit au niveau de l'attachement aux récepteurs de la cellule hôte ou dans la sécrétion des rhoptries nécessaires à la formation de la jonction mobile (Cérède et al., 2005; Kessler et al., 2008). La variabilité de fonction des MICs leur permet à la fois de stabiliser / renforcer l'interaction MIC2-récepteur de l'hôte, mais aussi d'augmenter l'adaptabilité du parasite aux différents types cellulaires (Carruthers & Boothroyd, 2007).

Les ligands cellulaires des MICs sont pour le moment assez peu décrits mais des études ont permis d'en identifier quelques-uns : MIC4 peut se lier aux carbohydrates à résidus glycosidiques (Marchant et al., 2012) tandis que MIC2 peut se lier à l'héparine (Harper et al., 2004), à ICAM-1 impliquée dans l'adhésion entre cellules (Barragan et al., 2005) ainsi qu'à LAMTOR1 (late endosomal/lysosomal adaptor MAPK and mTOR activator 1) et RNaseH2B (ribonucléase H2 sous-unité B) impliqués dans de nombreux processus biologiques comme la transduction des signaux, la maturation des lysosomes ou la réplication de l'ADN (Y. Wang et al., 2014).

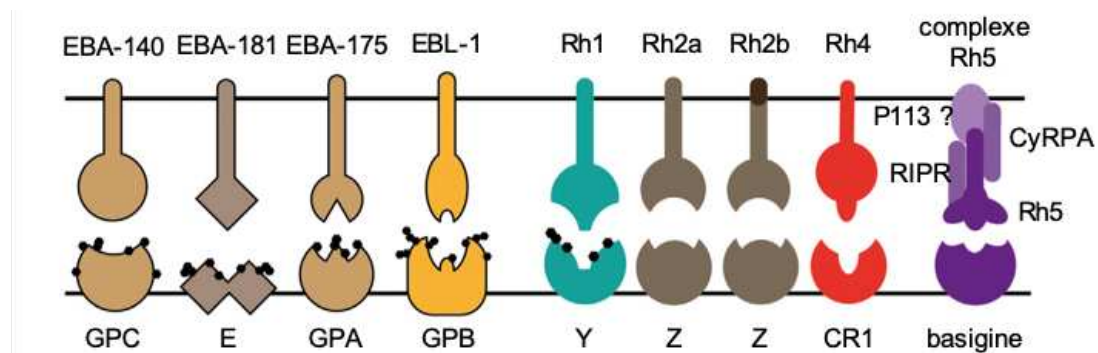


Figure 18 : Ligands parasites et récepteurs de l'hôte impliqués dans l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *Plasmodium*. GPA / GPB / GPC : Glycophorine A / B / C. Les récepteurs de l'hôte non identifiés sont indiqués par une lettre (E, Y et Z). (adapté de Cowman et al., 2017)

Chez *Plasmodium*, la réorientation du mérozoïte pour l'attachement apical repose sur deux familles de protéines parasites : les protéines EBL (pour Erythrocyte-Binding Like) et les protéines Rh (pour Reticulocyte-binding like homolog). Les protéines micronémales EBL regroupent chez *P. falciparum* EBA-175, EBL-1, EBA-140 et EBA-181 interagissant respectivement avec les glycophorines A, B et C et un récepteur inconnu présents en surface des érythrocytes (**Figure 18**) (Camus & Hadley, 1985; Maier et al., 2003; Mayer et al., 2006, 2009). Les protéines de rhoptries Rh regroupent chez *P. falciparum* Rh1, Rh2a, Rh2b (récepteurs inconnus) (Duraisingh et al., 2003; Rayner et al., 2001; Stubbs et al., 2005; Triglia et al., 2004), Rh4 (interagissant avec le récepteur du complément 1 (CR1 ou CD35) (Tham et al., 2010) et Rh5 se liant à la basigine (BSG ou CD147) (Crosnier et al., 2011) (**Figure 18**).

L'interaction de ces protéines avec leurs récepteurs (à l'exception de Rh5 qui intervient plus tard) représente le début de l'invasion (Lopaticki et al., 2011) et entraîne des vagues de déformation de l'érythrocyte permettant au parasite de se réorienter (Weiss et al., 2015). Rh5, provenant des rhoptries, agit en complexe avec deux protéines micronémales : Ripr (Rh5 interacting protein) et CyRPA (Cystein-Rich Protective Antigen) (**Figure 18**) (Galaway et al., 2017; Reddy et al., 2015; Volz et al., 2016) et la présence du complexe au pôle apical des mérozoïtes permet la formation d'un pore lors de l'interaction avec la basigine, déclenchant le signal calcique requis pour les étapes ultérieures de l'invasion (**Figure 17**) (Chen et al., 2011; Volz et al., 2016). Le complexe Rh5-CyRPA-Ripr constitue actuellement une cible prometteuse pour des vaccins ciblant le stade sanguin (Ragotte et al., 2020).

La jonction mobile

A la suite de la réorientation du parasite, le contenu des rhoptries est excrété (Dubremetz, 2007) et permet la formation au pôle apical d'une structure appelée jonction mobile initialement observée en microscopie électronique comme une zone dense aux électrons (Michel et al., 1980). Elle est composée d'un complexe protéique ancré à la fois dans la membrane du parasite mais aussi dans la membrane de la cellule hôte, qui va ensuite progresser en formant une structure caractéristique en anneau autour du parasite puis se désolidariser après son entrée dans la cellule hôte (Besteiro et al., 2011). Le point intéressant de cette jonction est qu'elle n'implique pas directement de récepteur de l'hôte mais consiste en un complexe de protéines parasitaires dont certaines sont injectées dans la cellule hôte par le parasite. Des expériences d'immunoprécipitation chez *Toxoplasma* ont permis d'identifier un complexe protéique composé de la protéine micronémale AMA1 (Apical Membrane Antigen 1) et des protéines du collet des rhoptries, les RONS, sécrétées au pôle apical du parasite et colocalisant avec la jonction mobile durant l'invasion, formant la structure en anneau (Alexander et al., 2005; Besteiro et al., 2009; Guérin, El Hajj, et al., 2017; Lebrun et al., 2005; Straub et al., 2009). AMA1 est une protéine sécrétée par le parasite dont la délétion ou le blocage par anticorps inhibe l'invasion des cellules par les tachyzoïtes (Hehl et al., 2000; Zhang et al., 2007) puisqu'elle sert à organiser le complexe macro-moléculaire contenant les RONS indispensable à l'invasion (Mital et al., 2005). Le complexe AMA1-RONS a été identifié chez les mérozoïtes de *Plasmodium* (Alexander et al., 2006; Cao et al., 2009; Collins et al., 2009; Lamarque et al., 2011; Narum et al., 2008) et est également localisé au moment de l'invasion au niveau de la jonction mobile entourant le parasite (Riglar et al., 2011). Le complexe est formé de RON4 et

RON5 présentes sur la face cytosolique de la membrane de la cellule hôte (Besteiro et al., 2009), ainsi que de RON2 également cytosolique mais dont un court ectodomaine fait le lien entre AMA1 et le complexe de RONs (**Figure 19**) (Lamarque et al., 2011; Tyler & Boothroyd, 2011). Il existe chez les *Coccidia*, dont fait partie *Toxoplasma*, deux RONs supplémentaires (RON8 et RON4_{L1}) absentes chez *Plasmodium*. En présence d'anticorps inhibant l'interaction AMA1-RON2, les mérozoïtes sont observés s'attacher à l'érythrocyte, se réorienter et pousser sur la membrane sans réussir à entrer (Richard et al., 2010; Srinivasan et al., 2011), ce qui confirme la nécessité de l'interaction AMA1/RON2 pour déclencher l'invasion mais également la temporalité de cet évènement qui intervient tardivement pour tracter le parasite dans l'érythrocyte.

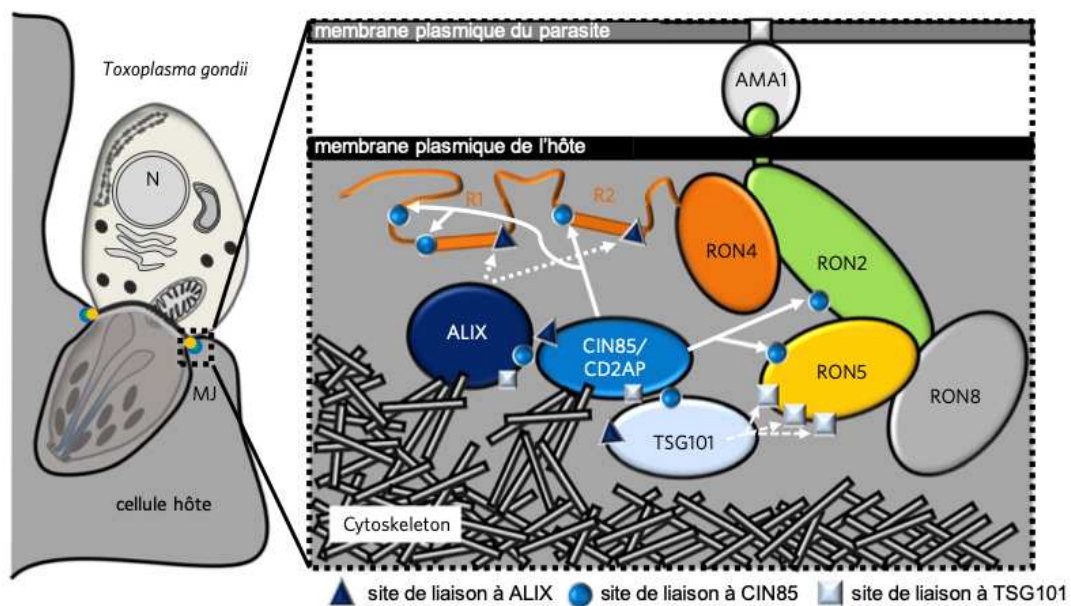


Figure 19 : Modèle de la jonction mobile et son interaction avec la cellule hôte lors de l'invasion par un tachyzoïte de *Toxoplasma*. La jonction mobile est composée d'AMA1 en surface du parasite interagissant avec le complexe de RONs inséré dans la cellule hôte. AMA1 interagit avec RON2 en surface de la cellule hôte et RON2 forme un complexe avec RON4, RON5 et RON8. Les membres du complexe de RONs recrutent ensuite des protéines liées au cytosquelette de la cellule hôte. (adapté de Guérin, Corrales, et al., 2017)

AMA1 est une protéine micronémale (Healer et al., 2002) initialement identifiée comme antigène de surface des mérozoïtes de 66kDa essentielle à l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *P. knowlesi* (Deans et al., 1982). La protéine native fait 83kDa puis est processée à 66kDa lors de sa translocation en surface (Narum & Thomas, 1994). C'est une protéine membranaire de type I possédant une courte région cytoplasmique conservée, une région transmembranaire et une large région extracellulaire dont la structure a été résolue par cristallographie en 2005 (Bai et al., 2005; Pizarro et al., 2005): elle contient 3 domaines stabilisés par des ponts disulfures dont les domaines I et II sont repliés ensemble pour former

un domaine fonctionnel séparé du domaine III (MacRaild et al., 2011). Les domaines I et II adoptent une structure similaire aux modules PAN, impliqués dans des interactions protéine-protéine et présents dans des protéines comme le plasminogène (impliqué dans la dissolution des dépôts fibrineux vasculaires), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF pour Hepatocyte Growth Factor) ou encore la prékallikréine (impliquée dans la coagulation) (Tordai et al., 1999).

L'interaction des domaines I et II forme une fente hydrophobe à la surface de la protéine qui est le site d'interaction avec RON2 ainsi qu'avec les anticorps ou peptides bloquants (Healer et al., 2005; Vulliez-Le Normand et al., 2012). L'analyse de la structure du complexe formé par AMA1 et RON2 a depuis permis de déchiffrer plus précisément les déterminants moléculaires impliqués dans cette interaction cruciale (Tonkin et al., 2011). Le domaine cytoplasmique d'AMA1 n'est pas impliqué dans son trafic à la surface mais est essentiel à sa fonction (Treck et al., 2009). Initialement proposé comme lien entre le complexe protéique et le glidéosome via son interaction avec l'aldolase (Sheiner et al., 2010), la remise en question du rôle de l'aldolase dans la motilité (B. Shen & Sibley, 2014) a relancé le questionnement sur la fonction du domaine intracellulaire d'AMA1 dans la mise en place de la jonction mobile. Pour son importance dans l'établissement de la jonction mobile, AMA1 représente une cible intéressante pour les recherches vaccinales bien que son polymorphisme chez *P. falciparum* représente un obstacle à franchir pour la bonne efficacité d'un vaccin sur le terrain (Remarque et al., 2008).

Chez *Toxoplasma*, le complexe de RONs recrute des protéines cytosoliques de la cellule hôte (Guérin, Corrales, et al., 2017). Le complexe recrute les protéines ALIX (ALG2-interacting protein X), TSG101 (Tumour Susceptibility Gene), CIN85 (CBL-interacting Protein) ainsi que CD2AP (CD2-Associated Protein), connues pour interagir avec des éléments du cytosquelette (**Figure 19**). De plus il a été montré une réorganisation en anneau de l'actine de la cellule hôte au niveau du point d'invasion, avec le recrutement de ARP2/3 et la cortactine impliquées dans la polymérisation de l'actine (**Figure 16**) (Gonzalez et al., 2009). Ainsi le recrutement des protéines de l'hôte permet de détourner sa machinerie pour faciliter l'invagination de la membrane plasmique autour du parasite tandis que le complexe AMA1-RONs fournirait au parasite la force nécessaire pour se tracter dans la cellule.

Au sein de la vacuole

Chez *Toxoplasma*, lors du relargage des protéines de rhoptries les protéines du bulbe (les ROPs)

sont sécrétées dans le cytosol de la cellule dans des vésicules appelées évacuoles qui vont ensuite fusionner avec la vacuole parasitophore et ainsi apporter les protéines nécessaires à sa maturation (Hakansson et al., 2001). Une fois le parasite dans sa vacuole, il va également relâcher les protéines contenues dans ses granules denses (protéines GRA) qui vont majoritairement se localiser à la membrane de la vacuole et être impliquées dans les échanges moléculaires entre la vacuole du parasite et la cellule hôte (Carruthers & Sibley, 1997; Clough & Frickel, 2017). Chez les mérozoïtes de *Plasmodium*, deux complexes majoritaires de protéines ROPs sont décrits : le complexe RAP et le complexe RhopH dont l'absence de certains composants entraîne des défauts de croissance du parasite (Ben Chaabene et al., 2021; Counihan et al., 2013; Spielmann et al., 2012). Les granules denses sont bien moins nombreux chez les mérozoïtes de *Plasmodium* que chez les tachyzoïtes de *Toxoplasma* et leur contenu est relâché après l'entrée du parasite dans la cellule. Les protéines contenues dans ces granules denses sont majoritairement impliquées dans le transfert de protéines à la membrane de la vacuole (Bullen et al., 2012; Morita et al., 2018).

ii. *L'invasion productive par les sporozoïtes de Plasmodium*

En opposition avec les deux modèles précédents, l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium* reste peu caractérisée et en l'absence d'imagerie directe de l'entrée, les différentes étapes du processus d'invasion restent hypothétiques, basées sur l'étude des facteurs parasitaires identifiées comme impliqués dans ce phénomène. Dans cette partie sont exposées les différentes étapes de l'invasion par le sporozoïte, établies par analogie avec les étapes observées dans les autres modèles.

L'attachement et l'interaction initiale avec l'hépatocyte

Le sporozoïte est recouvert d'antigènes de surface, la CSP interagissant avec les HSPGs des hépatocytes (Coppi et al., 2007) et TRAP essentielle pour sa motilité et interagissant également avec les HSPG du foie (**Figure 20**) (Matuschewski, 2002; Sultan et al., 1997). Par analogie avec les MSPs des mérozoïtes et des SAGs des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, on considère que la CSP sert à l'attachement initial du sporozoïte et à la reconnaissance des cellules à infecter via les HSPG hautement sulfatés (Coppi et al., 2007; Pinzon-Ortiz et al., 2001, voir partie II-4-2 de l'introduction : "La séquestration dans le foie"). TRAP est un orthologue de MIC2 et certains de leurs domaines peuvent être échangés sans effet sur la fonctionnalité des protéines

(Kappe et al., 1999; Klug et al., 2020), suggérant une fonction conservée entre les parasites. TRAP agirait donc en soutien de la CSP dans la reconnaissance des cellules hôtes via les HSPGs mais aussi dans la mise en place d'une interaction plus forte à l'instar de MIC2 chez *Toxoplasma gondii*.

Des protéines à domaine 6-cystéines spécifiques du sporozoïte ont été identifiées comme essentielles à l'invasion des hépatocytes (P36 et P52) (**Figure 20**) et un lien fonctionnel entre P36 et des récepteurs des hépatocytes (CD81 et SR-B1) a été démontré (Manzoni et al., 2017 - voir partie III-1 de l'introduction : "Facteurs de l'hôte impliqués dans l'invasion"). En parallèle, une étude a montré le rôle essentiel de CD81 de l'hôte pour la décharge des rhoptries associée à l'invasion productive des sporozoïtes de *P. yoelii* (Risco-Castillo et al., 2014). En effet dans des cellules non permissives à *P. yoelii*, les sporozoïtes traversant les cellules sans former de vacuole parasitophore présentent RON2 et RON4 à leur pôle apical tandis que dans des cellules exprimant CD81, les sporozoïtes intracellulaires perdent ce signal, reflétant de manière indirecte la sécrétion des rhoptries.

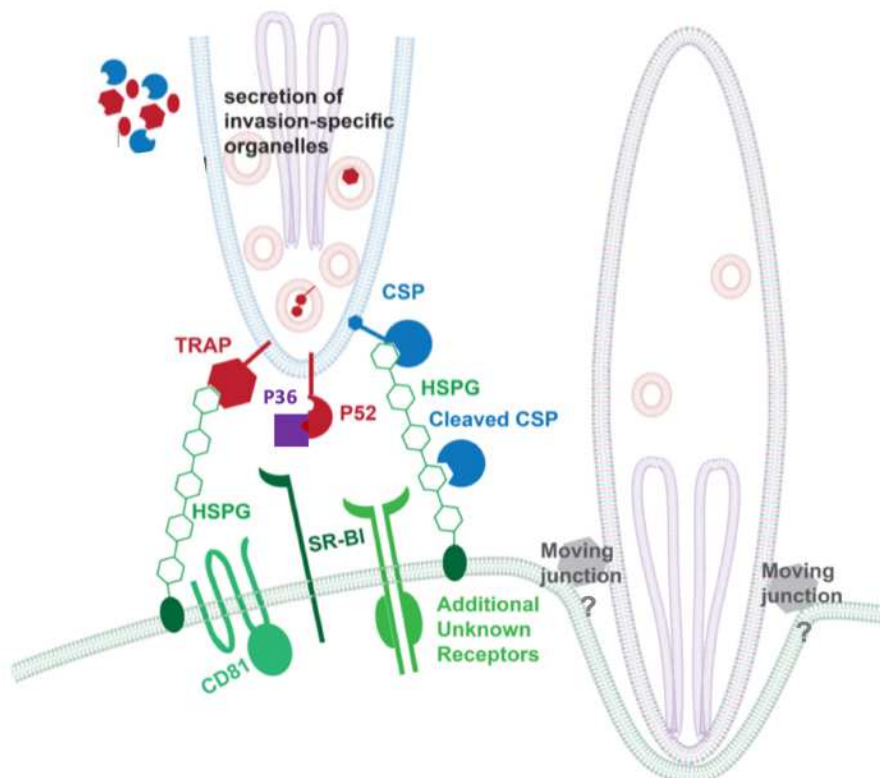


Figure 20 : Modèle de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*. Les différents facteurs parasitaires et de l'hôte impliqués dans l'invasion productive des hépatocytes par les sporozoïtes sont représentés. (adapté de Kaushansky & Kappe, 2015)

Une jonction mobile putative chez le sporozoïte

La jonction mobile n'ayant jamais pu être visualisée entre le sporozoïte et l'hépatocyte, elle reste putative mais des arguments suggèrent cependant son existence. C'est un mode d'invasion conservé parmi les apicomplexes dont les acteurs moléculaires (AMA1 et les RONs) sont retrouvés chez presque tous les représentants du phylum, suggérant une fonction conservée dans la jonction mobile. *Cryptosporidium* qui a par exemple un mode d'invasion unique au sein des apicomplexes puisqu'il reste extracytosolique après invasion bien qu'enveloppé dans une membrane, ne possède pas d'orthologues de ces protéines. Cette observation souligne l'importance de la jonction mobile dans le processus d'invasion cellulaire chez les apicomplexes. Or, ces protéines sont également retrouvées dans le protéome des sporozoïtes (Florens et al., 2002; Hamada et al., 2021), et l'inhibition de l'interaction AMA1-RON2 inhibe l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes (Silvie et al., 2004; Yang, Lopaticki, et al., 2017), suggérant la formation d'une jonction chez le sporozoïte, essentielle pour l'invasion.

Le gène codant pour AMA1 ne peut être délété au stade sanguin (Triglia et al., 2000) ce qui complique son étude chez le sporozoïte, forçant à l'utilisation de stratégies de délétion conditionnelle (Bargieri et al., 2013; Giovannini et al., 2011; Tibúrcio et al., 2019). Deux études concluent à un rôle indépendant d'AMA1 et des RONs dans l'invasion avec RON2 et RON4 impliquées dans la jonction mobile et AMA1 impliquée plutôt dans l'attachement du parasite aux cellules puisque sa délétion n'inhibe pas l'invasion des sporozoïtes et si elle inhibe l'invasion des mérozoïtes, ceux capables d'envahir le foie à travers une jonction mobile fonctionnelle (Bargieri et al., 2013; Giovannini et al., 2011). Les auteurs concluent qu'AMA1 serait impliquée dans l'interaction de la surface du parasite avec les cellules. Ils n'excluent cependant pas un double rôle d'AMA1 dont l'interaction avec RON2 permettrait de désengager AMA1 d'une liaison à un récepteur de la cellule hôte, ce qui initierait l'invasion.

Deux études récentes se sont intéressées au rôle des protéines RONs chez le sporozoïte et elles révèlent un nouveau rôle inattendu de ces protéines dans l'invasion des glandes salivaires du moustique par le parasite (Ishino et al., 2019; Nozaki et al., 2020). Elles révèlent un rôle de ces protéines au niveau de l'invasion des hépatocytes et de leur traversée par les sporozoïtes, qui s'expliquerait par un rôle dans l'attachement du parasite puisque la délétion des RONs impacte la motilité des sporozoïtes qui adhèrent moins au substrat.

Le rôle précis des protéines AMA1 et RONs chez les sporozoïtes reste donc peu clair, et ces

protéines semblent impliquées dans d'autres processus que la formation de la jonction mobile. Elles semblent néanmoins essentielles à la fois au stade sanguin, au stade hépatique et chez le moustique, soulignant l'importance d'étudier le rôle de ces protéines.

(3) Dans l'hépatocyte

La vacuole parasitophore (PV) dans laquelle le parasite va se développer est formée de la membrane plasmique de l'hépatocyte qui s'invagine autour du parasite ainsi que de protéines parasitaires exportées. Il a été observé chez *Toxoplasma gondii* une exclusion de certaines protéines de l'hôte selon leur ancrage à la membrane (Charron & Sibley, 2004; Mordue et al., 1999). La membrane de la vacuole parasitophore (PVM) est poreuse et permet le transfert passif de petites molécules, régulé par le cholestérol présent provenant de la membrane de l'hôte (Bano et al., 2007).

i. Marqueurs des stades hépatiques

Quelques protéines parasitaires ont été identifiées à la PVM bien que leur rôle précis n'ait pas été décrit (Vaughan & Kappe, 2017). Les protéines UIS3 et UIS4 sont notamment insérées dans la PVM et peuvent servir de marqueur de la vacuole parasitophore permettant de repérer les parasites intracellulaires en développement (Manzoni et al., 2017). UIS4 est transcrit chez le sporozoïte mais sa traduction est réprimée jusqu'au stade hépatique (Silvie et al., 2014), suggérant la nécessité pour le sporozoïte de posséder les facteurs nécessaires à une transition rapide en forme hépatique répliquative. En effet, la délétion d'UIS3 ou d'UIS4 entraîne un arrêt précoce du développement des parasites dans les hépatocytes (Mueller, Camargo, et al., 2005; Mueller, Labaied, et al., 2005). UIS3 interagit avec la L-FABP (Liver-Fatty Acid Binding Protein), suggérant un rôle dans le transfert des lipides dans la vacuole parasitophore pour la croissance du parasite (Mikolajczak et al., 2007). Plus récemment il a été montré qu'UIS3 agit comme inhibiteur de l'autophagie du parasite en se liant à un marqueur de l'autophagie (LC3 pour microtubule-associated protein 1 light chain 3) et en entrant ainsi en compétition avec son ligand physiologique (Real et al., 2018).

ii. Libération des mérozoïtes

Après le développement du parasite et sa différenciation en mérozoïtes, la vacuole parasitophore

est dégradée tandis que l'hépatocyte hôte se décroche sans entrer en apoptose. Les mérozoïtes contenus dans la cellule sont ensuite relâchés dans la circulation sanguine regroupés dans des vésicules appelées mérosomes, qui bourgeonnent de la cellule hôte dans le sinusoïde hépatique (**Figure 21**) (Prudêncio et al., 2006; Sturm et al., 2006; Tarun et al., 2006). Ces vésicules ont été observées chez *P. berghei* et *P. yoelii* et elles se diffusent dans la circulation sanguine pour aller s'accumuler au niveau des poumons. Il semblerait ensuite qu'elles se dégradent en libérant les mérozoïtes dans la circulation sanguine (Baer, Klotz, et al., 2007; Vaughan et al., 2008). Cette stratégie consistant à sortir du parenchyme hépatique dans des vésicules entourées de membrane de la cellule hôte permettrait au parasite de contourner le système immunitaire de l'hôte en échappant aux cellules de Kupffer dans le sinusoïde (Baer, Klotz, et al., 2007).

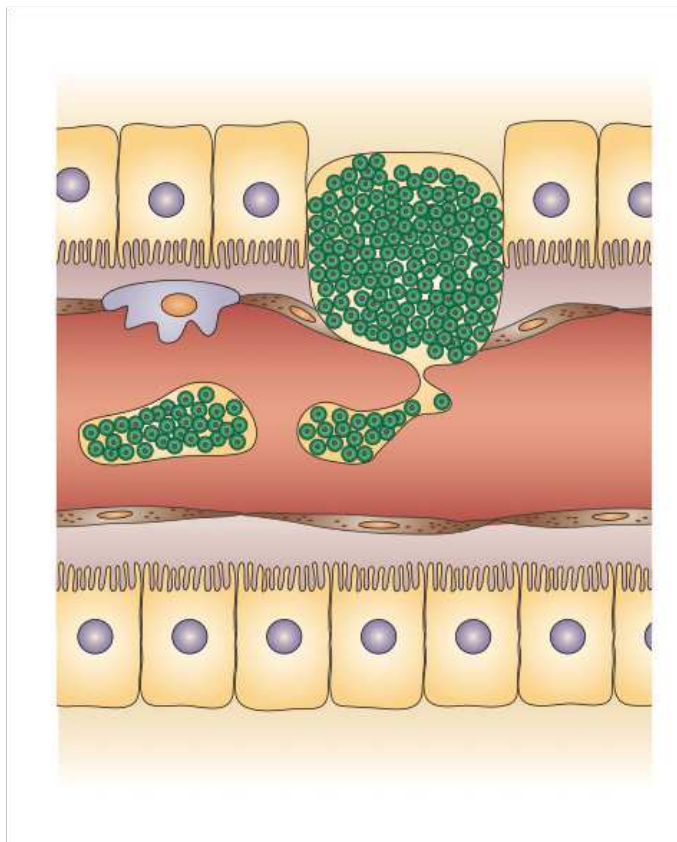


Figure 21 : Représentation schématique de la sortie des hépatocytes par *Plasmodium*. La libération des mérozoïtes dans la circulation sanguine se fait par formation de vésicules remplies de mérozoïtes, les mérosomes, qui bourgeonnent dans le sinusoïde hépatique. (Prudêncio et al., 2006)

III. Acteurs moléculaires de l'invasion productive des cellules par les sporozoïtes de *Plasmodium*

1. Facteurs de l'hôte impliqués dans l'invasion

Du côté des hépatocytes, des récepteurs membranaires impliqués dans l'invasion ont été identifiés fonctionnellement mais à ce jour aucune interaction directe entre ces récepteurs et des protéines du sporozoïte n'a été prouvée.

Les deux récepteurs hépatocytaires les plus étudiés en tant que facteurs d'entrée des sporozoïtes sont la tétraspanine CD81 (Silvie et al., 2003) et le récepteur SRB1 (Rodrigues et al., 2008; Yalaoui, Huby, et al., 2008), qui sont deux récepteurs décrits comme impliqués dans l'invasion des hépatocytes par le virus de l'hépatite C (HCV) (Catanese et al., 2010; Fénéant et al., 2014; Flint et al., 1999; Scarselli et al., 2002).

(1) CD81

i. Généralités sur les tétraspanines

CD81 appartient à la super-famille des tétraspanines qui sont retrouvées au sein d'une très grande diversité d'organismes uni- ou multi-cellulaires (Charrin et al., 2014; Monk & Partridge, 2012). Tous les types cellulaires expriment au moins une tétraspanine, pour la plupart localisées en surface cellulaire mais certaines peuvent être présentes dans des compartiments intracellulaires ou dans des structures excrétées (exosomes). Certaines tétraspanines ont une distribution tissulaire restreinte tandis que d'autres ont un spectre d'expression très large. Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires contenant 4 domaines transmembranaires, des extrémités cytosoliques et deux boucles extracellulaires : une petite (EC1 ou SEL pour Small Extracellular Loop) et une grande (EC2 ou LEL pour Large Extracellular Loop) (**Figure 22**). La grande boucle est composée d'une région conservée avec trois hélices alpha (**Figure 22 – A, B et E**) ainsi que d'une région variable contenant dans le cas de CD81 deux hélices alpha (**Figure 22 – C et D**), des résidus cystéines (de 2 à 6) formant des ponts disulfures ainsi qu'un motif signature des tétraspanines : cystéine-cystéine-glycine (CCG). Les domaines transmembranaires sont composés d'hélices alpha possédant des résidus polaires conservés (asparagine, acide glutamique, glutamine). La petite boucle intracellulaire ainsi que les extrémités amino- et carboxy-terminales peuvent contenir des résidus cystéines juxta-

membranaires pouvant être palmitoylés. Il peut y avoir des sites de glycosylation mais leur nombre et leur position sont très variables d'une tétraspanine à l'autre.

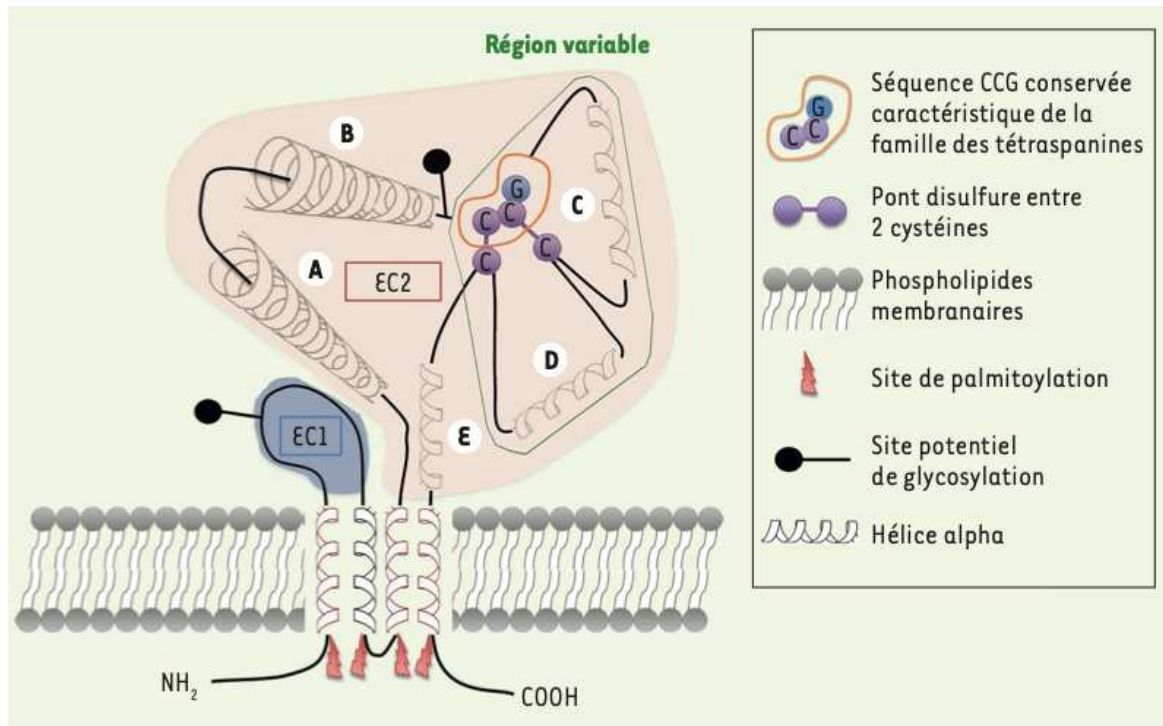


Figure 22 : Représentation schématique de la structure moléculaire commune aux protéines de la famille des tétraspanines. (Masse et al., 2016)

Les tétraspanines jouent un rôle d'organiseurs membranaires par l'intermédiaire de la formation de complexes multimoléculaires constituant ce qui est appelé un réseau de tétraspanines (tetraspanin web) à la surface des cellules (Boucheix & Rubinstein, 2001; Rubinstein et al., 1996). Ce réseau est constitué de micro-domaines riches en cholestérol et en sphingolipides, nommés TEM (pour Tetraspanin Enriched Microdomain). La variété des tétraspanines et de leur expression leur confère des rôles dans de nombreux processus biologiques tels que le trafic protéique, la transduction de signaux, la différenciation, l'adhésion ou la fusion cellulaire (Monk & Partridge, 2012). Il est intéressant de noter que les TEM sont décrits comme jouant un rôle dans l'infection de cellules par certains virus (HCV, Papillomavirus humain, Influenza, HIV-1 et FIV), bactéries (*Chlamydia*, *Listeria*, *E. Coli*) et même champignons pathogènes (*C. neoformans*, *A. fumigatus*, *C. albicans*) (résumé dans Monk & Partridge, 2012). Une tétraspanine en particulier a été identifiée comme essentielle à l'invasion des hépatocytes par certaines espèces de *Plasmodium* : il s'agit de la tétraspanine CD81.

ii. CD81

CD81 a été identifiée en 1990 lors d'un criblage de cibles d'anticorps inhibant la prolifération cellulaire (Oren et al., 1990) et initialement nommée TAPA-1 (pour Target of an AntiProliferative Antibody). C'est une protéine de 236 acides aminés pour 26kDa possédant une structure caractéristique des tétraspanines telle que décrite précédemment. Elle possède 4 résidus cystéines dans sa grande boucle extracellulaire dont 2 sont impliqués dans le motif CCG. La protéine n'est pas glycosylée mais possède 6 résidus cystéines palmitoylés distribués sur la boucle intracellulaire ainsi que sur les extrémités amino- et carboxy-terminales (Fénéant et al., 2014). CD81 est exprimée de façon ubiquitaire excepté dans les globules rouges et les plaquettes. Dans le foie, elle est exprimée au niveau de l'endothélium sinusoidal et dans les hépatocytes, majoritairement à la membrane basolatérale.

CD81 est impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération des lymphocytes (Miyazaki, 1997), la fusion des gamètes mâles et femelles (Rubinstein et al., 2006) ou encore la régénération musculaire (Charrin et al., 2013). Ces résultats ayant été obtenus par l'étude de souris déficientes pour CD81, l'absence de la protéine révèle qu'elle n'est pas essentielle pour le développement de l'animal mais joue tout de même un rôle important dans différents processus.

En ce qui concerne son implication dans l'invasion des hépatocytes par *Plasmodium*, CD81 représente un facteur d'entrée essentiel pour les sporozoïtes de *P. yoelii* et *P. falciparum* ce qui a été montré *in vivo* (Foquet et al., 2015; Silvie et al., 2003) et *in vitro* (Dumoulin et al., 2015; Manzoni et al., 2017; Silvie, Greco, et al., 2006). Alors que les souris CD81^{-/-} sont réfractaires à l'infection par *P. yoelii*, *P. berghei* est en revanche capable de se développer chez ces souris, indiquant l'utilisation d'une voie d'entrée parallèle (Silvie et al., 2003). Cependant une étude plus récente a montré que CD81 pouvait être utilisée comme voie d'entrée alternative par *P. berghei* (Manzoni et al., 2017). S'il a été montré que *P. falciparum* a besoin de CD81 dans les hépatocytes primaires humains, la complémentation avec la version humaine de CD81 d'hépatocytes primaires murins délétés pour CD81 n'est pas suffisante pour les rendre permissifs à *P. falciparum*, suggérant l'implication d'autres facteurs d'entrée *in vivo* (Silvie, Greco, et al., 2006).

Il a été montré l'importance de la localisation de CD81 dans des microdomaines enrichis en tétraspanines pour l'invasion par les sporozoïtes puisque le cholestérol participe à la localisation des tétraspanines dans ces domaines et sa déplétion inhibe l'invasion des hépatocytes *in vitro*

par *P. yoelii*, *P. falciparum* (Silvie, Charrin, et al., 2006) et même par *P. berghei* lorsqu'il doit emprunter cette voie (Silvie et al., 2007). L'utilisation de lignées cellulaires exprimant des versions chimériques de CD81 avec CD9 (une autre tétraspanine dont l'inhibition n'impacte pas l'invasion) a permis de découvrir une région de CD81 située dans la grande boucle extracellulaire et impliquée dans l'invasion par les sporozoïtes (Yalaoui, Zougbedé, et al., 2008). Il semblerait cependant qu'il n'y ait pas d'interaction directe entre le parasite et CD81 puisqu'une forme recombinante du domaine LEL de CD81 ou des anticorps dirigés contre les régions décrites comme importantes n'inhibent pas l'invasion par les sporozoïtes (Silvie et al., 2003; Yalaoui, Zougbedé, et al., 2008). Ces observations suggèrent plutôt une association de CD81 avec d'autres protéines qui interagiraient directement avec le sporozoïte. L'échec de l'inhibition par anticorps s'expliquerait alors par l'interaction de CD81 avec son partenaire, masquant ainsi le site de fixation de l'anticorps.

(2) SRB1 et les Scavenger Receptor type B

i. Généralités sur les récepteurs scavengers

Les récepteurs scavenger (ou éboueurs) forment une super-famille de récepteurs ancrés à la membrane qui sont décrits comme interagissant avec une grande variété de ligands incluant des protéines endogènes mais aussi des pathogènes (PrabhuDas et al., 2017; Zani et al., 2015). Ils ont été identifiés dans les années 1970 dans les macrophages comme récepteurs permettant l'endocytose et la dégradation des lipoprotéines de basse densité (LDL) modifiées (et pas natives) (Goldstein et al., 1979) mais il a depuis été montré qu'ils interagissent avec de nombreux ligands. Les récepteurs sont divisés en classes selon leur structure (actuellement 12 classes de A à L) et chaque classe est sous-divisée en types selon les spécificités de séquence (PrabhuDas et al., 2017).

Les récepteurs qui ont été identifiés comme impliqués dans l'invasion par *Plasmodium* appartiennent à la classe B et sont nommés SR-B. Il en existe trois : SR-B1, CD36 (ou SR-B2) et LIMP-2 (ou SR-B3). Les récepteurs de classe B sont caractérisés par la présence de deux domaines transmembranaires, d'une boucle extracellulaire et de deux extrémités cytoplasmiques (PrabhuDas et al., 2017).

ii. LIMP-2

LIMP-2 (pour Lysosomal Integral Membrane Protein) est une glycoprotéine lysosomale

exprimée dans de nombreux organes comme le cerveau, le cœur, le foie, les poumons ou les reins (Neculai et al., 2013). Elle a été décrite comme servant de récepteur à un entérovirus mais son rôle dans l'invasion du foie par les sporozoïtes de *Plasmodium* n'a pas encore été étudié. Elle a cependant représenté un intérêt en tant que premier représentant des récepteurs scavengers dont la structure a été déterminée par cristallisation, permettant de modéliser la structure de CD36 et SR-B1 (Neculai et al., 2013).

iii. CD36

CD36, aussi appelée translocase des acides gras (FAT) est une glycoprotéine membranaire présente à la membrane plasmique de nombreuses cellules comme les plaquettes, les érythrocytes, les monocytes, les cellules musculaires squelettiques, les hépatocytes... Elle est impliquée dans de nombreux processus selon sa localisation : dans les cellules endothéliales elle est impliquée dans l'inhibition de l'angiogenèse et la promotion de l'apoptose, dans les macrophages elle joue un rôle dans la phagocytose et l'activation de la réponse inflammatoire etc... Ses différents rôles dans le métabolisme et l'immunité sont résumés dans Silverstein & Febbraio, 2009. Elle a pour ligands des phospholipides modifiés, des acides gras et la thrombospondine. Sa structure a été résolue par cristallisation (Hsieh et al., 2016) et confirme la modélisation faite à partir de la structure de LIMP-2 (Neculai et al., 2013). CD36 possède dans son domaine extracellulaire un domaine de liaison à la thrombospondine ainsi que plusieurs domaines de liaison aux LDL oxydés. La structure de la protéine révèle une cavité centrale hydrophobe traversant toute la longueur de la protéine et qui servirait au passage des acides gras (Hsieh et al., 2016; Silverstein & Febbraio, 2009).

CD36 a été identifiée dans le cadre de la recherche de protéines impliquées dans la cytoadhérence des globules rouges infectés par *Plasmodium* (Ockenhouse & Chulay, 1988) et il a rapidement été montré que l'interaction entre CD36 et les globules rouges infectés est directe (Oquendo et al., 1989). La protéine parasitaire PfEMP1 présente en surface des globules rouges parasités a été identifiée comme ligand de CD36 (Baruch et al., 1996) et la structure du complexe CD36-domaine de liaison à PfEMP1 a ensuite été résolue (Hsieh et al., 2016). Cette étude a montré que l'interaction est médiée par une phénylalanine apicale de CD36 qui est également essentielle pour la liaison aux LDL oxydés. L'interaction entre les globules rouges infectés et CD36 leur permet ainsi d'adhérer aux vaisseaux sanguins et d'échapper à l'élimination par la rate. En revanche cette cytoadhérence est également responsable chez l'hôte des formes graves et notamment du neuropaludisme par obstruction des vaisseaux sanguins.

L'implication de CD36 dans l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium* a été questionnée au vu des similarités de séquence entre les protéines parasitaires CSP et TRAP et la thrombospondine (ligand physiologique de CD36). Cependant une étude utilisant des anticorps bloquants *in vitro* et des souris déficientes en CD36 a montré qu'il n'y a pas d'impact sur l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes (Sinnis & Febbraio, 2002). Les auteurs n'excluent cependant pas la possibilité que CD36 fasse partie d'un système de récepteurs redondants qui compenseraient son absence.

iv. SR-B1

SR-B1 est une glycoprotéine présente majoritairement 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). SR-B1 est un récepteur possédant de nombreux ligands et qui permet notamment le transfert lipidique depuis et vers différentes classes de lipoprotéines (Acton et al., 1996). Il permet le transfert du cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL) vers les cellules (Urban et al., 2000), notamment au niveau du foie (Brundert et al., 2005; Shen et al., 2018). La structure de SR-B1 a été modélisée par homologie avec la structure de LIMP-2 (Neculai et al., 2013). La protéine possède comme LIMP-2 et CD36 deux domaines transmembranaires et un domaine extracellulaire comportant une cavité hydrophobe délimitée par des feuilletts beta. Des inhibiteurs du transport de lipides (BLT) inhibent le transfert de cholestérol par SR-B1 en se liant à un résidu présent dans la cavité hydrophobe, confirmant le rôle de ce tunnel dans le transfert lipidique (Yu et al., 2011).

SR-B1 définit une voie d'entrée indépendante de CD81 utilisée par les sporozoïtes de certaines espèces comme *P. berghei* (Rodrigues et al., 2008; Silvie et al., 2007) et *P. vivax* (Manzoni et al., 2017). Les hépatocytes primaires de souris SR-B1^{-/-} sont très peu infectés par *P. yoelii* et *P. berghei* (Yalaoui, Huby, et al., 2008). Cette inhibition de l'invasion est liée à la perte de cholestérol membranaire en absence de SR-B1 puisque la complémentation en cholestérol restaure l'infectiosité des parasites. Le faible taux de cholestérol est corrélé à une faible présence de CD81 dans les TEM, ce qui peut expliquer l'inhibition de l'invasion (Yalaoui, Huby, et al., 2008). La déplétion de SR-B1 dans une lignée cellulaire ou l'inhibition du transfert lipidique grâce au BLT dans des hépatocytes primaires inhibent l'infection par *P. berghei* et *P. falciparum* respectivement (Rodrigues et al., 2008). Des anticorps anti-SR-B1 mais pas anti-CD81 inhibent l'invasion d'hépatocytes primaires humains par *P. vivax*. Une approche par

ARN interférence ou anticorps bloquant SR-B1 dans des lignées cellulaires n'exprimant pas CD81 a également révélé l'importance de SR-B1 pour *P. berghei* en l'absence de CD81 (Manzoni et al., 2017). Dans ce contexte d'utilisation de voie CD81-indépendante par le sporozoïte, une étude récente a précisé les déterminants moléculaires impliqués dans l'invasion et a révélé l'importance de 11 acides aminés présents dans le domaine apical du récepteur (Langlois et al., 2020). Il semblerait également que SR-B1 possède un rôle dans la phase de développement hépatique du parasite via l'apport de lipides puisqu'une étude a montré une réduction du nombre et de la taille des formes exo-érythrocytaires après une déplétion des lipides (Rodrigues et al., 2008). Ces observations sont confirmées dans le foie de souris SR-B1^{-/-} (Yalaoui, Huby, et al., 2008).

Si SR-B1 est directement impliqué au cours de l'invasion par *P. berghei* et *P. vivax*, par un mécanisme indépendant de CD81, il pourrait jouer un rôle indirect dans l'infection par la voie CD81, de façon indirecte en régulant le niveau de cholestérol membranaire et donc l'expression de CD81 dans les microdomaines enrichis en tétraspanines (Yalaoui, Huby, et al., 2008).

(3) EphA2

i. Généralités sur les récepteurs Eph

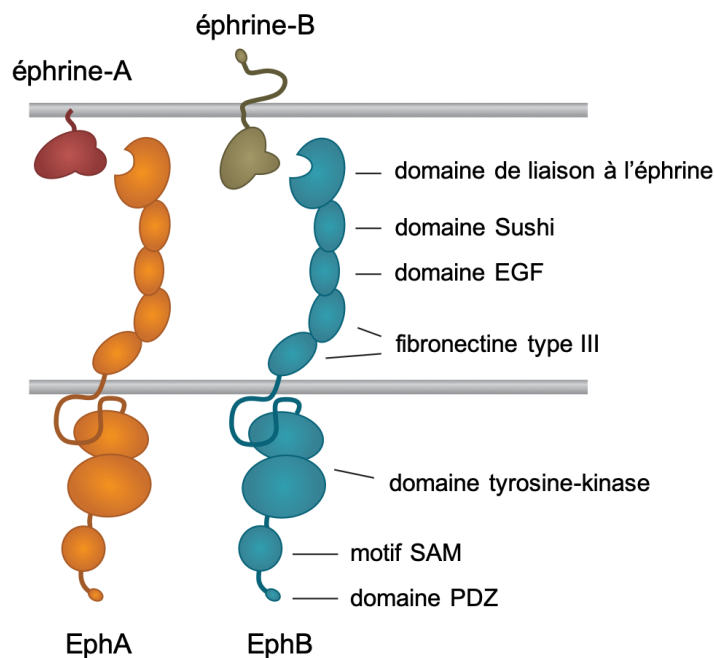


Figure 23 : Structure des récepteurs Eph. EGF : Epidermal Growth Factor; SAM : Sterile Alpha-Motif. (adapté de Lisabeth et al., 2013)

Les protéines Eph appartiennent à la super-famille des récepteurs à tyrosine kinase

transmembranaires. La liaison à leurs ligands (éphrines) également membranaires permet la communication cellule-cellule et induit l'activation de différentes voies de signalisation (Kania & Klein, 2016; Pasquale, 2005). Les récepteurs Eph et leurs ligands sont éparpillés à la surface des cellules puis leur interaction va permettre leur ré-organisation en micro-domaines définissant des zones de signalisation (Kania & Klein, 2016). Ils sont ainsi impliqués dans la morphologie, l'adhérence, la survie, la différenciation ainsi que la prolifération cellulaire. Ils jouent donc un rôle dans des processus aussi variés que l'orientation des axones, la neurogenèse, l'angiogenèse ou la sécrétion d'insuline. Les récepteurs Eph sont composés d'une large portion extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une région intracellulaire (**Figure 23**). La région intracellulaire contient un segment juxtaposé à la membrane, un domaine à tyrosine kinase, un motif SAM (sterile alpha-motif) et un domaine PDZ impliqué dans l'interaction avec des éléments du cytosquelette. La portion extracellulaire contient un domaine de liaison au ligand (LBD), un domaine Sushi, un domaine EGF-like (EGF pour Epidermal Growth Factor) et deux domaines fibronectine de type III (Lisabeth et al., 2013). Ils sont classés en deux groupes (A et B) selon leur affinité pour les éphrines A (ancrées via une ancre GPI) ou les éphrines B (ancrées via un domaine transmembranaire) (**Figure 23**).

ii. *EphA2*

Le récepteur EphA2 a été identifié comme potentiellement impliqué dans l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*. L'étude, basée sur la différence de susceptibilité de deux souches de souris BALB/c à l'invasion par *P. yoelii* (Kaushansky, Austin, et al., 2015), identifie EphA2 comme exprimé à un plus haut niveau dans les hépatocytes de la souche plus susceptible (Kaushansky, Douglass, et al., 2015). De plus l'analyse de l'expression d'EphA2 dans des lignées d'hépatocytes montre qu'il existe une population de cellules exprimant fortement EphA2 et que cette population est préférentiellement envahie par les sporozoïtes de *P. yoelii* et *P. falciparum* (Kaushansky, Douglass, et al., 2015). Cette étude suggère également une interaction fonctionnelle entre EphA2 et P36 (protéine parasitaire impliquée dans le choix de la voie d'entrée par les sporozoïtes – voir chapitre suivant) puisque la phosphorylation d'EphA2 induite après contact avec son ligand l'éphrine A est inhibée en présence de P36. Cependant un article plus récent pointe les limitations de l'étude précédente, notamment au niveau des méthodologies utilisées pour quantifier l'invasion des parasites et l'expression d'EphA2 (Langlois et al., 2018). Cette étude conclut à l'absence de rôle d'EphA2 dans l'invasion par *P. berghei* et *P. yoelii* grâce à l'utilisation d'anticorps bloquants et d'ARN

interférents dans différentes lignées cellulaires exprimant ou pas CD81 et SR-B1. Elle n'exclut cependant pas son implication dans le déclenchement de cascades de signalisation post-invasion. Au final, même si la plus faible susceptibilité des souris EphA2 $-/-$ à l'invasion suggère un rôle de ce récepteur, le fait que l'invasion dans ces souris soit seulement ralentie et non abolie souligne que le récepteur n'est pas essentiel (Kaushansky, Douglass, et al., 2015).

En résumé, il existe à l'heure actuelle 2 récepteurs dont l'implication dans l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes a été prouvée : CD81 et SR-B1. Ces récepteurs représentent des voies d'entrée indépendantes utilisées par les différentes espèces de *Plasmodium*. *P. falciparum* et *P. yoelii* utilisent la voie CD81-dépendante tandis que *P. vivax* utilise la voie CD81-indépendante (par SR-B1). *P. berghei* est quant à lui capable d'utiliser les deux voies pour entrer dans les hépatocytes (**Figure 24**). Il est important de noter qu'aucune interaction directe entre des facteurs parasitaires et un de ces récepteurs n'a été décrite à ce jour.

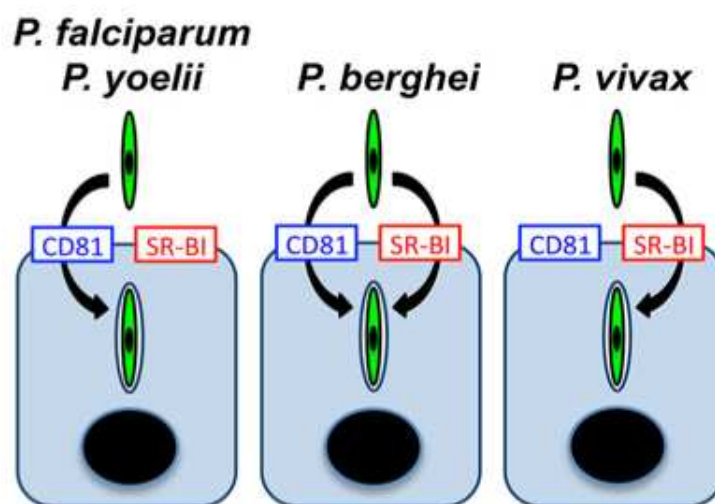


Figure 24 : Modèle d'entrée dans les hépatocytes par les sporozoïtes de différentes espèces de *Plasmodium*. (Manzoni et al., 2017)

2. Facteurs spécifiques du sporozoïte impliqués dans l'invasion : les protéines à domaine 6-cystéines

Une famille de protéines regroupe 14 membres exprimés à différentes phases du cycle de vie du parasite et qui sont souvent impliqués dans l'interaction entre le parasite et son environnement : il s'agit des protéines à 6-cystéines (**Figure 25**) (Arredondo & Kappe, 2017).

Parmi ces protéines, deux exprimées chez le sporozoïte ont été identifiées comme essentielles à l'invasion des hépatocytes, P36 et P52 (Annoura et al., 2012; Ishino et al., 2005; Labaied et al., 2007; Manzoni et al., 2017; Ploemen et al., 2012; VanBuskirk et al., 2009; van Dijk et al., 2005). Une étude a également révélé un lien fonctionnel entre P36 et les récepteurs des hépatocytes CD81 et SR-B1 qui représentent des voies d'entrées distinctes pour les différentes espèces de *Plasmodium* (Manzoni et al., 2017). Contrairement aux protéines de la jonction mobile qui sont impliquées dans l'invasion à différents stades de vie du parasite et font partie d'un mécanisme conservé chez les apicomplexes, P36 et P52 sont spécifiques du sporozoïte. Nous détaillerons ici les protéines exprimées par le sporozoïte et aborderons les protéines d'autres stades dont la fonction est connue.

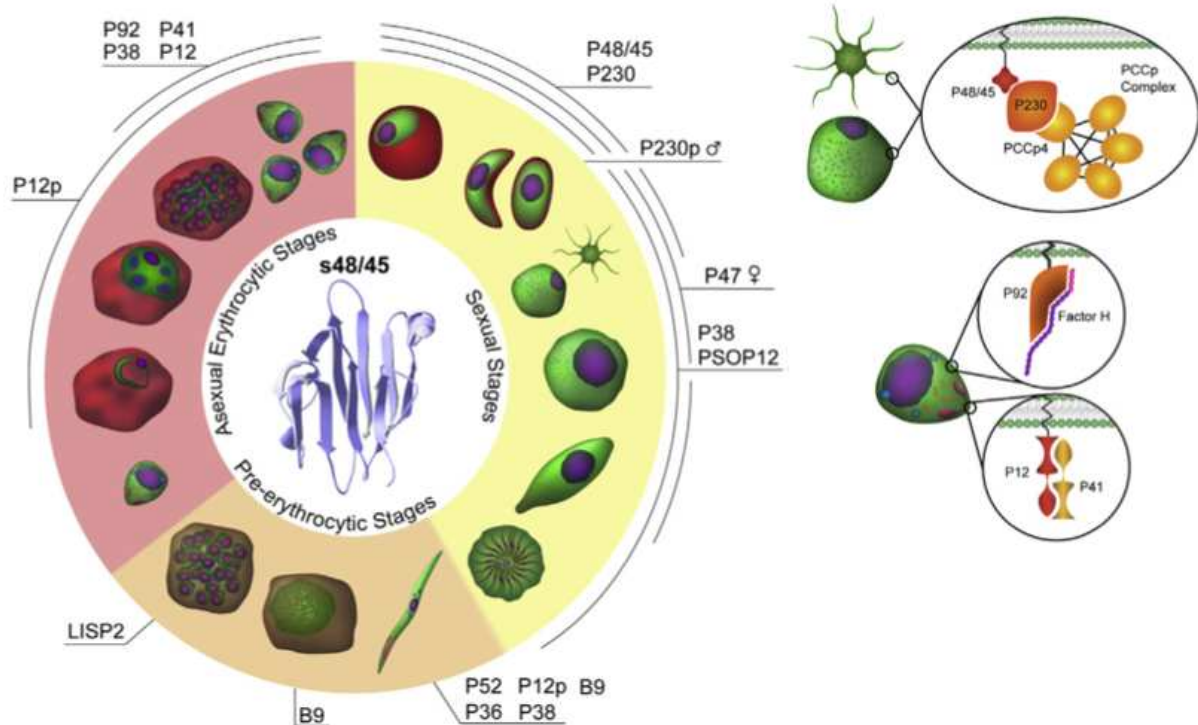


Figure 25 : La famille des protéines à domaine 6-cystéines chez *Plasmodium*. A gauche : Représentation des membres de la famille des protéines à 6-cystéines exprimées le long du cycle de vie du parasite, avec la structure du domaine à 6-cystéines au centre. A droite : modélisation des interactions mises en jeu par certaines de ces protéines. (adapté de Arredondo & Kappe, 2017)

(1) La famille de protéines à domaine 6-cystéines

Les protéines à domaine 6-cystéines ont été identifiées dans les années 1970 lors d'études portant sur des vaccins bloquant la transmission. Il était déjà connu que l'immunisation de

poules avec des gamétocytes de parasites aviaires atténués par irradiation permettait la réduction de la transmission aux moustiques (Carter & Chen, 1976; Gwadz, 1976). L'étude des antigènes présents à la surface des gamétocytes de *P. falciparum* a mis en évidence la présence de Pfs230p et du doublet Pfs48/45 (Rener et al., 1983), historiquement membres fondateurs de la famille. La plupart des épitopes des anticorps monoclonaux anti-Pfs230 générés sont détruits par réduction, montrant l'importance de la formation de ponts disulfures dans la bonne conformation et l'antigénicité des protéines (Carter et al., 1990, 1995; Read et al., 1994). A ce jour, la famille de protéines à domaine 6-cystéines est composée de 14 membres identifiés chez *Plasmodium falciparum* et la structure de 3 d'entre eux a été résolue (Pf12, Pf41 et P12p) (Dietrich et al., 2021; Parker et al., 2015; Tonkin et al., 2013). Les protéines sont exprimées tout au long du cycle de vie du parasite : P36, P52, P12p, B9 et P38 chez le sporozoïte, P12p, P12, P41, P38 et P92 au stade érythrocytaire, P48/45, P230, P230p, P47, P38 et PSOP12 au stade sexué et enfin B9 et LISP2 (sequestrin) au stade hépatique (**Figure 25, Figure 26**) (Arredondo & Kappe, 2017).

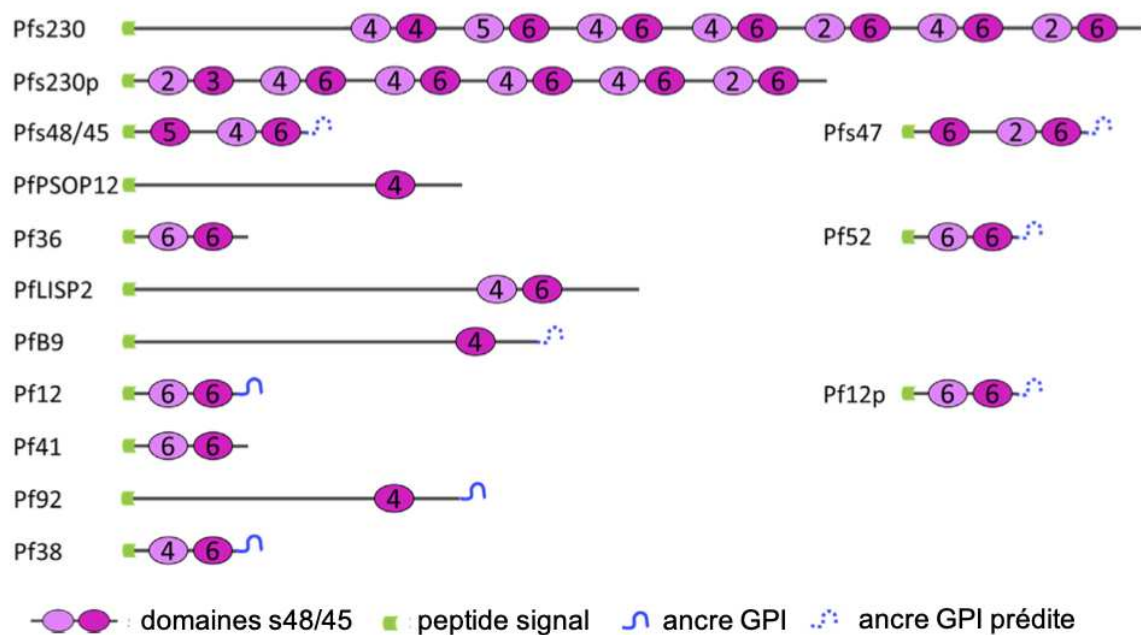


Figure 26 : Structure des protéines de la famille des protéines à domaine 6-cystéines chez *Plasmodium falciparum*. (adapté de Arredondo 2017)

(2) Structure du domaine à 6-cystéines

Le domaine s48/45, caractéristique de la famille des protéines à 6-cystéines, a été identifié pour

la première fois en 1993 (Williamson et al., 1993) en étudiant la protéine Pfs230 présente à la surface des gamétocytes. La comparaison de la séquence de gènes codant pour différentes protéines de cette famille identifiées à l'époque et plus précisément de l'arrangement des cystéines a permis la prédiction des ponts disulfures formés et un début de prédiction de la structure du domaine dès 1995 (Carter et al., 1995). Il faudra cependant attendre 17 ans pour que la structure du domaine soit résolue expérimentalement, en étudiant un domaine de la protéine Pf12 par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) (Arredondo et al., 2012). Ce délai s'explique par la difficulté de produire des protéines de *Plasmodium* ayant la bonne configuration dans des systèmes hétérologues.

Le domaine forme un sandwich- β composé de trois feuillets β et d'une courte hélice α . Le premier feuillet β (feuillet A) possède cinq brins (β_2 , β_1 , β_4 , β_9 et β_8), le second feuillet (feuillet B) en comporte quatre (β_3 , β_{11} , β_{10} et β_5) et le troisième feuillet (feuillet C) est composé de deux brins (β_6 et β_7). Deux paires de cystéines forment chacune un pont disulfure liant deux feuillets β entre eux et la troisième paire forme un pont liant les brins d'un même feuillet : Le premier pont disulfure (cys1-cys2) relie les feuillets A et B au niveau des brins β_1 et β_3 , le second pont disulfure (cys3-cys6) lie les mêmes feuillets par les brins β_4 et β_{10} et le troisième pont (cys4-cys5) relie la boucle située entre les brins β_5 et β_6 au brin β_{10} du même feuillet B (Arredondo et al., 2012).

Initialement, la structure de ce domaine a été prédite comme similaire à celle du domaine SRS (Sag1-Related Sequence) découvert chez *Toxoplasma* et possédant également des feuillets β possédant un mix de brins parallèles et anti-parallèles, liés entre eux par des ponts disulfures (He et al., 2002). Malgré une similarité de séquence en acides aminés d'environ 10% entre les deux domaines, il a été montré que leur structure était proche, malgré une divergence au niveau des ponts disulfures : le premier pont disulfure du domaine SRS fait le lien (cys1-cys6), le second pont fait le lien (cys2-cys5) et le dernier fait le lien (cys3-cys4) (Arredondo et al., 2012; Gerloff et al., 2005). Il a été découvert à ce jour chez *Toxoplasma* un peu plus de 180 gènes codant pour des protéines de la famille SRS et, comme pour les protéines à 6-cystéines, les gènes sont souvent associés en tandem dans le génome (Jung et al., 2004; J. D. Wasmuth et al., 2012). Les protéines SRS sont exprimées tout au long du cycle de vie de *Toxoplasma*, et sont des adhésines de surface du parasite impliquées dans l'adhésion cellulaire, l'évasion immune ou l'atténuation de la virulence (J. D. Wasmuth et al., 2012).

(3) Les protéines exprimées chez le sporozoïte

i. P36

P36 a été identifiée avec d'autres protéines lors du BLAST sur le domaine 6-cystéines (Templeton & Kaslow, 1999). Elle a été nommée selon sa masse moléculaire prédite à l'époque. Chez *P. falciparum*, son gène est situé sur le chromosome 4 et ne possède pas d'intron. Il code pour une protéine de 379 acides aminés pour 45kDa. Elle possède deux domaines à 6-cystéines complets et juxtaposés et il est prédit qu'elle possède un peptide signal et pas d'ancre GPI (Templeton & Kaslow, 1999). Des études de protéomique et par Western-blot ont permis de déterminer l'expression de la protéine uniquement chez les sporozoïtes des glandes salivaires chez *P. falciparum* et *P. berghei* (Ishino et al., 2005; Lasonder et al., 2008; Lindner et al., 2013). La protéine a récemment été localisée par microscopie électronique au niveau des micronèmes des sporozoïtes de glandes salivaires de *P. yoelii* (Arredondo et al., 2018).

La délétion de P36 a déjà été effectuée chez *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. falciparum*, par délétion du gène seul ou avec le gène adjacent sur le génome codant pour le paralogue de P36 (P52 ou P36p) (Annoura et al., 2012; Ishino et al., 2005; Labaied et al., 2007; Manzoni et al., 2017; Ploemen et al., 2012; VanBuskirk et al., 2009; van Dijk et al., 2010). Elles montrent que la délétion de P36 n'entraîne aucun défaut du parasite au niveau de la réplication au stade sanguin et du développement chez le moustique. En revanche la protéine a un rôle crucial au niveau de l'invasion des cellules hépatiques puisque sa délétion entraîne une abolition presque complète de l'invasion des hépatocytes sans impacter la traversée cellulaire par les sporozoïtes de *P. berghei* (Ishino et al., 2005), *P. yoelii* (Arredondo et al., 2018; Labaied et al., 2007) et *P. falciparum* (Annoura et al., 2012; VanBuskirk et al., 2009), phénotype renforcé lorsque P36 est délétée en même temps que son paralogue.

Chez *P. berghei* et *P. falciparum*, les parasites délétés pour P36 et P52 sont tout de même capables de se développer au stade hépatique, en très petit nombre, et d'initier une phase d'infection sanguine (Annoura et al., 2012; Ploemen et al., 2012). Ces parasites ont été étudiés et ne présentent pas de vacuole parasitophore au sein du cytoplasme de l'hépatocyte mais parviennent néanmoins à se développer selon un mécanisme inconnu.

Une étude de complémentation génétique inter-espèces de P36 et P52 a révélé le rôle de P36 dans l'invasion (Billker, 2017; Manzoni et al., 2017). Des parasites *P. berghei* et *P. yoelii* ont été choisis pour leur usage différent des récepteurs d'entrée dans les hépatocytes (respectivement SRB1 ou CD81 et CD81 seulement). En complétant un parasite avec P36

ou P52 de l'autre espèce, l'étude a montré que P36 est responsable du choix du récepteur utilisé par le parasite pour envahir les cellules.

Une étude récente chez *P. yoelii* a révélé par immunoprécipitation que P36 et son paralogue P52 forment un complexe chez le parasite et que P36 est sécrétée dans le surnageant des parasites après activation à 37°C (Arredondo et al., 2018). Au vu du modèle formé par le complexe P230-P48/45, il est possible que P36 et P52 forment un complexe similaire avec P36 exposée en surface et interagissant avec des récepteurs des hépatocytes et P52 ancrant le complexe à la membrane via son ancre GPI. La protéine n'étant cependant pas détectée dans le protéome de surface sporozoïtes activés (Swearingen et al., 2016), cette hypothèse est remise en question ou s'expliquerait par une localisation en surface de P36 très transitoire.

ii. P52

P52 a été identifiée lors d'une analyse de génomique comparative incluant les nouvelles données de l'époque sur le séquençage du génome de *P. falciparum* (Thompson et al., 2001). La protéine a été identifiée comme paralogue de P36 et initialement appelée P36p. Elle a également été nommée P52, pour sa masse moléculaire prédite, lors de sa découverte au cours d'une analyse transcriptomique du sporozoïte (Kappe et al., 2001). Chez *P. falciparum*, son gène est situé sur le chromosome 4, adjacent à celui codant pour P36 et ne possède pas d'intron. Il code pour une protéine de 478 acides aminés pour 56kDa. Elle possède deux domaines à 6-cystéines complets et elle possède un peptide signal et une ancre GPI prédits (Kappe et al., 2001; Thompson et al., 2001). Elle possède 24% de similarité de séquence au niveau des domaines à 6-cystéines avec son paralogue P36. Des études de protéomique et par western-blot ont permis de déterminer l'expression de la protéine uniquement chez les sporozoïtes des glandes salivaires chez *P. yoelii*, *P. falciparum* et *P. berghei* (Ishino et al., 2005; Lasonder et al., 2008; Lindner et al., 2013). Une étude initiale d'immunofluorescence chez *P. berghei* a montré que P52 localise au pôle apical des sporozoïtes de glandes salivaires uniquement (Ishino et al., 2005). La protéine a été localisée par microscopie électronique au niveau des micronèmes des sporozoïtes de glandes salivaires de *P. berghei* et *P. yoelii* (Arredondo et al., 2018; Ishino et al., 2005). De plus l'étude sur *P. berghei* montre que la détection de P52 en surface des parasites se fait uniquement après activation des parasites à 37°C, suggérant une localisation dans les micronèmes puis une translocation en surface au moment de l'activation (Ishino et al., 2005).

Le gène codant pour P52 a été délété chez *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. falciparum*, seul (Ishino et al., 2005; van Dijk et al., 2005; van Schaijk et al., 2008) ou en tandem avec le gène codant pour P36 (Annoura et al., 2012; Labaied et al., 2007; Ploemen et al., 2012; VanBuskirk et al., 2009). Les mutants délétés pour P52 seul présentent le même phénotype que les mutants délétés pour P36 *in vivo* et *in vitro*, n'étant pas capable d'envahir productivement les hépatocytes. Le phénotype est renforcé chez les mutants doublement délétés, incapables de former et/ou de maintenir leur vacuole parasitophore.

L'étude ayant révélé le rôle de P36 dans le choix de la voie d'entrée a également mis en avant l'absence de rôle de P52 dans ce choix, suggérant un rôle pour P52 d'ancre du complexe P52/P36 à la surface des parasites après leur activation pour interaction avec des récepteurs des cellules hépatocytaires (Arredondo et al., 2018; Manzoni et al., 2017).

iii. B9

B9 a été identifiée lors de l'étude génomique cherchant les protéines contenant des domaines à 4-cystéines dérivés des domaines à 6-cystéines complets (Annoura et al., 2014). Le gène codant pour B9 est situé sur le chromosome 3 de *P. falciparum* et contient un intron de 291pb pour 3,2kb au complet. Il code pour une protéine de 969 acides aminés pour 115kDa prédit. Elle possède un peptide signal et une ancre GPI prédits. Elle a été décrite comme possédant un domaine dégénéré à 4-cystéines en C-terminal de la protéine (Annoura et al., 2014). Dans cette étude, des transcrits de B9 ont été détectés chez les sporozoïtes de *P. berghei* par RT-PCR mais la protéine n'a été détectée par immunofluorescence que chez les stades hépatiques de *P. falciparum* (de J2 à J5 post-invasion). Chez *P. berghei*, l'expression de la protéine a été étudiée en exprimant la protéine fluorescente mCherry sous contrôle de régions régulatrices du gène codant pour B9. La fluorescence n'est détectée qu'au stade hépatique à partir de 5h post-invasion et décroît pour ne plus être détectable à 24h post-invasion. L'expérience d'immunofluorescence chez *P. falciparum* a montré que la protéine était localisée dans le cytoplasme des parasites hépatiques ainsi que le long de leur membrane plasmique, et est bien indépendante de la vacuole parasitophore.

Dans cette étude, le rôle de B9 a été étudiée chez *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. falciparum* par génération de mutants de délétion. Chez les trois espèces, les mutants délétés pour B9 ne présentent pas de phénotype au stade sanguin et au cours du développement chez le moustique (Annoura et al., 2014). Les mutants ne présentaient pas non plus de défaut au niveau de la traversée et de l'invasion des hépatocytes (Annoura et al., 2014). Les auteurs concluent que

c'est au niveau du développement au stade hépatique que B9 joue un rôle : chez *P. berghei* et *P. yoelii*, les parasites délétés ne sont pas détectés dans les hépatocytes *in vitro* 24h post-invasion ni dans les foies de souris *in vivo* 40h post-invasion, résultant en une abrogation presque complète du développement en stade sanguin. Chez *P. falciparum*, les parasites délétés pour B9 sont retrouvés dans les cellules jusqu'à 24h post-invasion mais disparaissent par la suite. Cependant la méthodologie de détection des parasites n'est pas optimale et les parasites intracellulaires observés ne représentent pas forcément des parasites ayant envahi productivement la cellule. Comme chez *P. berghei* et *P. yoelii*, de très rares parasites arrivent à se développer normalement malgré l'absence de B9. Des souches de *P. falciparum* délétés pour le gène b9 (et un autre gène, slarp) sont actuellement évaluées en tant que vaccins vivants atténués (Roestenberg et al., 2020; van Schaijk et al., 2014).

iv. P12p

Pf12p a été identifiée lors du séquençage du génome de *P. falciparum* sur le chromosome 6 (Hall et al., 2002). Le gène codant pour Pf12p ne possède pas d'intron et code pour une protéine de 371 acides aminés pour 43kDa. Elle a été décrite comme possédant 2 domaines à 6-cystéines complets ainsi qu'un peptide signal et une ancre GPI prédits (Gerloff et al., 2005) et sa structure a été résolue par cristallographie récemment (Dietrich et al., 2021). Les données de spectrométrie de masse chez *P. falciparum*, *P. yoelii* et *P. berghei* indiquent la présence de la protéine chez les sporozoïtes (Hamada et al., 2021; Lasonder et al., 2008; Lindner et al., 2013; Swearingen et al., 2016) et dans le mérosome de *P. berghei* (Shears et al., 2019). Une de ces études montre la présence de Pf12p en surface des sporozoïtes en présence de BSA qui mime l'activation des sporozoïtes uniquement.

Le rôle de P12p est encore inconnu, la délétion de la protéine chez *P. yoelii* n'ayant entraîné aucun phénotype sur les différents stades de vie du parasite (Arredondo & Kappe, 2017).

v. P38

Pf38 a été identifiée comme nouveau membre de la famille des protéines à 6-cystéines en même temps que P52 dans une étude de génomique comparative (Thompson et al., 2001). Le gène codant pour Pf38 est situé sur le chromosome 5 de *P. falciparum* et ne possède pas d'intron. Il code pour une protéine de 349 acides aminés pour 41kDa. Elle a été décrite comme possédant 2 domaines à 6-cystéines ainsi qu'un peptide signal (Thompson et al., 2001). Des analyses

protéomiques ont précisé la présence d'une ancre GPI chez Pf38 (Gilson et al., 2006) ainsi que l'expression de la protéine dans les schizontes et les sporozoïtes (Bozdech et al., 2003; Gilson et al., 2006; Hamada et al., 2021; Swearingen et al., 2016). La localisation de la protéine a été déterminée par immunofluorescence ou fusion de la protéine à la GFP chez *P. falciparum* (Feller et al., 2013; Sanders et al., 2005). Elle est localisée dans les schizontes, au pôle apical des mérozoïtes et dans les stades sanguins sexués. Chez *P. yoelii*, la fusion de la protéine à une étiquette hémagglutinine (HA) a permis de préciser sa localisation vésiculaire chez les sporozoïtes, probablement au niveau des micronèmes (Swearingen et al., 2016).

La délétion de P38 chez *P. berghei* et *P. yoelii* n'affecte pas le développement du parasite au stade sanguin ou hépatique ni chez le moustique (Harupa, 2015; van Dijk et al., 2010). Cependant chez *P. falciparum*, différentes études ont montré que des anticorps générés contre des protéines recombinantes inhibent en partie l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes et la transmission au moustique (Feller et al., 2013; Paul et al., 2017). Une première expérience utilisant des peptides synthétiques décrit une activité de liaisons de peptides de P38 aux érythrocytes (García et al., 2009). Plus récemment, une étude par immunoprécipitation a montré que P38 fait partie d'un complexe en surface des mérozoïtes comprenant notamment Pf41 et Pf12 (Paul et al., 2017). L'étude a également montré que P38 interagit avec la glycophorine A présente en surface des érythrocytes. La protéine pourrait donc avoir un rôle plus important dans l'invasion des mérozoïtes chez *P. falciparum* que chez les *Plasmodium* murins.

(4) Protéines exprimées à d'autres stades dont la fonction est connue

i. P230 et P48/45

P230 et P48/45 sont exprimées à la surface des gamétocytes et gamètes mâles et femelles (Reiner et al., 1983; van Dijk et al., 2010). Les protéines interagissent entre elles (N. Kumar & Wizel, 1992) et forment un complexe multi-protéique ancré en surface des gamétocytes par P48/45 possédant une ancre GPI. Le complexe est nécessaire au bon déroulement de la reproduction sexuée du parasite (Scholz et al., 2008; Simon et al., 2009, 2016). En effet, les gamètes mâles délétés pour P230 ou P48/45 sont incapables de s'attacher aux gamètes femelles pour les fertiliser, résultant en un nombre d'oocystes réduits (Eksi et al., 2006; van Dijk et al., 2001, 2010). Le complexe multi-protéique contient, en plus de P230 et P48/45, des membres de la famille PfCCp présentes en complexe à la surface des gamétocytes (Simon et al., 2009). Toutes les protéines de ce complexe jouent un rôle dans la reproduction sexuée du parasite et son développement dans le moustique (Pradel, Hayton, et al., 2004; Scholz et al., 2008; Simon et

al., 2009). Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que Pfs230 interagit directement avec Ps48/45 et PfCCp4 avant l'activation du gamétocyte puis va également se lier aux autres protéines du complexe PfCCP afin de stabiliser le complexe à la membrane du parasite au moment de la gamétocytogenèse (Simon et al., 2016). C'est à ce jour le seul exemple connu de protéines à domaine 6-cystéines impliquées dans un complexe protéique plus large que les tandems observés (**Figure 25**).

ii. P12 et P41

P12 et P41 sont exprimées dans les schizontes et mérozoïtes (Gilson et al., 2006; Sanders et al., 2005; Shears et al., 2019) où elles forment un hétérodimère ancré en surface via P12 et son ancre GPI (**Figure 25**) (Parker et al., 2015; Taechalerpaisarn et al., 2012; Tonkin et al., 2013). Une première étude se basant sur des peptides synthétiques de P12 et P41 suggérait une capacité d'adhésion aux globules rouges et d'inhibition de l'invasion (García et al., 2009). Une étude plus récente se basant sur la délétion des gènes codant pour P12 ou P41 n'a cependant révélé ni capacité d'adhésion des protéines natives aux érythrocytes ni aucun défaut de développement au stade sanguin (Taechalerpaisarn et al., 2012). Le rôle de ces protéines reste donc encore à élucider.

iii. P92

P92 est exprimée à la surface des schizontes et mérozoïtes (Lee et al., 2016; Obando-Martinez et al., 2010; Sanders et al., 2007). P92 joue un rôle dans la stratégie d'évitement du système immunitaire de l'hôte par le parasite au stade sanguin. En effet, les mérozoïtes sont capables de recruter le facteur H de l'hôte qui régule le système du complément et évitent ainsi la destruction par la cascade du complément. Des expériences d'immunoprécipitation ont identifiés Pf92 en tant que protéine parasitaire recrutant le facteur H (**Figure 25**). De plus des parasites délétés pour cette protéine se révèlent incapables de se lier au facteur H et se développent moins en culture (Kennedy et al., 2016). Il est intéressant de noter que P92 n'a été décrite que chez *P. falciparum* et *P. vivax* et est la seule protéine à 6-cystéines à ne pas avoir d'orthologue dans les espèces de *Plasmodium* murines, leurs hôtes possédants pourtant également un système du complément.

iv. *LISP2*

LISP2 est exprimée dans le cytoplasme du parasite et dans l'espace vacuolaire au stade hépatique (Itani et al., 2014; Orito et al., 2013). L'absence de la protéine entraîne un arrêt du développement tardif du parasite, particulièrement au niveau de la formation des mérozoïtes dans les schizontes hépatiques (Annoura et al., 2014; H. Kumar et al., 2016; Orito et al., 2013). Récemment, LISP2 a été décrite comme marqueur des jeunes stades hépatiques chez *P. cynomolgi* et *P. vivax*, permettant de distinguer les hypnozoïtes dormants (ne l'exprimant pas) des jeunes trophozoïtes (exprimant LISP2 au niveau de la protubérance de la vacuole parasitophore) (Gupta et al., 2019).

v. *P47*

P47 est exprimée à la surface des gamétocytes et gamètes femelles (van Schaijk et al., 2006) et à la surface des ookinètes (Molina-Cruz et al., 2013). Une étude effectuée sur la descendance de deux souches de *P. falciparum* capable ou pas d'infecter des moustiques *Anopheles gambiae* a révélé un rôle essentiel de Pfs47 dans l'évasion de la réponse immunitaire innée du moustique via le système du complément (Molina-Cruz et al., 2013; Ramphul et al., 2015). Une étude plus récente sur des haplotypes de Pfs47 a montré que le remplacement par différents haplotypes de Pfs47 est suffisant pour changer la compatibilité parasite / vecteur. L'étude propose l'hypothèse que Pfs47 agisse comme une clé en désactivant des voies du système du complément impliqués dans la réponse antiplasmodiale du moustique. Les différents haplotypes de Pfs47 formeraient alors différentes clés permettant de déjouer la réponse immunitaire innée de différents vecteurs (Molina-Cruz et al., 2015). Une étude plus récente chez *P. berghei* a en revanche révélé un rôle important de P47 chez les gamètes femelles, ces derniers chez des mutants délétés ne s'attachant pas aux gamètes mâles, ce qui entraîne une baisse de la fertilité (van Dijk et al., 2010).

vi. *P230p*

P230p est exprimée chez les gamétocytes mâles aux derniers stades de développement et présente une distribution diffuse cytoplasmique (Eksi et al., 2008; Eksi & Williamson, 2002). La protéine ne semble pas avoir de redondance fonctionnelle avec P230 puisqu'elle n'est pas uprégulée pour compenser l'absence de P230 (Eksi et al., 2006) et les deux protéines ne

présentent pas le même profil d'expression (Eksi et al., 2008). La fonction de P230p est encore inconnue puisque sa délétion chez *P. berghei* et *P. yoelii* n'entraîne pas de phénotype au stade sanguin, pendant le développement sexuel du parasite ou pendant son développement chez le moustique (Hart et al., 2015; van Dijk et al., 2010). Depuis, le locus de P230p est souvent utilisé comme site d'insertion de gènes rapporteurs (Hart et al., 2015; Janse et al., 2006; Lin et al., 2011; Manzoni et al., 2015).

OBJECTIFS

La phase d'invasion hépatique par *Plasmodium* représente une cible vaccinale de grand intérêt puisqu'elle constitue une porte d'entrée obligatoire chez l'hôte mammifère et qu'elle précède la phase répllicative sanguine responsable des symptômes de la maladie. Cependant, à l'inverse de l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes, l'invasion hépatique par les sporozoïtes de *Plasmodium* reste un processus peu caractérisé à ce jour. Une meilleure compréhension des facteurs aussi bien parasitaires que de l'hôte intervenant dans ce processus ouvrirait la voie à l'étude de nouvelles cibles vaccinales.

Ce travail de thèse vise à contribuer à la caractérisation fonctionnelle de protéines exprimées chez le sporozoïte et impliquées dans l'invasion des hépatocytes.

Deux protéines appartenant à la famille des protéines à domaine 6-cystéines, P36 et P52, ont été identifiées comme essentielles à l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes puisque leur délétion impacte spécifiquement ce processus (Ishino et al., 2005; Manzoni et al., 2017; van Schaijk et al., 2008). P36 a même été identifiée, par une approche de complémentation génétique inter-espèce, comme étant un facteur parasitaire déterminant le choix de la voie d'entrée dans les hépatocytes par les sporozoïtes (Manzoni et al., 2017). La complémentation de parasites *P. berghei* avec P36 et P52 provenant de *P. falciparum* ou *P. vivax* ne permet cependant pas de restaurer l'infectiosité de parasites knockout pour les gènes codant ces protéines (Manzoni et al., 2017), suggérant l'existence d'autres facteurs parasitaires jouant un rôle dans l'invasion. L'analyse protéomique des sporozoïtes des glandes salivaires a révélé l'expression à ce stade de 5 protéines de la famille des protéines à domaine 6-cystéines : P36 et P52, mais aussi P12p, P38, B9. Si le rôle de P36 et P52 chez le sporozoïte a été largement documenté par le passé, le rôle des trois autres protéines à domaine 6-cystéines reste à définir. **Le premier objectif de ma thèse consiste donc à déterminer le rôle de ces trois protéines (P12p, P38 et B9) chez le sporozoïte, grâce à une approche de délétion des gènes au stade sanguin et de phénotypage des sporozoïtes.**

Les protéines P36 et P52 sont spécifiques des sporozoïtes et leur rôle dans l'invasion des hépatocytes est précoce et intervient en amont de la sécrétion des rhoptries (Manzoni et al., 2017). L'étape suivant la sécrétion des rhoptries chez les mérozoïtes consiste en la formation

de la jonction mobile qui va permettre l'internalisation du parasite. Si cette jonction n'a jamais été observée chez les sporozoïtes, la conservation de ses acteurs moléculaires chez les apicomplexes en général et chez le sporozoïte de *Plasmodium* suggère un rôle conservé. Parmi ces acteurs moléculaires, on retrouve AMA1 et les protéine RONS ainsi que la protéine CLAMP (Claudin-like Apicomplexa Micronemal Protein). Ces protéines sont toutes exprimées au stade sanguin où elles sont retrouvées au niveau de la jonction mobile lors de l'entrée dans les érythrocytes (Alexander et al., 2006; Lamarque et al., 2011; Riglar et al., 2011; Sidik et al., 2016) ainsi que chez le sporozoïte (Florens et al., 2002; Hamada et al., 2021) où leur rôle reste à définir. AMA1 et les RONS ont été identifiées chez *Toxoplasma* et chez les mérozoïtes de *Plasmodium* comme un complexe faisant intervenir les RONS exportées sous forme d'un complexe à la membrane de la cellule hôte et AMA1 présent à la surface du parasite, permettant l'interaction des membranes et fournissant au parasite la force nécessaire à son internalisation. Leur rôle chez le sporozoïte est cependant controversé, puisque des études ont montré que l'inhibition de l'interaction AMA1-RON2 impacte l'invasion des hépatocytes (Silvie et al., 2004; Yang, Lopaticki, et al., 2017) alors que d'autres études basées sur la délétion conditionnelle du gène codant pour AMA1 concluent à un rôle non essentiel de la protéine dans l'invasion des hépatocytes (Bargieri et al., 2013; Giovannini et al., 2011). CLAMP a été identifiée lors d'un criblage CRISPR/Cas9 identifiant les gènes essentiels à l'invasion chez *Toxoplasma* (Sidik et al., 2016). Elle est localisée au niveau de la jonction mobile lors de l'invasion de cellules par les tachyzoïtes de *Toxoplasma* et sa délétion inhibe l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *Plasmodium*. Son rôle chez le sporozoïte n'a quant à lui jamais été rapporté.

Les modifications génétiques du parasite étant effectuées au stade sanguin, les approches de délétion classique sont inapplicables aux gènes essentiels à ce stade, ce qui a compliqué et retardé l'étude du rôle chez le sporozoïte de protéines impliquées dans l'invasion au stade sanguin. Le développement de méthodes de mutagenèse conditionnelle a cependant permis d'ouvrir la voie à l'étude de ces protéines chez le sporozoïte. Des approches de knock-down basées sur des échanges de promoteurs (Klug et al., 2018; Laurentino et al., 2011) ou sur la déstabilisation de l'ARNm (Agop-Nersesian et al., 2008; Prommana et al., 2013) ou de la protéine (Armstrong & Goldberg, 2007) se sont révélées efficaces chez le parasite mais les limitations de chaque approche soulignent le besoin de développement de nouvelles méthodes (de Koning-Ward et al., 2015). Une méthode de knock-out conditionnel basée sur l'utilisation de la recombinase Flp (système Flp/FRT) a été utilisée pour l'étude du rôle de protéines

essentielles au stade sanguin chez le sporozoïte, notamment AMA1 (Giovannini et al., 2011) mais ce système a déjà montré ses limites avec la persistance de la présence de la protéine qui peut être liée à une délétion trop tardive du gène (Govindasamy et al., 2016). Le système DiCre a depuis émergé comme une méthode robuste de délétion conditionnelle de séquences d'ADN entourées de sites Lox grâce à la recombinaise Cre active uniquement en présence de rapamycine (Jullien et al., 2003). Ce système a notamment été adapté à *P. falciparum* (Collins et al., 2013) et *P. berghei* (Kent et al., 2018). Au laboratoire, nous avons développé une méthode utilisant le système DiCre pour étudier au stade sporozoïte le rôle de gènes essentiels chez *P. berghei*. **Le second objectif de ma thèse consiste à utiliser l'approche DiCre chez *P. berghei* pour revisiter le rôle d'AMA1 et des RONS et définir le rôle de CLAMP chez les sporozoïtes.**

MÉTHODOLOGIE

Modèles expérimentaux

Parasites :

Dans nos études, nous avons utilisé des parasites de rongeurs utilisés en routine au laboratoire : *P. berghei* (souche ANKA) et *P. yoelii* (souche 17XNL). Les sporozoïtes de *P. yoelii* dépendent strictement de la protéine de l'hôte CD81 pour infecter les cellules hépatiques, alors que ceux de *P. berghei* peuvent utiliser selon le type cellulaire une voie CD81-dépendante ou CD81-indépendante (Manzoni et al., 2017). L'équipe a précédemment généré des lignées *P. berghei* et *P. yoelii* exprimant constitutivement la GFP (Manzoni et al., 2015) qui présentent l'avantage de faciliter la détection des parasites au stade sanguin par cytométrie en flux et chez les moustiques (chez qui les estomacs et les glandes salivaires apparaissent fluorescents sous loupe binoculaire à fluorescence).

Modèles murins :

Les infections de routine sont effectuées dans des souris femelles Swiss CD-1 âgées de 6 à 10 semaines. Les infections de souris par injection de sporozoïtes sont effectuées dans des souris femelles C57BL/6J (pour *P. berghei*) ou BALB/c (pour *P. yoelii*), plus sensibles à l'infection. Toutes les expériences impliquant des modèles animaux ont été effectuées avec respect de la règle des 3Rs (Tannenbaum & Bennett, 2015) et en accord avec la directive 2010/63/EU du parlement européen et du conseil relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Le projet a reçu une autorisation du ministère après avis du comité d'Éthique Charles Darwin (projet 7475-2016110315516522).

Moustiques :

Une colonie de moustiques *Anopheles stephensi* est maintenue dans l'insectarium du laboratoire. Les moustiques sont infectés lors d'un repas sanguin sur des souris infectées anesthésiées. Après la transmission, les moustiques sont maintenus à la température adéquate pour chaque espèce de parasite (21°C pour *P. berghei* et 24°C pour *P. yoelii*). Les sporozoïtes

sont isolés par dissection manuelle des glandes salivaires des moustiques à la fin de leur développement (21 jours post-transmission pour *P. berghei* et 14 jours post-transmission pour *P. yoelii*).

Modèles cellulaires :

Afin d'étudier l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes, nous utilisons des lignées hépatocytaires permissives à l'infection par les parasites murins. La lignée HepG2 (ATCC HB-8065) permet l'infection par *P. berghei* grâce à l'expression du récepteur SR-BI, mais est réfractaire à celle par *P. yoelii* du fait de l'absence d'expression du récepteur CD81. Par conséquent, pour les études d'infection par *P. yoelii* nous utilisons une lignée d'HepG2 génétiquement modifiée pour exprimer la protéine CD81 (HepG2/CD81) (Silvie, Greco, et al., 2006).

Résumé des procédures expérimentales

Le détail des matériels et des méthodes utilisés est indiqué dans la section correspondante des manuscrits inclus dans la partie Résultats du manuscrit.

Transfection

Chez *Plasmodium*, les modifications génétiques sont possibles par recombinaison homologue. Les transfections du parasite se font au stade sanguin où il est le plus facilement manipulable et où la multiplication exponentielle permet la sélection de mutants recombinants. Le sang de souris infectées est cultivé pour obtenir une population synchronisée de parasites au stade schizonte. Les mérozoïtes isolés de ces schizontes sont nucleofectés (système basé sur l'électroporation), permettant l'introduction de transgènes dans les parasites, avant d'être injectés dans des souris (Janse et al., 2006). La sélection des parasites transgéniques se fait par ajout des drogues de sélection dans l'eau de boisson des souris et éventuellement par tri en cytométrie en flux selon la fluorescence des parasites.

Induction de l'excision chez les parasites DiCre et phénotypage chez le moustique

Nous avons généré une lignée de parasites exprimant une recombinase inducible (système DiCre) dans le but d'étudier chez les sporozoïtes des glandes salivaires le rôle de protéines essentielles au stade sanguin. Dans ce but, nous ciblons les stades sexués du parasite (où nos gènes d'intérêt ne sont pas essentiels) 24h avant la transmission au moustique par traitement des souris avec une dose unique de rapamycine (une condition contrôle sans traitement est systématiquement effectuée en parallèle) (**Figure 27**). Le jour suivant, les parasites sont transmis aux moustiques lors d'un repas sanguin. À 16 jours post-transmission, une fraction des moustiques est disséquée pour isoler les sporozoïtes des estomacs et de l'hémolymphe et la proportion de sporozoïtes excisés et non-excisés est déterminée sur la base de la fluorescence des parasites (**Figure 27**). À 21 jours post-transmission, des moustiques sont disséqués pour isoler les sporozoïtes des glandes salivaires dont la proportion d'excisés et non-excisés est également déterminée (**Figure 27**). Le phénotype de ces sporozoïtes va ensuite pouvoir être analysé à l'aide de différentes expériences détaillées au paragraphe suivant.

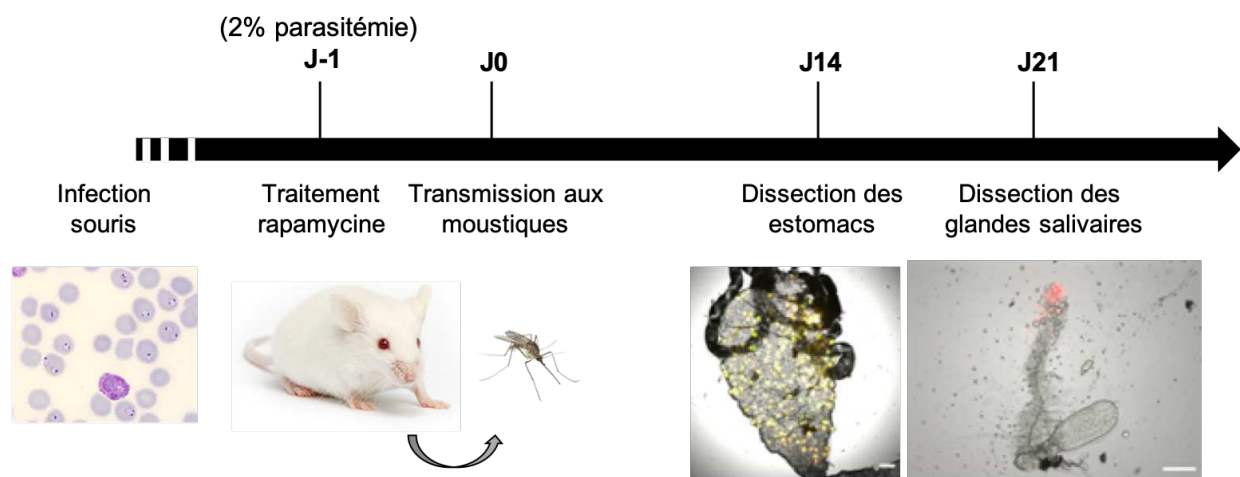


Figure 27 : Schéma des étapes d'analyse de mutants conditionnels par l'approche DiCre.

Phénotypage des sporozoïtes des glandes salivaires

La fusion des protéines d'intérêt avec une étiquette (3xFlag) permet leur détection en immunofluorescence et par western-blot. Les partenaires de la protéine d'intérêt peuvent également être identifiées par co-immunoprécipitation couplée à une analyse en spectrométrie de masse.

Différentes caractéristiques des sporozoïtes peuvent être évaluées après leur isolement des glandes salivaires, et nous nous intéressons particulièrement à leurs capacités de traversée et d'invasion des hépatocytes. Pour évaluer la traversée cellulaire, les sporozoïtes sont mis en contact avec les hépatocytes en présence de Dextran fluorescent, un composé marquant les cellules après rupture de l'intégrité membranaire lors de la traversée des sporozoïtes. Les cellules sont analysées en cytométrie en flux 3h post-invasion pour déterminer le pourcentage de cellules Dextran-positives (cellules traversées) (**Figure 28**). Pour évaluer l'invasion productive par les sporozoïtes, ces derniers sont mis en contact des cellules pendant 3h avant que les sporozoïtes extracellulaires soient éliminés par lavages. Les cellules sont ensuite mises à incuber pour au moins 24h avant d'être fixées pour une révélation des vacuoles parasitophores par immunomarquage, permettant leur dénombrement (**Figure 28**). Dans le cas où l'on s'intéresse à la motilité des sporozoïtes, ces derniers sont resuspendus dans un milieu activateur et déposés en plaque à 37°C. Après 10 minutes d'incubation, ils sont ensuite examinés par vidéomicroscopie à raison d'une image par seconde pendant trois minutes (**Figure 28**).

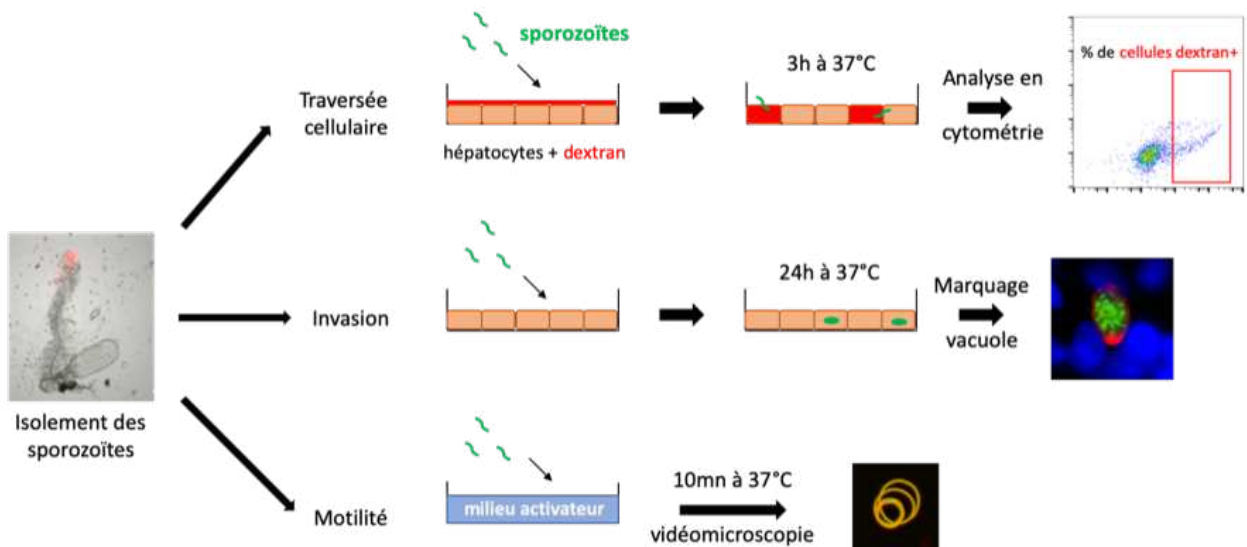


Figure 28 : Analyse phénotypique des sporozoïtes.

DEUXIÈME PARTIE
RÉSULTATS

I. Identification de B9 comme acteur de l'invasion productive par les sporozoïtes

(1) Contexte

B9 a initialement été identifiée lors d'une étude génomique cherchant les protéines contenant des domaines à 4-cystéines dérivés des domaines à 6-cystéines complets (Annoura et al., 2014). Dans cette étude, des transcrits de B9 ont été détectés chez les sporozoïtes mais la protéine n'a été détectée en immunofluorescence qu'au stade hépatique chez *P. falciparum*. L'étude conclut grâce à la délétion de la protéine qu'elle a un rôle au niveau du maintien ou du développement de la vacuole parasitophore au sein de l'hépatocyte chez les trois espèces étudiées : *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. falciparum*. Cependant, les données de protéomique, y compris une étude récente de l'équipe, contredisent les données précédentes d'expression de la protéine en montrant la présence de B9 dans le protéome total des sporozoïtes de *P. berghei*, *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. yoelii* (Hamada et al., 2021; Lindner et al., 2019; Swearingen et al., 2017). Nous avons donc voulu explorer plus en détails le rôle de cette protéine chez les sporozoïtes de *P. berghei*, ainsi que deux autres protéines de la même famille également retrouvées chez les sporozoïtes, P12p et P38.

(2) Stratégie et résultats

Une stratégie « Gene Out Marker Out » (GOMO) (Manzoni et al., 2015) a été appliquée sur *P. berghei* et *P. yoelii*, permettant la génération de lignées de parasites où le gène codant B9, P12p ou P38 a été remplacé par une cassette d'expression de la GFP. Ces mutants ont permis d'exclure un rôle essentiel chez les sporozoïtes de P12p et P38, mais ont également permis de révéler le rôle de B9 lors de l'infection du foie. Nous nous sommes donc intéressés plus précisément à la structure de cette protéine et à son rôle dans l'invasion productive des cellules par les sporozoïtes.

B9 est une protéine membranaire contenant une séquence d'ancrage GPI prédite. Au niveau structural, une étude par modélisation a permis la détection de 3 domaines : un domaine propeller N-terminal codé par l'exon 1 du gène et deux domaines à 6-cystéines putatifs codés par l'exon 2 du gène. Le domaine propeller contient 9 résidus cystéines impliqués dans la formation de ponts disulfures, donnant au domaine une structure proche de la protéine CyRPA (Wong et al., 2019). CyRPA est une protéine exprimée par les mérozoïtes et faisant partie d'un

complexe comprenant notamment Rh5 et impliqué dans l'interaction avec la basigine des érythrocytes au cours de l'invasion (Volz et al., 2016). La structure tertiaire du domaine propeller de B9 a été modélisée à partir de la structure de CyRPA (Wong et al., 2019) et révèle une structure hélicoïdale à six branches, chaque branche composée de quatre feuillets beta disposés en antiparallèle. Au vu de ce qui est connu de CyRPA et son interaction avec Rh5 dans un complexe essentiel à l'invasion des érythrocytes et de la similarité de structure entre le domaine propeller de B9 et CyRPA, nous avons émis l'hypothèse d'un rôle du domaine propeller de B9 dans des interactions protéine – protéine. Aucun partenaire de B9 n'a cependant été identifié en spectrométrie de masse après co-immunoprécipitation de B9 chez les sporozoïtes. Cependant grâce à un système hétérologue d'expression (en cellules de mammifères), nous avons révélé l'existence d'une interaction entre le domaine propeller de B9, P36 et P52.

Pour approfondir l'étude structure-fonction de B9, nous avons généré des parasites exprimant des versions tronquées ou chimériques de la protéine. Les parasites exprimant B9 tronquée de son domaine propeller sont non invasifs dans les lignées cellulaires, soulignant l'importance de ce domaine pour la fonctionnalité de la protéine. Nous avons également remplacé chez *P. berghei* le domaine propeller de B9 par le domaine provenant de *P. yoelii* : les parasites sont infectieux dans les lignées cellulaires indépendamment de l'expression de CD81, suggérant que le domaine propeller n'est pas impliqué dans le choix de la voie d'entrée par le parasite.

Il est à noter que si les séquences des domaines propeller de *P. yoelii* et *P. berghei* partagent 90,1% d'identité, celles de *P. berghei* et *P. falciparum* ne partagent que 48% d'identité et le domaine propeller de *P. falciparum* présente une insertion de 45 acides aminés par rapport à *P. berghei* et *P. yoelii*, formant une boucle entre les branches V et VI de l'hélice. Nous avons généré un parasite exprimant une version de PbB9 possédant le propeller de *P. falciparum* et ces mutants sont non invasifs dans les lignées cellulaires, ce qui renforce l'idée d'un rôle de B9 en association avec d'autres protéines parasitaires.

La génération d'une lignée de parasites exprimant la protéine B9 fusionnée à une étiquette Flag a permis de préciser la localisation de la protéine en microscopie à fluorescence. Les sporozoïtes présentent en microscopie à fluorescence classique un marquage typique des protéines micronémales : interne au parasite, ponctiforme et intense de part et d'autre du noyau. La microscopie à super-résolution STED a permis de préciser la localisation de la protéine : elle est distribuée tout au long du sporozoïte sauf au niveau du noyau et semble vésiculaire,

compatible avec une localisation dans les micronèmes. Nous avons également réalisé un co-marquage avec une autre protéine micronémale décrite, AMA1 (Healer et al., 2002), afin d'étudier leur distribution en super-résolution. Si les deux protéines présentent le même type de marquage, la superposition des marquages met en avant l'absence quasi complète de co-localisation entre les protéines, suggérant l'expression de ces protéines dans des sous-populations spécifiques de micronèmes. Cependant B9, à l'instar de ce qui a été décrit pour AMA1, est sécrétée après activation puisqu'elle est retrouvée dans le surnageant de sporozoïtes activés, à une taille légèrement inférieure à celle de la protéine détectée dans les lysats de parasites non activés, suggérant un clivage de la protéine, peut-être au niveau de son ancre GPI.

(3) Conclusion

En conclusion, cette étude a permis de révéler pour la première fois le rôle de B9 dans l'invasion productive des hépatocytes par les sporozoïtes de *P. berghei* et *P. yoelii* et son absence de rôle dans le choix de la voie d'entrée dans les hépatocytes par les parasites, à l'instar de P52 et à l'inverse de P36 (Manzoni et al., 2017). L'étiquetage de la protéine endogène nous a également permis d'observer un marquage de type micronémal chez les sporozoïtes, se traduisant en microscopie à super-résolution par un marquage de type vésiculaire de part et d'autre du noyau du parasite. De façon intéressante, bien qu'AMA1 présente le même type de marquage vésiculaire, les deux protéines ne co-localisent pas, suggérant leur distribution dans des sous-groupes spécifiques de micronèmes. L'étude de la structure de B9 a révélé une similarité structurale de son domaine propeller avec celui de la protéine CyRPA impliquée dans un complexe nécessaire à l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes. Par analogie, B9 pourrait être impliquée dans des interactions similaires chez les sporozoïtes.

Implication personnelle dans le projet :

J'ai participé sur ce projet à la finalisation de l'analyse phénotypique des mutants structure-fonction générés par une ancienne postdoc de l'équipe. J'ai participé à la génération de nouveaux mutants structure-fonction et ai été en charge de l'analyse de la sécrétion de B9 et de l'analyse de sa localisation en microscopie à super-résolution.

(4) Manuscrit B9 finalisé

Les tableaux des supplementary datas ne sont pas intégrés dans ce manuscrit de thèse.

***Plasmodium* sporozoites require the protein B9 to invade hepatocytes**

Priyanka Fernandes¹, Manon Loubens¹, Carine Marinach¹, Romain Coppée^{2#}, Morgane Grand¹, Thanh-Phuc Andre¹, Soumia Hamada^{1,3}, Anne-Claire Langlois¹, Sylvie Briquet¹, Philippe Bun⁴, Olivier Silvie¹

¹Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, CIMI-Paris, Paris, France

²Université de Paris, UMR 261 MERIT, IRD, F-75006, Paris, France

³Sorbonne Université, INSERM, UMS PASS, Plateforme Post-génomique de la Pitié Salpêtrière (P3S), 75013, Paris, France

⁴INSERM U1266, Neurlmag Facility, Institute of Psychiatry and Neurosciences of Paris, Paris, France

Running head: B9 is essential for sporozoite entry into hepatocytes

Correspondence to Olivier Silvie, olivier.silvie@inserm.fr.

#Current affiliation: Université de Paris, Infection Modelisation Antimicrobial Evolution (IAME), Inserm UMR1137, F-75018 Paris, France.

Key words: *Plasmodium* sporozoites; malaria; hepatocyte; invasion; B9 protein; beta-propeller domain.

ABSTRACT

Plasmodium sporozoites are transmitted to a mammalian host during blood feeding by an infected mosquito and invade hepatocytes for initial replication of the parasite in the liver. This leads to the release of thousands of merozoites into the blood circulation and initiation of the pathogenic blood stages of malaria. Merozoite invasion of erythrocytes has been well characterized at the molecular and structural levels. In sharp contrast, the molecular mechanisms of sporozoite invasion of hepatocytes are poorly characterized. Here we report a new role during sporozoite entry for the B9 protein, a member of the 6-cysteine domain protein family. Using genetic tagging and gene deletion approaches in rodent malaria parasites, we show that B9 is secreted from sporozoite micronemes and is required for productive invasion of hepatocytes. Structural modelling indicates that the N-terminus of B9 forms a beta-propeller domain structurally related to CyRPA, a cysteine-rich protein forming an invasion complex with Rh5 and RIPP in *P. falciparum* merozoites. We provide evidence that the beta-propeller domain of B9 is essential for protein function during sporozoite entry and interacts with P36 and P52, both also essential for productive invasion of hepatocytes. Our results suggest that, despite using distinct sets of parasite and host entry factors, *Plasmodium* sporozoites and merozoites may share common structural modules to assemble protein complexes for invasion of host cells.

INTRODUCTION

Malaria is caused by *Plasmodium* spp. parasites and still remains a major health and socio-economic problem in endemic countries¹. Sporozoites, the mosquito-transmitted forms of the malaria parasite, first infect the liver for an initial and obligatory round of replication, before initiating the symptomatic blood stages. Infection of the liver is clinically silent and constitutes an ideal target for a malaria vaccine. Until now, only one single antigen, the circumsporozoite protein (CSP), had been considered for clinical vaccine development against the extracellular sporozoite stage, with limited success². Other sporozoite antigens, especially parasite proteins involved in host-parasite interactions, could be considered as potential vaccine targets to prevent sporozoite entry into hepatocytes. This highlights the need to better characterize the molecular mechanisms of sporozoite infection in order to identify new vaccine targets.

Like other Apicomplexan parasites, *Plasmodium* invades host cells using a unique mechanism that involves the sequential secretion of apical organelles, called micronemes and rhoptries, and the formation of a moving junction (MJ) through which the parasite actively glides to enter the cell and form a specialized parasitophorous vacuole (PV) where it further replicates³. Proteins released from micronemes onto the parasite surface are prime candidates to interact with host cell surface receptors, triggering subsequent secretion of the rhoptry content, formation of the MJ and commitment to productive invasion. However, until now the ligand-receptor interactions mediating *Plasmodium* sporozoite invasion and the nature of the sporozoite MJ have remained enigmatic⁴.

We previously characterized host entry pathways used by human (*P. falciparum*, *P. vivax*) and rodent (*P. yoelii*, *P. berghei*) parasites to infect hepatocytes^{5,6}, and showed that CD81 and SR-BI define independent entry routes for *P. falciparum* and *P. vivax* sporozoites, respectively⁶. Remarkably, this alternative usage of host cell receptors is also observed with rodent malaria model parasites, providing robust and tractable experimental systems^{6,7}. Indeed, *P. yoelii* sporozoites, like *P. falciparum*, strictly require CD81 to infect liver cells, whereas *P. berghei* can alternatively use CD81 or SR-BI for productive invasion⁶. Only two

parasite proteins, P36 and P52, have been identified as being specifically required for productive invasion of hepatocytes^{6,8-11}. Using inter-species genetic complementation in mutant *P. berghei* and *P. yoelii* lines, we showed that P36 is a key determinant of host cell receptor usage, establishing for the first time a functional link between sporozoite and host cell entry factors⁶. The molecular function of P36 remains unknown. One study proposed that P36 interacts with the ephrin receptor EphA2 on hepatocytes to mediate infection¹², but direct evidence for such an interaction is lacking, and EphA2 was later shown to be dispensable for sporozoite productive invasion¹³. Interestingly, interspecies genetic complementation experiments showed that *P. berghei* $\Delta p52\Delta p36$ mutants complemented with PyP52 and PyP36 exhibit a *P. yoelii*-like phenotype as they preferentially infect CD81-expressing cells⁶. However, whilst *P. yoelii* sporozoites are unable to infect hepatocytes in the absence of CD81, complemented *P. berghei* mutants retain a residual invasion capacity in CD81-deficient cells⁶. Furthermore, genetic complementation with *P. falciparum* or *P. vivax* P52 and P36 cannot restore infection of $\Delta p52\Delta p36$ *P. berghei* sporozoites⁶. These results strongly suggest that additional parasite factors contribute to receptor-dependent productive invasion.

P36 and P52 both belong to the so-called 6-cysteine domain protein family, which is characterized by the presence of one or several 6-cysteine (6-cys) domains¹⁴. 6-cys domains are ~120 amino acid long domains containing four or six conserved cysteine residues that respectively form two or three disulphide bonds resulting in a beta-sandwich fold¹⁴. *Plasmodium* spp. possess 14 members of the 6-cys protein family¹⁵. *Plasmodium* 6-cys proteins are typically expressed in a stage-specific manner, and have been implicated in protein-protein interactions in *P. falciparum* merozoites^{16,17}, gametocytes^{18,19}, ookinetes²⁰ and sporozoites¹¹. Proteomic studies have shown that, in addition to P36 and P52, *Plasmodium* sporozoites express three other 6-cys proteins, P12p, P38 and B9²¹⁻²⁴. While the contribution of P12p and P38 had not been studied until now, a previous study reported that the protein B9 is not expressed in sporozoites due to translational repression, and is not required for sporozoite invasion but is needed during infection of hepatocytes for early maintenance of the

PV¹⁵.

Here, we systematically analysed the role of P12p, P38 and B9 during sporozoite invasion, using a reverse genetics approach based on our Gene Out Marker Out (GOMO) strategy²⁵. We report that *b9* gene deletion totally abrogates sporozoite infectivity, whilst *p12p* and *p38* are dispensable for hepatocyte infection in both *P. berghei* and *P. yoelii*. We show that B9 is a sporozoite micronemal protein and that B9-deficient sporozoites fail to productively invade hepatocytes. Secondary structure analysis and protein structure modelling indicate that B9 is a hybrid protein containing a CyRPA-like beta propeller domain in addition to non-canonical 6-cys domains. Structure-guided mutagenesis reveals that the propeller domain is not associated with host receptor usage but is essential for B9 function, possibly through the assembly of supramolecular protein complexes with the 6-Cys proteins P36 and P52 during host cell invasion.

RESULTS

Analysis of the repertoire of *Plasmodium* sporozoite 6-cys proteins suggests that P36, P52 and B9 are employed by infectious sporozoites only

In order to define the repertoire of 6-cys proteins expressed at the sporozoite stage, we first analysed the proteome datasets of *P. falciparum*^{22,26}, *P. vivax*²⁴, *P. yoelii*²⁶ and *P. berghei*²¹ sporozoites. As expected, P36 and P52 were identified by mass spectrometry in sporozoites from all four species. Interestingly, three other 6-cys proteins, P12p, P38 and B9, were consistently identified across the datasets. Among this core of five 6-cys proteins, P12p and P38 have been identified in the surface proteome of *P. falciparum* sporozoites, P12p being quantitatively enriched on the surface of activated parasites in the presence of bovine serum albumin²⁷. Interestingly, P12p and P38 do not seem to be uniquely employed by sporozoites, as they have been detected in *P. falciparum* asexual and sexual blood stages²⁸⁻³², and in *P. berghei* gametocytes³³, respectively. In contrast, P36, P52 and B9 were identified in sporozoites only, and a recent study identified P36, P52 and B9 as up-regulated in infectious sporozoites (UIS) proteins in *P. falciparum* and *P. yoelii*, whilst P12p and P38 were also detected in oocyst-derived sporozoites³⁴. These observations suggest that B9, like P36 and P52, may play a role in mature sporozoites.

Reverse genetics analysis in rodent malaria parasites shows that *b9* (but not *p12p* and *p38*) is essential for sporozoite infectivity

A previous study reported that B9 is not expressed in sporozoites and is required for early liver stage development but not host cell invasion¹⁵. The contribution of P12p and P38 during sporozoite invasion has not been investigated so far, although the *p38* gene could be deleted in *P. berghei* without any detectable phenotypic defect during blood stage parasite growth and transmission to mosquitoes^{35,36}. Given the consistent detection of P12p, P38 and B9 proteins in sporozoites by mass spectrometry, we sought to determine the functional importance of these proteins in *P. berghei* and *P. yoelii* sporozoites using a reverse genetics approach. We used our GOMO strategy³⁷ to replace genes of interest, through homologous recombination

with a GFP expression cassette under the control of a constitutive HSP70 promoter, to facilitate monitoring of host cell invasion (**Supplementary Fig. 1a**). Targeting vectors were assembled by inserting 5' and 3' homology fragments of *P. berghei* or *P. yoelii* *p12p* (PBANKA_0111100; PY17X_0112700), *p38* (PBANKA_1107600; PY17X_1108700) and *b9* (PBANKA_0808100; PY17X_0811300) genes in the GOMO-GFP plasmid³⁷, and used to transfect wild type (WT) *P. berghei* (ANKA) or *P. yoelii* (17XNL) blood stage parasites. We then applied the GOMO selection strategy, consisting of positive selection with pyrimethamine, negative selection with 5-fluorocytosine and flow cytometry-assisted parasite sorting, as previously described³⁷. Pure populations of GFP-expressing drug-selectable marker-free *Pb* Δ *p12p*, *Pb* Δ *p38*, *Pb* Δ *b9*, *Py* Δ *p12p*, *Py* Δ *p38* and *Py* Δ *b9* parasite lines were obtained, confirming that none of the targeted genes are essential during blood stage replication of the parasite. Genotyping by PCR confirmed gene deletion and excision of the drug-selectable marker cassette, as desired, in all parasite lines (**Supplementary Fig. 1b-h**). All the mutants could be transmitted to mosquitoes and produced normal numbers of salivary gland sporozoites, similar to Δ *p36* parasites (**Fig. 1a-b**). We then assessed the infectivity of the *P. berghei* and *P. yoelii* mutant lines in C57BL/6 and BALB/c mice, respectively. C57BL/6 mice injected with 10,000 *Pb* Δ *p12p* or *Pb* Δ *p38* sporozoites all developed a patent blood stage infection, like the parental *Pb*GFP parasites (**Fig. 1c**). Similarly, BALB/c mice injected with 10,000 *Py* Δ *p12p* or *Py* Δ *p38* sporozoites all developed a patent blood stage infection (**Fig. 1d**). In sharp contrast, none of the animals injected with *P. berghei* or *P. yoelii* Δ *b9* sporozoites developed parasitemia, phenocopying the Δ *p36* mutants (**Fig. 1c-d**). Abrogation of Δ *b9* sporozoite infectivity was also observed *in vitro* in hepatocyte cell lines. FACS analysis 24 hours post-infection revealed a dramatic reduction in the number of *Pb* Δ *b9* exoerythrocytic forms (EEFs) in comparison to control *Pb*GFP or *Pb* Δ *p12p* and *Pb* Δ *p38* sporozoites in HepG2 cells, which was similar to the reduction observed with *Pb* Δ *p36* mutants (**Fig. 1e**). Using antibodies specific for UIS4, a marker of the PV membrane (PVM) that specifically labels productive vacuoles^{38,39}, we confirmed that, in contrast to Δ *p12p* and Δ *p38* mutants, Δ *b9* parasites were not able to form productive vacuoles

(Fig. 1f). Together, these results show that *b9* is essential for sporozoite liver infection both *in vivo* and *in vitro*, corroborating the results of a previous study¹⁵, and that *p12p* and *p38* genes on the contrary are dispensable for parasite invasion and liver stage development.

Fig 1

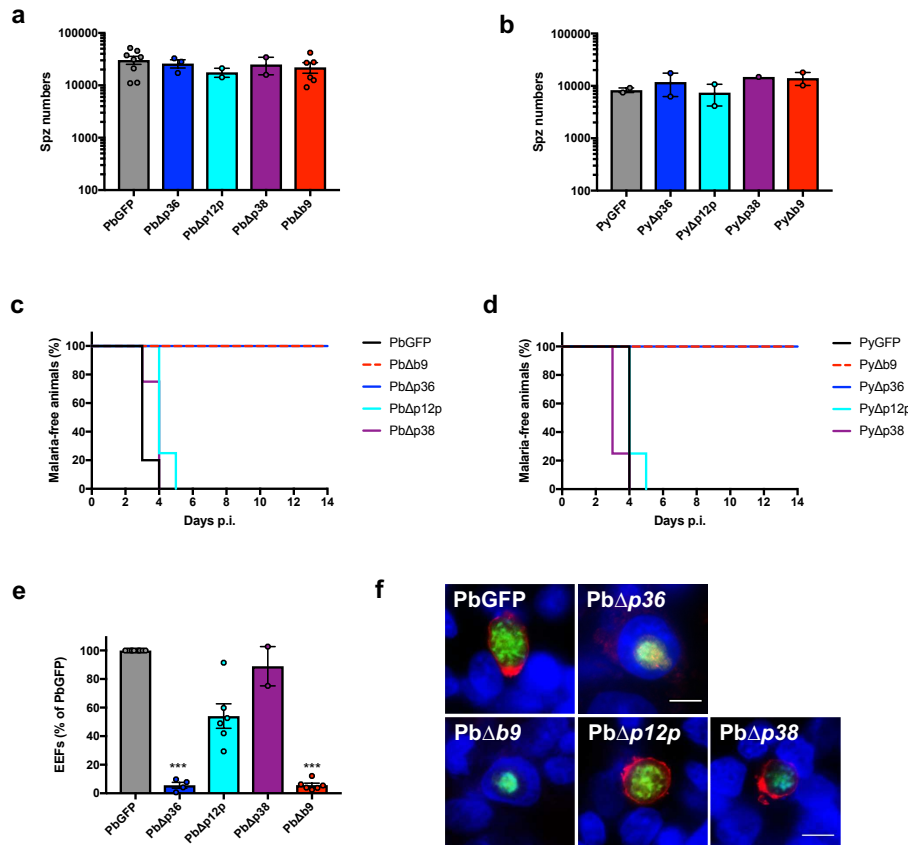


Figure 1. Deletion of *b9* but not *p12P* or *p38* genes abrogates sporozoite infectivity in *P. berghei* and *P. yoelii*. **a**, Number of sporozoites isolated from the salivary glands of mosquitoes infected with PbGFP, PbΔp36, PbΔp12p, PbΔp38 or PbΔb9 parasites (mean +/- SD; $p = 0.67$, one-way ANOVA). **b**, Number of sporozoites isolated from the salivary glands of mosquitoes infected with PyGFP, PyΔp36, PyΔp12p, PyΔp38 or PyΔb9 parasites (mean +/- SD; $p = 0.66$, one-way ANOVA). **c**, Kaplan-Meier analysis of time to patency in C57BL/6 mice ($n = 5$) after intravenous injection of 10^4 PbGFP, PbΔp36, PbΔp12p, PbΔp38 or PbΔb9 sporozoites. Mice were followed daily for the appearance of blood stage parasites ($p = 0.0001$, Log rank Mantel-Cox test). **d**, Kaplan-Meier analysis of time to patency in BALB/c mice ($n = 5$) after intravenous injection of 10^4 PyGFP, PyΔp36, PyΔp12p, PyΔp38 or PyΔb9 sporozoites.

Mice were followed daily for the appearance of blood stage parasites ($p < 0.0001$, Log rank Mantel-Cox test). **e**, Infection rates were determined by quantification of EEFs (GFP-positive cells) 24 h after infection of HepG2 cell cultures with PbGFP, Pb $\Delta p36$, Pb $\Delta p12p$, Pb $\Delta p38$ or Pb $\Delta b9$ sporozoites. Results are expressed as % of control (PbGFP). *** $p < 0.001$ as compared to PbGFP (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). **f**, Immunofluorescence images of HepG2 cells infected with PbGFP, Pb $\Delta p36$, Pb $\Delta p12p$, Pb $\Delta p38$ or Pb $\Delta b9$ parasites expressing GFP (green) and labelled with anti-UIS4 antibodies (red) and Hoechst 77742 (blue). PbGFP, Pb $\Delta p12p$ and Pb $\Delta p38$ are surrounded by a UIS4-positive PV membrane (red), while Pb $\Delta p36$ and Pb $\Delta b9$ parasites are intranuclear and lack a UIS4-positive PVM. Scale bar, 10 μm .

B9 is required for sporozoite invasion

After infection of cell cultures with $\Delta b9$ sporozoites, only very low numbers of intracellular parasites were observed, all of which were seemingly intranuclear and lacked a UIS4-labeled PVM, similar to the $\Delta p36$ mutants (**Fig. 1f**). Intranuclear EEFs are known to result from cell traversal events⁴⁰. Accordingly, a cell wound-repair assay confirmed that the cell traversal activity of $\Delta b9$ sporozoites is not different to PbGFP parasites, in both HepG2 and HepG2/CD81 cells (**Fig 2a-b**). In contrast, direct quantification of invaded cells by FACS revealed that host cell invasion by $\Delta b9$ sporozoites is greatly impaired in both cell types (**Fig. 2c-d**). Based on the similar phenotype observed with $\Delta b9$ and $\Delta p36$ parasites⁶, we hypothesized that B9 could play a role during productive invasion. Productive host cell invasion is associated with discharge of the sporozoite rhoptries, resulting in depletion of the rhoptry proteins RON2 and RON4^{3,41}. To monitor rhoptry discharge in B9-deficient parasites, we genetically modified the *ron4* locus in the Pb $\Delta b9$ mutant line to replace the endogenous RON4 by a RON4-mCherry fusion by double homologous recombination (**Supplementary Fig. 2**). In parallel, we also genetically modified parental PbGFP and mutant Pb $\Delta p36$ parasites, using the

same RON4-targeting vector (**Supplementary Fig. 2**). Examination of PbGFP/RON4-*mCherry*, Pb Δ b9/RON4-*mCherry* and Pb Δ p36/RON4-*mCherry* by fluorescence microscopy confirmed expression of the rhoptry marker in merozoites and sporozoites, as expected⁴¹ (**Fig. 2e**). We then performed invasion assays in HepG2 cells and analysed the presence of the RON4-*mCherry* rhoptry marker by fluorescence microscopy. As expected, the RON4-*mCherry* signal was lost in a vast majority of intracellular PbGFP/RON4-*mCherry* sporozoites, reflecting rhoptry discharge during productive invasion (**Fig. 2f**). In sharp contrast, RON4-*mCherry* was detected in all examined Pb Δ b9 and Pb Δ p36 intracellular sporozoites, indicating that sporozoites lacking B9 or P36 invade cells without secreting their rhoptries, i.e. through traversal mode only. Altogether, these data demonstrate that genetic deletion of B9 abrogates productive host cell invasion by sporozoites, phenocopying the lack of P36. Our data also show that B9, like P36, is essential for both CD81-dependent and CD81-independent sporozoite entry.

Fig 2

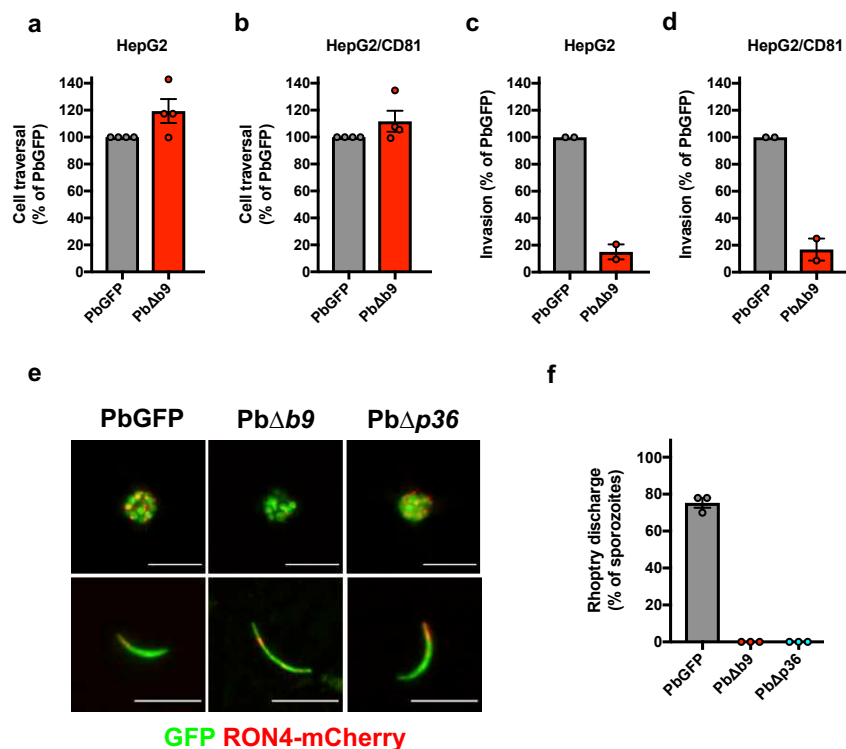


Figure 2. Sporozoites require B9 for productive invasion of host cells. a-b, Sporozoite cell traversal activity was analysed in HepG2 (a) and HepG2/CD81 (b) cell cultures incubated

for 3 hours with PbGFP or Pb $\Delta b9$ sporozoites in the presence of rhodamine-labelled dextran. The number of traversed (dextran-positive) cells was determined by FACS. **c-d**, Sporozoite invasion rates were determined in HepG2 (c) and HepG2/CD81 (d) cell cultures incubated for 3 hours with PbGFP or Pb $\Delta b9$ sporozoites. The percentage of invaded (GFP-positive) cells was determined by FACS. **e**, Fluorescence microscopy images of RON4-mCherry-expressing PbGFP, Pb $\Delta b9$ and Pb $\Delta p36$ erythrocytic schizonts (upper panels) and salivary gland sporozoites (lower panels). Scale bar, 10 μm . **f**, Rhoptry discharge was analysed by fluorescence microscopy examination of HepG2 cells incubated for 3 hours with RON4-mCherry- expressing PbGFP, Pb $\Delta b9$ or Pb $\Delta p36$ sporozoites. Results are expressed as the percentage of parasites without detectable RON4-mCherry signal.

B9 is secreted from the sporozoite micronemes

The phenotype of $\Delta b9$ mutants, combined with proteomic data, implies that the protein B9 is expressed in *P. berghei* sporozoites and plays a crucial role during host cell productive invasion, unlike previously thought¹⁵. In order to confirm the expression of B9 at the protein level and define its localization, we genetically modified the endogenous *b9* locus in *P. berghei* (PbGFP) to insert a triple Flag epitope in the protein-coding sequence, through double homologous recombination (**Supplementary Fig. 3a**). Because B9 is predicted to be glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored, we inserted the 3xFlag tag towards the C-terminus of the protein, downstream of the putative 6-cys domains but upstream of the predicted omega site (aspartate residue at position 826). Correct integration of the construct was confirmed by PCR on genomic DNA from B9-Flag blood stage parasites (**Supplementary Fig. 3b**). Importantly, we observed no defect in sporozoite development (**Fig. 3a**) and infectivity (**Fig. 3b**) in the B9-Flag line, demonstrating that the insertion of a 3xFlag epitope in B9 sequence had no detrimental effect on the protein function.

Immunofluorescence with anti-Flag antibodies revealed that B9 is readily detected in

B9-Flag salivary gland sporozoites, with a distribution pattern typical of a micronemal protein (**Fig. 3c**). Super-resolution microscopy using stimulated-emission-depletion (STED) showed that B9 distributes in numerous vesicles localized on each side of the nucleus, consistent with B9 being a micronemal protein (**Fig. 3d**). Interestingly, B9 did not co-localize with the apical membrane antigen 1 (AMA1), suggesting that the two proteins are present in distinct microneme subsets in salivary gland sporozoites (**Fig. 3e**). We next analysed the fate of B9 upon activation of sporozoite microneme secretion, by western blot. In non-activated control parasites, B9 was detected as a single band around 80 kDa (**Fig. 3f**). Upon stimulation of microneme secretion, B9 was also recovered in the supernatant fraction as a slightly smaller band, indicating that B9 is secreted from sporozoites upon activation, possibly after proteolytic processing (**Fig. 3f**). We failed to detect B9 on the surface of B9-Flag sporozoites by immunofluorescence, irrespective of parasite activation, suggesting that following microneme secretion, B9 is mainly released as a shed protein.

Fig 3

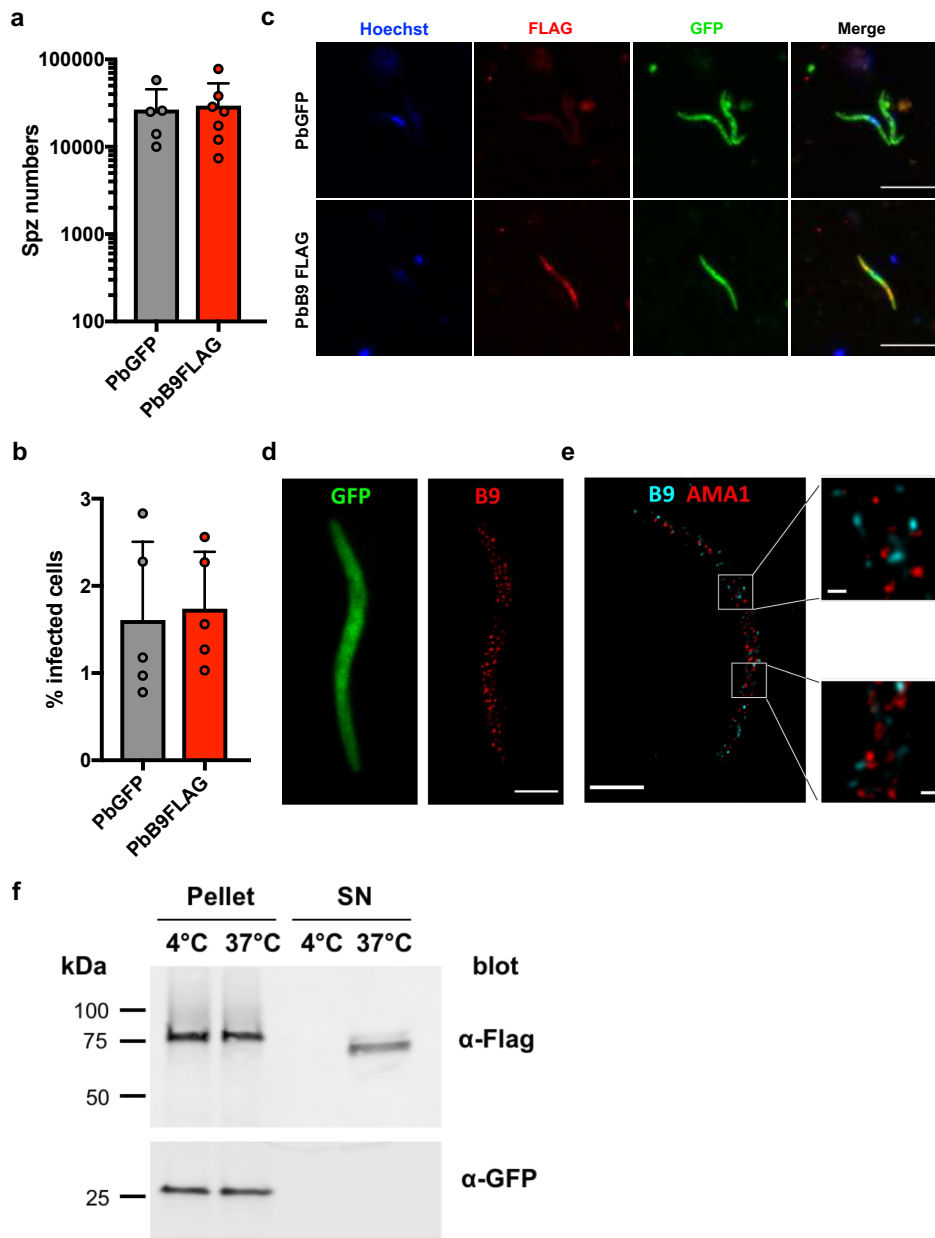


Figure 3. B9 localizes to a subset of sporozoite micronemes and is secreted upon parasite activation. **a**, Number of sporozoites isolated from the salivary glands of mosquitoes infected with PbGFP or PbB9-Flag parasites (mean +/- SD; $p = 0.2893$, Two-tailed ratio paired t test). **b**, Infection rates of PbGFP and PbB9-Flag parasites were determined in HepG2 cells 24 hours post-infection. The results show the percentage of invaded (GFP-positive) cells as determined by FACS (mean +/- SD; $p = 0.6768$, Two-tailed ratio paired t test). **c**,

Immunofluorescence analysis of PbGFP and PbB9-Flag sporozoites labelled with anti-Flag antibodies (red). Parasites express GFP (green) and nuclei were stained with Hoechst 77742 (blue). Scale bar, 10 μm . **d**, Localization of B9 in sporozoites. First panel, confocal image of GFP (green); second panel, visualization of B9-Flag (red) using 2D STED (maximum intensity projection). Scale bar, 2 μm . **e**, STED images of a B9-flag sporozoite labelled with anti-AMA1 (red) and anti-Flag (cyan) antibodies. Scale bar, 2 μm (200 nm in insets). **f**, Immunoblot of B9-Flag sporozoite pellets and supernatants in control conditions (4°C) or after stimulation of microneme secretion (37°C), using anti-Flag or anti-GFP antibodies. The data shown are representative of three independent experiments.

B9 contains a CyRPA-like beta propeller domain

To get more insights into B9 properties, we investigated sequence and structural features of the protein using *P. falciparum* B9 as the reference sequence. Both hydrophobic cluster analysis and secondary structure prediction of B9 suggested that the whole sequence contains some strand and helix structures (**Supplementary Fig. 4**). However, no annotated conserved domain was detected at the sequence level using InterPro. In sharp contrast, three domains were predicted at the structural level using HHpred: an N-terminus propeller domain similar to that of CyRPA (e-value: 5.4e-03) encoded by the first exon, and two putative but poorly supported 6-cys domains encoded by the second exon (e-value > 1) (**Fig. 4a**). CyRPA is a cysteine-rich protein expressed in *P. falciparum* merozoites, where it forms a protein complex that is essential for invasion of erythrocytes^{42,43}. B9 is enriched in cysteines, nine being located in the predicted propeller domain that we suppose are involved in the formation of disulphide bonds in a similar manner to CyRPA⁴⁴, to stabilize the protein structure (**Fig. 4a**).

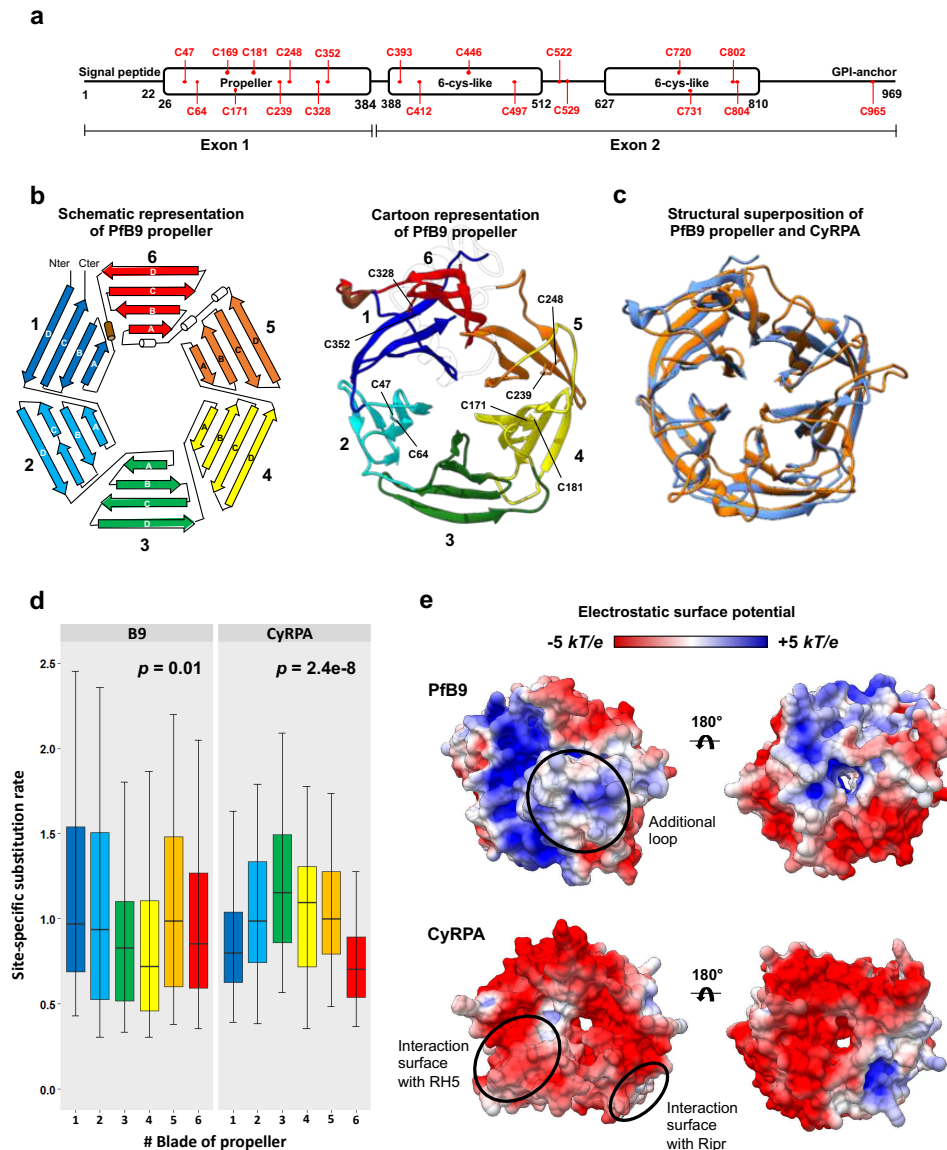
Fig 4

Figure 4. Structural and evolutionary features of B9 propeller. **a**, Predicted B9 conserved domains. Pfb9 was used as the reference sequence. Cysteines are indicated in red. The delimitation of the domains is based on the HHpred results. B9 is composed of two exons, the first one covering the whole propeller domain. **b**, Predicted tertiary structure of Pfb9 propeller. The predicted model is indicated as a schematic representation (*left*) and as cartoon (*right*). Each of the six blades is indicated with a specific color, labeled 1 to 6, and is composed of four-stranded anti-parallel beta-sheet, labeled A to D. The four disulfide bridges found in Pfb9 are indicated. The long loop connecting blades 5 and 6 in the cartoon representation is transparent for ease of representation. **c**, Structural superposition of Pfb9 propeller with

CyRPA. PfB9 and CyRPA are respectively colored in blue and orange. Both superposition and RMSD calculation were based on all Ca atoms using the *MatchMaker* function in UCSF Chimera. **d**, Conservation level of the six blades of B9 propeller and CyRPA. Site-specific rates were estimated using the GP4Rate tool, and were compared between the six blades using non-parametric Kruskal-Wallis *H* test. Box boundaries represent the first and third quartiles and the length of whiskers correspond to 1.5 times the interquartile range. **e**, Electrostatic surface potential of PfB9 propeller and CyRPA structures, estimated with the APBS method. Electrostatic potential values are in units of kT/e at 298 K, on a scale of -5 kT/e (red) to $+5$ kT/e (blue). White color indicates a neutral potential. The missing charges were added using the Add Charge function implemented in UCSF Chimera. The additional long loop connecting blades 5 and 6 of PfB9 propeller and the interaction surfaces of CyRPA with Rh5 and Ripr are indicated with circles.

To explore the structural features of the B9 propeller, we predicted the tertiary structure of PfB9 propeller (covering positions 26 to 386) by homology modelling using CyRPA as a template structure⁴⁴ (PDB ID: 5TIH; **Supplementary File 1; Supplementary Fig. 5**). As expected, PfB9 adopted a six-bladed propeller structure, with each blade being composed of four-stranded anti-parallel beta-sheets (**Fig. 4b**). Four disulphide bonds were predicted within the blades which may stabilize each individual blade of the PfB9 propeller (C47-C64, C171-C181, C239-C248, C328-C352; **Fig. 4b**). Furthermore, a long loop connecting blades 5 and 6 and containing three putative short helices was observed in the PfB9 propeller, which was not found in CyRPA and in most *Plasmodium* B9 proteins (such as PbB9 and PyB9; **Supplementary Fig. 6**). This partially structured region is supported by intrinsic disorder prediction (**Supplementary Fig. 4**), in line with another characteristic of CyRPA, where the loop located on blade 5 likely becomes disordered to accommodate occupancy by a helix of Rh5⁴³. The model superimposed well with the CyRPA structure, except for some blade- and strand-connecting loops (RMSD: 3.8 Å; **Fig. 4c**). This similar fold, in addition to the binding

activities of CyRPA (targeting Rh5 and Ripr⁴³), suggests that the B9 propeller may promote protein-protein interactions.

Since CyRPA is functionally annotated and its binding properties are known, we checked whether the B9 propeller and CyRPA shared a common evolutionary history, which could help to predict the functional sites in the B9 propeller. For this, we generated two datasets consisting of distinct *Plasmodium* B9 (n = 23) or CyRPA (n = 18) sequences (**Supplementary Tables 1 and 2**). Multiple sequence alignments and corresponding phylogenetic trees of these datasets (**Supplementary Files 2 and 3**, and **Supplementary Fig. 7**) were then used concomitantly with their respective tertiary structures to estimate spatially correlated site-specific substitution rates using the GP4Rate tool (**Supplementary Tables 3 and 4**). The six blades were found to be heterogeneously conserved over time for both B9 and CyRPA (Kruskal-Wallis *H* test: B9: $p = 0.01$; CyRPA: $p = 2.4e-8$; **Fig. 4d**). Interestingly, we noticed distinct patterns of evolution between the two proteins: the most conserved blades of B9 propeller (3 and 4) are the less conserved ones in CyRPA (**Fig. 4d**). Because CyRPA interacts with Ripr through its most conserved blade⁴³, i.e. 6 (**Fig. 4d**), we logically hypothesize that the blades 3 and 4 of the B9 propeller may target putative partners. Finally, in concordance with different evolutionary histories, we note that the PfB9 propeller and CyRPA display a dissimilar electrostatic surface potential. While almost the entire surface of CyRPA (including the regions mediating interactions with Rh5 and Ripr) is electronegative, some parts of the PfB9 propeller are electropositive (**Fig. 4e**), thus suggesting different binding properties.

The propeller domain is required for B9 function

We next sought to define the functional importance of the predicted propeller domain, using a structure-guided genetic complementation strategy to evaluate the functionality of truncated B9 proteins (**Fig. 5a**). We assembled various constructs encoding the entire or partially deleted B9, all containing an intact signal peptide and C-terminus sequences to ensure correct secretion and GPI-anchoring of the protein (**Fig. 5b**).

Fig 5

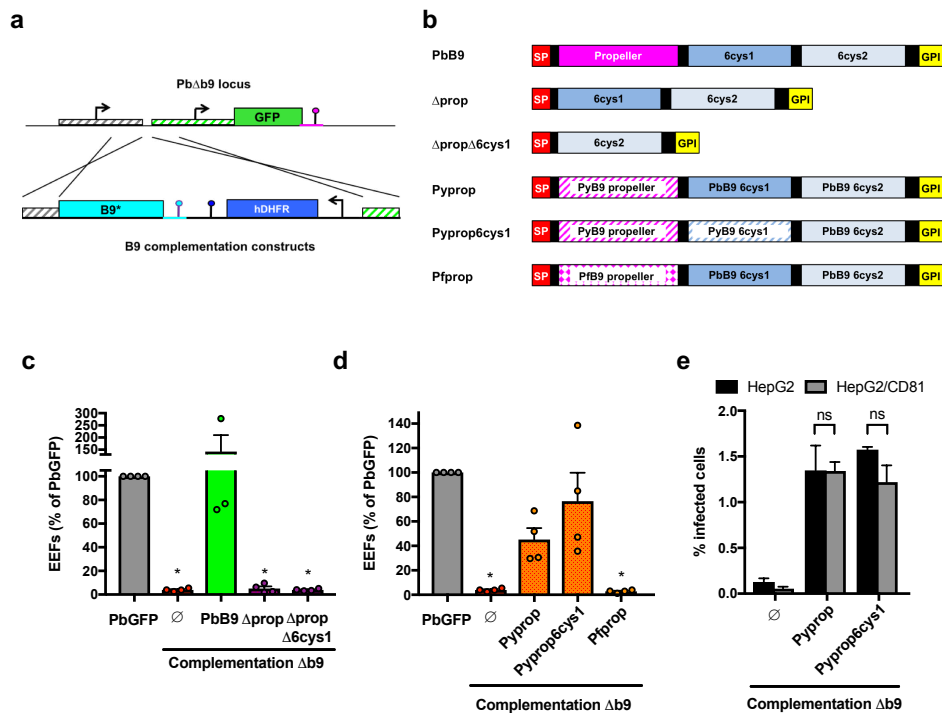


Figure 5. The propeller domain is required for B9 function during sporozoite invasion.

a, Strategy used to genetically complement Pb Δ b9 with different versions of B9 (indicated as B9*) by double crossover homologous recombination. **b**, Schematic representation of the B9 constructs used for genetic complementation. SP, signal peptide, GPI, glycosylphosphatidylinositol. **c**, Infection rates were determined by quantification of EEFs (GFP-positive cells) 24 h after infection of HepG2 cell cultures with sporozoites of PbGFP, Pb Δ b9 or Pb Δ b9 complemented with PbB9, Δ prop or Δ prop Δ 6cys1 constructs. Results are expressed as % of control (PbGFP). * $p < 0.05$ as compared to PbGFP (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). **d**, Infection rates were determined by quantification of EEFs (GFP-positive cells) 24 h after infection of HepG2 cell cultures with sporozoites of PbGFP, Pb Δ b9 or Pb Δ b9 complemented with Pyprop, Pyprop6cys1 or Pfprop constructs. Results are expressed as % of control (PbGFP). * $p < 0.05$ as compared to PbGFP (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). **e**, Infection rates in HepG2 or HepG2/CD81 cells infected with Pb Δ b9 or Pb Δ b9 complemented with PyProp or Pyprop6cys1 constructs were determined 24 hours post-infection. The results show the

percentage of invaded (GFP-positive) cells as determined by FACS (mean +/- SD). ns, non-significant (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test).

Constructs were used for transfection of the drug selectable marker-free *Pb* Δ *b9* mutant line. After confirmation of correct integration by genotyping PCR (**Supplementary Fig. 8**), genetically complemented parasites were transmitted to mosquitoes, and sporozoites were tested for infectivity in cell cultures. Complementation of *Pb* Δ *b9* sporozoites with a construct encoding the entire *PbB9* fully restored sporozoite infectivity in HepG2 cell cultures (**Fig. 5c**), validating the genetic complementation approach. In contrast, parasites complemented with a truncated B9 lacking the propeller domain, alone or in combination with the first 6-cys domain, were not infectious, phenocopying the parental B9-deficient parasites (**Fig. 5c**). These results show that the propeller domain is required for B9 function during sporozoite entry. Interestingly, chimeric B9 versions where the propeller domain of *PbB9* was replaced by the equivalent sequence from *PyB9* (*Pyprop*, *Pyprop6cys1*; **Fig. 5b**) restored sporozoite infectivity (**Fig. 5d**). In contrast, substitution of the *PfB9* propeller domain for the *PbB9* propeller (*Pfprop*; **Fig. 5b**) did not restore infectivity in complemented parasites (**Fig. 5d**). Interestingly, complementation with the *PyB9* propeller domain restored infection in both HepG2, which express SR-B1 but not CD81, and HepG2/CD81 cells, which express both receptors⁶, suggesting that the B9 propeller domain does not restrict host receptor usage (**Fig. 5e**).

The propeller domain of B9 interacts with P36 and P52

Our structural modelling revealed that B9 contains an N-terminus beta-propeller domain structurally similar to *CyRPA*. In *P. falciparum* merozoites, *CyRPA* interacts with Rh5 and Ripr to form a complex that is essential for invasion of erythrocytes^{42,43,45}. While Ripr is conserved among *Plasmodium* species, *CyRPA* is found in primate but not rodent parasites, and Rh5 is restricted to *P. falciparum* and other *Laverania* species⁴⁶. As Rh5 and Ripr are not expressed by sporozoites^{21,23,24}, we hypothesized that B9 might be involved in the formation

of distinct protein complexes in sporozoites. To test this hypothesis, we first performed co-immunoprecipitation experiments with anti-Flag antibodies, using protein extracts from B9-Flag sporozoites, followed by protein identification by mass spectrometry. However, B9 was the only protein consistently identified in three independent biological replicates by mass spectrometry (data not shown).

We considered that B9 might interact with other sporozoite proteins only at the time of host cell invasion, similarly to CyRPA, which interacts with Rh5 following secretion of merozoite apical organelles⁴². Because sporozoite invasion is a rare event that is difficult to address experimentally, we opted for an alternative strategy based on heterologous expression of sporozoite proteins in mammalian cells, to test for potential interactions between B9 and the 6-cys proteins P36 and P52 as candidate partners, a choice motivated by the shared phenotype of gene deletion mutants. For this purpose, we used a surface display approach to express *P. berghei* proteins at the surface of Hepa1-6 cells after transient transfection⁴⁷. Codon-optimized versions of the propeller domain of PbB9 (amino acids 31-348) or the tandem 6-cys domains of PbP36 (amino acids 67-352) were fused at the N-terminus to the signal peptide of the bee venom melittin (BVM), and at the C-terminus to a V5 epitope tag and the transmembrane domain of glycophorin A, followed by mCherry, C-Myc and 6xHis tags (**Fig. 6a**). As a control, we used an mCherry construct containing all elements except the B9 or P36 sequences. Codon-optimized versions of the tandem 6-cys domains of *P. berghei* P36 and P52 (amino acids 33-302) were expressed either as transmembrane proteins with 3xFlag and GFP tags, or as soluble secreted proteins (sol), with a 3xFlag epitope tag only at the C-terminus (**Fig. 6a**). Interaction between proteins was then tested in co-transfection experiments, by immunoprecipitation followed by western blot. Both P52-GFP (**Fig. 6b**) and P52-sol (**Fig. 6c**) proteins were co-immunoprecipitated with P36-mCherry but not with the control mCherry protein, validating the strategy and confirming the interaction between *P. berghei* P36 and P52 proteins. More importantly, these experiments showed that P36 and P52 co-immunoprecipitated with B9-mCherry, in both transmembrane (**Fig. 6b**) and soluble (**Fig. 6c**) configurations. These results strongly suggest that B9, P36 and P52 form a supramolecular

protein complex that, when considering the functional data in this study, appears to mediate productive invasion of hepatocytes by sporozoites.

Fig 6

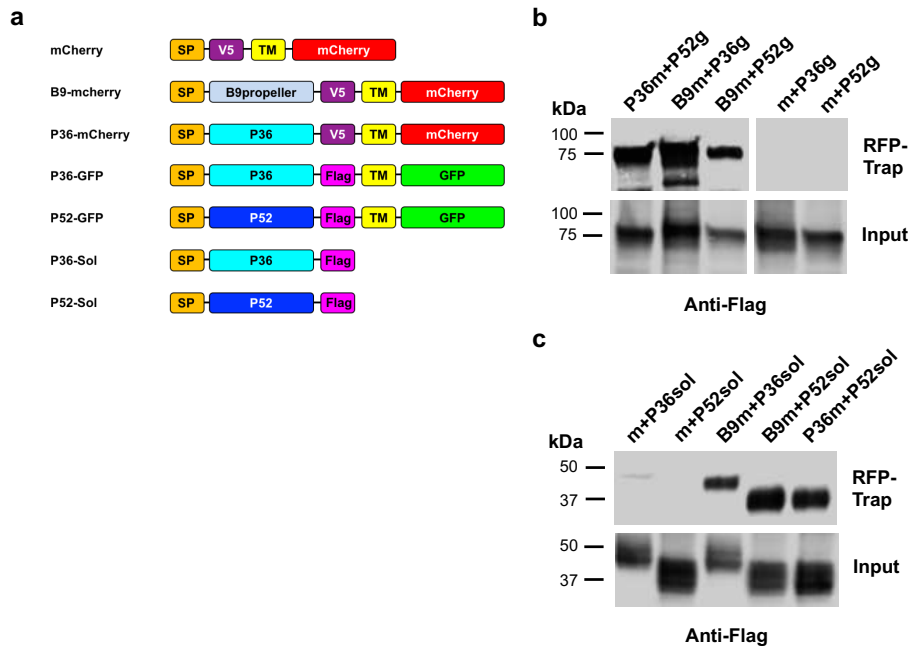


Figure 6. The propeller domain of B9 interacts with P36 and P52. **a**, Schematic representation of the constructs used for heterologous expression in mammalian cells. SP, signal peptide from the bee venom melittin; TM, transmembrane domain and C-terminal portion of mouse Glycophorin A. **b-c**, Hepa1-6 cells were transiently transfected with constructs encoding mCherry (m), B9-mCherry (B9m), or P36-mCherry (P36m) constructs, together with P36-GFP (P36g), P52-GFP (P52g), P36sol or P52sol constructs. Following immunoprecipitation of mCherry-tagged proteins, co-immunoprecipitated proteins (RFP-trap) and total extracts (input) were analysed by western blot using anti-Flag antibodies. The data shown are representative of three independent experiments.

DISCUSSION

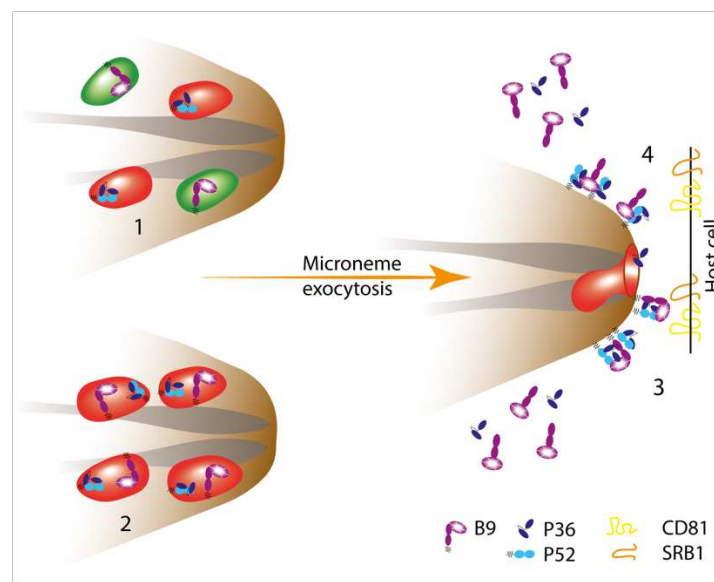
Productive invasion of hepatocytes is a crucial step following transmission of the malaria parasite by a mosquito, however the molecular mechanisms involved remain poorly understood. Until now, only two sporozoite-specific proteins, the 6-cys proteins P36 and P52, have been associated with productive host cell invasion^{6,8}. Here we identify another member of the 6-cys family, B9, as a crucial entry factor. Our data contradict in part those from a previous study, where the authors concluded that B9 is not expressed in sporozoites and is not involved in parasite entry, based mainly on indirect assays¹⁵. In this study, we demonstrate through genetic tagging that B9 is expressed in *P. berghei* sporozoites, corroborating mass spectrometry data²¹⁻²⁴. Direct quantification of invasion by flow cytometry established that *PbΔb9* parasites have an invasion defect. In addition, *PbΔb9* sporozoites do not discharge their rhoptries upon contact with host cells, similar to *PbΔp36* sporozoites, indicating that both proteins are acting at an early step during invasion. We further provide evidence that B9 interacts with P36 and P52, suggesting that the three proteins participate in an invasion complex that is required for productive invasion of hepatocytes.

Comparison of profile hidden Markov models between PfB9 and tertiary structure database identified an N-terminus beta propeller domain structurally similar to CyRPA, a cysteine-rich protein expressed in *P. falciparum* merozoites, where it forms a protein complex that is essential for invasion of erythrocytes^{42,43}. Our data suggest that the propeller domain of B9 directly interacts with both P36 and P52. We speculate that blades 3 and 4 of the propeller, which are the most conserved, could be involved in these interactions. Interestingly, the interaction of B9 with P36 and P52 was detected using a heterologous expression system but not by co-IP from sporozoite protein extracts. This observation suggests that B9 may interact with P36 and P52 only after parasite activation, similar to CyRPA, which forms a complex with Rh5 and Ripr only at the time of merozoite invasion in *P. falciparum*⁴². B9 was secreted from sporozoites upon stimulation of microneme exocytosis, as described previously with P36 in *P. yoelii*¹¹. B9 shedding could be associated with proteolytic processing, as suggested by the differential migration pattern in western blots. This suggests two possible models, where B9

may bind to P36/P52 either as a membrane-bound or as a free form (**Fig. 7**). Interestingly, although B9 displayed a typical micronemal distribution, it did not colocalize with AMA1. This observation supports the hypothesis that sporozoites contain discrete subsets of micronemes, associated with specific functions⁴.

Figure 7. Model for B9 interaction with P36 and P52 for sporozoite host cell invasion. B9 may localize in distinct (1) or same (2) micronemes as P36 and P52. Upon microneme exocytosis, the three proteins are released onto the sporozoite surface where B9 could

Fig 7



associate with P36 and P52, either as a membrane-bound form (3) or as a processed form (4). The complex may participate in direct or indirect interactions with host cell receptors, including CD81 and SRB1, to trigger commitment to productive host cell invasion.

P. berghei and *P. yoelii* sporozoites use different pathways to invade hepatocytes, with the latter being strictly dependent on CD81, like *P. falciparum*^{5,7}. Inter-species complementation experiments have shown that P36 (but not P52) is a key determinant of this differential usage of host receptors⁶. Using a similar approach, we show that the propeller domain of PyB9 can functionally replace the homologous sequence in PbB9, however without

altering host receptor usage. This suggests that the B9 propeller does not directly participate in interaction with host receptors. Rather, we hypothesize that B9 may regulate the trafficking and/or binding of P36 to host cells, possibly by concentrating P36-P52 complexes at the surface of the parasite. In contrast, substituting the PfB9 propeller for the *P. berghei* domain abolished protein function, possibly because of impaired interactions with *P. berghei* P36 and/or P52. In this regard, the PfB9 and PbB9 propeller domains show only 48% identity at the amino acid level, versus 90% between PyB9 and PbB9 domains (**Supplementary Fig. 6**). Reciprocally, the essential role of B9 in assembling invasion complexes with P36 and P52 could also explain why *P. falciparum* and *P. vivax* P36 and P52 failed to compensate for the absence of their counterparts in *P. berghei*⁶, as these proteins may not associate with PbB9 to form functional complexes.

Interestingly, an improved version of the neural network-based model AlphaFold⁴⁸ predicts that the C-terminus portion of B9 is organized in three beta sandwiches rather than two (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). The structures of these domains and their function remain to be experimentally determined. While our data suggest that B9 6-cys-like domains are not required for interaction with P36 and P52, they might regulate the activity of the propeller and/or participate in interactions with host cell surface molecules.

In conclusion, this study reveals that the 6-Cys protein B9 is required for productive host cell invasion by sporozoites. B9 contains a functionally important beta-propeller domain that is likely involved in the formation of a supramolecular protein complex with P36 and P52. Our results suggest that *Plasmodium* sporozoites and merozoites, despite using distinct sets of parasite and host entry factors, may share common structural modules to assemble protein complexes for invasion of host cells. The complex formed by B9, P36 and P52 proteins may represent a potential target for intervention strategies to prevent the initial stages of malaria liver infection.

METHODS

Ethics Statement

All mouse 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. Protocols were approved by the Ethical Committee Charles Darwin N°005 (approval #7475-2016110315516522).

Experimental animals, parasites, and cell lines

P. berghei and *P. yoelii* blood stage parasites were propagated in female Swiss mice (6–8 weeks old, from Janvier Labs). 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* locus²⁵. *Anopheles stephensi* mosquitoes were fed on *P. berghei* or *P. yoelii*-infected mice using standard methods⁴⁹, 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. *P. berghei* and *P. yoelii* sporozoite infections were performed in female C57BL/6 or BALB/c mice, respectively (6 weeks old, from Janvier Labs), by intravenous injection in a tail vein. HepG2 (ATCC HB-8065), HepG2/CD81⁴⁰ and Hepa1-6 cells (ATCC CRL-1830) were cultured at 37°C under 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (Life Technologies), as described⁷. HepG2 and HepG2/CD81 were cultured in culture dishes coated with rat tail collagen I (Becton-Dickinson).

Gene deletion of *p12p*, *p38* and *b9* in *P. berghei* and *P. yoelii*

Gene deletion mutant parasites were generated using our “Gene Out Marker Out” (GOMO) strategy²⁵. For each target gene, a 5' fragment and a 3' fragment were amplified by PCR from *P. berghei* (ANKA) or *P. yoelii* (17XNL) WT genomic DNA, using primers listed in **Supplementary Table 5**, and inserted into *SacII/NotI* and *XhoI/KpnI* restriction sites, respectively, of the GOMO-GFP vector²⁵, using the In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech). The

resulting targeting constructs were linearized with *Sac*II and *Kpn*I before transfection. All constructs used in this study were verified by DNA sequencing (Eurofins Genomics). Purified schizonts of *P. berghei* ANKA or *P. yoelii* 17XNL WT parasites were transfected with targeting constructs by electroporation using the AMAXA Nucleofector™ device, as described⁵⁰, and immediately injected intravenously in mice. GFP-expressing parasite mutants were then isolated by flow cytometry after positive and negative selection rounds, as described²⁵. Parasite genomic DNA was extracted using the Purelink Genomic DNA Kit (Invitrogen), and analysed by PCR using primer combinations specific for WT, 5' or 3' recombined and marker excised loci (listed in **Supplementary Table 6**).

Genetic tagging of RON4 and B9

Fusion of mCherry at the C-terminus of RON4 was achieved through double crossover homologous recombination. For this purpose, 5' and 3' homology fragments, consisting of a 1.2 kb terminal RON4 fragment (immediately upstream of the stop codon) and a 0.6 kb downstream fragment were amplified by PCR using primers listed in **Supplementary Table 7**, and cloned into *Not*I/*Spe*I and *Hind*III/*Kpn*I sites, respectively, of the B3D+mCherry plasmid⁵¹. The resulting construct was linearized with *Not*I and *Kpn*I before transfection of PbGFP, PbΔ*b9* or PbΔ*p36* purified schizonts. Recombinant parasites were selected with pyrimethamine and cloned by limiting dilution and injection into mice. Integration of the construct was confirmed by PCR on genomic DNA using specific primer combinations listed in **Supplementary Table 7**. Tagging of *P. berghei* B9 with a triple Flag epitope was achieved by double crossover homologous recombination with the endogenous *B9* gene locus. For this purpose, three inserts were amplified by PCR and sequentially inserted in two steps using the In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech). In the first step, a 3' homology 736-bp fragment was cloned into the *Nhe*I site in a plasmid containing a GFP-2A-hDHFR cassette under control of the *P. yoelii* HSP70 promoter. In the second step, a 5' homology 759-bp fragment from B9 ORF and a 789-bp fragment comprising a triple Flag epitope, a recodonized B9 C-terminus sequence and the 3' UTR of PyB9 were inserted into *Kpn*I/*Eco*RI sites of the plasmid. Primers used to assemble

the B9 tagging construct and the sequence of the synthetic gene are listed in **Supplementary Table 8**. The resulting construct was linearized with *KpnI* and *NheI* before transfection of WT *P. berghei* (ANKA) parasites. Recombinant parasites were selected with pyrimethamine and cloned by limiting dilution and injection into mice. Integration of the construct was confirmed by PCR on genomic DNA using specific primer combinations listed in **Supplementary Table 8**.

Structure-guided mutagenesis of *P. berghei* B9

Genetic complementation of *PbΔb9* parasites was achieved by double crossover homologous recombination using a vector containing a hDHFR cassette and a 3' homology arm corresponding to the 5' sequence of the HSP70 promoter of the GFP cassette in the *PbΔb9* line. First, an 840-bp fragment including the coding sequence for *PbB9* N-terminus (amino acids 1-29), and a 1096-bp fragment encoding the C-terminus (amino acids 647-852) followed by the 3' UTR of *PbB9* were sequentially inserted into the plasmid, in *KpnI/EcoRI* sites, resulting in the $\Delta\text{prop}\Delta\text{6cys1}$ construct. Cloning of a 1950-bp fragment of *PbB9* gene (including the coding sequence for amino acids 30-646) into *XhoI/KpnI* sites of the $\Delta\text{prop}\Delta\text{6cys1}$ plasmid resulted in the *PbB9* construct, encoding the full length *PbB9* protein. Cloning of a 912-bp fragment of *PbB9* gene (including the coding sequence for amino acids 344-646) into *XhoI/KpnI* sites of the $\Delta\text{prop}\Delta\text{6cys1}$ plasmid resulted in the Δprop construct. Cloning of a 1992-bp fragment from *PyB9* gene (including the coding sequence for amino acids 30-653 of *PyB9*) into *XhoI/KpnI* sites of the $\Delta\text{prop}\Delta\text{6cys1}$ plasmid resulted in the *PyProp6cys1* construct. Cloning of a 948-bp fragment from *PyB9* gene (encoding amino acids 30-342 of *PyB9*) and a 903-bp fragment from *PbB9* gene (encoding amino acids 346-646 of *PbB9*) into *XhoI/KpnI* sites of the $\Delta\text{prop}\Delta\text{6cys1}$ plasmid resulted in the *PyProp* construct. Cloning of a 1071-bp fragment from *PfB9* gene (encoding amino acids 25-379 of *PfB9*) and a 903-bp fragment from *PbB9* gene (encoding amino acids 346-646 of *PbB9*) into *XhoI/KpnI* sites of the $\Delta\text{prop}\Delta\text{6cys1}$ plasmid resulted in the *PfProp* construct. The primers used to assemble the constructs for genetic complementation are listed in **Supplementary Table 9**. The constructs were linearized

with *NheI* before transfection of *PbΔb9* purified schizonts. Recombinant parasites were selected with pyrimethamine. Integration of the constructs was confirmed by PCR on genomic DNA using specific primer combinations listed in **Supplementary Table 9**.

Sporozoite invasion assays

Host cell invasion by GFP-expressing sporozoites was monitored by flow cytometry⁵². 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). For measurement of cell traversal activity, sporozoites were incubated with cells in the presence of 0.5 mg/ml rhodamine-conjugated dextran (Life Technologies). Three hours post-infection, cell cultures were washed, trypsinized and analysed on a Guava EasyCyte 6/2L bench cytometer equipped with 488 nm and 532 nm lasers (Millipore), for detection of GFP-positive cells and dextran-positive cells, respectively. To assess liver stage development, HepG2 or HepG2/CD81 cells were infected with GFP-expressing sporozoites and cultured for 24-36 hours before analysis either by FACS or by fluorescence microscopy, after fixation with 4% PFA and labeling with antibodies specific for UIS4 (Sicgen).

Fluorescence microscopy

To visualize RON4-mCherry in transgenic parasites, purified schizonts and sporozoites were deposited on poly-L-lysine coated coverslips and fixed with 4% PFA. GFP and mCherry images were captured on a Zeiss Axio Observer.Z1 fluorescence microscope equipped with a Plan- Aplanachromat 63×/1.40 Oil DIC M27 objective. Images acquired using the Zen 2012 software (Zeiss) were processed with ImageJ or Photoshop CS6 software (Adobe) for adjustment of contrast. To quantify rhoptry discharge, RON4-mCherry expressing *PbGFP*, *PbΔb9* or *PbΔp36* sporozoites were incubated with HepG2 cells for 3 h at 37°C. After extensive washes to remove extracellular parasites, cultures were trypsinized and cells were examined under a fluorescence microscope to assess for mCherry fluorescence in GFP-expressing intracellular sporozoites. At least 50 intracellular parasites in triplicate wells were examined for

each parasite line. The percentage of rhoptry discharge was defined as the proportion of intracellular sporozoites without detectable RON4-mCherry signal. For immunofluorescence analysis of B9-Flag parasites, sporozoites collected from infected mosquito salivary glands were deposited on poly-L-lysine coated coverslips, fixed with 4% PFA and permeabilized with 1% Triton X-100. Parasites were labelled with anti-Flag mouse antibodies (M2 clone, Sigma) and AlexaFluor 594-conjugated secondary antibodies (Life Technologies). Nuclei were stained with Hoechst 77742. For double labelling of B9 and AMA1, we used anti-Flag mouse antibodies (M2 clone, Sigma) and anti-AMA1 rat antibodies⁵³ (clone 28G2, Bei Resources), followed by atto647N-conjugated anti-mouse and Alexa-594-conjugated anti-rat antibodies. Coverslips were mounted on glass slides with ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Life Technologies). STED imaging was carried out with a 93x glycerol-immersion objective (NA 1.3) on a Leica TCS SP8 STEDX microscope equipped with a White Light Laser. AlexaFluor 594 and atto647N-labelled compartments were excited at 590 or 644 nm, respectively, and depleted with a pulsed 775 nm STED laser. Image frames were acquired sequentially frame by frame at a scan speed of 200 lines/s with an optimal pixel size and a line average of 4 to 8. Deconvolution of STED data was performed using the default deconvolution settings in Huygens Professional Deconvolution software v18.10 (Scientific Volume Imaging) that were estimated from the metadata. Brightness and Contrast were adjusted using Fiji⁵⁴.

Western blot

B9-Flag sporozoites were isolated from the salivary glands of infected mosquitoes and resuspended in 1X PBS. Microneme secretion was stimulated by incubation for 15 min at 37°C in a buffer containing 1% BSA and 1% ethanol, as described⁵⁵. Pellet and supernatant fractions were then isolated from activated and non-activated (control) sporozoites, resuspended in Laemmli buffer and analysed by SDS-PAGE under non-reducing conditions. Western blotting was performed using primary antibodies against the Flag epitope (M2 clone, Sigma) or against GFP (loading control), and secondary antibodies coupled with Alexa Fluor 680. Membranes were then analysed using the InfraRed Odyssey system (Licor).

Heterologous expression of *Plasmodium* proteins in Hepa1-6 cells

Two vectors for mammalian cell expression were first assembled in a pEF1 α -AcGFP1-N1 backbone. The first one (mCherry) encodes a cassette consisting of the signal peptide from bee venom melittin (BVM), a V5 epitope, the transmembrane and C-terminus of mouse Glycophorin A (GYPA), mCherry, Myc and 6xHis tags. In the second one (GFP), the cassette encodes the signal peptide from BVM, a 3xFlag epitope, the transmembrane and C-terminus of mouse GYPA, and GFP. Codon-optimized versions of PbB9 propeller domain (amino acids 31-348), PbP36 (amino acids 67-352) or PbP52 (amino acids 33-302) were inserted in the mCherry and/or GFP plasmids between the signal peptide and the Flag or V5 epitope tag. Two additional constructs for expression of soluble PbP36 and PbP52 were obtained by adding a stop codon immediately after the 3xFlag epitope. The construct cassette sequences are indicated in **Supplementary Table 10**. High concentration plasmid solutions were produced using XL1-Blue Competent Cells (Agilent) and plasmid extraction was performed using Qiagen Plasmid Maxikit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Plasmid transfection was performed in Hepa1-6 cells using the Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's specifications. Following plasmid transfection, cells were cultured for 24 h before lysis in a buffer containing 1% NP40. Protein extracts were then subjected to immunoprecipitation using agarose beads coupled with anti-RFP nanobodies (Chromotek). Eluates were collected and analysed by western blot, using anti-Flag antibodies. Membranes were analysed using the InfraRed Odyssey system (Licor).

B9 immunoprecipitation and mass spectrometry

Freshly dissected B9-Flag sporozoites were lysed on ice for 30 min in a lysis buffer containing 0.5% w/v NP40 and protease inhibitors. After centrifugation (15,000 \times g, 15 min, 4°C), supernatants were incubated with protein G-conjugated sepharose for preclearing overnight. Precleared lysates were subjected to B9-Flag immunoprecipitation using Anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) for 2h at 4°C, according to the manufacturer's protocol. PbGFP parasites

with untagged B9 were used as a control and treated in the same fashion. After washes, proteins on beads were eluted in 2X Laemmli and denatured (95°C, 5min). After centrifugation, supernatants were collected for further analysis. Samples were subjected to a short SDS-PAGE migration, and gel pieces were processed for protein trypsin digestion by the DigestProMSi robot (Intavis), as described²¹. Peptide samples were analysed on a timsTOF PRO mass spectrometer (Bruker) coupled to the nanoElute HPLC, as described²¹. Mascot generic files were processed with X!Tandem pipeline (version 0.2.36) using the PlasmoDB_PB_39_PbergheiANKA database, as described²¹.

Structural analyses of B9 propeller

The secondary structure of PfB9 was predicted by hydrophobic cluster analysis⁵⁶ and using PSIPRED 4.0⁵⁷. Conserved domains were searched using InterPro⁵⁸ and HHpred⁵⁹. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors were predicted using the NetGPI tool (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetGPI>)⁶⁰. Intrinsic disorder prediction was made using the IUPred2A web server (<https://iupred2a.elte.hu/>)⁶¹. The homology model of PfB9 propeller (amino acids 26 to 386) was built with the X-ray structure at 2.4 Å resolution of CyRPA from *P. falciparum* (PDB ID: 5TIH⁴⁴) using the Robetta web server⁶² (default parameters). The model was refined and energy-minimized using respectively GalaxyRefine⁶³ and Yasara⁶⁴, then validated using MolProbity⁶⁵ and Prosa II⁶⁶ (**Supplementary Fig. 5**). Structural alignment of PfB9 propeller and CyRPA was performed using the *MatchMaker* function in UCSF Chimera⁶⁷. Protein electrostatic surface potential was calculated using Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS⁶⁸), after determining the per-atom charge and radius of the structure with PDB2PQR v.2.1.1⁶⁹. The Poisson-Boltzmann equation was solved at 298 K using a grid-based method, with solute and solvent dielectric constants fixed at 2 and 78.5, respectively. We used a scale of $-5 kT/e$ to $+5 kT/e$ to map the electrostatic surface potential in a radius of 1.4 Å. All tertiary structures were visualized and drawn using UCSF Chimera⁶⁷.

Evolutionary analysis of B9 and CyRPA

The amino acid sequence of PfB9 (PlasmoDB code: PF3D7_0317100) and CyRPA (PF3D7_0423800) were queried against the PlasmoDB database⁷⁰ (release 46) and the NCBI non-redundant protein database using blastp searches (BLOSUM62 scoring matrix). Twenty-three B9 and eighteen CyRPA sequences were retrieved from distinct *Plasmodium* species. Protein sequence alignments were generated using MAFFT version 7 (default parameters⁷¹). Output alignments were visually inspected and manually edited with BioEdit v7.2.5. Amino acid positions containing gaps in at least 30% of all sequences were removed. Phylogenetic relationships of B9 and CyRPA amino acid sequences were inferred using the maximum-likelihood method implemented in PhyML v3.0⁷², after determining the best-fitting substitution model using the Smart Model Selection (SMS) package⁷³. The nearest neighbour interchange approach was chosen for tree improving, and branch supports were estimated using the approximate likelihood ratio aLRT SH-like method⁷⁴. Site-specific substitution rates were estimated by considering their spatial correlation in tertiary structure using the GP4Rate tool⁷⁵. GP4rate requires an amino acid sequence alignment, a phylogenetic tree and a protein tertiary structure to estimate the conservation level during species evolution and the characteristic length scale (in Å) of spatially correlated site-specific substitution rates. For B9, we used the refined tertiary structure predicted by Robetta, while we chose the X-ray structure resolved at 2.4 Å resolution for CyRPA (PDB ID: 5TIH⁴⁴).

Statistical analysis

Statistical significance of infection data was assessed by Mann-Whitney test or One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. Survival curves were analyzed using the Log rank Mantel-Cox test. All statistical tests were computed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). *In vitro* experiments were performed with a minimum of three technical replicates per experiment. Statistical analyses for structural modelling were performed using the computing environment R version 3.5.2 (R Foundation for Statistical Computing).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jean-François Franetich, Maurel Tefit and Thierry Houpert for rearing of mosquitoes. The following reagent was obtained through BEI Resources, NIAID, NIH: Monoclonal Anti-Plasmodium Apical Membrane Antigen 1, Clone 28G2 (produced in vitro), MRA-897A, contributed by Alan W. Thomas. This work was funded by grants from the Laboratoire d'Excellence ParaFrap (ANR-11-LABX-0024), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE15-0004) and the Fondation pour la Recherche Médicale (EQU201903007823). The authors acknowledge the Conseil Régional d'Ile-de-France, Sorbonne Université, the National Institute for Health and Medical Research (INSERM) and the Biology, Health and Agronomy Infrastructure (IBiSA) for funding the timsTOF PRO. ML was supported by a 'DIM 1Health' doctoral fellowship awarded by the Conseil Régional d'Ile-de- France.

REFERENCES

1. World Health Organization. World Malaria Report 2019. 1–232 (2019).
2. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* **386**, 31–45 (2015).
3. Risco-Castillo, V. *et al.* Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles. *Cell Host Microbe* **18**, 593–603 (2015).
4. Loubens, M. *et al.* Plasmodium sporozoites on the move: switching from cell traversal to productive invasion of hepatocytes. *Mol. Microbiol.* (2020). doi:10.1111/mmi.14645
5. Silvie, O. *et al.* Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nat. Med.* **9**, 93–96 (2003).
6. Manzoni, G. *et al.* Plasmodium P36 determines host cell receptor usage during sporozoite invasion. *Elife* **6**, e25903 (2017).
7. Silvie, O., Franetich, J. F., Boucheix, C., Rubinstein, E. & Mazier, D. Alternative invasion pathways for plasmodium berghei sporozoites. *Int. J. Parasitol.* **37**, 173–182 (2007).
8. Ishino, T., Chinzei, Y. & Yuda, M. Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Mol. Microbiol.* **58**, 1264–1275 (2005).
9. Labaied, M. *et al.* Plasmodium yoelii sporozoites with simultaneous deletion of P52 and P36 are completely attenuated and confer sterile immunity against infection. *Infect. Immun.* **75**, 3758–3768 (2007).
10. van Schaijk, B. C. *et al.* Gene disruption of Plasmodium falciparum p52 results in attenuation of malaria liver stage development in cultured primary human hepatocytes. *PLoS One* **3**, e3549 (2008).
11. Arredondo, S. A. *et al.* The Micronemal Plasmodium Proteins P36 and P52 Act in Concert to Establish the Replication-Permissive Compartment Within Infected Hepatocytes. **8**, 413 (2018).
12. Kaushansky, A. *et al.* Malaria parasites target the hepatocyte receptor EphA2 for successful host infection. *Science* **350**, 1089–1092 (2015).
13. Langlois, A. C., Marinach, C., Manzoni, G. & Silvie, O. Plasmodium sporozoites can invade hepatocytic cells independently of the ephrin receptor A2. *PLoS One* **13**, e0200032 (2018).

14. Arredondo, S. A. & Kappe, S. H. I. The s48/45 six-cysteine proteins: mediators of interaction throughout the Plasmodium life cycle. *International Journal for Parasitology* **47**, 409–423 (2017).
15. Annoura, T. *et al.* Two Plasmodium 6-Cys family-related proteins have distinct and critical roles in liver-stage development. *FASEB J.* **28**, 2158–2170 (2014).
16. Taechalertpaisarn, T. *et al.* Biochemical and functional analysis of two plasmodium falciparum blood-stage 6-Cys proteins: P12 and P41. *PLoS One* **7**, (2012).
17. Kennedy, A. T. *et al.* Recruitment of Factor H as a Novel Complement Evasion Strategy for Blood-Stage Plasmodium falciparum Infection . *J. Immunol.* **196**, (2016).
18. Kumar, N. Target antigens of malaria transmission blocking immunity exist as a stable membrane bound complex. *Parasite Immunol.* **9**, 321–335 (1987).
19. Simon, N. *et al.* Sexual stage adhesion proteins form multi-protein complexes in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J. Biol. Chem.* **284**, (2009).
20. Molina-Cruz, A. *et al.* Plasmodium falciparum evades immunity of anopheline mosquitoes by interacting with a Pfs47 midgut receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, (2020).
21. Hamada, S. *et al.* In-depth proteomic analysis of Plasmodium berghei sporozoites using trapped ion mobility spectrometry with parallel accumulation-serial fragmentation. *Proteomics* **21**, (2021).
22. Lasonder, E. *et al.* Proteomic profiling of Plasmodium sporozoite maturation identifies new proteins essential for parasite development and infectivity. *PLoS Pathog.* **4**, (2008).
23. Lindner, S. E. *et al.* Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites. *Mol Cell Proteomics* **12**, 1127–1143 (2013).
24. Swearingen, K. E. *et al.* Proteogenomic analysis of the total and surface-exposed proteomes of Plasmodium vivax salivary gland sporozoites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005791 (2017).
25. Manzoni, G. *et al.* A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites. *Sci Rep* **4**, 4760 (2014).
26. Lindner, S. E. *et al.* Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 1127–1143 (2013).
27. Swearingen, K. E. *et al.* Interrogating the Plasmodium Sporozoite Surface: Identification

- of Surface-Exposed Proteins and Demonstration of Glycosylation on CSP and TRAP by Mass Spectrometry-Based Proteomics. *PLoS Pathog.* **12**, e1005606 (2016).
28. Treeck, M., Sanders, J. L., Elias, J. E. & Boothroyd, J. C. The Phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* Reveal Unusual Adaptations Within and Beyond the Parasites' Boundaries. *Cell Host Microbe* **10**, 410–419 (2011).
 29. Oehring, S. C. *et al.* Organellar proteomics reveals hundreds of novel nuclear proteins in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Biol.* **13**, (2012).
 30. Lasonder, E. *et al.* Integrated transcriptomic and proteomic analyses of *P. falciparum* gametocytes: molecular insight into sex-specific processes and translational repression. *Nucleic Acids Res.* **44**, 6087–101 (2016).
 31. Pease, B. N. *et al.* Global analysis of protein expression and phosphorylation of three stages of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development. *J. Proteome Res.* **12**, 4028–45 (2013).
 32. Silvestrini, F. *et al.* Protein export marks the early phase of gametocytogenesis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 1437–48 (2010).
 33. Khan, S. M. *et al.* Proteome Analysis of Separated Male and Female Gametocytes Reveals Novel Sex-Specific *Plasmodium* Biology. *Cell* **121**, 675–687 (2005).
 34. Lindner, S. E. *et al.* Transcriptomics and proteomics reveal two waves of translational repression during the maturation of malaria parasite sporozoites. *Nat. Commun.* **10**, 4964 (2019).
 35. van Dijk, M. R. *et al.* Three members of the 6-cys protein family of *Plasmodium* play a role in gamete fertility. *PLoS Pathog.* **6**, e1000853 (2010).
 36. Bushell, E. *et al.* Functional Profiling of a *Plasmodium* Genome Reveals an Abundance of Essential Genes. *Cell* **170**, 260-272.e8 (2017).
 37. Manzoni, G., Briquet, S. & Risco-Castillo, V. A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2014).
 38. Risco-Castillo, V. Malaria sporozoites traverse cells within transient vacuoles. *Cell Host Microbe* (2015).
 39. Mueller, A. K., Labaled, M., Kappe, S. H. I. & Matuschewski, K. Genetically modified

- Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* **433**, 164–167 (2005).
40. Silvie, O. *et al.* Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the Plasmodium species. *Cell. Microbiol.* **8**, 1134–1146 (2006).
 41. Risco-Castillo, V. *et al.* CD81 is required for rhoptry discharge during host cell invasion by Plasmodium yoelii sporozoites. *Cell. Microbiol.* **16**, 1533–1548 (2014).
 42. Volz, J. C. *et al.* Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *Cell Host Microbe* **20**, 60–71 (2016).
 43. Wong, W. *et al.* Structure of Plasmodium falciparum Rh5–CyRPA–Ripr invasion complex. *Nature* **565**, 118–121 (2019).
 44. Chen, L. *et al.* Structural basis for inhibition of erythrocyte invasion by antibodies to plasmodium falciparum protein CyRPA. *Elife* **6**, (2017).
 45. Reddy, K. S. *et al.* Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for Plasmodium falciparum erythrocyte invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, (2015).
 46. Galaway, F., Yu, R., Constantinou, A., Prugnolle, F. & Wright, G. J. Resurrection of the ancestral RH5 invasion ligand provides a molecular explanation for the origin of P. Falciparum malaria in humans. *PLoS Biol.* **17**, (2019).
 47. Dreyer, A. M., Beauchamp, J., Matile, H. & Pluschke, G. An efficient system to generate monoclonal antibodies against membrane-associated proteins by immunisation with antigen-expressing mammalian cells. *BMC Biotechnol.* **10**, (2010).
 48. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, (2021).
 49. Ramakrishnan, C. *et al.* Laboratory maintenance of rodent malaria parasites. *Methods Mol Biol* **923**, 51–72 (2013).
 50. Janse, C. J., Ramesar, J. & Waters, A. P. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite Plasmodium berghei. *Nat. Protoc.* **1**, 346–356 (2006).
 51. Silvie, O., Goetz, K. & Matuschewski, K. A sporozoite asparagine-rich protein controls initiation of Plasmodium liver stage development. *PLoS Pathog.* **4**, (2008).

52. Prudêncio, M., Rodrigues, C. D., Ataíde, R. & Mota, M. M. Dissecting in vitro host cell infection by Plasmodium sporozoites using flow cytometry. *Cell. Microbiol.* **10**, 218–24 (2008).
53. Narum, D. L. & Thomas, A. W. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of Plasmodium falciparum merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**, (1994).
54. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**, (2012).
55. Brown, K. M., Sibley, L. D. & Lourido, S. High-Throughput Measurement of Microneme Secretion in Toxoplasma gondii. in *Methods in Molecular Biology* **2071**, (2020).
56. Callebaut, I. *et al.* Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): Current status and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* **53**, 621–645 (1997).
57. Buchan, D. W. A. & Jones, D. T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res.* **47**, W402–W407 (2019).
58. Mulder, N. J. *et al.* InterPro: an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Brief. Bioinform.* **3**, 225–235 (2002).
59. Söding, J., Biegert, A. & Lupas, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **33**, (2005).
60. Gíslason, M. H., Nielsen, H., Almagro Armenteros, J. J. & Johansen, A. R. Prediction of GPI-anchored proteins with pointer neural networks. *Curr. Res. Biotechnol.* **3**, (2021).
61. Mészáros, B., Erdős, G. & Dosztányi, Z. IUPred2A: Context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Res.* **46**, (2018).
62. (No Title). Available at: <https://robetta.bakerlab.org/>. (Accessed: 4th January 2021)
63. Heo, L., Park, H. & Seok, C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Res.* **41**, (2013).
64. Krieger, E. *et al.* Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **77**, 114–122 (2009).
65. Chen, V. B. *et al.* MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular

- crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21 (2010).
66. Wiederstein, M. & Sippl, M. J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**, (2007).
 67. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
 68. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10037–10041 (2001).
 69. Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. & Baker, N. A. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**, W665-7 (2004).
 70. Aurrecochea, C. *et al.* PlasmoDB: A functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Res.* **37**, (2009).
 71. Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780 (2013).
 72. Guindon, S. *et al.* New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**, 307–321 (2010).
 73. Lefort, V., Longueville, J.-E. & Gascuel, O. SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 2422–2424 (2017).
 74. Anisimova, M., Bielawski, J. P. & Yang, Z. Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1585–1592 (2001).
 75. Huang, Y. F. & Golding, G. B. Phylogenetic Gaussian Process Model for the Inference of Functionally Important Regions in Protein Tertiary Structures. *PLoS Comput. Biol.* **10**, (2014).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Fig S1 (part 1)

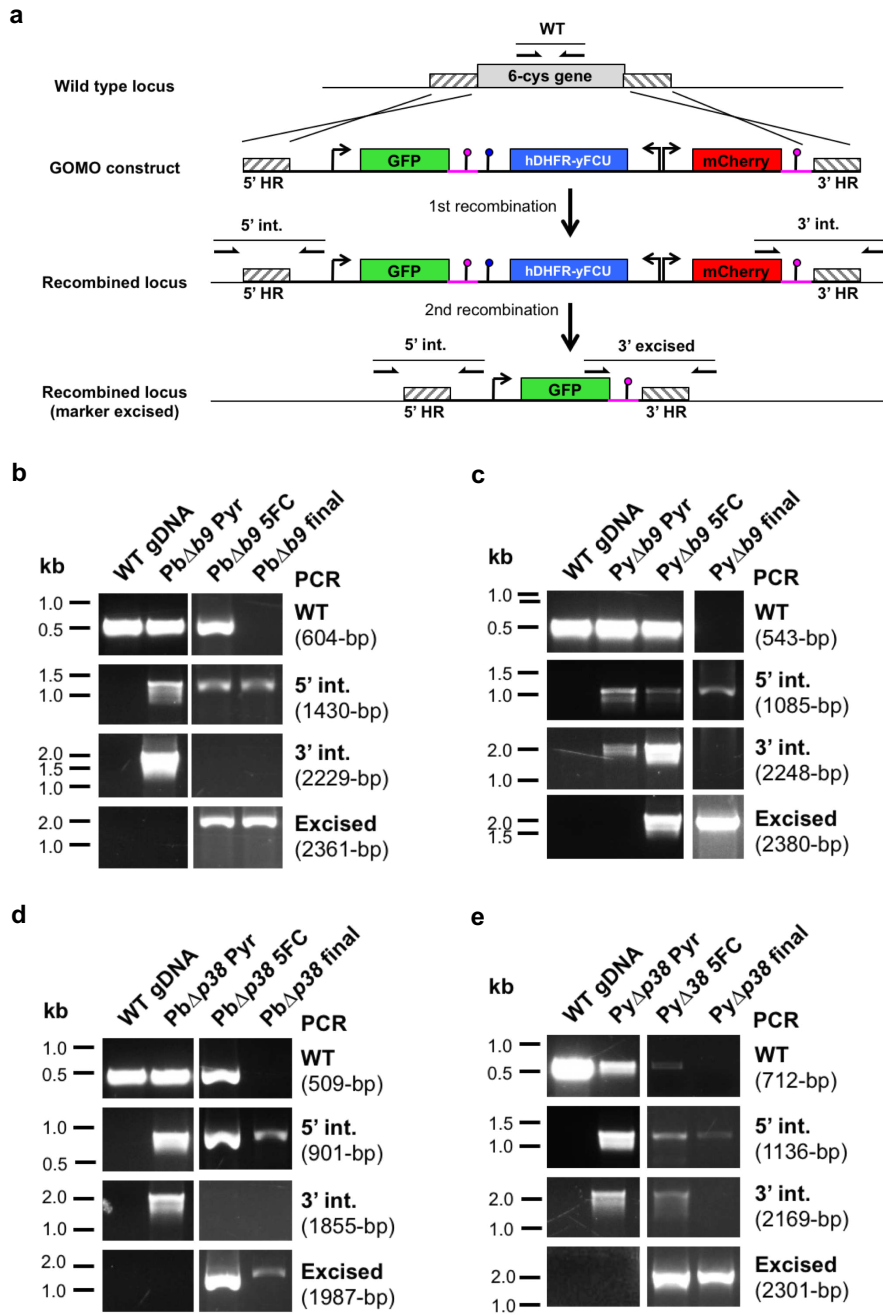
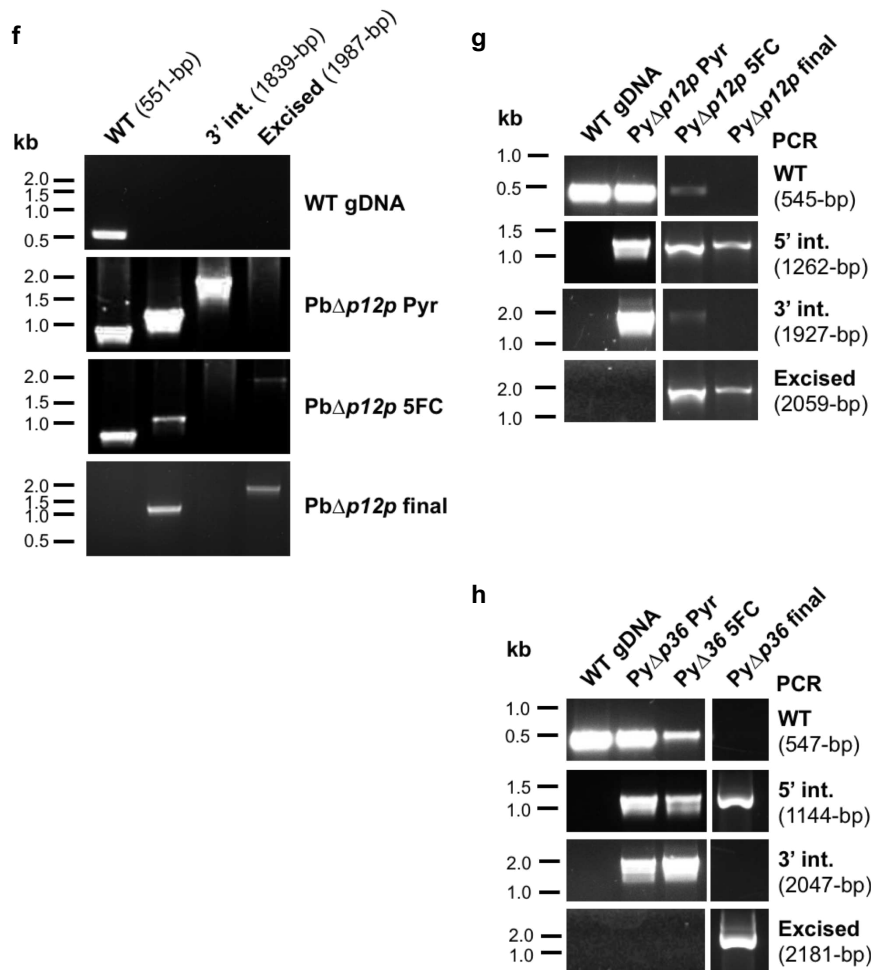


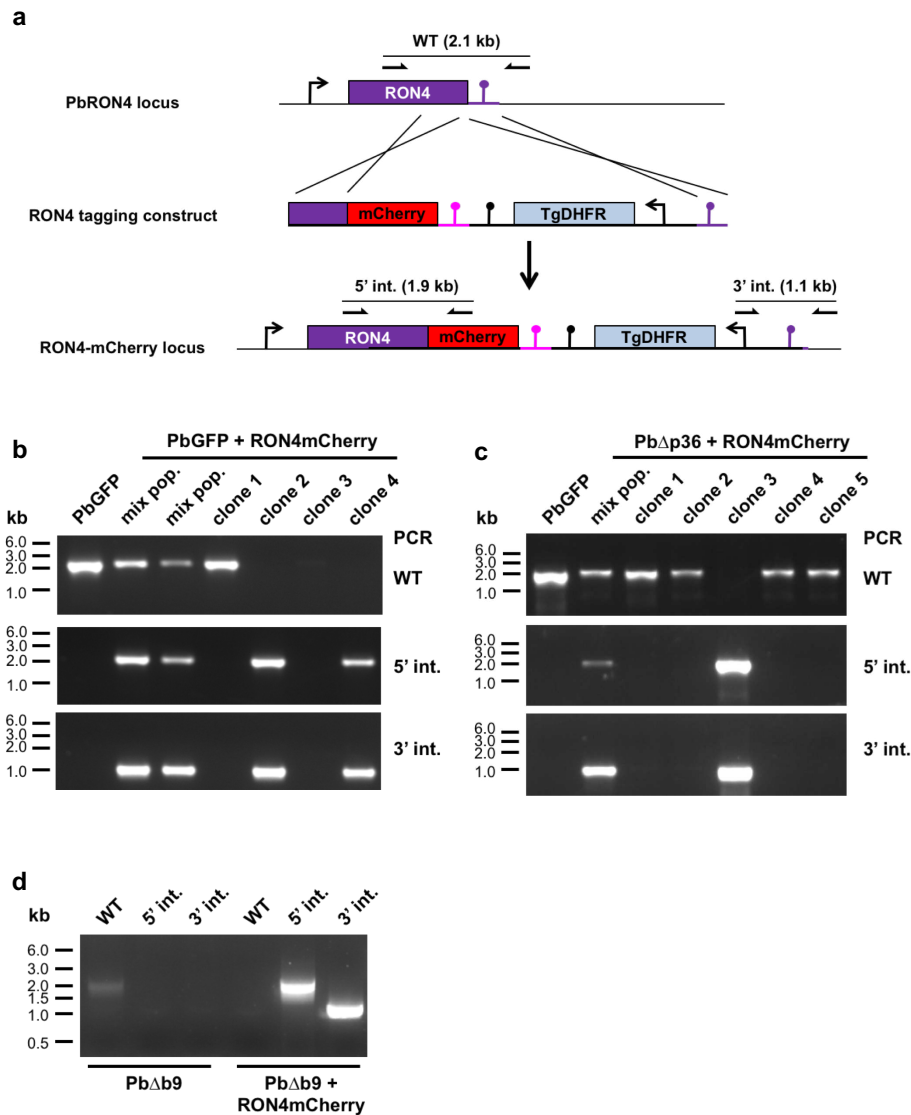
Fig S1 (part 2)



Supplementary Figure 1. Generation of 6-cys knockout parasite lines in *P. berghei* and *P. yoelii*. **a**, Replacement strategy to delete 6-cys candidate genes. The wild-type locus of 6-cys genes was targeted with a GOMO-GFP replacement plasmid containing a 5' and a 3' homologous sequence inserted on each side of a GFP/hDHFR-yFCU/mCherry triple cassette. Upon double crossover recombination, the gene of interest is replaced by the plasmid cassettes. Subsequent recombination between the two identical PbDHFR/TS 3' UTR sequences (pink lollipops) results in excision of hDHFR-yFCU and mCherry. Genotyping primers and expected PCR fragments are indicated by arrows and lines, respectively. **b–h**, Genotyping of WT and PbΔb9 (**b**), PyΔb9 (**c**), PbΔp38 (**d**), PyΔp38 (**e**), PbΔp12p (**f**), PbΔp12p (**g**) and PbΔp36 (**h**) parasites, recovered after positive selection with pyrimethamine (Pyr), negative selection with 5-fluorocytosine (5FC), and parasite sorting by flow cytometry (final). Parasite genomic DNA was analyzed by PCR using primer combinations specific for the unmodified locus (WT), the 5' integration (5'int.), 3' integration (3'int.) and 3' marker excision (excised) events. The absence of amplification with primer combinations specific for the WT

locus (WT) and the non-excised integrated construct (3' integration) confirms that the final populations contain pure knockout drug-selectable marker-free parasites.

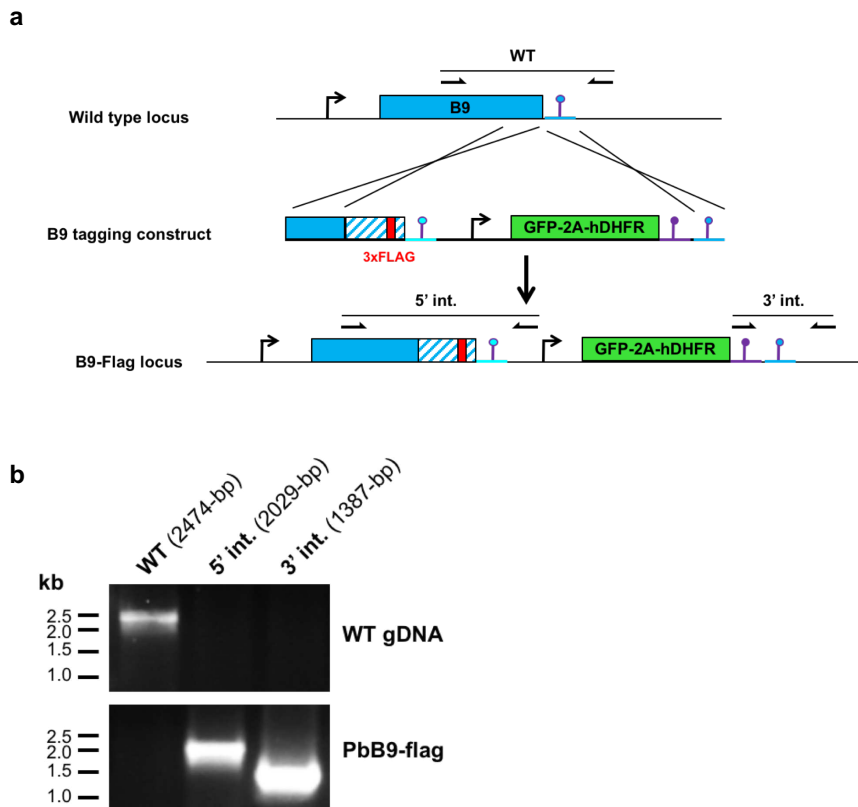
Fig S2



Supplementary Figure 2. Generation of RON4-mCherry expressing parasites. **a**, Strategy used to tag RON4 with mCherry by double crossover homologous recombination in PbGFP, PbΔp36 and PbΔb9 parasites. The *P. berghei* RON4 locus was targeted with a tagging construct containing a 5' homology fragment coding the C-terminal part of RON4, fused in frame to the mCherry coding sequence and followed by the 3' UTR of *P. berghei* DHFR (pink lollipop), a TgDHFR/TS selection cassette, and a 3' homology fragment corresponding to RON4 3'UTR (purple lollipop). Upon a double crossover event, the endogenous RON4 gene is replaced by a single mCherry-tagged RON4 copy. Genotyping primers and expected PCR fragments are indicated by arrows and lines, respectively. **b-d**, Correct construct integration

was confirmed by analytical PCR using primers specific for the unmodified locus (WT) or for the 5' and 3' recombination events (5' int. and 3' int., respectively) at the *RON4* locus. The absence of amplification with the WT primer combination confirms the purity of the transgenic population in PbGFP/*RON4*-mCherry clones 2 and 4 (b), Pb $\Delta p36$ /*RON4*-mCherry clone 3 (c) and Pb $\Delta b9$ /*RON4*-mCherry (d).

Fig S3

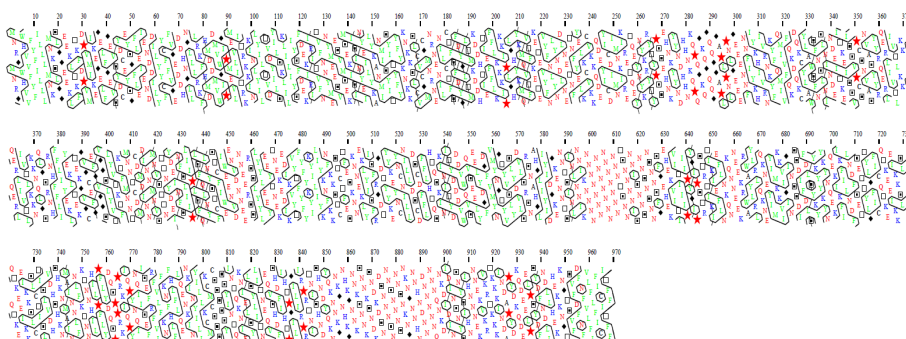


Supplementary Figure 3. Genetic tagging of B9 in *P. berghei*. **a**, Strategy used to tag B9 with a triple Flag epitope by double crossover homologous recombination in *P. berghei* WT parasites. The *P. berghei* B9 locus was targeted with a tagging construct containing a 5' homology fragment from PbB9 ORF, a recodoned C-terminal sequence of B9 (blue and white striped) with a 3xFlag sequence inserted (red), the 3' UTR of *PyB9* (cyan lollipop), a GFP-2A-hDHFR cassette, and a 3' homology fragment corresponding to *PbB9* 3'UTR (blue lollipop). Upon a double crossover event, the endogenous B9 gene is replaced by a single Flag-tagged B9 copy. Genotyping primers and expected PCR fragments are indicated by arrows and lines, respectively. **b**, Correct construct integration was confirmed by analytical PCR using primers specific for the unmodified locus (WT) or for the 5' and 3' recombination events (5' int. and 3' int., respectively) at the B9 locus. The absence of amplification with the WT primer combination confirms the purity of the transgenic population in PbB9-Flag parasites.

Fig S4

a

Hydrophobic Cluster Analysis



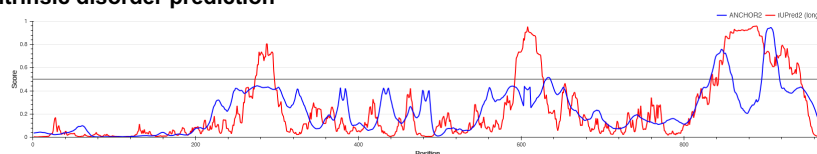
b

PSIPRED secondary structure prediction

	10	20	30	40	50																																													
1	M	N	R	G	W	H	V	V	F	F	I	L	L	L	M	N	K	S	L	G	G	E	E	K	L	T	K	F	D	P	V	M	I	K	E	G	E	L	F	G	E	V	S	Y	D	C	E	Y	S	
51	G	F	L	E	I	E	N	D	D	I	L	Y	Y	C	F	F	V	G	E	D	D	H	N	G	L	L	L	R	K	F	H	M	D	D	M	V	W	G	I	P	M	E	V	L	I	T	R	K	K	I
101	N	L	Y	I	L	T	V	D	Y	I	L	S	K	L	I	L	I	Y	S	F	D	E	K	I	R	I	T	V	F	N	N	Y	M	E	E	S	V	M	S	E	K	I	S	I	N	Y	E	L	Y	
151	K	A	N	M	I	S	Y	I	T	Y	F	Y	K	N	K	K	S	L	C	V	G	M	N	R	N	E	N	I	L	C	T	F	S	F	D	Y	G	L	T	M	K	D	D	H	T	I	E	F		
201	L	K	K	K	I	P	L	G	H	Y	K	M	Q	V	T	F	K	E	T	E	V	Y	F	N	L	Y	N	D	L	N	E	T	N	F	Y	E	L	K	C	V	K	K	Q	D	E	Y	I	C	D	I
251	M	N	K	I	R	E	T	Q	E	Y	N	Y	K	R	Y	T	Y	P	S	S	E	H	N	K	Y	N	D	H	H	N	K	Q	P	Q	G	K	Q	G	Q	G	G	A	P	L	P	N	L	G		
301	E	E	E	N	N	F	I	Y	K	H	I	V	R	N	K	Y	Q	M	I	V	F	Q	K	D	Q	K	C	Y	L	A	W	S	F	N	S	L	N	I	N	D	E	I	T	K	E	S	S	V		
351	P	C	S	N	V	A	S	Y	R	Q	E	R	L	I	V	T	L	K	K	N	Q	L	G	S	R	N	H	F	F	L	I	Y	E	K	L	T	E	K	G	V	G	C	E	F	G	V	G	G	S	
401	L	Y	V	T	K	T	F	M	N	N	T	C	D	M	D	I	N	M	N	V	S	T	T	N	Y	D	E	I	N	F	S	L	I	I	P	L	S	F	Q	L	N	Y	S	T	C	F	I	W	E	
451	E	N	V	D	N	N	E	E	R	S	L	Y	L	E	E	Y	T	N	E	K	E	D	I	K	V	Y	T	F	Y	F	Y	K	Y	I	L	I	Y	K	N	F	K	S	T	C	T	F	E			
501	S	K	N	N	E	K	L	Y	I	S	F	R	G	D	T	Y	K	E	Y	N	C	N	I	L	L	D	S	C	D	F	L	H	T	Q	S	K	I	N	I	T	Y	D	D	V	W	Q	V			
551	S	E	E	L	Y	D	G	F	V	M	Y	N	G	T	Y	V	S	L	Y	D	V	L	S	R	S	N	A	H	G	L	I	Y	I	D	G	K	E	N	N	T	S	I	N	L	N	I	K	N		
601	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
651	K	I	E	F	L	N	K	Q	N	N	E	K	R	W	A	Y	L	R	L	Q	K	N	E	Y	I	M	K	K	V	I	G	I	N	S	S	D	I	F	D	L	S	Y	K	Y	K	Y	N	Q		
701	E	K	I	K	F	I	L	N	D	F	S	E	T	T	Y	L	G	F	I	C	Q	T	K	E	E	I	K	K	S	L	C	T	I	S	L	V	D	H	S	H	K	N	M	A	I	N	N	L	F	K
751	T	N	N	H	I	L	P	F	L	Y	D	Q	S	P	P	R	K	I	Q	P	Y	N	Q	I	I	S	E	F	R	F	V	L	F	K	N	F	H	L	F	L	Q	E	N	K	I	N	Y	I	L	
801	K	C	M	C	S	S	S	S	S	S	Y	I	N	T	Q	K	N	I	E	L	S	Y	L	I	T	N	E	Q	V	S	H	D	F	I	H	T	P	G	L	I	R	P	R	T	N	I	S	H	N	D
851	Y	Q	K	N	N	K	G	N	H	K	G	N	N	K	S	N	N	K	S	N	D	K	D	S	N	N	N	S	N	N	N	S	N	K	N	G	N	H	N	D	N	N	N	N	N	Q	K	K	D	
901	I	D	I	N	S	N	Y	S	I	H	N	N	E	K	V	K	R	T	K	K	I	N	D	A	P	Y	D	K	Q	D	E	L	P	S	Y	D	F	N	D	L	L	H	E	K	K	N	G			
951	T	S	V	F	D	F	N	F	V	L	F	L	F	I	C	I	T	F																																

c

Intrinsic disorder prediction



Supplementary Figure 4. Secondary structure analysis of PfB9. a, Hydrophobic cluster analysis of PfB9. Cluster of hydrophobic amino acids are surrounded. Red stars and black diamond correspond to proline and glycine amino acids respectively. b, Secondary structure prediction PfB9 using PSIPRED 4.0. Pink, yellow, and grey background colors indicate predicted helix, strand, and coil structures, respectively. c, Intrinsic disorder prediction of PfB9 using IUPred2A. Predictions are based on energy estimation for ordered and disordered residues by IUPred2 (red line) and for disordered binding regions by ANCHOR2 (blue line).

Fig S5

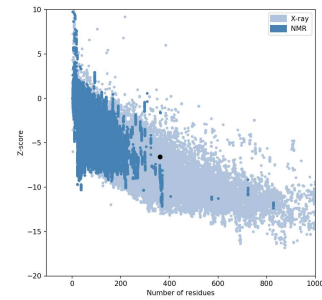
a

Molprobrity results

	PfB9 propeller model	CyRPA
Poor rotamers	1/341 (0.29)	2/305 (0.66)
Favored rotamers	335/341 (97.95)	283/305 (92.79)
Ramachandran outliers	4/359 (1.11)	0/320 (0.00)
Ramachandran favored	330/359 (91.92)	307/320 (95.94)
Bad bonds	5/3121 (0.16)	0/2775 (0.00)
Bad angles	6/4204 (0.14)	0/3744 (0.00)

b

Prosa II result



Supplementary Figure 5. Model structure validation. The structure model of PfB9 propeller (amino acids 26 to 386) was validated using MolProbrity (a) and Prosa II (b). For Prosa II, the Z-score of the PfB9 propeller model (indicated as a black point) falls within those of protein structures obtained by X-ray crystallography.

Fig S6

```

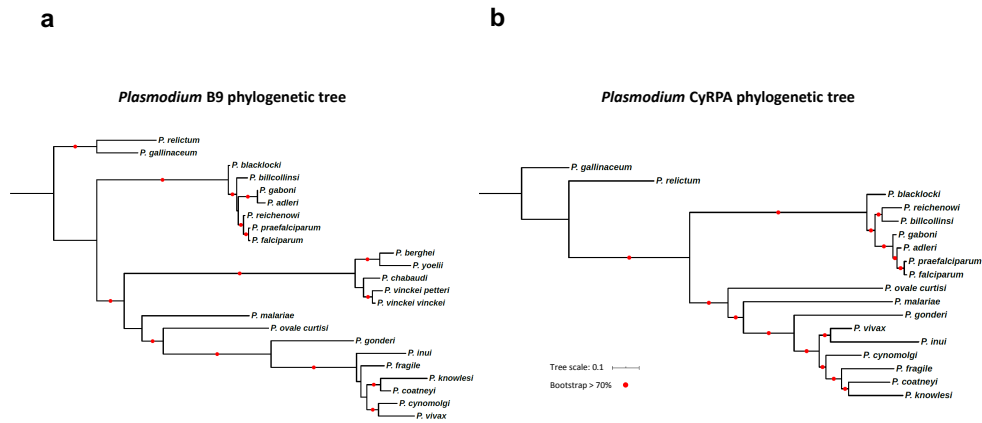
*****
PfB9 LKRFQWIKREGGLGQVSYHIFSSGFLIENDQILLYFFVSGDDINGLLRFRFMDQWGIPEVLLTPR-NINDYFLTVDFILSRLLIYFQRIYVFNVYVESVMSKISIMY
PbB9 LNKRFPIIKREGGLGQVSYHIFSSGFLIENDQILLYFFVSGSNAT-NGLSITTPNFKLWQIPREVLLEKNDIQYSPFDISGNLLIYDINNIYVFNVYVESVMSKISIMY
PyB9 LNKRFPIIKREGGLGQVSYHIFSSGFLIENDQILLYFFVFINNT-NGLFTFNTLKLWQVAKVLLFKNDIERYSPFDISANNLLIYDINNIYVFNVYVESVMSKISIMY
-----
PfB9 ELLYKAMISVYFYKMKKSLRGMNNNGNIIFSFYDGLMIDENLIEFLKOSIPDIQYKIDVFNKHVYVFNLSREKKEISFYEPKFDODTENYDGLNIIISANLQ-----
PbB9 RMVHKFNISVYFYKMKKSLRGMNNNGNIIFSFYDGLMIDENLIEFLKOSIPDIQYKIDVFNKHVYVFNLSREKKEISFYEPKFDODTENYDGLNIIISANLQ-----
PyB9 RMVHKFNISVYFYKMKKSLRGMNNNGNIIFSFYDGLMIDENLIEFLKOSIPDIQYKIDVFNKHVYVFNLSREKKEISFYEPKFDODTENYDGLNIIISANLQ-----
-----
PfB9 PSEHNKYNDHNKQPGKQGGGAPLNLGEEENFIYKHVKNVYQMIYVQKDKCYLWSPNSLNINDEIKKISSVFNVSVYRQERLIVTLKKN--QLGRNHFLLIYEKL
PbB9 -----NIKRYILRTKQSIVSVQKGNICYIOWSPNSLNINDEIKKISSDTSFNVSIVQNNELLATFKKNINPDPTGNEYVALFEKL
PyB9 -----NINRYILRTKQSIVSVQKGNICYIOWSPNSLNINDEIKKISSDTSFNVSILQREHLIVTLKKNINPDPTGNEYVALFEKL

```

* Full identity between PfB9, PbB9 and PyB9
 ~ Identity between PbB9 and PyB9
 . Mismatch between PbB9 and PyB9
 - Gapped positions of PbB9 and PyB9

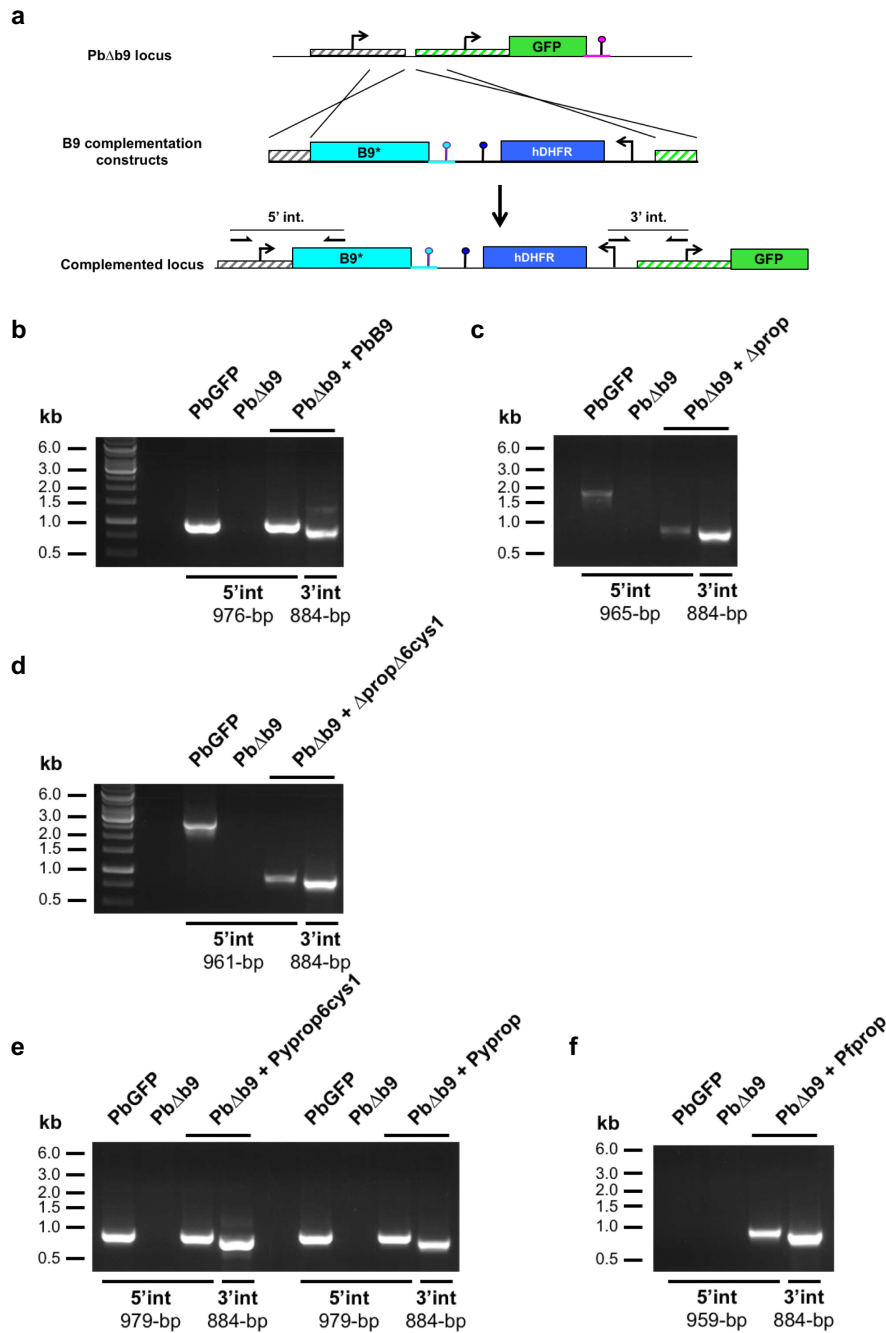
Supplementary Figure 6. Protein sequence alignment of the B9 propeller from *P. falciparum*, *P. berghei* and *P. yoelii*. Conserved residues are in bold, cysteines in red.

Fig S7



Supplementary Figure 7. Phylogenetic trees of B9 and CyRPA. Multiple sequence alignments and corresponding phylogenetic trees were established using two datasets consisting of distinct *Plasmodium* B9 (n = 23) or CyRPA (n = 18) sequences. Phylogenetic trees were inferred by maximum likelihood using PhyML, and branch supports were estimated using the approximate likelihood ratio aLRT SH-like method.

Fig S8



Supplementary Figure 8. Genetic complementation of Pb Δ b9 parasites. **a**, Strategy used to genetically complement Pb Δ b9 with different versions of B9 (indicated as B9*) by double crossover homologous recombination. Genotyping primers and expected PCR fragments are indicated by arrows and lines, respectively. **b-f**, Correct construct integration was confirmed by analytical PCR using primers specific for the 5' and 3' recombination events (5' int. and 3' int., respectively) and genomic DNA from PbGFP, Pb Δ b9, and Pb Δ b9 complemented with the PbB9 (b), Δ prop (c), Δ prop Δ 6cys1 (d), Pyprop (e), Pyprop6cys1 (e) or Pfprop (f) constructs.

II. Étude des protéines essentielles à l'invasion chez les mérozoïtes et les sporozoïtes

L'étude chez les sporozoïtes de protéines essentielles à l'invasion par les mérozoïtes nécessite l'utilisation d'approches de délétion conditionnelle. L'équipe s'est intéressée au système DiCre permettant l'excision de séquences d'ADN entourées de sites Lox en présence de rapamycine, permettant ainsi d'induire l'excision de gènes d'intérêt chez les stades sexués avant la transmission au moustique. La génération d'une lignée de *P. berghei* exprimant le système DiCre a permis d'étudier le rôle de protéines décrites comme impliquées dans la jonction mobile des mérozoïtes, et ainsi de revisiter le rôle d'AMA1 et des RONs et d'identifier le rôle de CLAMP chez les sporozoïtes.

1. Mise en place de la stratégie DiCre chez *P. berghei* pour l'étude chez le sporozoïte de gènes essentiels au stade sanguin

(1) Contexte

La mutagenèse du parasite représente un outil d'une importance capitale pour la compréhension de son fonctionnement. L'haploïdie du génome de *Plasmodium* et l'abondance de parasites au cours de la phase de développement érythrocytaire en font le stade idéal pour des modifications génétiques par recombinaison homologue. Les gènes essentiels au stade sanguin sont cependant réfractaires aux stratégies classiques de génétique inverse et nécessitent l'utilisation de stratégies de mutagenèse conditionnelle afin d'étudier leur rôle dans les autres stades de développement du parasite, notamment le stade sporozoïte qui nous intéresse.

Différentes stratégies conditionnelles ont déjà été mises en place chez *Plasmodium* comme l'échange de promoteurs endogènes par des promoteurs spécifiques de gènes exprimés au stade sanguins (Ishino et al., 2019; Klug et al., 2018; Laurentino et al., 2011; Siden-Kiamos et al., 2011) ou régulables (Meissner et al., 2005; Pino et al., 2012). D'autres méthodes interviennent en aval, jouant sur la déstabilisation de l'ARNm (Agop-Nersesian et al., 2008; Prommana et al., 2013) ou de la protéine (Armstrong & Goldberg, 2007). Ces stratégies ne garantissent cependant pas un knock-down complet de la protéine et peuvent entraîner des problèmes de régulation de l'expression de la protéine d'intérêt au stade sanguin (de Koning-Ward et al., 2015). Deux méthodes de délétion conditionnelle basées sur l'activité de recombinases ont émergé en parallèle : la stratégie DiCre et la stratégie Flp/FRT. Le système Flp/FRT repose sur

l'activité de la recombinaise Flp exprimée sous contrôle du promoteur de TRAP qui va exciser les séquences d'ADN situées entre des sites FRT (Carvalho et al., 2004; Giovannini et al., 2011). Une étude a cependant montré chez les sporozoïtes la persistance d'une protéine d'intérêt, suggérant une délétion trop tardive du gène par la recombinaise (Govindasamy et al., 2016). Le système DiCre repose quant à lui sur la séparation en deux sous-unités inactives de la recombinaise Cre dont l'activité est restaurée en présence de rapamycine, permettant l'excision de séquences d'ADN situées entre des sites Lox (Jullien et al., 2003). Il a été implémenté chez *P. berghei* (Kent et al., 2018) et *P. falciparum* (Jones et al., 2016; Yap et al., 2014) où il a récemment été utilisé pour étudier le rôle d'AMA1 chez les stades de développement chez le moustique (Tibúrcio et al., 2019).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la génération d'une lignée *P. berghei* exprimant les composants du système DiCre et permettant l'étude chez les sporozoïtes de gènes essentiels au stade sanguin ou dans les stades précoces de développement chez le moustique.

(2) Stratégie et résultats

Nous avons généré une lignée PbDiCre à partir de la lignée PbGFP précédemment générée par l'équipe (Manzoni et al., 2015) par remplacement de la cassette d'expression de la GFP par une construction contenant une cassette d'expression de la mCherry, les éléments du système DiCre ainsi qu'une cassette d'expression du marqueur de sélection DHFR flanquée de sites LoxP. L'exposition à une dose de rapamycine a résulté en l'excision du gène de la DHFR et la génération d'une lignée mCherry-positive, sans marqueur de sélection et exprimant le système DiCre.

Après avoir vérifié que cette lignée se développe normalement au cours du cycle de vie du parasite, nous avons voulu tester l'efficacité du système DiCre pour l'excision de gènes dans les stades de développement chez le moustique. Pour cela une nouvelle lignée a été générée par remplacement chez PbDiCre de la cassette d'expression de la mCherry par une cassette d'expression de la GFP et de la DHFR flanquée de sites LoxN ainsi que du gène de la CFP en aval. L'exposition à la rapamycine engendre l'excision du gène de la GFP et la restauration de la cassette d'expression de la CFP. Ainsi l'efficacité de l'excision après exposition à la rapamycine peut être mesurée grâce à la disparition de la fluorescence verte et à l'apparition d'une fluorescence bleue chez les parasites. Cette lignée de parasite a permis de confirmer l'excision quasiment complète de la GFP dans les oocystes et donc chez les sporozoïtes des

glandes salivaires du moustique après exposition à la rapamycine. De façon intéressante, cette excision est comparable lorsque le traitement à la rapamycine intervient sur les stades sanguins sexués (24h avant la transmission au moustique) ou après les étapes précoces de développement chez le moustique (après formation des oocystes).

(3) Conclusion

En conclusion, nous avons généré une lignée de *P. berghei* exprimant le système DiCre et avons validé ce système dans les stades de développement chez le moustique à l'aide de rapporteurs fluorescents. La lignée PbDiCre se développe normalement au cours du cycle de vie du parasite et présente une fluorescence rouge et une absence d'expression de marqueur de sélection, facilitant les futures transfections nécessaires au ciblage des gènes d'intérêt. Nous avons montré que l'exposition des stades sanguins du parasite à une dose unique de rapamycine 24h avant la transmission au moustique est suffisante pour permettre une excision presque complète de séquences d'ADN d'intérêt. De plus nous avons montré l'efficacité du système dans le cadre d'une exposition plus tardive à la rapamycine, aux stades précoces de développement chez le moustique, illustrant la robustesse et la polyvalence du système. Cette lignée de parasites ouvre la voie à l'étude de gènes essentiels à différents stades de vie du parasite.

Nous avons optimisé et standardisé la stratégie permettant de cibler un gène d'intérêt par insertion de sites LoxN de part et d'autre du gène à l'aide de plasmides génériques générés par l'équipe. Nous avons également standardisé la méthode d'induction de l'excision par exposition à la rapamycine à différents stades de développement du parasite. Il en a résulté la publication d'un article dans PLoS One (Fernandes, Briquet et al., 2020) ainsi que d'un chapitre de protocole détaillé publié dans *Methods in Molecular Biology (Parasite Genomics)* (**Annexes I et II**).

Implication personnelle dans le projet :

J'ai participé sur ce projet à l'optimisation du protocole d'induction de DiCre et à la standardisation de l'analyse phénotypique chez le moustique et dans les hépatocytes.

2. Étude d'AMA1 et des RONS, protéines de la jonction mobile

(1) Contexte

L'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *Plasmodium* est un processus bien décrit impliquant l'attachement initial du parasite, la formation d'une jonction mobile et sa pénétration dans l'érythrocyte (Cowman et al., 2017). La jonction mobile est formée en partie d'un complexe protéique contenant notamment une protéine micronémale, AMA1, et des protéines de rhoptries (RONS) (Cao et al., 2009; Riglar et al., 2011). Les protéines RONS vont être sécrétées dans la cellule hôte et le complexe va se fixer à la membrane avec RON2 exposée qui va servir de récepteur à AMA1 exprimée en surface du mérozoïte (Alexander et al., 2005; Besteiro et al., 2009; Tonkin et al., 2011). Le complexe AMA1-RONS forme une structure en forme d'anneau qui va migrer du pôle antérieur du mérozoïte au pôle postérieur lors de l'internalisation du parasite (Riglar et al., 2011).

Cette structure caractéristique des apicomplexes a été abondamment décrite et visualisée chez les tachyzoïtes de *Toxoplasma* et les mérozoïtes de *Plasmodium* mais la rareté des événements d'invasion par les sporozoïtes a limité son étude à ce stade. Ses composants au stade sanguin (AMA1, RON2 et RON4 notamment) sont également retrouvés chez les sporozoïtes (Florens et al., 2002; Hamada et al., 2021; Tokunaga et al., 2019) mais leur rôle à ce stade reste mal défini. Le développement des méthodes de mutagenèse conditionnelle a permis d'étudier le rôle de RON2 et RON4 chez le sporozoïte, où ils se révèlent essentiels à l'invasion des glandes salivaires du moustique (Ishino et al., 2019; Nozaki et al., 2020) et des hépatocytes dans le cas de RON4 (Giovannini et al., 2011). Pour AMA1 les résultats obtenus sont contradictoires puisque les premiers essais de délétion conditionnelle de la protéine décrivent AMA1 comme non essentielle à l'invasion des hépatocytes (Bargieri et al., 2013; Giovannini et al., 2011) alors que l'inhibition d'AMA1 à l'aide d'anticorps ou de peptides bloquants impacte l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes (Silvie et al., 2004; Yang, Lopaticki, et al., 2017).

Nous nous sommes donc intéressés à revisiter le rôle d'AMA1, RON2 et RON4 chez les sporozoïtes de *P. berghei* à l'aide du système de délétion conditionnelle DiCre précédemment décrit.

(2) Stratégie et résultats

La première étude de knock-down d'AMA1 chez les sporozoïtes s'appuie sur une stratégie de délétion du 3'UTR d'*ama1* grâce au système Flp/FRT (Giovannini et al., 2011). Nous avons donc initialement voulu vérifier que cette approche de délétion du 3'UTR était bien suffisante pour dépléter AMA1 chez les sporozoïtes. Pour cela, des sites LoxN ont été insérés autour du 3'UTR d'*ama1* dans la lignée PbDicre (*ama1*Δ_{utr}). Un parasite contrôle permettant de vérifier que l'utilisation du système DiCre n'affecte pas le parasite a également été généré par insertion des sites LoxN en aval du 3'UTR (*ama1*Con). Les sites LoxN sont insérés en même temps qu'une cassette d'expression de la GFP, permettant de différencier par fluorescence les parasites excisés (mCherry+ / GFP-) des parasites non-excisés (mCherry+ / GFP+). Nous n'avons pas observé de différence dans la croissance au stade sanguin et chez le moustique des parasites *ama1*Con et *ama1*Δ_{utr}, avec ou sans traitement à la rapamycine. Des expériences d'immunofluorescence anti-AMA1 chez les schizontes sanguins et chez les sporozoïtes des glandes salivaires révèlent la persistance de la protéine AMA1 chez les parasites *ama1*Δ_{utr} traités à la rapamycine. Ainsi, l'excision du 3'UTR d'*ama1* n'est pas suffisante pour supprimer l'expression de la protéine chez le parasite, ce qui explique l'absence de phénotype observé au stade sanguin chez les parasites *ama1*Δ_{utr} traités à la rapamycine.

Nous avons donc choisi comme nouvelle stratégie de déléter l'intégralité du gène *ama1* (*ama1*cKO) en insérant un site LoxN en amont du promoteur dans la lignée de parasites *ama1*Con traités à la rapamycine (possédant un site LoxN résiduel en aval du 3'UTR d'*ama1*). Après traitement à la rapamycine des stades sanguins nous observons une réduction drastique de la croissance parasitaire, cohérente avec le rôle essentiel d'AMA1 dans l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes. Ces parasites ont ensuite été transmis aux moustiques afin d'étudier le rôle d'AMA1 chez les sporozoïtes. De façon intéressante, nous observons chez les parasites *ama1*cKO traités à la rapamycine une réduction majeure du nombre de sporozoïtes isolés des glandes salivaires à 21 jours post-transmission alors que cette diminution n'est pas observée chez les sporozoïtes isolés des oocystes à 16 jours post-transmission. Nous avons confirmé que cette diminution ne provenait pas d'un défaut de sortie des oocystes par les sporozoïtes, soulignant un rôle d'AMA1 dans l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes de l'hémolymphe.

Après avoir confirmé par immunofluorescence l'absence d'AMA1 chez les sporozoïtes des glandes salivaires *ama1*cKO traités à la rapamycine, nous nous sommes intéressés au rôle d'AMA1 dans l'invasion des hépatocytes. Il a été décrit que l'inhibition de l'interaction AMA1-

RON2 réduit la traversée des hépatocytes par les sporozoïtes (Yang, Lopaticki, et al., 2017), nous nous sommes donc intéressés à la traversée et l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes déplétés pour AMA1. Les parasites *ama1cKO* traités à la rapamycine traversent les hépatocytes de façon équivalente aux parasites *ama1Con*, suggérant une absence de rôle d'AMA1 dans la motilité et la traversée des parasites. L'invasion productive des hépatocytes a été analysée par observation des formes exo-érythrocytaires (EEFs) 24h post-invasion. Nous observons une réduction significative du nombre d'EEFs chez les parasites *ama1cKO* traités à la rapamycine par rapport aux parasites non traités. En l'absence d'AMA1 les parasites conservent néanmoins une capacité résiduelle à envahir productivement les hépatocytes en formant des vacuoles parasitophores.

Nous avons généré en parallèle des lignées de parasites *ron2cKO* et *ron4cKO* dans lesquelles les gènes *ron2* et *ron4* respectivement sont flanqués de sites LoxN. Les résultats obtenus avec ces parasites sont similaires à ceux obtenus avec les parasites *ama1cKO* au stade sanguin et chez le moustique où la délétion des protéines entraîne respectivement une inhibition de la croissance et un défaut d'invasion des glandes salivaires. Au niveau des hépatocytes, la délétion des protéines entraîne également une baisse du nombre d'EEFs observés, importante pour RON4 et plus modérée pour RON2 malgré une augmentation de la traversée chez ces parasites, classiquement observée chez les sporozoïtes avec un défaut d'invasion productive. A l'instar de ce qui est observé avec les parasites *ama1cKO*, les EEFs observées chez les parasites traités présentent une vacuole parasitophore et résultent donc d'une invasion productive résiduelle des sporozoïtes délévés pour RON2 ou RON4.

Afin de mieux caractériser la colonisation des glandes salivaires nous avons utilisé une méthode de microscopie électronique tridimensionnelle (serial block face scanning EM). Ces expériences ont montré que les sporozoïtes déficients en AMA1, bien qu'en faible nombre, se répartissent dans les glandes salivaires de manière similaire au parasite sauvage, ce qui suggère un rôle d'AMA1 (et des RONS) lors de l'étape initiale d'invasion des glandes. Par ailleurs, nous avons montré que les sporozoïtes, même s'ils interagissent de façon étroite avec les membranes cellulaires, ne forment pas de vacuole parasitophore dans les glandes salivaires.

(3) Conclusion

En conclusion, cette étude s'est intéressée à revisiter le rôle d'AMA1, RON2 et RON4 chez les

sporozoïtes de *P. berghei* grâce à l'approche de délétion conditionnelle DiCre. Elle a permis de confirmer les rôles déjà décrits de RON2 et RON4 dans l'invasion au stade sanguin (Bushell et al., 2017; Lamarque et al., 2011) et dans l'invasion des glandes salivaires du moustique (Ishino et al., 2019; Nozaki et al., 2020). Nos résultats démontrent qu'AMA1 et les RONS coopèrent pour faciliter l'invasion des cellules non seulement chez les mérozoïtes mais aussi chez les sporozoïtes, aussi bien chez le moustique que chez l'hôte mammifère. Ils suggèrent également une fonction jusque-là inconnue du complexe AMA1-RONS, indépendante de la formation de la vacuole répllicative. AMA1 et les RONS pourraient constituer des cibles intéressantes pour des stratégies vaccinales visant à bloquer la transmission du parasite.

Implication personnelle dans le projet :

Les lignées de parasites mutants ont été générées par une ancienne postdoc de l'équipe qui a également initié la caractérisation des mutants AMA1. J'ai participé sur ce projet à l'analyse phénotypique des mutants AMA1 chez le moustique et à l'analyse phénotypique complète des mutants RONS.

(4) Manuscrit AMA1-RONS finalisé

Les vidéos des supplementary datas ne sont pas intégrées dans ce manuscrit de thèse mais seront disponibles dans la version soumise à publication.

The AMA1-RON complex drives *Plasmodium* sporozoite invasion in the mosquito and mammalian hosts

Priyanka Fernandes^{1*}, Manon Loubens^{1*}, Rémi Le Borgne², Carine Marinach¹, Beatrice Ardin¹, Sylvie Briquet¹, Laetitia Vincensini¹, Soumia Hamada^{1,3}, Bénédicte Hoareau-Coudert⁴, Jean-Marc Verbavatz², Allon Weiner¹, Olivier Silvie¹

¹Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, CIMI-Paris, 75013, Paris, France

²Institut Jacques Monod, Université de Paris, CNRS, UMR 7592, 75205, Paris, France

³Sorbonne Université, INSERM, UMS PASS, Plateforme Post-génomique de la Pitié Salpêtrière (P3S), 75013, Paris, France

⁴Sorbonne Université, INSERM, UMS PASS, Plateforme de cytométrie de la Pitié-Salpêtrière (CyPS), 75013, Paris, France

*These authors contributed equally to the work.

Running head: AMA1-RON complex in *Plasmodium* sporozoites

Correspondence and requests for materials should be addressed to O.S. (email: olivier.silvie@inserm.fr).

Key words: *Plasmodium*; malaria; sporozoites; conditional mutagenesis; AMA1; RONS.

SUMMARY

Plasmodium sporozoites that are transmitted by blood-feeding female *Anopheles* mosquitoes invade hepatocytes for an initial round of intracellular replication, leading to the release of merozoites that invade and multiply within red blood cells. Sporozoites and merozoites share a number of proteins that are expressed by both stages, including the Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and the Rhoptry Neck Proteins (RONs). Although AMA1 and RONs are essential for merozoite invasion of erythrocytes during asexual blood stage replication of the malaria parasite, their precise function in sporozoites is unclear. Here we show that AMA1 interacts with RONs in salivary gland sporozoites. By using DiCre-mediated conditional gene deletion in *P. berghei*, we demonstrate that loss of AMA1, RON2 or RON4 in sporozoites impairs invasion of the mosquito salivary glands and of mammalian hepatocytes. Three-dimensional volume electron microscopy revealed that sporozoites intimately interact with acinar cell membranes inside the mosquito salivary glands, yet do not reside in a parasitophorous vacuole. Our data establish that AMA1 and RONs facilitate host cell invasion across *Plasmodium* invasive stages independently of the formation of a replicative vacuole, implying a hitherto unsuspected function of the complex. Our results also open up the possibility of targeting the AMA1-RON complex for transmission-blocking antimalarial strategies.

INTRODUCTION

Host cell invasion is an obligatory step in the *Plasmodium* life cycle. There are several invasive stages of *Plasmodium*, each equipped with its own set of specialised secretory organelles and proteins that facilitate invasion into or through host cells. Invasive stages of Apicomplexa typically invade target host cells actively by gliding through a structure known as the moving junction (MJ), which consists in a circumferential zone of close apposition of parasite and host cell membranes. Studies with *Toxoplasma gondii* tachyzoites and *Plasmodium falciparum* merozoites have shown that formation of the MJ involves the export of rhoptry neck proteins RONs into the host cell, where RON2 inserted in the host cell membrane serves as a receptor for the Apical Membrane Antigen 1 (AMA1), which is secreted from the micronemes onto the surface of the parasite (Besteiro et al., 2011; Cowman et al., 2017; Frénel et al., 2017). Formation of the MJ is associated with active penetration inside the parasitophorous vacuole (PV), which is essential for further development and replication of the parasite.

Although the AMA1-RON2 interaction seems to be conserved across the phylum of Apicomplexa, its role in *Plasmodium* sporozoites is controversial. *Plasmodium* sporozoites express AMA1 and the RON proteins RON2, RON4 and RON5 (Giovannini et al., 2011; Hamada et al., 2021; Lindner et al., 2013; Silvie et al., 2004; Swearingen et al., 2017; Tokunaga et al., 2019; Tufet-Bayona et al., 2009). Two studies reported that AMA1 is not essential for development in the mosquito and during hepatocyte invasion in *P. berghei*, while RON4 in contrast was shown to be essential for hepatocyte invasion, suggesting independent roles for AMA1 and RON proteins in sporozoites (Bargieri et al., 2013; Giovannini et al., 2011). However, both polyclonal antibodies against AMA1 (Silvie et al., 2004) and the R1 peptide inhibitor of AMA1 in merozoites (Harris et al., 2005), effectively reduced hepatocyte invasion by *P. falciparum* sporozoites (Yang et al., 2017). More recently, a promoter swap strategy was employed to knockdown RONs in *P. berghei* sporozoites, uncovering an unexpected role of these proteins during invasion of the mosquito salivary glands (Ishino et al., 2019; Nozaki et

al., 2020). Owing to these conflicting data, the precise role of AMA1 and RONs in *Plasmodium* sporozoites is uncertain.

As conventional reverse genetics cannot be used to target AMA1 and RONs, due to their essential nature in asexual blood stages, previous studies relied on conditional approaches such as the Flippase (FLP)/Flp recombination target (FRT) system or promoter swap strategies to target these genes. The rapamycin inducible DiCre recombinase system has recently emerged as a potent method of gene inactivation in different developmental stages of the parasite life cycle, in *P. falciparum* (Tibúrcio et al., 2019) and *P. berghei* (Fernandes et al., 2020). We recently described a fluorescent DiCre-expressing parasite line in *P. berghei* and showed that efficient and complete gene excision can be induced in asexual blood stages and also sporozoites (Fernandes et al., 2020). In this study, we used the DiCre system to achieve conditional deletion of *ama1*, *ron2* and *ron4* genes in *P. berghei* sporozoites, and characterise their role in mosquito stages and during hepatocyte infection. In addition to describing a novel role for AMA1 in mosquito salivary gland invasion, our data shed light on essential interactions between AMA1, RON2 and RON4 during sporozoite invasion in both mosquito and mammalian hosts, implying a conserved feature of the invasion process across invasive stages of *Plasmodium*. Our data also reveal a hitherto unsuspected function of the AMA1-RON complex that is uncoupled from PV formation.

RESULTS

Deletion of *ama1* 3'UTR is not sufficient to abrogate AMA1 expression in *P. berghei*

To ablate AMA1 protein expression in *P. berghei*, we first decided to conditionally delete the 3' untranslated region (UTR) of *ama1* using the DiCre method, as previously reported with the FLP/FRT system (Giovannini et al., 2011). We floxed the 3'UTR of *ama1*, together with a GFP and an hDHFR marker, to generate the *ama1* Δ utr parasite line in the mCherry-expressing PbDiCre parasite background (Fernandes et al., 2020) (**Figure 1A, Supplementary Figure S1A**). To exclude any unspecific effects arising from modification of the *ama1* locus, we also generated a control parasite line (*ama1*Con) where we introduced the LoxN sites downstream of the 3' UTR (**Figure 1B, Supplementary Figure S1B**). After transfection and selection with pyrimethamine, pure populations of recombinant parasites were sorted by flow cytometry and genotyped by PCR to confirm correct genomic integration of the constructs and to exclude the presence of any residual unmodified PbDiCre parasites (**Supplementary Figure S1C and S1D**).

We next analyzed the effects of rapamycin on *ama1*Con and *ama1* Δ utr parasites during blood stage growth, by quantifying the percentage of excised (mCherry⁺/GFP⁻) and non-excised (mCherry⁺/GFP⁺) parasites by flow cytometry (**Figure 1C and 1D**). In the *ama1*Con infected group, rapamycin treatment induced complete excision of the floxed GFP cassette (*ama1*Con^{rapa}) (**Figure 1C**), which, as expected, had no significant effect on parasite growth and multiplication in the blood, which was comparable to the untreated group (*ama1*Con^{UT}) (**Figure 1E**). Excision of the GFP cassette was also confirmed by genotyping PCR (**Supplementary Figure S1D**). Surprisingly, rapamycin treatment of the *ama1* Δ utr infected group (*ama1* Δ utr^{rapa}) also had no effect on both parasite growth and multiplication in the blood (**Figure 1F**), despite efficient DNA excision based on disappearance of the GFP cassette after rapamycin treatment (**Figure 1D**). Genotyping of mCherry⁺/GFP⁻ parasites by PCR and sequencing of the locus after excision confirmed that the 3'UTR had been excised in

ama1 Δ utr^{rapa} parasites, excluding any contamination with parental PbDiCre (**Supplementary Figure S1C**).

Figure 1

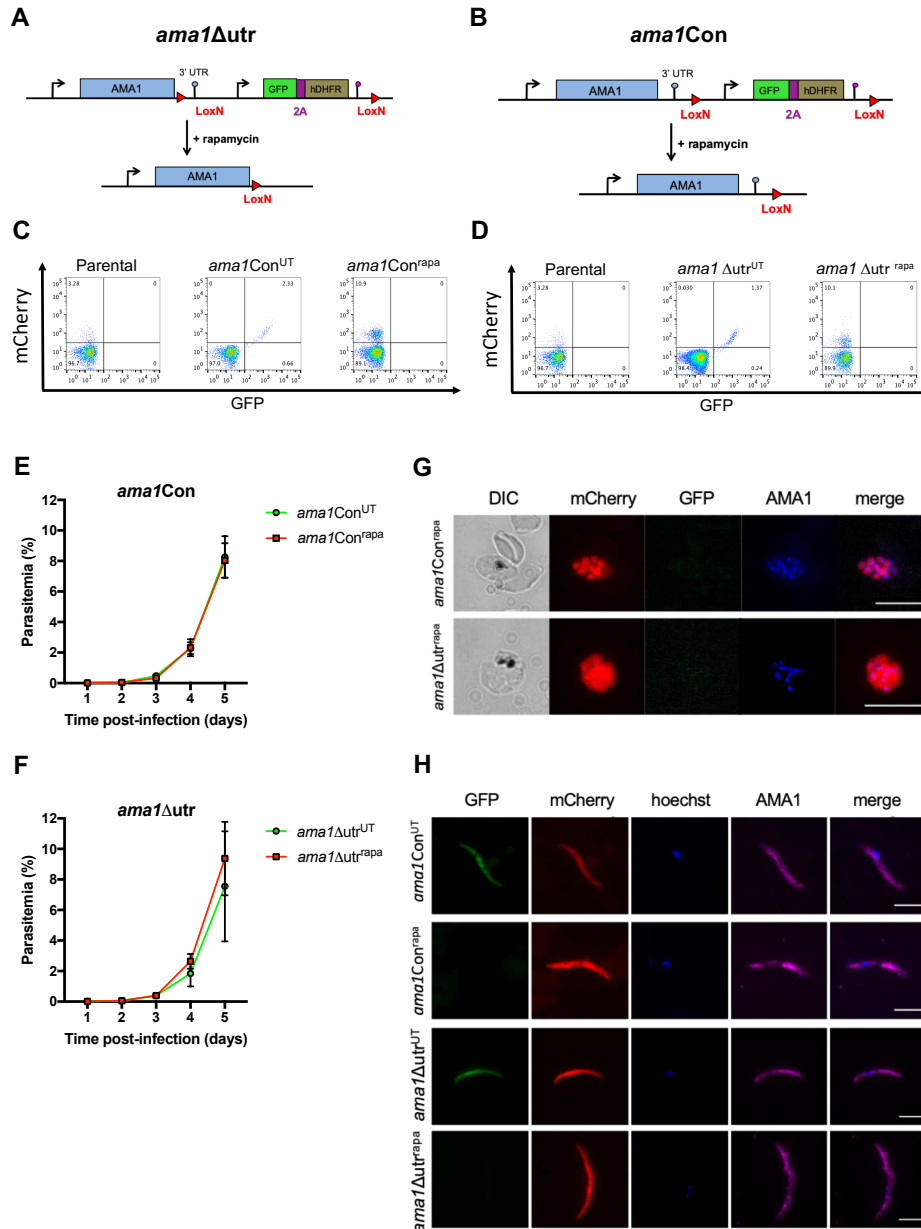


Figure 1. Deletion of the 3' UTR of *ama1* has no phenotypic impact in *P. berghei*

A-B. Strategy to generate *ama1* Δ utr (A) and *ama1*Con (B) parasites by modification of the wild type *ama1* locus in PbDiCre parasites. **C-D.** Flow cytometry analysis of PbDiCre (parental), *ama1*Con (C) and *ama1* Δ utr (D) untreated (^{UT}) or rapamycin-treated (^{rapa}) blood stage parasites. **E-F.** Blood stage growth of treated (^{rapa}) and untreated (^{UT}) *ama1*Con (E) or

ama1 Δ utr (F) parasites. Rapamycin was administered at day 2. The graphs represent the parasitaemia (mean +/- SEM) in groups of 3 mice. **G.** Immunofluorescence staining of rapamycin-treated *ama1*Con and *ama1* Δ utr blood stage schizonts with anti-AMA1 antibodies (blue). Scale bar = 10 μ m. **H.** Immunofluorescence images of rapamycin-treated *ama1*Con and *ama1* Δ utr sporozoites after staining with anti-AMA1 antibodies (magenta). Scale bar = 5 μ m.

To explore whether *ama1* Δ utr^{rapa} had adapted despite losing AMA1 expression, we fixed *ama1*Con^{rapa} and *ama1* Δ utr^{rapa} blood-stage schizonts and incubated them with anti-AMA1 antibodies for immunofluorescence staining. Intriguingly, we observed AMA1 expression in both *ama1*Con^{rapa} and *ama1* Δ utr^{rapa} merozoites (**Figure 1G**) implying that deletion of the *ama1* 3'UTR alone is not sufficient to abrogate expression of the protein in merozoites. We further analyzed the impact of 3'UTR deletion on AMA1 expression in sporozoites. For this purpose, *ama1*Con and *ama1* Δ utr parasites were treated with rapamycin or left untreated and then transmitted to mosquitoes, as described previously (Fernandes et al., 2020). Deletion of the *ama1* 3'UTR in *ama1* Δ utr^{rapa} parasites had no impact on oocyst formation in the midgut or sporozoite invasion of salivary glands, which were comparable to *ama1* Δ utr^{UT} and both *ama1*Con^{UT} and *ama1*Con^{rapa} parasites (**Supplementary Figure S2A and S2B**). Consistent with AMA1 expression in merozoites, we also observed AMA1 in *ama1* Δ utr^{rapa} salivary gland sporozoites by immunofluorescence, similar to *ama1*Con^{rapa} parasites (**Figure 1H**). We conclude from these data that deletion of the 3'UTR of *ama1* is not sufficient to abrogate AMA1 protein expression and cause phenotypical changes in *P. berghei* merozoites and sporozoites.

Complete conditional gene deletion of *ama1* in *P. berghei*

Since deletion of the 3'UTR was insufficient to deplete AMA1, we decided to delete the full-length *ama1* gene, by placing LoxN sites both upstream and downstream of the gene

(**Figure 2A**). One intrinsic feature of the Cre Lox system is the retention of a Lox site following recombination. We therefore reused *ama1Con^{rapa}* parasites, which contain a single LoxN site downstream of *ama1* 3'UTR, and transfected these parasites with the *ama1cKO* construct designed to introduce a second LoxN site upstream of the *ama1* gene, together with a GFP-hDHFR cassette (**Figure 2A and Supplementary Figure S3A**). Following transfection, the resulting *ama1cKO* parasites were sorted by FACS and genotyped to confirm correct integration of the construct into the genome and verify the absence of any residual unmodified *ama1Con* parasites (**Supplementary Figure S3B**). We then evaluated the effect of rapamycin treatment on blood-stage growth of *ama1cKO* parasites, by injecting mice with 10^6 pRBCs and treating them with a single oral dose of rapamycin. In contrast to untreated *ama1cKO* (*ama1cKO^{UT}*) infected mice, parasite growth was abrogated in mice upon rapamycin exposure (*ama1cKO^{rapa}*) (**Figure 2B**), confirming efficient gene deletion and consistent with an essential role of AMA1 in merozoite invasion and parasite survival in the blood.

AMA1 is required for sporozoite invasion of the mosquito salivary glands

Then, to determine the function of AMA1 in sporozoites, we transmitted *ama1cKO^{UT}* and *ama1cKO^{rapa}* parasites to mosquitoes, 24 hours after rapamycin treatment. In parallel, mosquitoes were fed with *ama1con^{UT}* and *ama1con^{rapa}* parasites as a reference line. Both *ama1cKO^{UT}* and *ama1cKO^{rapa}* parasites were capable of colonising the mosquito midgut (**Supplementary Figure S3C**), comparable to *ama1Con* parasites (**Supplementary Figure S2**). Despite no difference in the levels of exflagellation between all four parasite lines, we observed a slight reduction in the number of midgut sporozoites for *ama1cKO^{rapa}* parasites, which however was not statistically significant (**Figure 2C**). More importantly, quantification of the percentage of excised (mCherry⁺/GFP⁻) and non-excised (mCherry⁺/GFP⁺) parasites revealed close to 100% gene excision in sporozoites isolated from the midguts of mosquitoes infected with *ama1con^{rapa}* and *ama1cKO^{rapa}* parasites (**Figure 2F**).

Figure 2

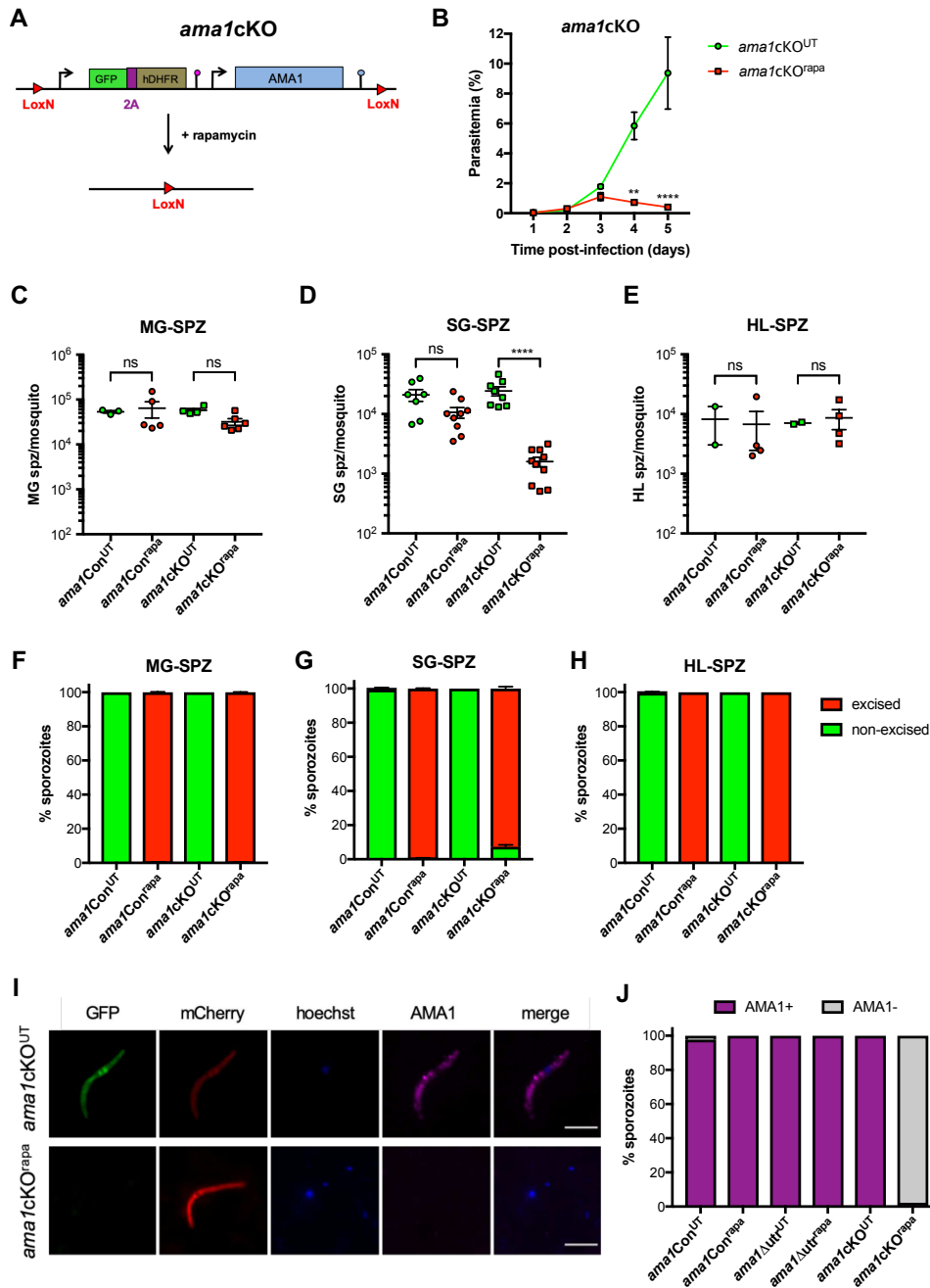


Figure 2. AMA1 is required during *P. berghei* invasion of mosquito salivary glands

A. Strategy to generate *ama1cKO* parasites by modification of the *ama1* locus in rapamycin-treated *ama1Con* parasites. **B.** Blood stage growth of treated (^{rapa}) and untreated (^{UT}) *ama1cKO* parasites. The graph represents the parasitaemia (mean +/- SEM) in groups of 3 mice. Rapamycin was administered at day 2. **, p < 0.01; ****, p < 0.0001 (Two-way ANOVA). **C-E.** Quantification of midgut sporozoites (MG-SPZ, C), salivary gland sporozoites (SG-SPZ, D), and hemolymph sporozoites (HL-SPZ, E).

D) or haemolymph sporozoites (HL-SPZ, E) isolated from mosquitoes infected with untreated (^{UT}) or rapamycin treated (^{rapa}) *ama1Con* and *ama1cKO* parasites. The graphs show the number of sporozoites per female mosquito (mean +/- SEM). Each dot represents the mean value obtained in independent experiments after dissection of 30-50 mosquitoes (MG, HL) or 50-70 mosquitoes (SG), respectively. Ns, non-significant; ****, $p < 0.0001$ (One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test). **F-H.** Quantification of excised (mCherry⁺/GFP⁻, red) and non-excised (mCherry⁺/GFP⁺, green) midgut sporozoites (MG-SPZ, F), salivary gland sporozoites (SG-SPZ, G) or haemolymph sporozoites (HL-SPZ, H) isolated from mosquitoes infected with untreated (^{UT}) or rapamycin treated (^{rapa}) *ama1Con* and *ama1cKO* parasites. **I.** Immunofluorescence imaging of untreated (^{UT}) and rapamycin-treated (^{rapa}) *ama1cKO* salivary gland sporozoites after staining with anti-AMA1 antibodies (magenta). Scale bar = 5 μ m. **J.** Quantification of AMA1-positive and AMA1-negative sporozoites among untreated (^{UT}) or rapamycin-treated (^{rapa}) *ama1Con*, *ama1 Δ utr* and *ama1cKO* sporozoites, as assessed by microscopy.

In the next step, we quantified sporozoites isolated from the salivary glands of infected mosquitoes and observed no difference between mosquitoes infected with *ama1con*^{UT} or *ama1cKO*^{UT} parasites (**Figure 2D**). In sharp contrast, the number of salivary gland sporozoites isolated from *ama1cKO*^{rapa} infected mosquitoes was severely reduced as compared to untreated parasites (**Figure 2D and Supplementary Figure S3D**). As expected, we could only observe mCherry⁺/GFP⁺ (non-excised) salivary gland sporozoites in *ama1con*^{UT} and *ama1cKO*^{UT} parasites, while *ama1con*^{rapa} and *ama1cKO*^{rapa} sporozoites were mCherry⁺/GFP⁻ (excised) (**Figure 2G**). Interestingly, a small proportion (<10%) of *ama1cKO*^{rapa} salivary gland sporozoites were mCherry⁺/GFP⁺ (non-excised), suggesting an enrichment of sporozoites harbouring an intact *ama1* gene, in the salivary glands of infected mosquitoes (**Figure 2G**).

In order to determine if a defect in egress from oocysts or invasion of the salivary glands was the reason behind the reduction in *ama1cKO*^{rapa} salivary gland sporozoite numbers, we

quantified haemolymph sporozoites from infected mosquitoes at day 14 post infection. There was no significant difference between the numbers of haemolymph sporozoites isolated from *ama1Con* and *ama1cKO* infected mosquitoes before or after rapamycin treatment (**Figure 2E**). Using microscopy, we could only see non-excised (mCherry⁺/GFP⁺) haemolymph sporozoites for *ama1Con*^{UT} and *ama1cKO*^{UT} infected mosquitoes, while all *ama1Con*^{rapa} and *ama1cKO*^{rapa} haemolymph sporozoites were excised (mCherry⁺/GFP⁻) (**Figure 2H**). The absence of a defect in egress from oocysts was also documented by microscopy imaging of the abdomen of infected mosquitoes, where scavenging of circulating sporozoites following egress results in bright red fluorescence of pericardiac cellular structures (**Supplementary Figure S3E**). A similar percentage of mosquitoes displayed mCherry-labelled pericardiac cells between untreated and rapamycin treated *ama1Con* and *ama1cKO* infected mosquitoes, confirming that loss of AMA1 expression in sporozoites does not affect sporozoite egress from oocysts (**Supplementary Figure S3F**).

Lastly, we verified the loss of AMA1 expression in sporozoites by immunofluorescence imaging of salivary gland sporozoites using anti-AMA1 antibodies. The micronemal pattern of AMA1 expression was consistent between *ama1Con*^{UT} and *ama1Con*^{rapa} sporozoites, as well as *ama1cKO*^{UT} sporozoites (**Figure 1H and 2I**). However, no AMA1 was detected in *ama1cKO*^{rapa} sporozoites, indicating the loss of AMA1 (**Figure 2I**). Quantification of AMA1 expression showed that all sporozoites from *ama1Con*^{UT}, *ama1Con*^{rapa} and *ama1cKO*^{UT}, as well as *ama1Δutr*^{UT} and *ama1Δutr*^{rapa} parasites, expressed AMA1 (**Figure 2J**). In contrast, >90% of the sporozoites isolated from *ama1cKO*^{rapa} infected mosquitoes lacked AMA1, confirming successful gene deletion and protein depletion (**Figure 2J**). Overall, our results demonstrate that loss of AMA1 expression in sporozoites impairs invasion of the mosquito salivary glands, without affecting development or egress from oocysts.

AMA1 is required for efficient sporozoite invasion of hepatocytes

In the next step, we decided to test if *ama1cKO*^{rapa} sporozoites could infect hepatocytes. AMA1 was previously implicated in cell traversal in *P. falciparum* sporozoites; hence we first

verified if *ama1cKO^{rapa}* sporozoites also displayed a similar defect in cell traversal *in vitro*, using a dextran assay as previously described (Mota et al., 2001). Quantification of dextran-positive cells indicated that cell traversal was comparable between *ama1con^{rapa}* and *ama1cKO^{rapa}* sporozoites, implying that both sporozoite motility and cell traversal were unaffected by excision of *ama1* (**Figure 3A**). We then infected HepG2 cell cultures with sporozoites isolated from mosquitoes previously fed with rapamycin-treated or untreated *ama1Con* and *ama1cKO* parasites. We quantified infected cells, containing exo-erythrocytic forms (EEFs), at 24 h post infection by flow cytometry and fluorescence microscopy. We observed a minor but non-significant reduction in the number of EEFs for *ama1con^{rapa}* parasites (**Figure 3B**) compared to *ama1con^{UT}*. In contrast, the number of EEFs obtained from hepatocytes infected with *ama1cKO^{rapa}* sporozoites was significantly reduced (**Figure 3B**). As expected, non-excised (mCherry⁺/GFP⁺) parasites comprised the majority of EEFs quantified for *ama1Con^{UT}* and *ama1cKO^{UT}* parasites (**Figure 3C**). Conversely, excised (mCherry⁺/GFP⁻) EEFs were predominantly observed for both *ama1Con^{rapa}* and *ama1cKO^{rapa}* infected hepatocytes. However, an enrichment of non-excised (mCherry⁺/GFP⁺) EEFs was observed in *ama1cKO^{rapa}* infected hepatocytes (**Figure 3C**), similar to what was observed for the salivary glands of mosquitoes infected with *ama1Con^{rapa}* parasites (**Figure 2G**). Importantly, we could not observe any obvious defect in developmental size or morphology for all four parasite lines, by fluorescence microscopy (**Figure 3D**). Finally, UIS4 staining of the PV membrane confirmed that mCherry⁺/GFP⁻ (excised) *ama1cKO^{rapa}* sporozoites could form a PV *in vitro*, similar to *ama1Con^{rapa}* EEFs (**Figure 3E**), implying that in the absence of AMA1, sporozoites conserve a residual capacity to productively invade host cells.

Figure 3

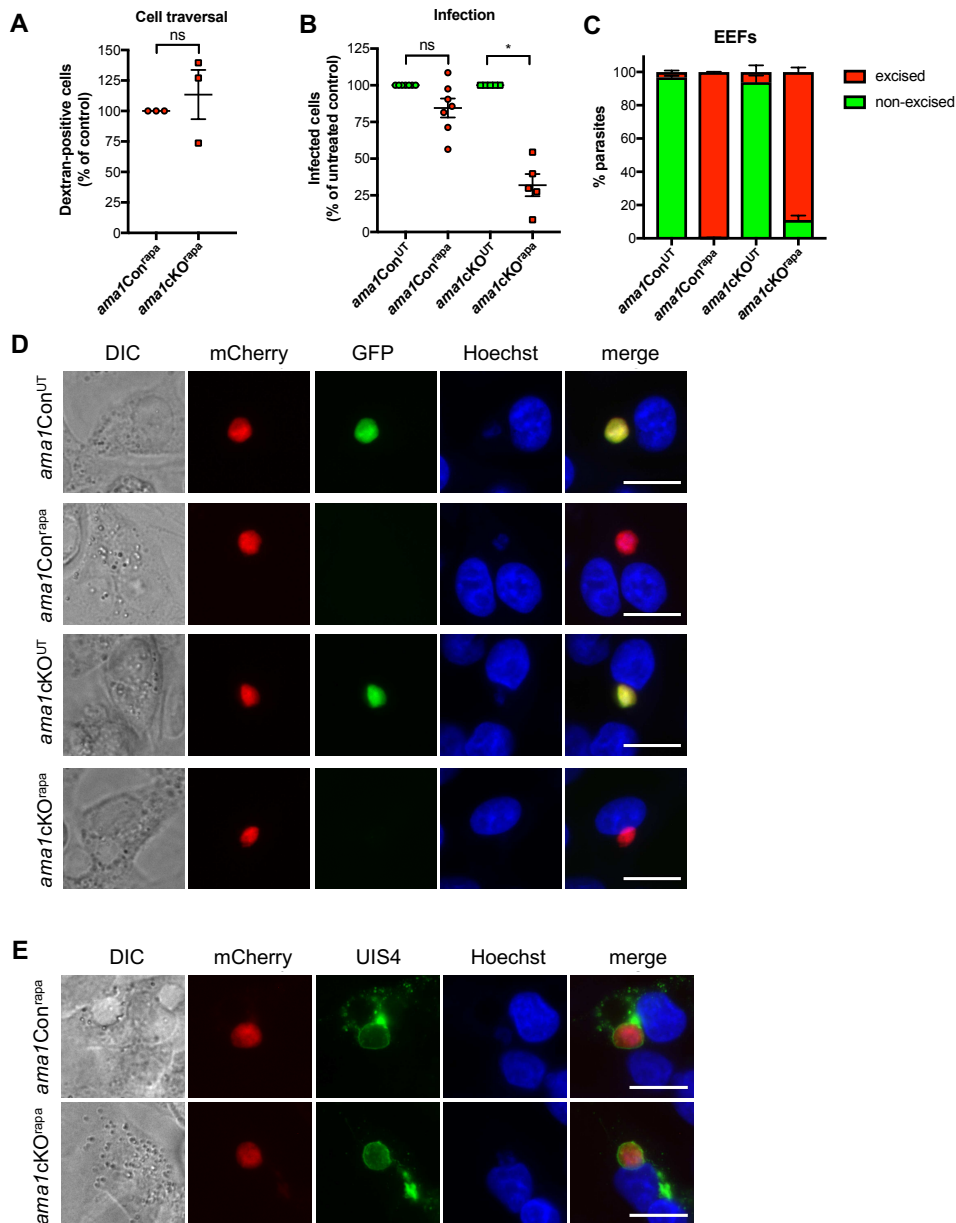


Figure 3. Sporozoite AMA1 is required for efficient infection of mammalian cells

A. Quantification of sporozoite cell traversal activity (% of dextran-positive cells) in rapamycin-treated *ama1Con* and *ama1cKO* parasites. The values for rapamycin-treated *ama1cKO* parasites are represented as percentage of the rapamycin-treated *ama1Con* parasites (mean +/- SEM of three independent experiments). Each data point is the mean of five technical replicates. Ns, non-significant (Two-tail ratio paired t test). **B.** Quantification of EEFs development *in vitro*, done by flow cytometry or microscopy analysis of HepG2 cells infected

with sporozoites isolated from either untreated (^{UT}) or rapamycin-treated (^{rapa}) *ama1Con* and *ama1cKO* infected mosquitoes. The data for rapamycin-treated *ama1Con* and *ama1cKO* parasites are represented as percentage of the respective untreated parasites (mean +/- SEM). Each data point is the mean of three technical replicates in one experiment. Ns, non-significant; *, p < 0.05 (Two-tail ratio paired t test). **C.** Quantification of excised (mCherry⁺/GFP⁻, red) and non-excised (mCherry⁺/GFP⁺, green) EEF populations for untreated and treated *ama1Con* and *ama1cKO* parasites. **D.** Fluorescence microscopy of EEF development (24h p.i.) *in vitro*, in HepG2 cells infected with salivary gland sporozoites from untreated (^{UT}) or rapamycin-treated (^{rapa}) *ama1Con* and *ama1cKO* parasites. Scale bar = 10 μm. **E.** Immunofluorescence imaging of mCherry⁺/GFP⁻ (excised) rapamycin-treated (^{rapa}) *ama1Con* and *ama1cKO* EEFs after staining with anti-UIS4 antibodies (green). Scale bar = 10 μm.

RON2 and RON4 interact with AMA1 in sporozoites and are required for host cell invasion

Merozoite AMA1 interacts with RON proteins for invasion of erythrocytes (Lamarque et al., 2011; Richard et al., 2010; Srinivasan et al., 2011). In order to investigate whether similar protein interactions also occur in sporozoites, we performed RFP-trap immunoprecipitation experiments using lysates from transgenic sporozoites expressing RON4 fused to mCherry. RON4, RON2, RON5 and AMA1 were the main proteins identified by mass spectrometry among co-precipitated proteins, showing that AMA1-RON interactions are conserved in salivary gland sporozoites (**Table S1**). We decided to focus on RON2 and RON4 and generated conditional mutants, using a two-step strategy to introduce LoxN sites upstream and downstream of the genes in PbDiCre parasites (**Figure 4A** and **Supplementary Figure S4A-B** and **S5A-B**). Clonal populations of *ron2cKO* and *ron4cKO* parasites were obtained by pyrimethamine selection and FACS sorting, and verified by genotyping PCR (**Supplementary Figure S4C** and **S5C**). In agreement with an essential role for RON2 and RON4 in the blood,

rapamycin-induced gene excision reduced blood-stage growth in *ron2cKO^{rapa}* and *ron4cKO^{rapa}* infected mice (**Figure 4B** and **4C**).

We then transmitted *ron2cKO* and *ron4cKO* parasites to mosquitoes, before and after rapamycin treatment respectively. Both parasite lines could colonise the midgut of mosquitoes as evidenced by microscopy imaging of midgut oocysts (**Supplementary Figure S6A** and **S6B**). Rapamycin treatment of *ron2cKO* and *ron4cKO* parasites before transmission led to slightly reduced midgut and haemolymph sporozoite numbers (**Figure 4D** and **4E**), but there was no difference in the percentage of mosquitoes displaying mCherry-labelled pericardiac cells (**Supplementary Figure S6C**), indicating no defect in egress from the oocyst for both *ron2cKO^{rapa}* and *ron4cKO^{rapa}* sporozoites. In contrast, the numbers of salivary gland sporozoites were severely reduced for both *ron2cKO^{rapa}* and *ron4cKO^{rapa}* parasites (**Figure 4F**), as observed for *ama1cKO^{rapa}* parasites. As expected, rapamycin treatment before transmission induced robust gene excision in both *ron2cKO^{rapa}* and *ron4cKO^{rapa}* sporozoites (**Figure 4G-I**). Despite reduced invasion we could recover sufficient numbers of *ron2cKO^{rapa}* and *ron4cKO^{rapa}* salivary gland sporozoites to assess host cell invasion *in vitro*. As observed with *ama1cKO^{rapa}* parasites, rapamycin-induced gene excision of *ron2* and *ron4* impaired invasion of HepG2 cells, as shown by reduced EEF numbers (**Figure 4J**). However, this effect was not statistically significant in the case of *ron2cKO^{rapa}* due to variability between experiments. Intriguingly, this was associated with increased cell traversal activity of *ron2cKO^{rapa}* (but not *ron4cKO^{rapa}*) sporozoites (**Figure 4K**). This observation is difficult to explain, but could result from unsuccessful productive invasion, as observed with other mutants (Manzoni et al., 2017), or from variability of sporozoite infectivity between independent batches. Overall, our data support an active role for RON2 and RON4 in invasion of both mosquito salivary glands and hepatocytes, similar to AMA1.

Figure 4

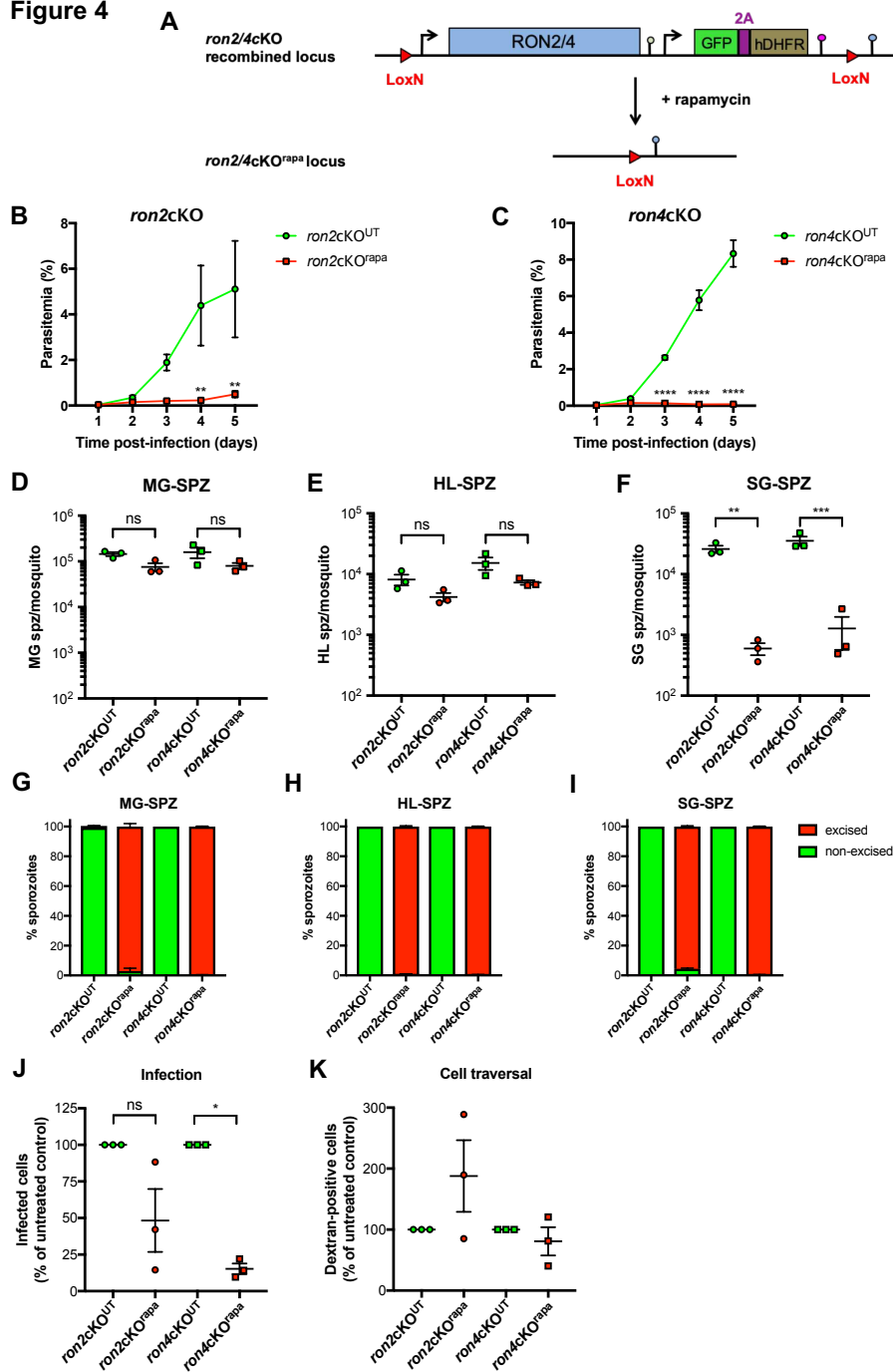


Figure 4. RON2 and RON4 are required for sporozoite invasion in the mosquito and mammalian hosts

A. Strategy to generate *ron2cKO* and *ron4cKO* parasites in the PbDiCre line. **B-C.** Blood stage growth of treated (^{rapa}) and untreated (^{UT}) *ron2cKO* (B) and *ron4cKO* (C) parasites. The graph represents the parasitaemia (mean +/- SEM) in groups of 5 mice. Rapamycin was administered at day 2. **, p < 0.01; ****, p < 0.0001 (Two-way ANOVA). **D-F.** Quantification of midgut

sporozoites (MG-SPZ, D), haemolymph sporozoites (HL-SPZ, E) or salivary gland sporozoites (SG-SPZ, F) isolated from mosquitoes infected with untreated (^{UT}) or rapamycin treated (^{rapa}) *ron2cKO* or *ron4cKO* parasites. The graphs show the number of sporozoites per female mosquito (mean +/- SEM). Each dot represents the mean value obtained in independent experiments after dissection of 30-50 mosquitoes (MG, HL) or 50-70 mosquitoes (SG), respectively. Ns, non-significant; **, p < 0.01; ***, p<0.001 (Two-tail ratio paired t test). **G-I.** Quantification of excised (mCherry⁺/GFP⁻, red) and non-excised (mCherry⁺/GFP⁺, green) midgut sporozoites (MG-SPZ, G), haemolymph sporozoites (HL-SPZ, H) or salivary gland sporozoites (SG-SPZ, I) isolated from mosquitoes infected with untreated (^{UT}) or rapamycin treated (^{rapa}) *ron2cKO* and *ron4cKO* parasites. **J.** Quantification of EEFs development *in vitro*, done by microscopy analysis of HepG2 cells infected with sporozoites isolated from either untreated or rapamycin-treated *ron2cKO* and *ron4cKO* infected mosquitoes. The data for rapamycin-treated parasites are represented as percentage of the respective untreated parasites (mean +/- SEM). Each data point is the mean of five technical replicates in one experiment. Ns, non-significant; *, p < 0.05 (Two-tail ratio paired t test). **K.** Quantification of sporozoite cell traversal activity (% of dextran-positive cells) in untreated and rapamycin-treated *ron2cKO* and *ron4cKO* parasites. The data for rapamycin-treated parasites are represented as percentage of the respective untreated parasites (mean +/- SEM). Each data point is the mean of five technical replicates from one experiment.

***P. berghei* sporozoites within mosquito salivary glands do not reside in a vacuole**

AMA1 and RONS are considered as key components of the MJ, which so far has been linked exclusively to PV formation. Our results showing that AMA1 and RONS are critical for invasion of salivary glands therefore suggested that sporozoites may form a PV in salivary gland cells. This assumption is supported in part by early studies based on electron microscopy showing sporozoites inside vacuoles within acinar cells (Ando et al., 1999; Pimenta et al., 1994; Sinden and Strong, 1978). In order to get more insights into the role of sporozoite AMA1

during invasion of the mosquito salivary glands, we used serial block face-scanning electron microscopy (SBF-SEM) for three-dimensional volume imaging of whole salivary glands isolated from mosquitoes infected with WT (PbGFP) or *ama1cKO^{rapa}* parasites. In infected salivary glands, WT sporozoites were observed inside acinar cells and in the apical cavities, where they clustered into bundles (**Figure 5A and 5B; Supplementary Movie 1**). Despite reduced number of sporozoites, we observed a similar distribution of *ama1cKO^{rapa}* parasites inside the salivary glands, with both intracellular and intraluminal sporozoites (**Figure 5A and 5B; Supplementary Movie 2**). Upon closer examination, we observed no obvious morphological defect in micronemes and rhoptries (**Figure 5C**) or apical organization (**Figure 5D**) in *ama1cKO^{rapa}* as compared to WT sporozoites.

Many sporozoites inside acinar cells were found lying in direct contact with the cell cytosol, without any visible vacuolar membrane (**Figure 5E**). Nevertheless, we also observed some sporozoites seemingly enclosed in a vacuole, with both WT (**Figure 5F**) and *ama1cKO^{rapa}* sporozoites (**Figure 5C**). However, careful examination of the 3D SBF-SEM images revealed that these structures are in fact not real vacuoles but instead correspond to invagination of acinar cellular membranes surrounding portions of intracellular sporozoites (**Figure 5F; Supplementary Movie 3**). These observations indicate that although sporozoites intimately interact with membranes inside acinar cells, they do not reside inside a PV. Collectively, our data support a role of AMA1 and RONs during invasion of the mosquito salivary glands, which is uncoupled from PV formation, thus revealing a novel function of the invasion complex.

Figure 5

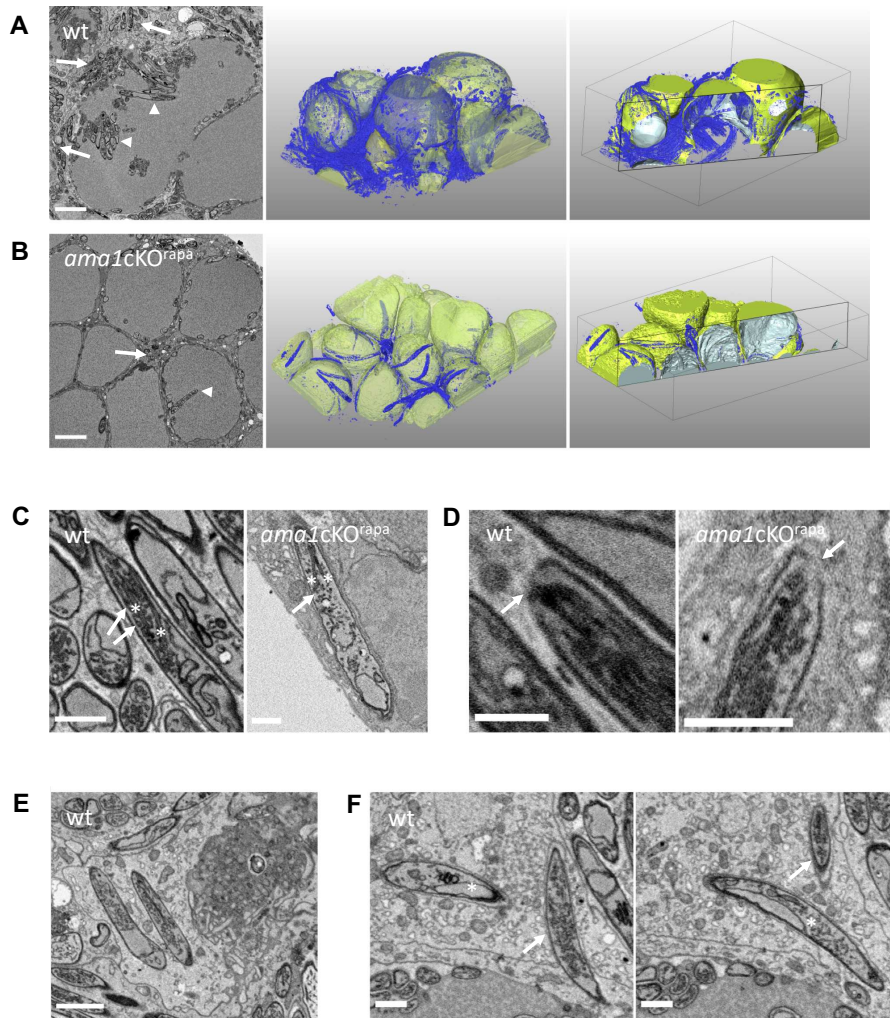


Figure 5. Serial block face-scanning electron microscopy (SBF-SEM) of infected mosquito salivary glands

A-B. Representative sections of salivary glands from mosquitoes infected with WT (A) or *ama1cKO^{rapa}* (B) parasites. Scale bars, 5 μm . The volume segmentation shows the secretory cavities (yellow) and sporozoites (blue). WT and AMA1-deficient sporozoites were observed inside the acinar cells (arrows) and in the secretory cavities (arrowheads). The images were taken from Supplementary movie 1 and Supplementary movie 2, respectively. **C.** SBF-SEM section showing apical secretory organelles, micronemes (arrows) and rhoptries (asterisks), in WT (left panel) or *ama1cKO^{rapa}* (right panel) sporozoites. Scale bars, 1 μm . **D.** Images of the apical tip of WT (left panel) and *ama1cKO^{rapa}* (right panel) sporozoites, showing the positioning

of apical organelles and an opening in the parasite pellicle (arrows). Scale bars, 1 μm . **E.** SBF-SEM imaging of WT sporozoites inside salivary gland acinar cells. The parasites are not surrounded by a vacuolar membrane and lie free in the cell cytoplasm. Scale bar, 2 μm . **F.** SBF-SEM sections from Supplementary Movie 3, showing WT sporozoites inside salivary gland acinar cells. The first section (left panel) shows a sporozoite partly wrapped inside host cell membranes (arrow), and a second one seemingly contained inside a vacuole (asterisk). The second section (right panel) shows that in fact the second sporozoite is not enclosed in a vacuole but instead is interacting with invaginated host cell membranes (asterisk), while the first parasite now seems surrounded by a membrane (arrow), giving the false impression of being enclosed in a vacuole. Scale bars, 2 μm .

DISCUSSION

AMA1 and RON proteins play an essential role in *Plasmodium* merozoites during invasion of erythrocytes, where they participate in the formation of the MJ. In contrast, their role in sporozoites was unclear so far. In this study, we exploited the DiCre recombinase system to efficiently delete *ama1*, *ron2* or *ron4* genes in *P. berghei* prior to transmission, allowing subsequent functional investigations in sporozoites. Our data establish that AMA1 and RONS are important for colonization of the salivary glands in the mosquito and for efficient invasion of mammalian hepatocytes.

Deletion of the 3'UTR of *ama1* using the DiCre system was not sufficient to abrogate protein expression, a phenomenon that has been observed before with other genes in *P. berghei* and *P. falciparum* (Collins et al., 2013; Ecker et al., 2012), and could explain the discrepancy between our results and previous reports (Giovannini et al., 2011). Therefore, we decided to delete the full-length *ama1* gene in a two-step approach to introduce Lox sites upstream and downstream of the gene of interest in mCherry-expressing PbDiCre parasites, together with a GFP cassette to facilitate monitoring of gene excision. Rapamycin treatment of *ama1*cKO parasites led to a major impairment in blood-stage growth, consistent with an essential role for AMA1 in RBC invasion, but without affecting transmission to mosquitoes. Remarkably, we observed a dramatic reduction in the number of salivary gland sporozoites isolated from *ama1*cKO^{rapa} infected mosquitoes despite comparable midgut and haemolymph sporozoite numbers between *ama1*Con^{rapa} *ama1*cKO^{rapa}, showing that AMA1 is important for efficient invasion of the salivary glands, but not egress from oocysts. In addition to a severe defect in salivary gland invasion in the mosquito, AMA1-deficient sporozoites also displayed a partial defect during invasion of mammalian hepatocytes.

We also conditionally deleted *ron2* and *ron4* genes using the DiCre method and obtained a similar phenotype as with *ama1*, with a severe reduction in salivary gland sporozoite numbers and reduced invasion of hepatocytes. This similar phenotype, combined with mass spectrometry evidence of an interaction between AMA1 and RON proteins, is consistent with AMA1 playing a role together with the RON complex during sporozoite host cell invasion. It

thus appears that the function of AMA1 and RONS cannot be dissociated, unlike previously thought (Giovannini et al., 2011). Our data are in line with those from two studies where a promoter exchange strategy was used to knockdown *ron2*, *ron4* and *ron5* in *P. berghei* sporozoites (Ishino et al., 2019; Nozaki et al., 2020). All three mutants shared a similar phenotype, with a defect in salivary gland invasion and reduced infection of HepG2 cell cultures by haemolymph sporozoites.

Despite a dramatic reduction in colonization of the mosquito salivary glands, *ama1cKO^{rapa}* displayed a similar distribution as WT sporozoites inside invaded glands by 3D EM imaging, supporting the notion that a functional role of AMA1 and the RONS is most likely restricted to the initial point of entry into the salivary glands. While we cannot exclude the presence of non-excised *ama1cKO^{rapa}* parasites inside infected glands in the SFB-SEM experiments, these parasites should only represent a minority of salivary gland sporozoites (<10%). Based on our data, we hypothesize that AMA1 is probably secreted before invasion of the glands to form a complex with RON proteins. The similar phenotype observed with *ron2cKO^{rapa}* and *ron4cKO^{rapa}* parasites further indicate that rhoptry secretion presumably also precedes entry into the salivary glands. Previous ultrastructural imaging studies of sporozoites have in fact reported the presence of four or more rhoptries in midgut-derived sporozoites, as opposed to two in mature salivary gland sporozoites (Kudryashev et al., 2010; Schrevel et al., 2008; Sinden and Strong, 1978; Tokunaga et al., 2019). These observations suggest the possibility of a rhoptry discharge or fusion event occurring before or during invasion of the glands. However, it is also possible that rhoptries partially secrete their contents, in a kiss-and-run process, in order to facilitate entry into the glands, a process that remains difficult to capture with the current tools available.

Although reminiscent of blood-stage merozoites, where the discharge of RON proteins has been associated with the formation of a canonical junction (Lamarque et al., 2011; Riglar et al., 2011), an examination of salivary glands of *P. gallinaceum*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes by electron microscopy failed to provide evidence for the formation of a typical MJ (Pimenta et al., 1994). The authors instead pointed out that sporozoites enter the salivary

glands through an invagination of the basal lamina while forming a junctional area between the anterior tip of the sporozoite and the plasma membrane of the acinar cells (Pimenta et al., 1994). The absence of a moving junction has likewise been corroborated by another study on *P. falciparum* sporozoites in *Anopheles stephensi* mosquitoes, where sporozoites were observed penetrating salivary glands through holes in the basal membrane without causing any obvious damage to the gland (Posthuma et al., 1989).

Aside from the MJ, there are also conflicting observations on the formation of vacuoles during salivary gland invasion. Pimenta *et al.* reported that newly invaded sporozoites found in the cytoplasm of the acinar cells were surrounded by a vacuole while those that had entered the secretory cavity were either devoid of a vacuole or present inside disintegrating vacuoles (Pimenta et al., 1994). Several other studies looking at sporozoites inside the salivary gland secretory cells of infected mosquitoes also failed to observe a PV around sporozoites (Posthuma et al., 1989; Sinden and Strong, 1978; Sterling et al., 1973; Wells and Andrew, 2019). Here we could resolve these discrepancies using volume electron microscopy, which revealed that the appearance of vacuoles around some sporozoites within the glands actually corresponds to endomembrane invaginations around intracellular parasites. While these data indicate that inside the acinar cells sporozoites do not reside in a PV, we cannot exclude that haemolymph sporozoites initially enter the salivary glands by forming a transient vacuole. In this regard, mature sporozoites can form transient vacuoles during traversal of hepatocytes (Risco-Castillo et al., 2015). However, this process is not associated with rhoptry discharge (Risco-Castillo et al., 2015), and we show here that neither AMA1 nor RONS are required for cell traversal activity, suggesting that distinct mechanisms drive invasion of the salivary glands and traversal through mammalian cells. Alternatively, sporozoites may use AMA1 and RONS to enter the cytosol of acinar cells directly, through a transient hole in the cell membrane. In this scenario, the role of AMA1-RONS could be to maintain a tight ring around the parasite, to allow invasion without creating a leak and disrupting the membrane surface tension, to prevent cell damage (**Figure 6**). AMA1 and RONS may play the same role during productive invasion of mammalian cells, except that in this case the parasite enters inside an invagination of the

host cell plasma membrane, leading to the formation of the PV. This unifying mechanistic model would also fit with the proposed role of RONs in sealing of the PV at the end of the invasion process (Pavlou et al., 2018). Sporozoites from another apicomplexan parasite, *Theileria parva*, also express AMA1 and RON2 (Nyagwange et al., 2018), yet enter host cells through circumferential zippering of the parasite and host membranes, in an actin-independent mechanism that does not involve the formation of a canonical junction (Shaw, 2003; Shaw et al., 1991). It is thus possible that AMA1 and RON2 fulfil an evolutionarily conserved function in facilitating membrane apposition during entry, not necessarily linked to PV formation.

Figure 6

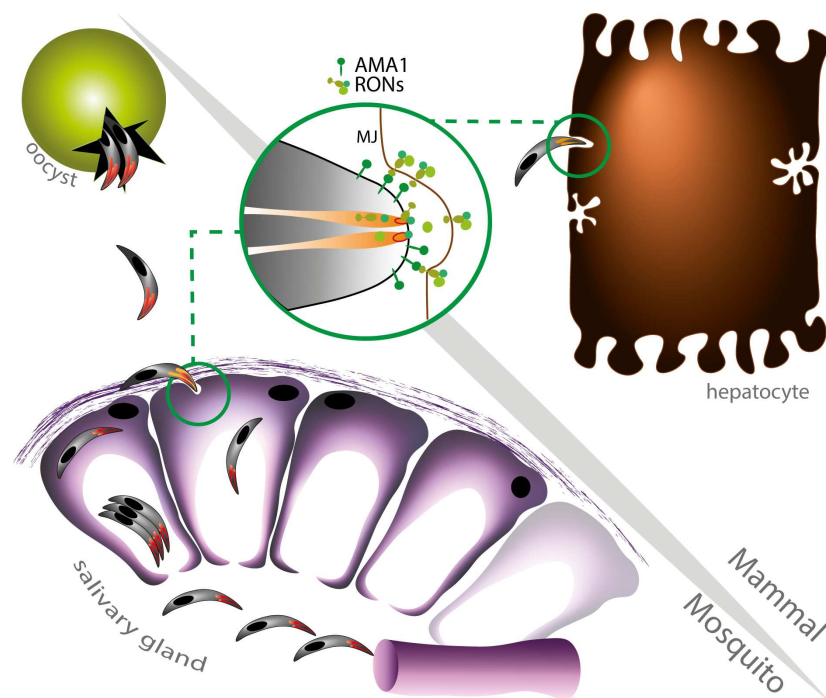


Figure 6. Model of AMA1-RON function in *Plasmodium* sporozoites. AMA1 and RON proteins drive two distinct sporozoite invasion events in the mosquito and mammalian hosts. After egress from oocysts, sporozoites first rely on AMA1 and RONs to enter the mosquito salivary glands, where they eventually accumulate in the secretory cavities. Then, following parasite transmission to a mammalian host, AMA1 and RONs are required for efficient productive invasion of hepatocytes. Both events supposedly involve rhoptry secretion and the

formation of a junction, which however is uncoupled from the formation of a canonical vacuole during colonization of the insect salivary glands.

Despite the significant reduction in numbers, a minor proportion of *ama1cKO*^{rapa}, *ron2cKO*^{rapa} and *ron4cKO*^{rapa} sporozoites could still invade the salivary glands of infected mosquitoes, suggesting that these sporozoites somehow adapted to the loss of AMA1, RON2 and RON4, perhaps through the use of alternative adhesion or invasion ligands. One can assume that the residual invasion we observed is the outcome of some degree of plasticity in AMA-RON interactions, whereby paralogs may compensate for the function of AMA1 and/or RONs (Lamarque et al., 2014; Parker et al., 2016). While there is no known paralog of RON2 in *Plasmodium*, the Membrane Associated Erythrocyte Binding-Like protein (MAEBL), which is a paralog of AMA1 was in fact reported to be essential for invasion of the salivary glands (Kappe et al., 1998; Kariu et al., 2002). Interestingly, MAEBL was not identified by co-immunoprecipitation in the RON2, RON4, RON5 complex in oocyst derived (Nozaki et al., 2020) or salivary gland sporozoites (this study), and *ama1cKO*^{rapa} sporozoites fail to invade the mosquito salivary glands, thus arguing against a compensatory role for MAEBL in AMA1-deficient sporozoites. Yet, we cannot exclude that MAEBL and AMA1-RONs function at the same step and cooperate for successful invasion of the salivary gland and possibly hepatocytes.

When tested in hepatocyte cell cultures, only a minor proportion of *ama1cKO*^{rapa}, *ron2cKO*^{rapa} and *ron4cKO*^{rapa} salivary gland sporozoites productively invaded and developed into EEFs, suggesting that the functional role of AMA1, RON2 and RON4 during invasion is likely conserved across invasive stages. The defect in hepatocyte invasion however was less pronounced in comparison to that observed for the salivary glands, implying either a possible adaptation of these parasites, or selection of the most invasive sporozoites (including the small number of non-excised parasites), or simply a differential dependency on AMA1-RONs during liver infection. Consistent with our results, a previous study has shown that anti-AMA1 only

partially inhibited *P. falciparum* infection of human hepatocytes *in vitro* (Silvie et al., 2004). Interestingly, knockdown of RON2 in sporozoites in a previous study, was shown to affect cell traversal and hepatocyte invasion, both *in vitro* and *in vivo*, with the authors implying that loss of RON2 in sporozoites affected attachment to both the salivary glands and hepatocytes, thereby influencing invasion (Ishino et al., 2019). An earlier report on *P. falciparum* sporozoites showed that interfering with the AMA1-RON2 interaction affected host cell traversal (Yang et al., 2017). However, *ama1cKO*^{rapa}, *ron2cKO*^{rapa} and *ron4cKO*^{rapa} sporozoites showed no defect in cell traversal, but were impaired in productive invasion, thus contradicting any essential role for AMA1, RON2 and RON4 in cell traversal, at least in *P. berghei*. While these differences in phenotypes could be attributed to differences between *P. falciparum* and *P. berghei*, it is possible that the use of salivary gland sporozoites in our study versus those obtained from the haemolymph by Ishino *et al.* accounted for the difference in observations for cell traversal between experiments.

Based on all these findings, we propose a new hypothesis where AMA1 and RONs cooperate to enable membrane apposition during entry, which permits the sporozoite to actively enter the salivary glands of the mosquito or productively invade hepatocytes in the mammalian host. Our data imply that these interactions between AMA1 and the RONs are crucial to invasive stages of *Plasmodium* and that their contribution to the invasion process is conserved across different stages and possibly species. Pre-clinical studies have shown that vaccination with the AMA1-RON2 complex induces functional antibodies that better recognize AMA1 as it appears complexed with RON2 during merozoite invasion, providing an attractive vaccine strategy against *Plasmodium* blood stages (Srinivasan et al., 2014, 2017). Our results indicate that the AMA1-RON complex might also be considered as a potential target to block malaria transmission.

METHODS

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Mice

Female Swiss mice (6–8 weeks old, from Janvier Labs) were used for all routine parasite infections. 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. Protocols were approved by the Ethical Committee Charles Darwin N°005 (approval #7475-2016110315516522).

Parasites

Conditional genome editing was performed in the *P. berghei* (ANKA strain) PbDiCre line, obtained after integration of mCherry and DiCre expression cassettes at the dispensable *p230p* locus (Fernandes et al., 2020). Two additional lines expressing RON4-mCherry and/or GFP (Manzoni et al., 2014) were used for immunoprecipitation and electron microscopy experiments, respectively. Parasites were maintained in mice through intraperitoneal injections of frozen parasite stocks. *Anopheles stephensi* mosquitoes were reared at 24°C with 80 % humidity and permitted to feed on infected mice that were anaesthetised, using standard methods of mosquito infection as previously described (Ramakrishnan et al., 2013). Post feeding, *P. berghei*-infected mosquitoes were kept at 21°C and fed daily on a 10% sucrose solution.

Host cell cultures

HepG2 cells (ATCC HB-8065) were cultured in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% L-Glutamine as previously described (Silvie et al., 2007), in culture dishes coated with rat tail collagen I (Becton-Dickinson).

METHOD DETAILS

Plasmid construction

In order to target different genes of interest, we first generated a generic plasmid,

pDownstream1Lox (Addgene #164574), containing a GFP-2A-hDHFR cassette under the control of a *P. yoelii hsp70* promoter and followed by the 3'UTR of *P. berghei calmodulin (cam)* gene and a single LoxN site. The plasmid also contains a yFCU cassette to enable the elimination of parasites carrying episomes by negative selection with 5-fluorocytosine.

The *ama1Con* plasmid was designed to excise only ~30 bp downstream of *P. berghei ama1* 3'UTR. Two fragments were inserted on each side of the GFP-2A-hDHFR cassette of the pDownstream1Lox plasmid: a 5' homology region (HR) homologous to the terminal portion of *ama1* (ORF and 3' UTR) followed by a single LoxN site, and a 3' HR homologous to a sequence downstream of the 3' UTR of *ama1* gene. The *ama1*Δutr plasmid was assembled similarly to the *ama1Con* construct except that the 5' HR consisted in the terminal portion of *ama1* ORF followed by a LoxN site and the 3' UTR of *P. yoelii ama1*, to allow excision of the 3'UTR upon rapamycin activation of DiCre. The *ama1cKO* plasmid was designed to introduce a single LoxN site upstream of *ama1* in the *ama1Con*^{rapa} parasites, which already contained a residual LoxN site downstream of the gene. To generate the *ama1cKO* plasmid, the pDownstream1Lox vector was first modified to remove the downstream LoxN site. Then, a 5' HR and a 3' HR, both homologous to sequences located upstream of *ama1* gene, were cloned into the modified plasmid on each side of the GFP-2A-hDHFR, with a single LoxN site introduced upstream of the GFP-2A-hDHFR cassette.

To generate *ron2cKO* and *ron4cKO* constructs, two separate plasmids, P1 and P2, were generated to insert a LoxN site upstream of the promoter and downstream of the gene of interest, respectively, in two consecutive transfections. P1 plasmids were constructed by insertion of 5' and 3' HR on each side of the GFP-2A-hDHFR cassette in the pDownstream1Lox plasmid, with a second LoxN site introduced upstream of the GFP cassette. The 5' HR and 3' HR correspond to consecutive fragments located in the promoter region of the GOI. Because the intergenic sequence between *ron4* gene and its upstream gene is short, and in order to maintain expression of the upstream gene and exclude any unwanted duplication and spontaneous recombination events, we introduced the 5' HR of *ron4* in two fragments, with fragment 1 corresponding to the region just upstream of the ORF while

fragment 2 corresponded to the 3' UTR from the *P. yoelii* ortholog of the upstream gene. P2 plasmids were constructed in a similar manner by insertion of a 5' HR and a 3'HR on each side of the GFP-2A-hDHFR cassette in the pDownstream1Lox plasmid. The 3' HR regions corresponded to the 3' UTR sequences of *RON2* or *RON4*, respectively. For both target genes, the 5' HR was divided into two fragments, where fragment 1 corresponded to the end of the ORF followed by a triple Flag tag, and fragment 2 corresponded to the 3' UTR from the *P. yoelii* ortholog gene, in order to avoid duplication of the 3' UTR region and spontaneous recombination.

All plasmid inserts were amplified by PCR using standard PCR conditions and the CloneAmp HiFi PCR premix (Takara). Following a PCR purification step (QIAquick PCR purification kit), the fragments were sequentially ligated into the target vector using the In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech). The resulting plasmid sequences were verified by Sanger sequencing (GATC Biotech) and linearised before transfection. All the primers used for plasmid assembly are listed in **Table S2**.

Parasite transfection

For parasite transfection, schizonts purified from an overnight culture of PbDiCre parasites were transfected with 5–10 µg of linearised plasmid by electroporation using the AMAXA Nucleofector device (Lonza, program U033), as previously described (Janse et al., 2006), and immediately injected intravenously into the tail vein of Swiss mice. For selection of resistant transgenic parasites, pyrimethamine (35 mg/L) and 5-fluorocytosine (0.5 mg/ml) were added to the drinking water and administered to mice, one day after transfection. Transfected parasites were sorted by flow cytometry on a FACSAria II (Becton-Dickinson), as described (Manzoni et al., 2014), and cloned by limiting dilutions and injections into mice. The parasitaemia was monitored daily by flow cytometry and the mice sacrificed at a parasitaemia of 2-3%. The mice were bled and the infected blood collected for preparation of frozen stocks (1:1 ratio of fresh blood mixed with 10% Glycerol in Alsever's solution) and isolation of parasites for genomic DNA extraction, using the DNA Easy Blood and Tissue Kit (Qiagen), according to the

manufacturer's instructions. Specific PCR primers were designed to check for wild-type and recombined loci and are listed in **Table S2**. Genotyping PCR reactions were carried out using Recombinant Taq DNA Polymerase (5U/ μ l from Thermo Scientific) and standard PCR cycling conditions.

***In vivo* analysis of conditional mutants**

DiCre recombinase mediated excision of targeted DNA sequences *in vivo* was achieved by a single oral administration of 200 μ g rapamycin (1mg/ml stock, Rapamune, Pfizer) to mice. Excision of the GFP cassette in blood stage parasites was monitored by flow cytometry using a Guava EasyCyte 6/2L bench cytometer equipped with 488 nm and 532 nm lasers (Millipore) to detect GFP and mCherry, respectively. To analyse parasite development in the mosquito, rapamycin was administered to infected mice 24 hours prior to transmission to mosquitoes, as described (Fernandes et al., 2020). Midguts were dissected out at day 14 post infection. The haemolymph was collected by flushing the haemocoel with complete DMEM, day 14 to 16 post infection. Salivary gland sporozoites were collected between 21–28 days post feeding from infected mosquitoes, by hand dissection and homogenisation of isolated salivary glands in complete DMEM. Live samples (infected mosquito midguts or salivary glands, sporozoites) were mounted in PBS and visualised live using a Zeiss Axio Observer.Z1 fluorescence microscope equipped with a LD Plan-Neofluar 403/0.6 Corr Ph2 M27 objective. The exposure time was set according to the positive control and maintained for both untreated and rapamycin-treated parasites, in order to allow comparisons. All images were processed with ImageJ for adjustment of contrast.

***In vitro* sporozoite assays**

HepG2 cells were seeded at a density of 30,000 cells/well in a 96-well plate for flow cytometry analysis or 10,000 cells/well in 8 well μ -slide (IBIDI) for immunofluorescence assays, 24 hours prior to infection with sporozoites. On the day of the infection, the culture medium in the wells was discarded and fresh complete DMEM was added along with 10,000 sporozoites, followed

by incubation for 3 hours at 37°C. After 3 hours, the wells were washed twice with complete DMEM and then incubated for another 24-48 hours at 37°C and 5% CO₂. For quantification of EEF numbers, the cells were trypsinised after two washes with PBS, followed by addition of complete DMEM and one round of centrifugation at 4°C. After discarding the supernatant, the cells were either directly re-suspended in complete DMEM for flow cytometry, or fixed with 2% PFA for 10 minutes, subsequently washed once with PBS and then re-suspended in PBS for FACS acquisition. For quantification of traversal events, fluorescein-conjugated dextran (0.5mg/ml, Life Technologies) was added to the wells along with sporozoites followed by an incubation at 37°C for 3 hours. After 3 hours, the cells were washed twice with PBS, trypsinised and resuspended in complete DMEM for analysis by flow cytometry.

RON4 immunoprecipitation and mass spectrometry

Freshly dissected RON4-mCherry sporozoites were lysed on ice for 30 min in a lysis buffer containing 0.5% w/v NP40 and protease inhibitors. After centrifugation (15,000 × g, 15 min, 4°C), supernatants were incubated with protein G-conjugated sepharose for preclearing overnight. Precleared lysates were subjected to mCherry immunoprecipitation using RFP-Trap beads (Chromotek) for 2h at 4°C, according to the manufacturer's protocol. PbGFP parasites with untagged RON4 were used as a control. After washes, proteins on beads were eluted in 2X Laemmli and denatured (95°C, 5min). After centrifugation, supernatants were collected for further analysis. Samples were subjected to a short SDS-PAGE migration, and gel pieces were processed for protein trypsin digestion by the DigestProMSi robot (Intavis), as described (Hamada et al., 2021). Peptide were separated on an Aurora UHPLC column from IonOpticks (25 cm x 75 µm, C18), using a 30 min gradient from 3 to 32% ACN with 0.1% formic acid, and analysed on a timsTOF PRO mass spectrometer (Bruker). Mascot generic files were processed with X!Tandem pipeline (version 0.2.36) using the PlasmoDB_PB_39_PbergheiANKA database, as described (Hamada et al., 2021).

Immunofluorescence assays

Blood-stage schizonts were fixed with 4% PFA and 0.0075% glutaraldehyde for 30 mins at 37°C with constant shaking. The samples were then quenched/permeabilised with 125mM glycine /0.1% Triton X-100 for 15 minutes, blocked with PBS/3% BSA, then incubated with Rat anti-AMA1 antibodies (1:250, clone 28G2, MRA-897A, Bei Resources) followed by Alexa Fluor goat anti-rat 405 antibodies (1:1000, Life Technologies). The samples were mounted in PBS and immediately visualised under a fluorescence microscope. Sporozoites were resuspended in PBS, added on top of poly-L-lysine coated coverslips and allowed to air dry. The sporozoites were then fixed with 4% PFA for 30 mins, followed by quenching with 0.1M glycine for 30 mins and two washes with PBS. In the next step, the sporozoites were permeabilised with 1% Triton-X for 5 mins, washed twice with PBS, then blocked with PBS 3%BSA for 1hr at RT and incubated with anti-AMA1 antibody (1:250) or anti-FLAG antibody diluted in blocking solution. Following 3 washes with PBS, the sporozoites were incubated with the secondary antibody (anti-Rat Alexa Fluor 647) diluted in blocking solution. Following 3 washes with PBS, the coverslips were mounted onto a drop of prolong diamond anti-fade mounting solution (Life Technologies), sealed with nail polish and imaged using a fluorescence microscope. Infected HepG2 cell cultures were washed twice with PBS, then fixed with 4% PFA for 20 minutes, followed by two washings with PBS and incubation with goat anti-UIS4 primary antibody (1:500, Sicgen), followed by donkey anti-goat Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:1000, Life Technologies).

Serial block face-scanning electron microscopy

For Serial Block Face-Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM), salivary glands were isolated from mosquitoes infected with PbGFP or *ama1cKO*^{rapa} parasites, and fixed in 0.1 M cacodylate buffer containing 3% PFA and 1% glutaraldehyde during 1 hour at room temperature. Intact salivary glands were then prepared for SBF-SEM (NCMIR protocol) (Deerinck et al., 2010) as follows: samples were post-fixed for 1 hour in a reduced osmium solution containing 1% osmium tetroxide, 1.5% potassium ferrocyanide in PBS, followed by

incubation with a 1% thiocarbonylhydrazide in water for 20 minutes. Subsequently, samples were stained with 2% OsO₄ in water for 30 minutes, followed by 1% aqueous uranyl acetate at 4 °C overnight. Samples were then subjected to en bloc Walton's lead aspartate staining (Walton, 1979), and placed in a 60 °C oven for 30 minutes. Samples were then dehydrated in graded concentrations of ethanol for 10 minutes in each step. The samples were infiltrated with 30% agar low viscosity resin (Agar Scientific Ltd, UK) in ethanol, for 1 hour, 50% resin for 2 hours and 100% resin overnight. The resin was then changed and the samples were further incubated during 3 hours, prior to inclusion by flat embedding between two slides of Aclar® and polymerization for 18 hours at 60 °C. The polymerized blocks were mounted onto aluminum stubs for SBF-SEM imaging (FEI Microtome 8 mm SEM Stub, Agar Scientific), with two-part conduction silver epoxy kit (EMS, 12642-14). For imaging, samples on aluminum stubs were trimmed using an ultramicrotome and inserted into a TeneoVS SEM (ThermoFisher Scientific). Acquisitions were performed with a beam energy of 2 kV, 200 pA (Figure 5C, 5D) or 400 pA (Figure 5A, 5B, 5E, 5F) current, in LowVac mode at 40 Pa, a dwell time of 1 μs per pixel at 5 nm (Figure 5C, 5D) or 10 nm (Figure 5A, 5B, 5E, 5F) pixel size. Sections of 50 nm were serially cut between images. Data acquired by SBF-SEM were processed using Fiji and Amira (ThermoFisher Scientific). Data alignment and manual segmentation were performed using Amira.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

In vitro experiments were performed with a minimum of three technical replicates per experiment. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons, or ratio paired t tests, as indicated in the figure legends. All statistical tests were computed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jean-François Franetich, Maurel Tefit and Thierry Houpert for rearing of mosquitoes. The following reagent was obtained through BEI Resources, NIAID, NIH: Monoclonal Anti-

Plasmodium Apical Membrane Antigen 1, Clone 28G2 (produced *in vitro*), MRA-897A, contributed by Alan W. Thomas. This work was funded by grants from the Laboratoire d'Excellence ParaFrap (ANR-11-LABX-0024), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE15-0004 and ANR-16-CE15-0010) and the Fondation pour la Recherche Médicale (EQU201903007823). The authors acknowledge the Conseil Régional d'Ile-de-France, Sorbonne Université, the National Institute for Health and Medical Research (INSERM) and the Biology, Health and Agronomy Infrastructure (IBiSA) for funding the timsTOF PRO. We acknowledge the ImagoSeine core facility of the Institut Jacques Monod, member of the France BioImaging infrastructure (ANR-10-INBS-04) and GIS-IBiSA, and funded by Région Ile-de-France (TeneoVS). ML was supported by a 'DIM 1Health' doctoral fellowship awarded by the Conseil Régional d'Ile-de-France. AW is supported by the ATIP-Avenir program.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, P.F., O.S.; methodology, P.F., S.B., J.M.V., A.W., O.S.; investigation, P.F., M.L., R.L.B., C.M., B.A., L.V., S.H., B.H.C., A.W.; resources, S.B., O.S.; writing – original draft, P.F., M.L., O.S.; writing – review & editing, P.F., M.L., R.L.B., C.M., S.B., J.M.V., A.W., O.S.; supervision, O.S.; funding acquisition, O.S.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Ando, K., Kuraishii, K., Nishikubo, K., Asami, T., Waidhet-Kouadio, P., Matsuoka, H., and Chinzei, Y. (1999). Sporozoite invasion of *Plasmodium berghei*, rodent malaria parasite, to the salivary glands of the vector mosquito, *Anopheles stephensi*: an electron microscopic study. *Japanese J. Trop. Med. Hyg.* 27, 7–12.
- Bargieri, D.Y., Andenmatten, N., Lagal, V., Thiberge, S., Whitelaw, J.A., Tardieux, I., Meissner,

- M., and Ménard, R. (2013). Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nat. Commun.* *4*, 2552.
- Besteiro, S., Dubremetz, J.F., and Lebrun, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: A key structure for invasion. *Cell. Microbiol.* *13*, 797–805.
- Collins, C.R., Das, S., Wong, E.H., Andenmatten, N., Stallmach, R., Hackett, F., Herman, J.P., Müller, S., Meissner, M., and Blackman, M.J. (2013). Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle. *Mol. Microbiol.* *88*, 687–701.
- Cowman, A.F., Tonkin, C.J., Tham, W.-H., and Duraisingh, M.T. (2017). The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host Microbe* *22*, 232–245.
- Deerinck, T.J., Bushong, E. a., Thor, a., and Ellisman, M.H. (2010). NCMIR methods for 3D EM: A new protocol for preparation of biological specimens for serial block face scanning electron microscopy. *Microscopy*.
- Ecker, A., Lewis, R.E., Ekland, E.H., Jayabalasingham, B., and Fidock, D.A. (2012). Tricks in *Plasmodium*'s molecular repertoire - Escaping 3'UTR excision-based conditional silencing of the chloroquine resistance transporter gene. *Int. J. Parasitol.* *42*.
- Fernandes, P., Briquet, S., Patarot, D., Loubens, M., Hoareau-Coudert, B., and Silvie, O. (2020). The dimerisable Cre recombinase allows conditional genome editing in the mosquito stages of *Plasmodium berghei*. *PLoS One* *15*.
- Frénal, K., Dubremetz, J.-F., Lebrun, M., and Soldati-Favre, D. (2017). Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 645–660.
- Giovannini, D., Späth, S., Lacroix, C., Perazzi, A., Bargieri, D., Lagal, V., Lebugle, C., Combe, A., Thiberge, S., Baldacci, P., et al. (2011). Independent roles of apical membrane antigen 1 and rhoptry neck proteins during host cell invasion by apicomplexa. *Cell Host Microbe* *10*, 591–602.
- Hamada, S., Pionneau, C., Parizot, C., Silvie, O., Chardonnet, S., and Marinach, C. (2021). In-depth proteomic analysis of *Plasmodium berghei* sporozoites using trapped ion mobility spectrometry with parallel accumulation-serial fragmentation. *Proteomics* *21*.
- Harris, K.S., Casey, J.L., Coley, A.M., Masciantonio, R., Sabo, J.K., Keizer, D.W., Lee, E.F., McMahon, A., Norton, R.S., Anders, R.F., et al. (2005). Binding hot spot for invasion inhibitory molecules on *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect. Immun.*

- Ishino, T., Murata, E., Tokunaga, N., Baba, M., Tachibana, M., Thongkukiatkul, A., Tsuboi, T., and Torii, M. (2019). Rhoptry neck protein 2 expressed in Plasmodium sporozoites plays a crucial role during invasion of mosquito salivary glands. *Cell. Microbiol.* 21, e12964.
- Janse, C.J., Ramesar, J., and Waters, A.P. (2006). High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat. Protoc.* 1, 346–356.
- Kappe, S.H.I., Noe, A.R., Fraser, T.S., Blair, P.L., and Adams, J.H. (1998). A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95.
- Kariu, T., Yuda, M., Yano, K., and Chinzei, Y. (2002). MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J. Exp. Med.* 195, 1317–1323.
- Kudryashev, M., Lepper, S., Stanway, R., Bohn, S., Baumeister, W., Cyrklaff, M., and Frischknecht, F. (2010). Positioning of large organelles by a membrane-associated cytoskeleton in *Plasmodium* sporozoites. *Cell. Microbiol.* 12, 362–371.
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B.W., et al. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.* 7.
- 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., and Lebrun, M. (2014). Plasticity and redundancy among AMA-RON pairs ensure host cell entry of *Toxoplasma* parasites. *Nat. Commun.* 5, 4098.
- Lindner, S.E., Swearingen, K.E., Harupa, A., Vaughan, A.M., Sinnis, P., Moritz, R.L., and Kappe, S.H. (2013). Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites. *Mol Cell Proteomics* 12, 1127–1143.
- Manzoni, G., Briquet, S., and Risco-Castillo, V. (2014). A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites. *Sci. Rep.* 99210, 1–10.
- Manzoni, G., Marinach, C., Topçu, S., Briquet, S., Grand, M., Tolle, M., Gransagne, M., Lescar, J., Andolina, C., Franetich, J.F., et al. (2017). *Plasmodium* P36 determines host cell receptor usage during sporozoite invasion. *Elife* 6, e25903.

- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., and Rodriguez, A. (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 291, 141–144.
- Nozaki, M., Baba, M., Tachibana, M., Tokunaga, N., Torii, M., and Ishino, T. (2020). Detection of the Rhoptry Neck Protein Complex in Plasmodium Sporozoites and Its Contribution to Sporozoite Invasion of Salivary Glands. *MSphere* 5, e00325-20.
- Nyagwange, J., Tijhaar, E., Ternette, N., Mobegi, F., Tretina, K., Silva, J.C., Pelle, R., and Nene, V. (2018). Characterization of the Theileria parva sporozoite proteome. *Int. J. Parasitol.* 48.
- Parker, M.L., Penarete-Vargas, D.M., Hamilton, P.T., Guérin, A., Dubey, J.P., Perlman, S.J., Spano, F., Lebrun, M., and Boulanger, M.J. (2016). Dissecting the interface between apicomplexan parasite and host cell: Insights from a divergent AMA-RON2 pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113.
- Pavlou, G., Biesaga, M., Touquet, B., Lagal, V., Balland, M., Dufour, A., Hakimi, M. ali, and Tardieux, I. (2018). Toxoplasma Parasite Twisting Motion Mechanically Induces Host Cell Membrane Fission to Complete Invasion within a Protective Vacuole. *Cell Host Microbe* 24.
- Pimenta, P.F., Touray, M., and Miller, L. (1994). The Journey of Malaria Sporozoites in the Mosquito Salivary Gland. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41, 608–624.
- Posthuma, G., Meis, J.F.G.M., Verhave, J.P., Gigengack, S., Hollingdale, M.R., Ponnudurai, T., and Geuze, H.J. (1989). Immunogold determination of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in Anopheles stephensi salivary gland cells. *Eur. J. Cell Biol.* 49.
- Ramakrishnan, C., Delves, M.J., Lal, K., Blagborough, A.M., Butcher, G., Baker, K.W., and Sinden, R.E. (2013). Laboratory maintenance of rodent malaria parasites. *Methods Mol Biol* 923, 51–72.
- Richard, D., MacRaid, C.A., Riglar, D.T., Chan, J.A., Foley, M., Baum, J., Ralph, S.A., Norton, R.S., and Cowman, A.F. (2010). Interaction between Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J. Biol. Chem.* 285.
- Riglar, D.T., Richard, D., Wilson, D.W., Boyle, M.J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D.S., Rogers, K.L., Whitchurch, C.B., et al. (2011). Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host*

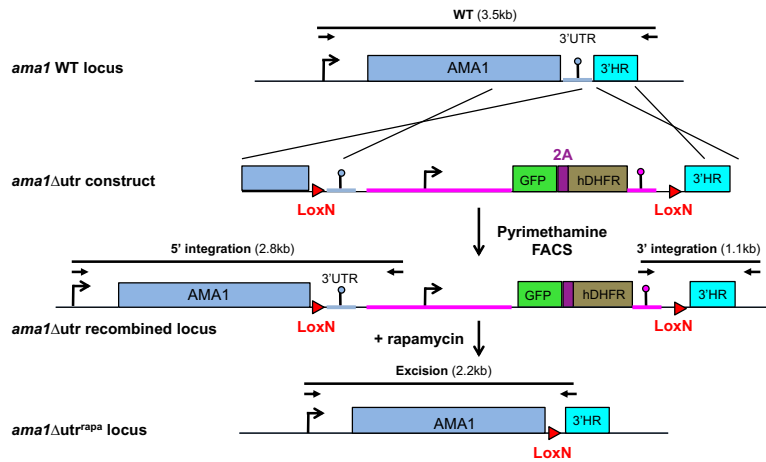
Microbe 9, 9–20.

- Risco-Castillo, V., Topçu, S., Marinach, C., Manzoni, G., Bigorgne, A.E., Briquet, S., Baudin, X., Lebrun, M., Dubremetz, J.F., and Silvie, O. (2015). Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles. *Cell Host Microbe* 18, 593–603.
- Schrevel, J., Asfaux-Foucher, G., Hopkins, J.M., Robert, V., Bourgouin, C., Prensier, G., and Bannister, L.H. (2008). Vesicle trafficking during sporozoite development in *Plasmodium berghei*: Ultrastructural evidence for a novel trafficking mechanism. *Parasitology* 135.
- Shaw, M.K. (2003). Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends Parasitol.* 19.
- Shaw, M.K., Tilney, L.G., and Musoke, A.J. (1991). The entry of *Theileria parva* sporozoites into bovine lymphocytes: Evidence for MHC class I involvement. *J. Cell Biol.* 113.
- Silvie, O., Franetich, J.-F.F.J.-F., Charrin, S., Mueller, M.S.S.M.S., Siau, A., Bodescot, M., Rubinstein, E., Hannoun, L., Charoenvit, Y., Kocken, C.H.H.C.H., et al. (2004). A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem* 279, 9490–9496.
- Silvie, O., Franetich, J.F., Boucheix, C., Rubinstein, E., and Mazier, D. (2007). Alternative invasion pathways for *plasmodium berghei* sporozoites. *Int. J. Parasitol.* 37, 173–182.
- Sinden, R.E., and Strong, K. (1978). An ultrastructural study of the sporogonic development of *plasmodium falciparum* in *anopheles gambiae*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 477–491.
- 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., et al. (2011). Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108.
- Srinivasan, P., Ekanem, E., Diouf, A., Tonkin, M.L., Miura, K., Boulanger, M.J., Long, C.A., Narum, D.L., and Miller, L.H. (2014). Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111.
- Srinivasan, P., Baldeviano, G.C., Miura, K., Diouf, A., Ventocilla, J.A., Leiva, K.P., Lugo-Roman, L., Lucas, C., Orr-Gonzalez, S., Zhu, D., et al. (2017). A malaria vaccine protects Aotus monkeys against virulent *Plasmodium falciparum* infection. *Npj Vaccines* 2.
- Sterling, C.R., Aikawa, M., and Vanderberg, J.P. (1973). The passage of *Plasmodium berghei*

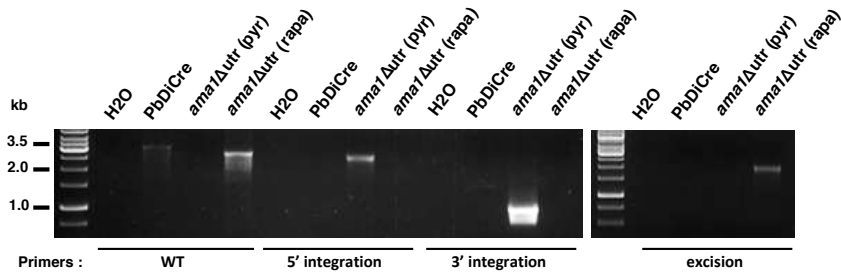
- sporozoites through the salivary glands of *Anopheles stephensi*: An electron microscope study. *J. Parasitol.* 59.
- Swearingen, K.E., Lindner, S.E., Flannery, E.L., Vaughan, A.M., Morrison, R.D., Patrapuvich, R., Koepfli, C., Muller, I., Jex, A., Moritz, R.L., et al. (2017). Proteogenomic analysis of the total and surface-exposed proteomes of *Plasmodium vivax* salivary gland sporozoites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005791.
- Tibúrcio, M., Yang, A.S.P., Yahata, K., Suárez-Cortés, P., Belda, H., Baumgarten, S., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G.-J., van Waardenburg, Y., Levashina, E.A., et al. (2019). A Novel Tool for the Generation of Conditional Knockouts To Study Gene Function across the *Plasmodium falciparum* Life Cycle. *MBio* 10, e01170-19.
- Tokunaga, N., Nozaki, M., Tachibana, M., Baba, M., Matsuoka, K., Tsuboi, T., Torii, M., and Ishino, T. (2019). Expression and Localization Profiles of Rhoptry Proteins in *Plasmodium berghei* Sporozoites. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 316.
- Tufet-Bayona, M., Janse, C.J., Khan, S.M., Waters, A.P., Sinden, R.E., and Franke-Fayard, B. (2009). Localisation and timing of expression of putative *Plasmodium berghei* rhoptry proteins in merozoites and sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* 166, 22–31.
- Walton, J. (1979). Lead aspartate, an en bloc contrast stain particularly useful for ultrastructural enzymology. *J. Histochem. Cytochem.* 27.
- Wells, M.B., and Andrew, D.J. (2019). *Anopheles* salivary gland architecture shapes plasmodium sporozoite availability for transmission. *MBio* 10.
- Yang, A.S.P., Lopaticki, S., O'Neill, M.T., Erickson, S.M., Douglas, D.N., Kneteman, N.M., and Boddey, J.A. (2017). AMA1 and MAEBL are important for *Plasmodium falciparum* sporozoite infection of the liver. *Cell. Microbiol.* 19, e12745.

Supplementary Figure S1

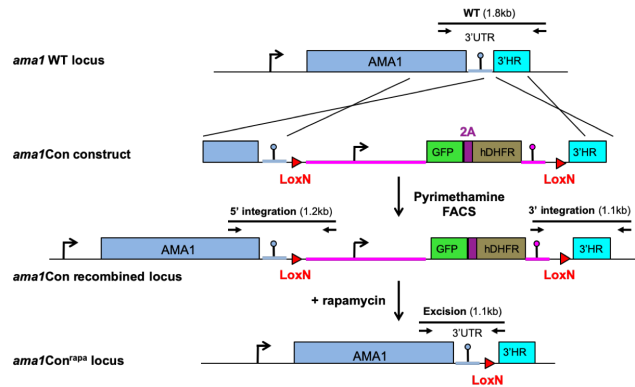
A



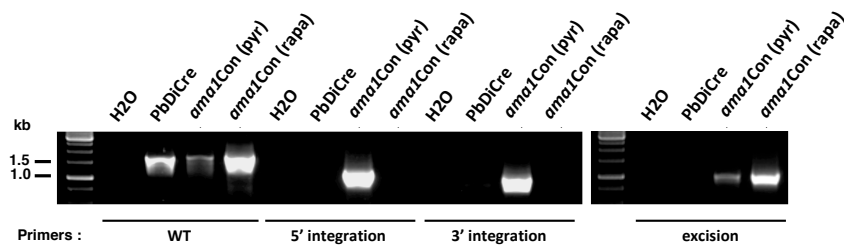
B



C



D

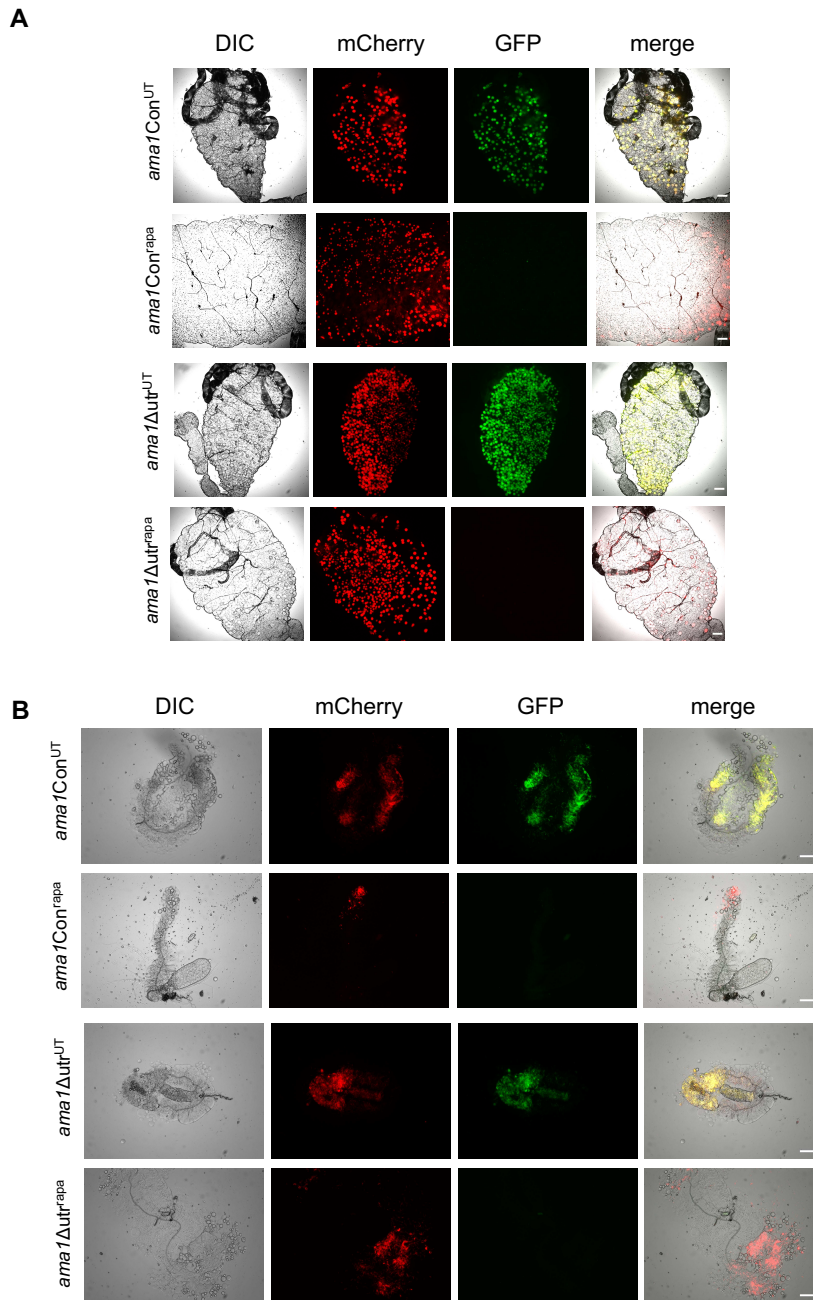


Supplementary Figure S1. Targeting of the 3'UTR of *P. berghei* *ama1* using the DiCre system

A. Strategy to generate *ama1*Δ*utr* parasites. The wild-type locus of *P. berghei* *AMA1* in the

PbDiCre parasite line was targeted with a *ama1*Δ_{utr} replacement plasmid containing 2 Lox sites and 5' and 3' homologous sequences inserted on each side of a GFP-2A-hDHFR cassette. Upon double crossover recombination, the LoxN sites are inserted upstream of the 3' UTR and downstream of the GFP-2A-hDHFR cassette, respectively. Activation of the DiCre recombinase with rapamycin results in excision of the 3' UTR together with the GFP-2A-hDHFR cassette. Genotyping primers and expected PCR fragments are indicated by arrows and lines, respectively. **B.** Genotyping of parental PbDiCre and *ama1*Δ_{utr} transfected parasites after pyrimethamine selection (pyr) and after rapamycin treatment (rapa) of the final population. Parasite genomic DNA was analysed by PCR using primer combinations specific for the unmodified locus (WT), the 5' integration, 3' integration or excision events. **C.** Strategy to generate *ama1*Con parasites. The construct is similar to the *ama1*Δ_{utr} construct (A), except that the first LoxN site is located downstream of the 3' UTR. Upon rapamycin-induced excision, the *AMA1* locus remains intact. **D.** Genotyping of parental PbDiCre and *ama1*Con transfected parasites after pyrimethamine selection (pyr) and after rapamycin treatment (rapa) of the final population. Parasite genomic DNA was analysed by PCR using primer combinations specific for the unmodified locus (WT), the 5' integration, 3' integration or excision events.

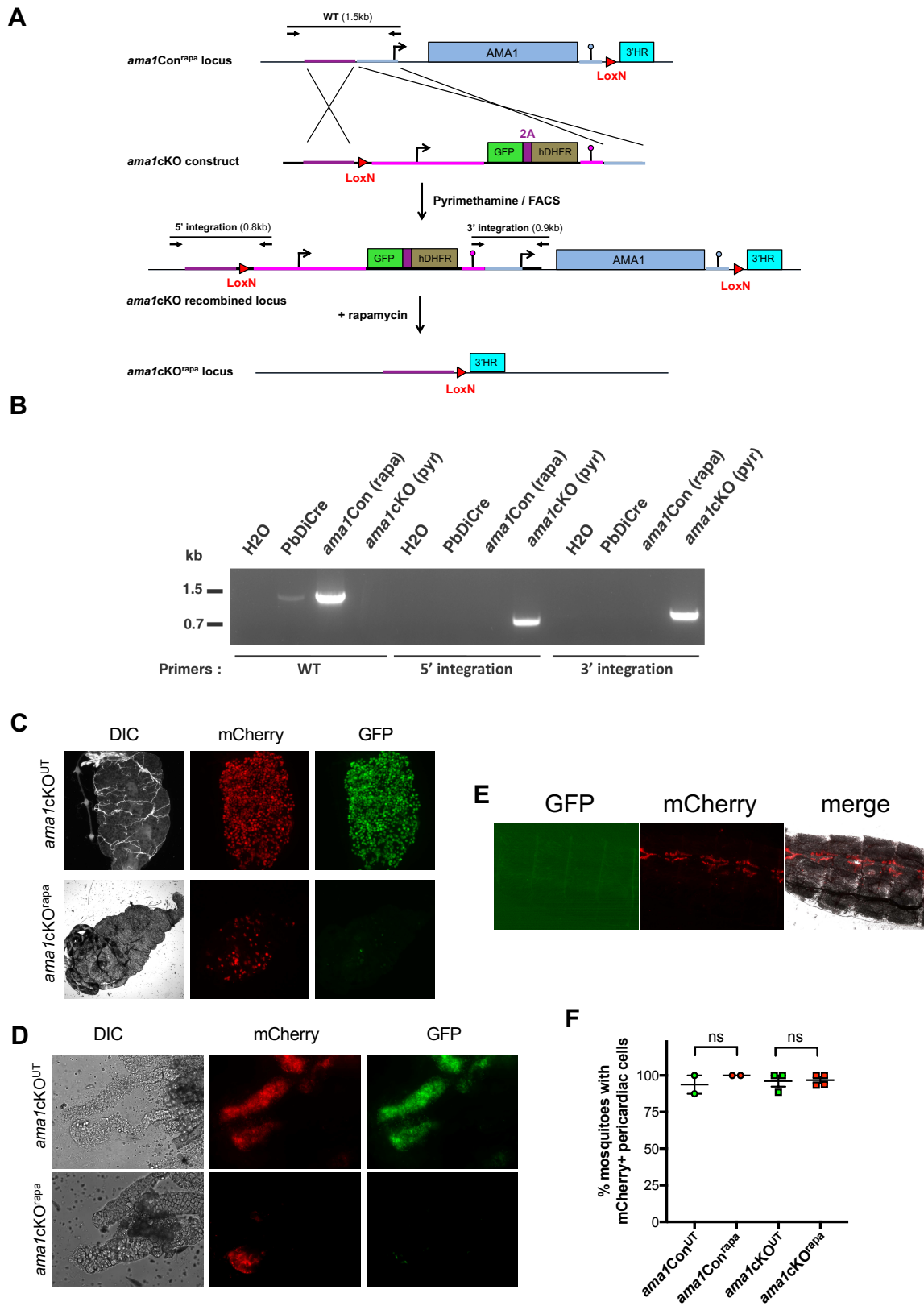
Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S2. Imaging of *ama1Con* and *ama1Δutr* parasites in mosquito midguts

A. Fluorescence microscopy images of midguts from mosquitoes infected with untreated (UT) or rapamycin-treated (rapa) *ama1Con* and *ama1Δutr* parasites. Scale bar = 200 μ m. **B.** Fluorescence microscopy images of salivary glands from mosquitoes infected with untreated (UT) or rapamycin-treated (rapa) *ama1Con* and *ama1Δutr* parasites. Scale bar = 200 μ m.

Supplementary Figure S3



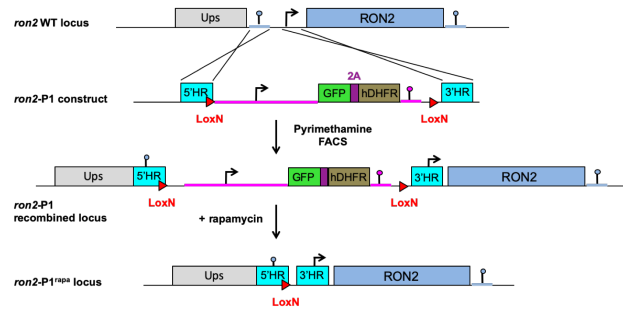
Supplementary Figure S3. Complete conditional gene deletion of *P. berghei* AMA1

A. Strategy to generate *ama1cKO* parasites. The AMA1 locus in *ama1Con^{rapa}* parasites was

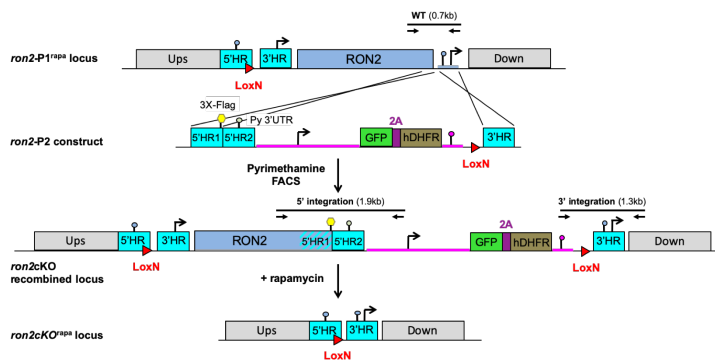
targeted with a *ama1cKO* replacement plasmid containing a single LoxN site and 5' and 3' homologous sequences inserted on each side of a GFP-2A-hDHFR cassette. Upon double crossover recombination, a second LoxN site is inserted upstream of the GFP-2A-hDHFR cassette and *AMA1* gene. Activation of the DiCre recombinase with rapamycin results in excision of the entire *AMA1* gene together with the GFP-2A-hDHFR cassette. Genotyping primers and expected PCR fragments are indicated by arrows and lines, respectively. **B.** Genotyping of PbDiCre, *ama1Con*^{rapa} (parental) and *ama1cKO* parasites. Parasite genomic DNA was analysed by PCR using primer combinations specific for the unmodified locus (WT), the 5' integration and 3' integration events. **C.** Fluorescence microscopy of midguts from mosquitoes infected with untreated (UT) or rapamycin-treated (*rapa*) *ama1cKO* parasites. Scale bar = 200 μ m. **D.** Fluorescence microscopy of salivary glands isolated from mosquitoes infected with untreated (UT) or rapamycin-treated (*rapa*) *ama1cKO* parasites. Scale bar = 200 μ m. **E.** Imaging of the abdomen of a mosquito infected with rapamycin treated *ama1cKO* parasites, after removal of the midgut, showing mCherry-labelled pericardiac structures. **F.** Quantification of mosquitoes with mCherry-labelled pericardial cells at D21 post-infection with untreated (UT) or rapamycin-treated (*rapa*) *ama1Con* and *ama1cKO* parasites. Ns, non-significant (Two-tail ratio paired t test).

Supplementary Figure S4

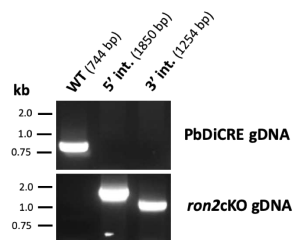
A



B



C



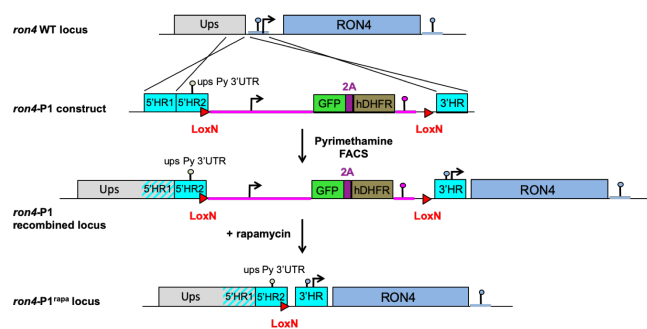
Supplementary Figure S4. Conditional gene deletion of *P. berghei* *ron2*

A-B. Two-step strategy to generate *ron2cKO* parasites. In the first step (A), the *RON2* locus in PbDiCre parasites was targeted with a *ron2-P1* replacement plasmid containing 5' and 3' homologous sequences and two LoxN sites flanking a GFP-2A-hDHFR cassette. Upon double crossover recombination, the two LoxN sites are inserted upstream of *RON2*. Activation of the DiCre recombinase with rapamycin results in excision of the GFP-2A-hDHFR cassette, leaving a single LoxN site upstream of the gene in *ron2-P1^{rapa}* parasites. In the second step (B), the *RON2* locus in *ron2-P1^{rapa}* parasites was targeted with a *ron2-P2* replacement plasmid

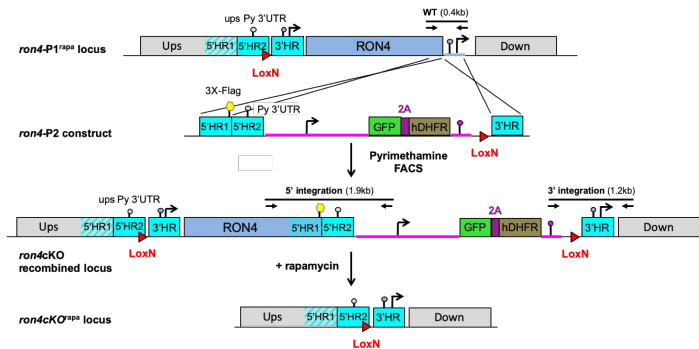
containing 5' and 3' homologous sequences flanking a GFP-2A- hDHFR cassette and a single LoxN site. Upon double crossover recombination, the LoxN site is inserted downstream of *RON2* and the GFP-2A- hDHFR cassette. Activation of the DiCre recombinase with rapamycin results in excision of the entire *RON2* gene together with the GFP-2A-hDHFR cassette. Genotyping primers and expected PCR fragments are indicated by arrows and lines, respectively. **C.** Genotyping of PbDiCre and *ron2cKO* parasites. Parasite genomic DNA was analysed by PCR using primer combinations specific for the unmodified locus (WT), the 5' and 3' integration events.

Supplementary Figure S5

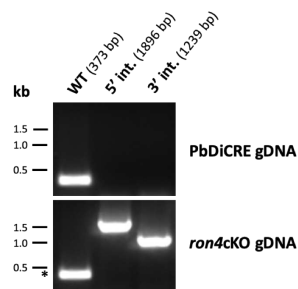
A



B



C

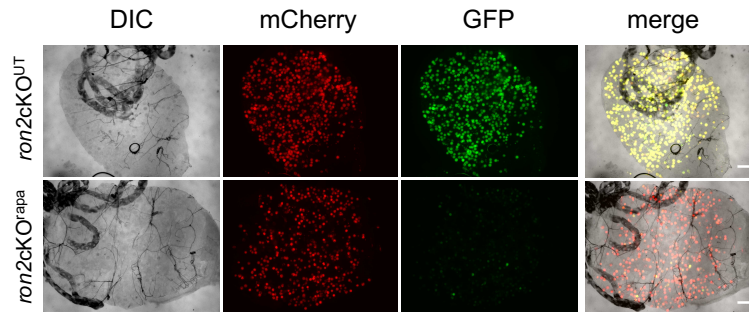


Supplementary Figure S5. Conditional gene deletion of *P. berghei ron4*

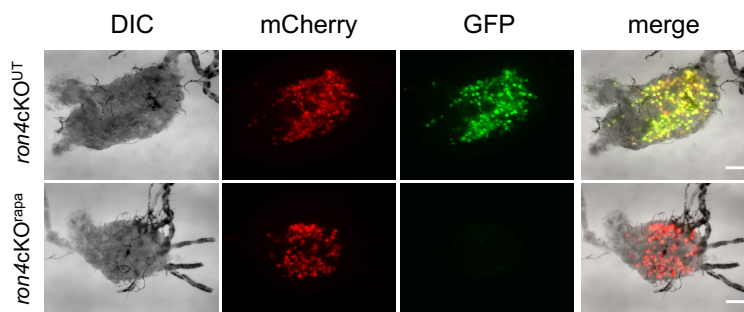
A-B. Two-step strategy to generate *ron4cKO* parasites. In the first step (A), the *RON4* locus in PbDiCre parasites was targeted with a *ron2-P1* replacement plasmid containing 5' and 3' homologous sequences and two LoxN sites flanking a GFP-2A- hDHFR cassette. Upon double crossover recombination, the two LoxN sites are inserted upstream of *RON4*. Activation of the DiCre recombinase with rapamycin results in excision of the GFP-2A-hDHFR cassette, leaving a single LoxN site upstream of the gene in *ron4-P1^{rapa}* parasites. In the second step (B), the *RON4* locus in *ron4-P1^{rapa}* parasites was targeted with a *ron4-P2* replacement plasmid containing 5' and 3' homologous sequences flanking a GFP-2A- hDHFR cassette and a single LoxN site. Upon double crossover recombination, the LoxN site is inserted downstream of *RON4* and the GFP-2A- hDHFR cassette. Activation of the DiCre recombinase with rapamycin results in excision of the entire *RON4* gene together with the GFP-2A-hDHFR cassette. Genotyping primers and expected PCR fragments are indicated by arrows and lines, respectively. **C.** Genotyping of PbDiCre and *ron4cKO* parasites. Parasite genomic DNA was analysed by PCR using primer combinations specific for the unmodified locus (WT), the 5' and 3' integration events.

Supplementary Figure S6

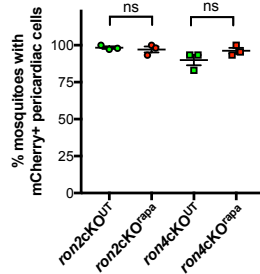
A



B



C



Supplementary Figure S6. Conditional gene deletion of *RON2* or *RON4* does not affect parasite development in the mosquito and egress from oocysts

A-B. Fluorescence microscopy of midguts from mosquitoes infected with untreated (UT) or rapamycin-treated (rapa) *ron2cKO* (A) or *ron4cKO* (B) parasites. Scale bar = 200 μ m. **C.** Quantification of mosquitoes with mCherry-labelled pericardiac cells at D21 post-infection with untreated (UT) or rapamycin-treated (rapa) *ron2cKO* or *ron4cKO* parasites. Ns, non-significant (Two-tail ratio paired t test).

Supplementary Movie 1. 3D segmentation of a mosquito salivary gland infected with WT sporozoites. Parasites appear in blue and secretory cavities in yellow. This movie corresponds to Figure 5A.

Supplementary Movie 2. 3D segmentation of a mosquito salivary gland infected with *ama1cKO^{rapa}* sporozoites. Parasites appear in blue and secretory cavities in yellow. This movie corresponds to Figure 5B.

Supplementary Movie 3. SBF-SEM sections of a mosquito salivary gland infected with WT parasites. This movie corresponds to Figure 5F.

Supplementary tables

Table S1. Mass spectrometry analysis of co-IP from RON4-mCherry sporozoites.

Gene ID	Description	Specific spectral counts
PBANKA_0713100	rhostry neck protein 5, putative	19
PBANKA_0932000	rhostry neck protein 4	17
PBANKA_1315700	rhostry neck protein 2	12
PBANKA_0915000	apical membrane antigen 1	8
PBANKA_1022800	glycine--tRNA ligase, putative	8
PBANKA_1446800	60 kDa chaperonin, putative	8
PBANKA_1121700	leucine--tRNA ligase, putative	7
PBANKA_1356700	kelch protein K13, putative	7
PBANKA_1464900	rhostry neck protein 3, putative	7
PBANKA_0417700	alpha tubulin 1	7
PBANKA_0819000	glideosome-associated protein 50, putative	6
PBANKA_1410300	M1-family alanyl aminopeptidase, putative	6
PBANKA_0404700	glutaredoxin 1, putative	5
PBANKA_0406500	T-complex protein 1 subunit eta, putative	5
PBANKA_1034500	conserved Plasmodium protein, unknown function	5
PBANKA_1035900	glycerophosphodiester phosphodiesterase, putative	5
PBANKA_1441100	haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	5
PBANKA_0405400	40S ribosomal protein S12, putative	4
PBANKA_1143600	alanine--tRNA ligase, putative	4

PBANKA_1302800	thioredoxin peroxidase 1	4
PBANKA_1352000	elongation factor 1-gamma, putative	4
PBANKA_0611900	histidine triad protein, putative	3
PBANKA_0208600	conserved protein, unknown function	3
PBANKA_0515200	MORN repeat-containing protein 1, putative	3
PBANKA_0603200	eukaryotic translation initiation factor 5A, putative	3
PBANKA_1222900	26S proteasome regulatory subunit RPN10, putative	3
PBANKA_1438000	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit, putative	3
PBANKA_1445100	ATP-dependent protease subunit ClpQ, putative	3
PBANKA_0501800	myosin essential light chain ELC, putative	3
PBANKA_0823500	glutamine synthetase, putative	2
PBANKA_1329300	40S ribosomal protein S3, putative	2
PBANKA_1006300	perforin-like protein 1	2
PBANKA_0306800	ATP-dependent RNA helicase UAP56, putative	2
PBANKA_0505100	ADP-ribosylation factor, putative	2
PBANKA_0708000	protein transport protein SEC23, putative	2
PBANKA_0719300	bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase, putative	2
PBANKA_0808200	proteasome subunit alpha type-3, putative	2
PBANKA_0919300	spermidine synthase, putative	2
PBANKA_0930300	GTP-binding nuclear protein RAN/TC4, putative	2
PBANKA_1035500	vacuolar protein sorting-associated protein 29, putative	2
PBANKA_1104800	actin-like protein, putative	2
PBANKA_1120100	conserved Plasmodium protein, unknown function	2
PBANKA_1126200	protein DJ-1, putative	2
PBANKA_1131100	adenylosuccinate synthetase, putative	2
PBANKA_1210900	phosphoglucomutase, putative	2
PBANKA_1410400	V-type proton ATPase catalytic subunit A, putative	2
PBANKA_1445400	protein transport protein SEC13, putative	2
PBANKA_1451200	p25-alpha family protein, putative	2
PBANKA_1460400	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP35, putative	2
PBANKA_1463200	vacuolar protein sorting-associated protein 26, putative	2
PBANKA_1432300	cell traversal protein for ookinetes and sporozoites	1
PBANKA_0303600	26S proteasome regulatory subunit RPN1, putative	1
PBANKA_1231000	40S ribosomal protein S11, putative	1
PBANKA_0715600	26S protease regulatory subunit 6B, putative	1
PBANKA_1216500	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	1
PBANKA_1240600	inner membrane complex protein 1g, putative	1

PBANKA_0407700	60S acidic ribosomal protein P2, putative	1
PBANKA_0506700	citrate synthase, mitochondrial, putative	1
PBANKA_0912100	casein kinase 1, putative	1
PBANKA_0103900	RNA-binding protein, putative	1
PBANKA_0206700	conserved Plasmodium protein, unknown function	1
PBANKA_0302300	aspartate aminotransferase, putative	1
PBANKA_0314600	conserved Plasmodium protein, unknown function	1
PBANKA_0402600	inner membrane complex protein 1a	1
PBANKA_0407200	dual specificity protein phosphatase	1
PBANKA_0410300	26S proteasome regulatory subunit RPN12, putative	1
PBANKA_0602800	ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative	1
PBANKA_0615400	serine--tRNA ligase, putative	1
PBANKA_0620800	conserved Plasmodium protein, unknown function	1
PBANKA_0718800	small GTP-binding protein sar1, putative	1
PBANKA_0721700	ran-specific GTPase-activating protein 1, putative	1
PBANKA_0809100	proteasome activator 28 subunit beta, putative	1
PBANKA_0821700	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, putative	1
PBANKA_0832600	proteasome subunit beta type-6, putative	1
PBANKA_0922500	kelch domain-containing protein, putative	1
PBANKA_0931800	pyridoxine biosynthesis protein PDX2, putative	1
PBANKA_1010000	mitochondrial acidic protein MAM33, putative	1
PBANKA_1012200	protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase, putative	1
PBANKA_1112300	ras-related protein Rab-1B, putative	1
PBANKA_1118600	cell division cycle protein 48 homologue, putative	1
PBANKA_1130400	proteasome subunit alpha type-4, putative	1
PBANKA_1137000	bergheilysin	1
PBANKA_1144000	26S proteasome regulatory subunit RPN11, putative	1
PBANKA_1208500	PI31 domain-containing protein, putative	1
PBANKA_1210800	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative	1
PBANKA_1231800	60S ribosomal protein L12, putative	1
PBANKA_1244000	cell cycle regulator protein, putative	1
PBANKA_1309900	M17 leucyl aminopeptidase, putative	1
PBANKA_1318900	methyltransferase, putative	1
PBANKA_1329500	protein phosphatase containing kelch-like domains	1
PBANKA_1338400	V-type proton ATPase subunit G, putative	1
PBANKA_1426100	conserved protein, unknown function	1
PBANKA_1434200	arginine--tRNA ligase, putative	1

PBANKA_1439100	BRO1 domain-containing protein, putative	1
PBANKA_1451500	conserved Plasmodium protein, unknown function	1
PBANKA_1459000	ankyrin-repeat protein, putative	1

Table S2. List of oligonucleotides used in the study.

	Primer	Primer sequence 5'-->3'
<i>ama1</i> Con construct	HR5'-For	tatagggcgaattgGGTACCTAGTTTAAATTGCCATGTGAACCTACGC
	HR5'-Rev	tataGAATTCCTCGAGATAAAGTATAAGGTATaCTATACGAAGTTATAGGTAAAAACAATACAA GTTGATAAGTCG
	HR3'-For	ACGAAGTTATgctaggTTATCAACTGTATTGTTTTACCTgtgc
	HR3'-Rev	ATTAAGTATGctagctaaacccatattatagaatgctttcc
<i>ama1</i> Con genotyping	WT-For	AACTGCTTTATCTAGTACAGAAGAGTTCG
	WT-Rev	TCGTCTTTATAACGTGTGCAAAGAACGG
	5'int-For	AACTGCTTTATCTAGTACAGAAGAGTTCG
	5'int-Rev	AGGAAAATATACACATGTATATATAAGAGG
	3'int-For	AATAATGTAAACAGTTATTCATTTTTTAAGG
	3'int-Rev	TCGTCTTTATAACGTGTGCAAAGAACGG
	Excision-For	AACTGCTTTATCTAGTACAGAAGAGTTCG
	Excision-Rev	TAAAAACAATACAAGTTGATAACCTAGC
<i>ama1</i> Δutr construct	HR5'_1-For	tatagggcgaattgGGTACCAGTAAATTAATAATATGTCATTGTGTGC
	HR5'_1-Rev	ATAACTTCGTATAAGGTATACTATACGAAGTTATTAATAATATGGTTTTGCATCAAACGG
	HR5'_2-For	cTTATACGAAGTTATaaaatagcattaataatttagtagtc
	HR5'_2-Rev	tataGAATTCCTCGAGATTATATAATAAGACATAATAAAAAAAAAAAAAACAATAAATG
	HR3'-For	ACGAAGTTATgctaggTTATCAACTGTATTGTTTTACCTgtgc
	HR3'-Rev	ATTAAGTATGctagctaaacccatattatagaatgctttcc
<i>ama1</i> Δutr genotyping	WT-For	aactaattttatgtttggttatgcatgc
	WT-Rev	TCGTCTTTATAACGTGTGCAAAGAACGG
	5'int-For	aactaattttatgtttggttatgcatgc
	5'int-Rev	AGGAAAATATACACATGTATATATAAGAGG
	3'int-For	AATAATGTAAACAGTTATTCATTTTTTAAGG
	3'int-Rev	TCGTCTTTATAACGTGTGCAAAGAACGG
	Excision-For	aactaattttatgtttggttatgcatgc
	Excision-Rev	TAAAAACAATACAAGTTGATAACCTAGC
<i>ama1</i> cKO construct	HR5'-For	gGGTACCCTCTCGAGTGAAGCTAAAGCAATTATTATTACAGAGG
	HR5'-Rev	tataGAATTCCTCGAGATAAAGTATAAGGTATaCTATACGAAGTTATTAGCACAAATTAAGGA ATTAATTTACTTTG
	HR3'-For	TTCTCTCCgctaggTGTGTTGTATAACTATAATGACATTTCC

	HR3'-Rev	ATTAAGTgtagcGGTACCACGCACATTGAAATTAAGCTATTTGAACC
<i>ama1</i> KO genotyping	WT-For	GGAAAATTAATGGGCCAATTTCAATTC
	WT-Rev	CACGCACATTGAAATTAAGCTATTTGAACC
	5'int-For	GGAAAATTAATGGGCCAATTTCAATTC
	5'int-Rev	AGGAAAATATACACATGTATATATAAAGAGG
	3'int-For	CAAATGGTGCACAAATACATTCTTCTC
	3'int-Rev	CAGTTGCATGCATAACCAACATAA
<i>ron2</i> cKO-P1 construct	HR5'-For	TATAGGGCGAATTGGGTACCCTGTTTGTACCTGTTTTAAGTGTGATCG
	HR5'-Rev	TATAGAATTCCTCGAGATAACTTCGTATAAgGTATaCTATACGAAGTTATCCTTTAGTGTGCTGTAT CATATTTTCATC
	HR3'-For	ACGAAGTTATGCTAGGGATGCATATCTGAATTCATTTGAAG
	HR3'-Rev	ATTAAGTgtagcGGTATTTACTACATTGTCCTTACTTGTGTAC
<i>ron2</i> cKO-P1 genotyping	WT/Excision-For	AAGAATTGAAATTTAAAACCATTGCATTAC
	WT/Excision-Rev	ATGCAAAGTAATATACTTTAGAAATATAGG
	5'int-For	GTGCTTATGCTCTATGTAGCATATG
	5'int-Rev	AGGAAAATATACACATGTATATATAAAGAGG
	3'int-For	AATAATGTAACAGTTATTCATTTTTTAAGG
	3'int-Rev	CCATTCCTGCTGGATTATAAGTTGGAC
<i>ron2</i> cKO-P2 construct	HR5'_1-For	TATAGGGCGAATTGGGTACCCTAAGAATCACTAGGCAACAAAATGACTG
	HR5'_1-Rev	ATATCGTATCTTTGTAGTCTCCATCGTGGCTTTATAATCTACTACGATTTTAGCATAAGATACAT AATGATAATTGCC
	HR5'_2-For	CAAAGATCACGATATTGATTACAAGGACGACGACGACAAAaaAATGACGCAATCATTTTTAAAACC AAG
	HR5'_2-Rev	TATAGAATTCCTCGAGCTAAAAAATCTCTTATAGCTGAAC
	HR3'-For	ACGAAGTTATGCTAGGAATAACGAAATCTTTAAAATAAGTAAC
	HR3'-Rev	ATTAAGTgtagcGGTATTTACTACATTGTCCTTACTTGTGTAC
<i>ron2</i> cKO-P2 genotyping	WT-For	GCAGCCGTCAATGAAATCCATAATC
	WT-Rev	CTCTCCCTATAGCTAAGCATCTCTTG
	5'int-For	GTGTTATGATCATTGTTCCGATCATGG
	5'int-Rev	AGGAAAATATACACATGTATATATAAAGAGG
	3'int-For	AATAATGTAACAGTTATTCATTTTTTAAGG
	3'int-Rev	GTTCTTTGCAATTTGATATATTTCCATCC
<i>ron4</i> cKO-P1 construct	HR5'_1-For	TATAGGGCGAATTGGGTACCCTGTAATAAATGTTTCTTCAAATAC
	HR5'_1-Rev	gaaaaatttaaattaTTAAACAATCAATGTTCAATGAAGTGTTTATGATAG
	HR5'_2-For	TAATTTAAATTTTTCAGTATGTATATTTTTTACACCCCTTCC
	HR5'_2-Rev	TATAGAATTCCTCGAGATAACTTCGTATAAgGTATaCTATACGAAGTTATGTGCATGGTTCACACCT TCACATAATACCG
	HR3'-For	ACGAAGTTATGCTAGGCAGTATGCATATCTGTTTACACCCCTTCC
	HR3'-Rev	ATTAAGTgtagcGGTATTTACTACATTGTCCTTACTTGTGTAC

<i>ron4cKO-P1</i> genotyping	WT/Excision- For	GAATAATGGGGGAAATAGCGAAGGG
	WT/Excision- Rev	ATTCATACGCATGCATACCCGTGTATCC
	5'int-For	GTACGATATAAAAACTTTAGACAG
	5'int-Rev	AGGAAAATATACACATGTATATATAAGAGG
	3'int-For	AATAATGTAAACAGTTATTCATTTTTTAAGG
	3'int-Rev	GAATGTACACACACATGCATATTCGCC
<i>ron4cKO-P2</i> construct	HR5'_1-For	TATAGGGCGAATTGGGTACCGTGATATTATGCAGCTACTGCTCAAAG
	HR5'_1-Rev	ATATCGTGATCTTTGTAGTCTCCATCGTGGTCCTTATAATCTAAATCATCAAAAATGGCTTTCTCAA CATCATCTTCTCC
	HR5'_2-For	CAAAGATCACGATATTGATTACAAGGACGACGACGACAAAataaAGTTAGTTTATTAAAAAATAA ATAGTAAAATACATG
	HR5'_2-Rev	TATAGAATTCCTCGAGCAATTTGTTCTACTTTCTTTGTGTGC
	HR3'-For	ACGAAGTTATGCTAGGGGTACTTTTGGATAAGTTATGTTCTGTATATATAC
	HR3'-Rev	ATTAAGTAGTGCTAGCGTGTGTATGCATATTTTTATTATTGCCAATTAC
<i>ron4cKO-P2</i> genotyping	WT-For	CACACAACGTATTAGCACATGAAATGG
	WT-Rev	CGAATGGAACAGATATACAATGATTCC
	5'int-For	GTAATAAACTTATGAGAACAAGTGGAAC
	5'int-Rev	AGGAAAATATACACATGTATATATAAGAGG
	3'int-For	AATAATGTAAACAGTTATTCATTTTTTAAGG
	3'int-Rev	CATTAAGATTATTTGTACCCCTAAATG

3. Étude de la protéine CLAMP (Claudin-Like Apicomplexan Microneme Protein)

(1) Contexte

L'identification de facteurs parasitaires impliqués dans l'invasion des hépatocytes est cruciale dans l'objectif de déterminer des cibles vaccinales d'intérêt. Le développement des méthodes de criblage pan-génomique permet actuellement d'identifier rapidement les gènes essentiels à la survie et à la croissance des parasites à différentes stades de leur cycle de vie (Bushell et al., 2017; Schwach et al., 2015; Sidik et al., 2016; Stanway et al., 2019). Un de ces criblages utilisant la méthode CRISPR/Cas9 chez *Toxoplasma gondii* a permis l'identification d'une protéine essentielle à l'invasion des cellules par le tachyzoïte, et conservée chez les apicomplexes : CLAMP (pour Claudin-Like Apicomplexan Microneme Protein) (Sidik et al., 2016). CLAMP est retrouvée à la jonction mobile lors de l'entrée des parasites dans les fibroblastes et sa délétion impacte négativement l'invasion par les parasites. Cette inhibition de l'invasion en absence de CLAMP a également été décrite chez les stades sanguins de *P. falciparum* via une approche conditionnelle (Sidik et al., 2016). Les résultats d'un criblage génomique chez *P. berghei* indiquent que CLAMP est également essentielle chez ce parasite (Bushell et al., 2017). Détectée dans le protéome des sporozoïtes (Hamada et al., 2021), son rôle à ce stade n'a pour le moment jamais été étudié. La protéine semble pourtant une cible vaccinale d'intérêt puisqu'elle a été décrite comme immunogène chez *Theileria equi* où des anticorps anti-CLAMP peuvent bloquer l'invasion au stade sanguin, suggérant une localisation de CLAMP en surface au moment de l'invasion (Onzere et al., 2021).

Nous nous sommes donc intéressés à déchiffrer le rôle de CLAMP chez les sporozoïtes de *P. berghei* à l'aide du système de délétion conditionnelle DiCre précédemment décrit.

(2) Stratégie et résultats

Nous avons généré une lignée *clamp*CKO chez *P. berghei* en utilisant la même stratégie que celle utilisée pour les gènes *ron2* et *ron4* dans le projet décrit précédemment. Une étiquette 3xFlag est insérée à l'extrémité C-terminale de CLAMP afin de permettre la détection de la protéine par western-blot et par immunofluorescence. L'exposition des parasites à la rapamycine au stade sanguin résulte en une forte diminution de la croissance, cohérente avec

ce qui a précédemment été décrit chez *P. falciparum* (Sidik et al., 2016) et *P. berghei* (Bushell et al., 2017). Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de CLAMP chez les sporozoïtes et avons transmis des parasites *clampcKO* exposés ou non à la rapamycine aux moustiques. A l'instar du phénotype observé chez les parasites *ama1cKO*, *ron2cKO* et *ron4cKO*, l'excision (mesurée par la disparition de la fluorescence GFP) est quasiment complète dans les sporozoïtes des oocystes et engendre un défaut de l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes. Dans le cas de CLAMP, nous avons également écarté l'hypothèse d'un défaut de sortie des oocystes. Les sporozoïtes des glandes salivaires ont néanmoins été isolés afin d'analyser le rôle de CLAMP dans l'invasion des hépatocytes. Chez le sporozoïte, CLAMP est distribuée de part et d'autre du noyau en un marquage ponctiforme, caractéristique des micronèmes. L'incubation de sporozoïtes *clampcKO* traités ou non à la rapamycine avec des hépatocytes révèle un rôle essentiel de CLAMP dans l'invasion productive puisqu'un nombre extrêmement réduit de formes exo-érythrocytaires est retrouvé chez les parasites délétés pour CLAMP. Nous avons voulu déterminer si la traversée des hépatocytes précédant leur invasion était également impactée par la délétion de CLAMP et de façon intéressante, les parasites se révèlent incapables de traverser les cellules en absence de la protéine. Ce phénotype intéressant nous a poussés à nous intéresser à la motilité des parasites en absence de CLAMP puisqu'un défaut de motilité pourrait expliquer l'inhibition à la fois de la traversée et de l'invasion productive des hépatocytes. Et en effet les sporozoïtes ne sont plus capables de se mouvoir *in vitro*, perdant leur capacité à glisser en cercle, déplacement caractéristique des sporozoïtes en modèle 2D.

(3) Conclusion

En conclusion, cette étude s'est intéressée pour la première fois au rôle de la protéine CLAMP chez les sporozoïtes grâce à la stratégie DiCre mise en place dans l'équipe chez *P. berghei*. La délétion de la protéine a confirmé son rôle au stade sanguin, précédemment décrit chez *P. falciparum* (Sidik et al., 2016) et *P. berghei* (Bushell et al., 2017). Nous avons également révélé le rôle essentiel de CLAMP dans la motilité des sporozoïtes, dont la disruption entraîne des défauts dans la traversée et l'invasion productive des hépatocytes. Bien que le rôle précis de CLAMP chez les sporozoïtes reste à déterminer, elle pourrait constituer une cible vaccinale intéressante de par l'importance de la motilité du parasite *in vivo* lors de la transmission du parasite par un moustique.

Implication personnelle dans le projet :

J'ai réalisé l'intégralité de ce projet, y compris la génération du mutant CLAMP et son analyse phénotypique. Pour ce projet, j'ai encadré une étudiante de Master 1 qui a participé à la production des plasmides nécessaires aux transfections.

(4) Manuscrit CLAMP

Les tableaux des supplementary datas ne sont pas intégrés dans ce manuscrit de thèse. Des expériences complémentaires d'analyse de l'expression de CLAMP aux stades sanguins et hépatiques sont en cours et les résultats seront ajoutés dans la version soumise à publication.

The claudin-like apicomplexan microneme protein is essential for *Plasmodium berghei* sporozoite motility and infectivity to mosquito and mammalian hosts

Manon Loubens¹, Clara-Eva Paquereau¹, Carine Marinach¹, Soumia Hamada^{1,2}, Bénédicte Hoareau-Coudert³, David Akbar⁴, Jean-François Franetich¹, Olivier Silvie¹

¹Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, CIMI-Paris, Paris, France

²Sorbonne Université, INSERM, UMS PASS, Plateforme Post-génomique de la Pitié Salpêtrière (P3S), 75013, Paris, France

³Sorbonne Université, INSERM, UMS PASS, Plateforme de cytométrie de la Pitié-Salpêtrière (CyPS), 75013, Paris, France

⁴Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut du Cerveau et de la Moelle Épineuse (ICM), CELIS Cell Culture Core Facility, 75013, Paris, France.

Correspondence and requests for materials should be addressed to OS (olivier.silvie@inserm.fr).

ABSTRACT

Apicomplexan parasites invade host cells actively through a moving junction (MJ) to form a replicative parasitophorous vacuole. This process requires the sequential secretion of the parasite apical organelles, the micronemes and the rhoptries. The claudin-like apicomplexan microneme protein (CLAMP) is a conserved protein that plays an essential role for invasion of host cells in *Toxoplasma gondii* tachyzoites and *Plasmodium falciparum* merozoites, presumably acting at the MJ. CLAMP is also expressed in sporozoites, the mosquito-transmitted forms of the malaria parasite, but its role in this stage is still unknown. CLAMP is essential for blood stage growth and is refractory to conventional gene deletion. To circumvent this obstacle and study the function of CLAMP in sporozoites, we used a conditional genome editing strategy based on the dimerisable Cre recombinase in the rodent malaria model parasite *P. berghei*. We successfully deleted *CLAMP* gene in *P. berghei* transmission stages and analyzed the functional consequences on sporozoite infectivity. We show that CLAMP depletion does not affect parasite development in the mosquito but abrogates sporozoite invasion of the insect salivary glands, cell traversal activity and productive invasion of hepatocytes. This severe phenotype was associated with major defects in gliding motility. This study uncovers a conserved role of CLAMP across invasive stages of the malaria parasite, and strongly suggest that CLAMP acts upstream of MJ formation.

INTRODUCTION

The life cycle of *Plasmodium* parasites is complex and involves a vertebrate host and an *Anopheles* vector, in which parasites will face several stages of differentiation and development. In mammals, infection begins when motile forms of the parasite known as sporozoites are injected in the skin during the bite of a blood-feeding infected mosquito. These sporozoites then migrate through the dermis until they reach a blood vessel and are then transported in the blood flow until they reach liver, where they infect hepatocytes and differentiate into thousands of merozoites that are then released in the blood and invade red blood cells (RBC).

Host cell invasion by apicomplexans rely on the regulated and sequential secretion of apical secretory vesicles, the micronemes and the rhoptries. Proteins from these vesicles, including the apical membrane antigen 1 (AMA1) and the rhoptry neck proteins (RONs), respectively, are secreted during invasion. RONs are exported into the host cell where RON2 is inserted into the host cell membrane and serves as a receptor for AMA1, which is localized on the parasite surface (Cao et al., 2009; Riglar et al., 2011). The AMA1-RON complex participate in the formation of a structure called moving junction (MJ), which mediates parasite internalization and the formation of a replicative niche, the parasitophorous vacuole (PV) (Alexander et al., 2005; Besteiro et al., 2011; Cowman et al., 2017; Lamarque et al., 2011). The MJ has been well characterized during host cell invasion by *Toxoplasma* tachyzoites and *Plasmodium* merozoites (Frénel et al., 2017). In contrast, the nature of the junction during sporozoite entry into hepatocytes remains elusive (Bargieri et al., 2014). Known components of the MJ, such as AMA1 and RONs, are also expressed in sporozoites (Hamada et al., 2021; Swearingen et al., 2017) , and are required during invasion not only of hepatocytes but also of the mosquito salivary glands (Giovannini et al., 2011; Ishino et al., 2019; Nozaki et al., 2020).

A genome-wide CRISPR/Cas9 screen performed in *Toxoplasma gondii* has identified a novel component of the MJ, the Claudin-Like Apicomplexan Microneme Protein (CLAMP) (Sidik et al., 2016). CLAMP orthologs are present in all available apicomplexan genome and

no related sequences could be identified outside the Apicomplexa group. CLAMP is required for host cell invasion in *T. gondii* tachyzoites and *P. falciparum* merozoites (Sidik et al., 2016). CLAMP is also predicted to be essential in *P. berghei* (Bushell et al., 2017). Topology predictions indicate structural similarities between CLAMP and the mammalian tight-junction proteins claudin-15 and claudin-19 (Krause et al., 2008; Sidik et al., 2016). CLAMP is found in *Toxoplasma* tachyzoite micronemes and at the MJ during invasion of host cells. Conditional knockdown of *CLAMP* affects *Toxoplasma* invasion without disturbing egress or microneme secretion. Similarly, depletion of CLAMP in *P. falciparum* merozoites leads to a drastic reduction in RBC invasion (Sidik et al., 2016). A more recent study focusing on the role of CLAMP in *Theileria equi* showed that CLAMP-specific antibodies inhibit invasion of equine erythrocytes (Onzere et al., 2021).

While proteomic studies have documented that CLAMP is also expressed in *Plasmodium* sporozoites (Hamada et al., 2021; Lindner et al., 2013; Swearingen et al., 2017), its role has never been assessed so far in these stages. One obstacle for genetic studies of essential factors like CLAMP is that genes that are essential in blood stages are refractory to conventional knock-out strategies. Nevertheless, several approaches for conditional deletion have emerged allowing the study of blood stage-essential genes in sporozoites. One of these approaches is based on the dimerisable Cre recombinase (DiCre), which can excise DNA sequences flanked by Lox sites in an inducible manner. The recombinase is split into two inactive subunits each fused to a rapamycin-ligand that interact in the presence of rapamycin, restoring the Cre activity (Jullien et al., 2003). In *Plasmodium*, asexual blood stage parasites can be targeted prior transmission to mosquitoes, allowing deletion of the gene of interest and phenotypical analysis in subsequent stages of the parasite life cycle (Fernandes et al., 2020; Tibúrcio et al., 2019). In this study, we used the DiCre system in *P. berghei* to study the role of CLAMP in sporozoites. The insertion of a 3xFlag tag fused to the protein allowed to study its expression in different developmental stages and showed a micronemal localization of the protein in sporozoites. Conditional deletion of *CLAMP* gene resulted in a dramatic decrease of sporozoite invasion not only of hepatocytes but also of the mosquito salivary glands. This

severe phenotype was associated with a major defect in sporozoite motility. This study reveals that CLAMP is required for *Plasmodium* sporozoite motility and infectivity in both the mosquito and mammalian hosts, and illustrates the robustness of the DiCre system for conditional genome editing across the parasite life cycle.

RESULTS

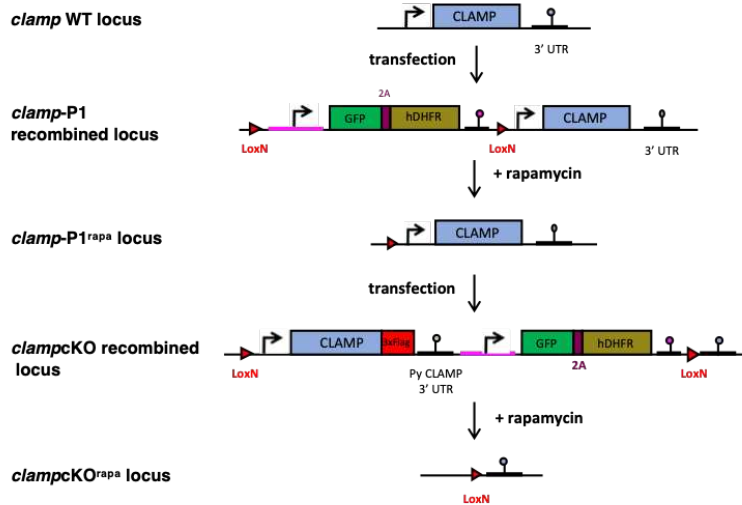
Conditional deletion of *CLAMP* gene in *P. berghei*

In order to study the role of CLAMP in *P. berghei* sporozoites, we used a *P. berghei* line expressing the DiCre system (Fernandes et al., 2020). In order to study the role and the localization of the protein CLAMP, we generated a *clamp*CKO line expressing CLAMP fused to a 3xFLAG tag, and flanked by LoxN sites. For this purpose, we used a two-step strategy (Fernandes et al., 2021) to introduce in two successive transfections LoxN sites upstream and downstream of CLAMP (**Fig1a**). A GFP cassette was introduced between CLAMP and the second Lox site, to facilitate monitoring of gene excision by flow cytometry or fluorescence microscopy (Fernandes et al., 2021).

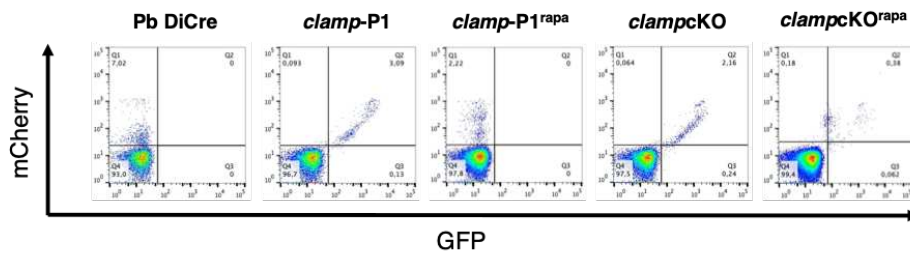
Following transfection of PbDicre parasites, integration of the construct by double homologous recombination resulted in the generation of *clamp*-P1 parasites expressing GFP (along with the endogenous mCherry expressed by PbDicre parasites) and resistant to pyrimethamine (**Fig 1b, Fig S1a**). Transfected parasites were selected with pyrimethamine, sorted by FACS then genotyped to confirm correct integration of the construct (**Fig S1b**). The resulting parasite population was exposed to a single dose of rapamycin given orally to mice, resulting in the excision of the GFP-hDHFR cassette and the persistence of a LoxN site upstream CLAMP gene promoter (**Fig1b, Fig S1a**). These parasites were sorted by flow cytometry and used for subsequent transfection. Following transfection of *clamp*-P1^{rapa} parasites, integration of the construct by double homologous recombination resulted in the generation of *clamp*CKO parasites expressing GFP along with the endogenous mCherry expressed by parental parasites, in addition to a 3xFLAG tag fused to CLAMP (**Fig1b, Fig S1c**). Transfected parasites were selected with pyrimethamine, sorted by flow cytometry then genotyped to confirm correct integration of the construct (**Fig S1d**). Cloning by limiting dilution resulted in the final *clamp*CKO parasite line that was used for this study.

Figure 1

A.



B.



C.

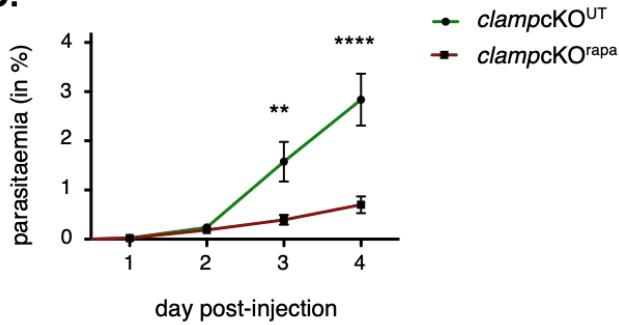


Figure 1. Generation of *P. berghei* *clamp*CKO parasites

A. Strategy to modify the *Pbclamp* locus in *PbDiCre* line. A first transfection in *PbDiCre* line (mCherry+) previously generated (Fernandes et al., 2020) led to insertion of a GFP / hDHFR expression cassette flanked by two LoxN site upstream of CLAMP locus. Rapamycin-induced excision of the cassette caused retention of one single LoxN site upstream of CLAMP. A second transfection of these parasites generated a population with CLAMP fused to 3xFLAG

tag, expressing GFP and hDHFR and with *clamp* locus flanked by LoxN sites. Rapamycin-induced activation of DiCre leads to excision of both the CLAMP gene and the GFP-hDHFR cassette. Plasmids used for transfection and details on constructs are shown in **FigS1**. **B.** Flow cytometry analysis of blood-stage parasites at different steps during generation of *clamp*CKO parasites after initial transfection of PbDiCre. **C.** Parasitaemia in mice infected with *clamp*CKO parasites before (*clamp*CKO^{UT}) and after rapamycin treatment (*clamp*CKO^{rapa}). The graphs shown are percent parasitaemia (mean +/- SEM of five mice per group) quantified by cytometry analysis. ** : P < 0,01; **** : P < 0,0001 (Two-way ANOVA).

We next assessed the effects of rapamycin on *clamp*CKO parasites during blood-stage growth by injecting 10⁶ parasitized red blood cells intravenously into mice. After confirmation of the presence of parasites in the blood by flow cytometry, we treated one cohort of infected mice with a single oral dose of rapamycin and then quantified the parasitaemia by flow cytometry. In agreement with an essential role for CLAMP in asexual blood stages (Bushell et al., 2017; Sidik et al., 2016), rapamycin-induced gene excision had a negative effect on blood-stage growth in *clamp*CKO^{rapa} infected mice (**Fig1c**).

CLAMP is required for invasion of mosquito salivary glands

We then decided to determine the role of CLAMP in sporozoites. We transmitted *clamp*CKO parasites to mosquitoes, with or without rapamycin treatment one day prior feeding of the mosquitoes. Both untreated (*clamp*CKO^{UT}) and rapamycin-exposed (*clamp*CKO^{rapa}) parasites were observed by fluorescence microscopy of midguts and salivary glands from infected mosquitoes (**Fig2a-b**). Strikingly, salivary glands from *clamp*CKO^{rapa} -infected mosquitoes exhibited a weak fluorescence, suggesting low parasite loads. Sporozoites were isolated and counted, revealing that rapamycin treatment of *clamp*CKO parasites had no significant impact in the numbers of midgut sporozoites, but severely reduced the numbers of

salivary gland sporozoites (**Fig2c-d**). As expected, rapamycin treatment induced robust gene excision in *clampcKO^{rapa}* parasites, as observed by counting the percentage of excised (GFP-) and non-excised (GFP+) sporozoites isolated from mosquitoes infected with *clampcKO^{UT}* or *clampcKO^{rapa}* parasites (**Fig2e-f**). Reduced numbers of salivary gland sporozoites could result from a defect in parasite egress from oocyst, a degradation in the haemolymph or a defect in salivary gland invasion. We therefore isolated and counted haemolymph sporozoites in *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}*-infected mosquitoes and observed no difference (**Fig2g**), showing that there is no defect in egress in *clampcKO^{rapa}* parasites. Moreover, previous studies using the same DiCre system (Fernandes et al., 2020) showed that mosquitoes infected with parasites expressing mCherry exhibit a red fluorescence of pericardiac cells following release of sporozoites in the haemolymph. We therefore counted the number of mosquitoes presenting this characteristic prior isolation of haemolymph and midgut sporozoites (**Fig2h**). In both conditions, a large majority of infected mosquitoes presented these fluorescent structures, ruling out the hypothesis of a defect in egress or parasite degradation in the haemolymph. Together, these results show that sporozoites depleted for CLAMP are able to develop normally in the mosquito until release in the haemolymph but are then impaired in their ability to invade mosquito salivary glands.

Figure 2

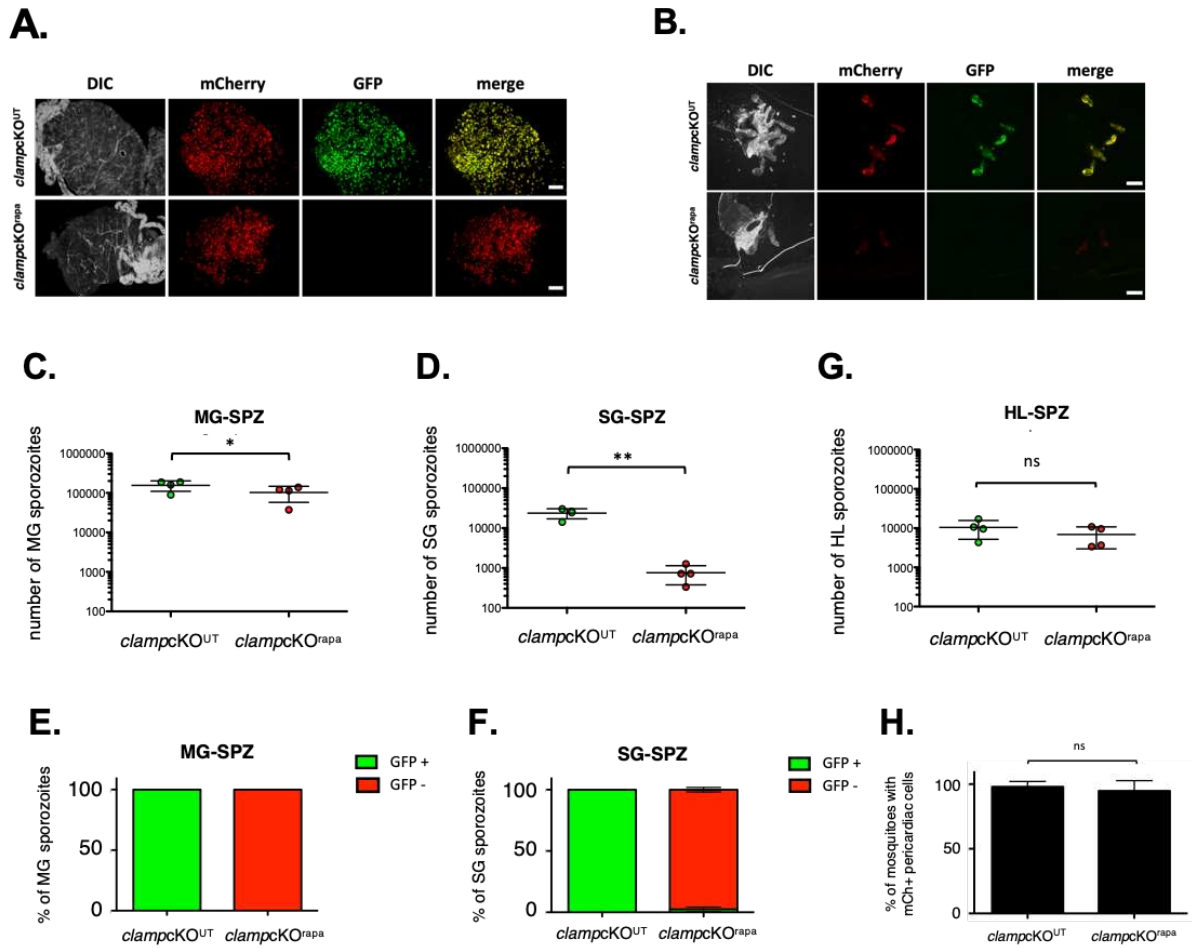


Figure 2. Deletion of CLAMP impacts invasion of mosquito salivary glands by sporozoites

A-B. Fluorescence microscopy imaging of unfixed midguts (A) and salivary glands (B) from *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}*-infected mosquitoes. Exposure times and contrast were adjusted at the same level for each channel in both conditions. Scale bar, 200 μ m. **C-D.** Comparison of sporozoite numbers isolated from midguts (C) and salivary glands (D) of female mosquitoes infected with *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}* parasites. * : P < 0,05; ** : P < 0,01 (Two-tail ratio paired t test). **E-F.** Fluorescence-based quantification of excised (GFP-) and non-excised (GFP+) sporozoites isolated from midguts (E) and salivary glands (F) of female mosquitoes infected with *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}* parasites. Results shown are based

on observation of at least 200 sporozoites per condition. **G.** Comparison of sporozoite numbers isolated from hemolymph of female mosquitoes infected with *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}* parasites. ns : non-significant (Two-tail ratio paired t test). **H.** Quantification of infected female mosquitoes exhibiting mCherry fluorescence in their pericardiac cells 21 days post-infection, based on observation of at least 50 mosquitoes per condition. All results shown in (C-H) are mean +/- SD of four independent experiments. ns : non-significant (Two-tail ratio paired t test).

CLAMP is essential for hepatocyte invasion

The 3xFlag fused to the protein allows its detection in *clampcKO^{UT}* sporozoites. Fluorescence microscopy showed a micronemal-like localization of the protein, with a punctuate staining around the nucleus (**Fig3a**). In contrast, no labelling was observed in *clampcKO^{rapa}* sporozoites, confirming complete depletion of the protein (**Fig3a**). We then assessed the capacity of sporozoites to invade and traverse hepatocytes *in vitro* in the absence of CLAMP. Using a dextran-based assay as previously described (Mota et al., 2001), we quantified by flow cytometry the amount of traversed cells at 3 hours post-infection. The percentage of dextran positive cells was drastically reduced in cultures incubated with *clampcKO^{rapa}* as compared with *clampcKO^{UT}* sporozoites, suggesting that cell traversal was severely impaired in sporozoites lacking CLAMP (**Fig3b**). We next tested if these sporozoites lacking CLAMP could infect and develop into EEFs in hepatocytic cell cultures. HepG2 cells were infected by sporozoites from treated and untreated parasites and EEFs were quantified at 24h post-infection by microscopy after staining of PVs with anti-UIS4 antibodies. These experiments revealed a dramatic reduction in the number of EEFs observed with *clampcKO^{rapa}* parasites (**Fig3c**).

In summary, these data show that in addition to its role during salivary gland invasion in the mosquito CLAMP is also essential for cell traversal and productive invasion.

Figure 3

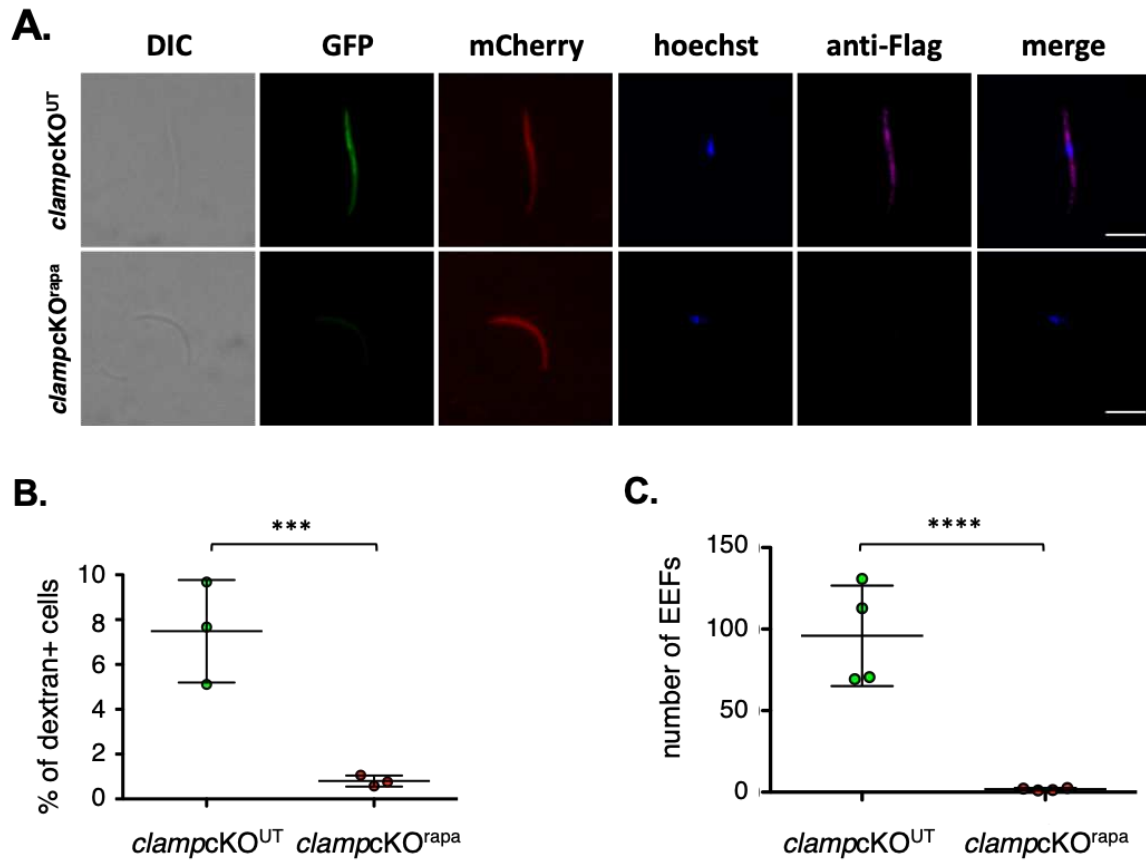


Figure 3. Conditional CLAMP gene deletion abrogates sporozoite cell traversal and productive invasion of hepatocytic cells

A. Immunofluorescence analysis of *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}* sporozoites labelled with anti-Flag antibodies (magenta). *clampcKO^{UT}* parasites express GFP (green) while both *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}* parasites express mCherry (red). Nuclei were stained with Hoechst 77742 (blue). Scale bar : 5 μ m. **B.** Quantification of traversed (dextran-positive) HepG2 cells determined by FACS after incubation for 3h with *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}* sporozoites and fluorescein-labeled dextran. Results shown are mean \pm SD of three independent experiments with at least 3 technical replicates each. *** : $P < 0,001$ (Two-tail ratio paired t test). **C.** Quantification of exo-erythrocytic forms (EEFs) in HepG2 cells determined by microscopy 24h post-invasion with *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}* sporozoites.

Results shown are mean +/- SD of four independent experiments with at least 3 technical replicates each. **** : P < 0,0001 (Two-tail ratio paired t test).

CLAMP is essential for sporozoite gliding motility

Regarding the defect of parasites lacking CLAMP to traverse and invade hepatocytes, we wondered if the parasite motility was affected. Sporozoites freshly isolated from salivary glands were activated in the presence of BSA and recorded live for 5 min. One limitation of the assessment of sporozoite motility was the medium of dissection that was enriched in mosquito debris for treated parasites as compared to untreated parasites because of the difference in the number of salivary gland sporozoites per mosquito. To ensure that the differences in the composition of the medium would not affect the motility of the parasite, we mixed *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}* sporozoites and recorded the mixture of parasites, which could be easily differentiated based on their mCherry/GFP fluorescence (**Fig4a**). Sporozoite motility was classified in 3 groups based on their movements : circular gliding, waving/floating or fixed (**Fig4a**). The effect of CLAMP deletion was striking as over more than 350 observed *clampcKO^{rapa}* sporozoites, only 1 showed a circular gliding pattern (**Fig4b**). The large majority of *clampcKO^{rapa}* were observed waving or floating (71,39%) while the rest was fixed (28,34%). In comparison, more than the third of *clampcKO^{UT}* sporozoites was observed exhibiting circular gliding (34,59%) (**Fig4b**). These results show that in absence of CLAMP sporozoites are not able to glide efficiently. This phenotype likely explains the defects observed in salivary gland and hepatocyte invasion and/or traversal as the motility brings the movement needed by the parasite to actively enter and/or exit cells.

Figure 4

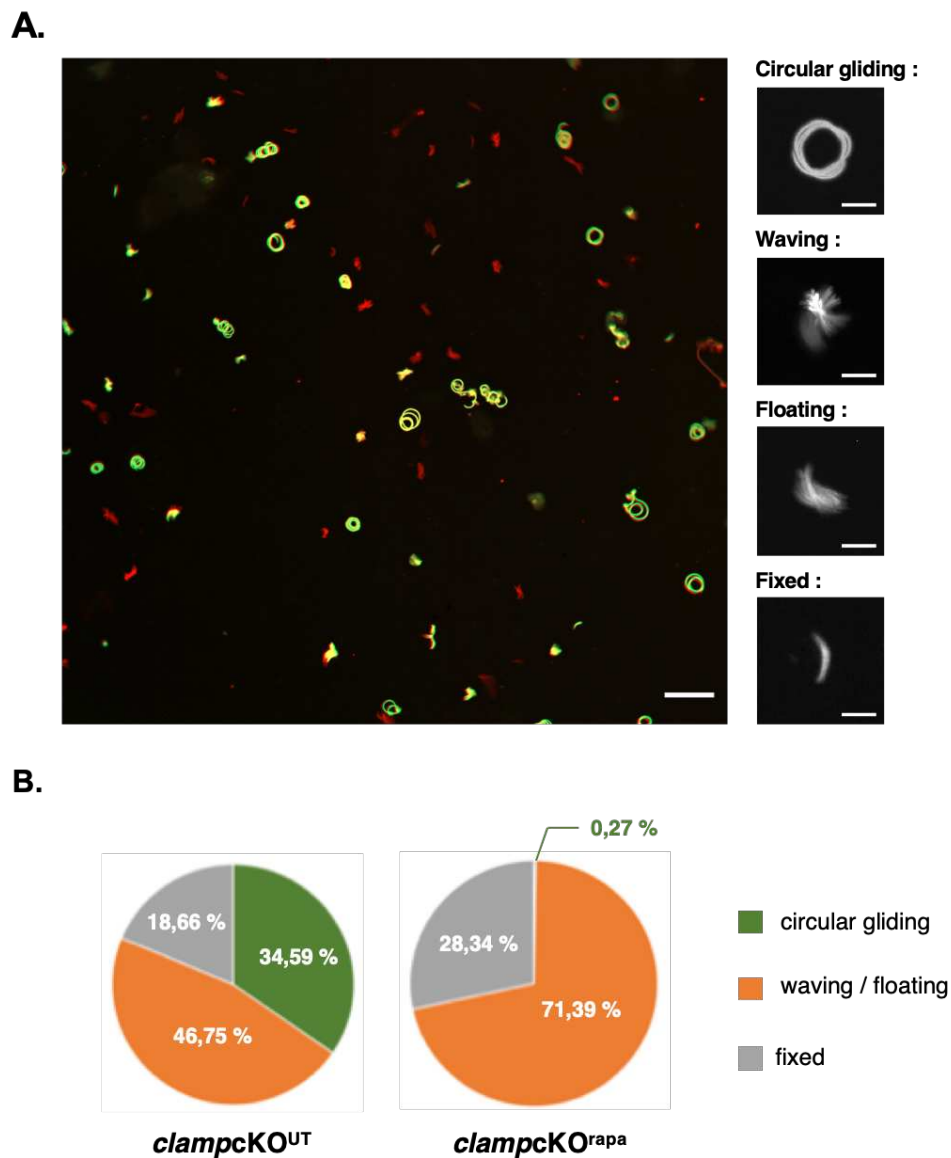


Figure 4. CLAMP is essential for sporozoite motility

A. Maximum intensity projection of video of *clampcKO^{UT}* (yellow) and *clampcKO^{rapa}* (red) sporozoites, recorded for 3 min. Sporozoites were mixed and activated in presence of BSA at 37°C before imaging. Their movement patterns were classified in four categories : circular gliding, waving, floating and fixed (shown in magnified images). Scale bar : 50µm for projection and 10µm for magnified images. **B.** Quantification of each moving pattern in *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}* sporozoites. At least 350 sporozoites were observed for each condition and classified in three groups based on their moving pattern.

DISCUSSION

For the first time, this study focused on the role of CLAMP in *Plasmodium* sporozoites, revealing its crucial role in gliding motility and infectivity. We generated a PbDiCre line in which *CLAMP* gene and a GFP expression cassette were flanked by LoxN sites. We first assessed the excision efficiency in blood stages, based on the disappearance of the GFP fluorescence upon exposure to rapamycin. The decrease in GFP fluorescence confirmed efficient excision in blood stage parasites, yet we fail to recover mCherry+ GFP- parasites, consistent with CLAMP being essential in blood stages (Bushell et al., 2017; Sidik et al., 2016). We transmitted the parasite deleted or not for CLAMP to mosquitoes in order to isolate salivary glands sporozoites and test infectivity to hepatocytes. The first striking effect of the absence of CLAMP was in fact observed in the mosquito. Indeed, the number of midgut sporozoites per mosquito was equivalent between excised and non-excised parasites but the number of salivary glands sporozoites was drastically reduced in excised parasites compared to non-excised ones. We could exclude the hypothesis of a defect in oocyst egress, indicating an important role of CLAMP in salivary gland invasion. Nevertheless, despite the low numbers of salivary gland sporozoites, we could analyse their phenotype in cellular assays, which revealed that in addition to the defect in salivary gland invasion in the mosquito, CLAMP-deficient sporozoites display a strong defect in both traversal and invasion of mammalian hepatocytic cells.

Cell traversal and productive invasion of hepatocytes are two independent processes relying on different molecular factors and parasites that cannot traverse cells can still invade them and the opposite is true (Loubens et al., 2021). However, both processes rely on the sporozoite motility. The motility of the parasite is based on a specific structure called glideosome, localized to the parasite inner membrane complex, and which forms a link between the actin-myosin motor of the parasite and surface adhesins interacting with extracellular substrates (Fréchal et al., 2017). Motility is essential for sporozoite infectivity as parasites in which motility is disrupted are impaired in their ability to invade and egress from cells. It relies notably on TRAP, the deletion of which inhibits sporozoite invasion of mosquito salivary glands and hepatocytes (Dundas et al., 2018; Ejigiri et al., 2012; Ghosh et al., 2009; Klug et al., 2020; Sultan et al.,

1997). These important roles in mosquito and mammalian invasion were also observed for others proteins implied in motility, such as TREP/S6/UOS3 (Combe et al., 2009; Steinbuechel and Matuschewski, 2008) or LIMP (Santos et al., 2017). We show in this study that CLAMP-deficient parasites are impaired in their gliding motility *in vitro*, suggesting an essential role of the protein in this process and supporting the observations made in invasion of mosquito and mammalian cells.

Motility of the parasite can be affected by the deletion of one of the components of the glideosome, as the core machinery in the parasite or the surface adhesins interacting with extracellular substrates. Adhesin secretion is a process tightly controlled by signalisation pathways, the perturbation of which can also affect many processes such as motility (Frénil et al., 2017; Lebrun et al., 2020). CLAMP predicted structure as described by Sidik et al. shows four transmembrane domains linked by extracellular loops and an intracellular proline-rich domain (PRD), homologous to the structure of claudins. Claudins are a family of conserved proteins involved in the formation of tight junctions between epithelial cells and the similarity of structure with CLAMP could suggest a direct role in sporozoite attachment and/or interaction with its environment. The description of neutralization-sensitive epitopes in in the predicted extracellular loops of CLAMP from *Theileria equi* (Onzere et al., 2021) strengthens the idea of an essential role of the protein at the parasite surface during invasion. Motility is essential for sporozoite infectivity *in vivo* and deciphering the molecular actors involved in this process is crucial and could lead to identification of new vaccine targets. In this study we showed that CLAMP is involved in sporozoite motility and that its deletion inhibits sporozoite invasion, both in the mosquito and in the mammalian host. It is likely that the defect in sporozoite infectivity is a direct consequence of impaired motility in CLAMP-deficient sporozoites. A defect in motility might also explain the invasion phenotype reported in *P. falciparum* (Sidik et al., 2016), as merozoites have been recently shown to exhibit some motility (Yahata et al., 2020). Although our results strongly suggest that CLAMP is not directly involved in MJ formation but is likely acting upstream, we cannot exclude that the protein plays multiple roles in distinct processes, including motility and host cell invasion. Alternatively, CLAMP could regulate microneme

biogenesis and/or secretion, although no such defects were observed in CLAMP-deficient *T. gondii* (Sidik et al., 2016). CLAMP might be considered as a potential target for strategies aimed at blocking the malaria infection early after transmission by the mosquito.

MATERIALS AND METHODS

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. Protocols were approved by the Ethical Committee Charles Darwin N°005 (approval #7475-2016110315516522).

Experimental animals, parasites and cell lines.

Female Swiss mice (6–8 weeks old, from Janvier Labs) were used for all routine parasite infections. Parasite lines were maintained in mice through intraperitoneal injections of frozen parasite stocks and transmitted to *Anopheles stephensi* mosquitoes for experimental purposes. A drop of blood from the tail was collected in 1ml PBS daily and used to monitor the parasitaemia by flow cytometry.

Anopheles stephensi mosquitoes were reared at 24°C with 80 % humidity and permitted to feed on infected mice that were anaesthetised, using standard methods of mosquito infection as previously described (Ramakrishnan et al. 2012). Post feeding, *P. berghei*-infected mosquitoes were kept at 21°C and fed daily on a 10% sucrose solution. To quantify development of parasites in mosquito, midgut and haemolymph sporozoites were collected at day 16 post-infection and salivary gland sporozoites were collected at day 21 post-infection from infected mosquitoes of the same batch. Sporozoites were collected by hand dissection and homogenisation of isolated midguts or salivary glands in complete DMEM (DMEM supplemented with 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% L-Glutamine) then counted using a haemocytometer (Neubauer cell chamber)

HepG2 cells (ATCC HB-8065) were cultured in complete DMEM at 37°C, 5% CO₂ as previously described (Silvie et al. 2007) and used for invasion and cell traversal assays.

Parental parasite line used for transfection was PbDiCre line previously generated by the team (Fernandes et al., 2020). It consists in a Pb ANKA line expressing mCherry and an expression cassette of DiCre system containing two inactive subunits of Cre recombinase linked to rapamycin-ligands. In presence of rapamycin, Cre activity is restored and allows excision of DNA sequences flanked by Lox sites. Pb ANKA and Py 17XNL genomic DNA were used for amplification of homology regions for construction of plasmids for transfections.

Generation of *P. berghei* CLAMP cKO line.

Plasmids constructs. Two plasmids, P1 and P2, were generated for insertion of a loxN site respectively upstream clamp promoter and downstream clamp ORF.

P1 plasmid was constructed by insertion of 5'HR1 and 5'HR2 (localized in clamp promoter) in genericUpstream plasmid, containing an expression cassette of GFP and hDHFR for pyrimethamine resistance flanked by two LoxN sites. First, 5'HR1 was amplified from Pb ANKA gDNA (895 bp fragment) and inserted in genericUpstream plasmid linearized by *KpnI* and *XhoI*. Secondly, 5'HR2 was amplified from Pb ANKA gDNA (1014 bp fragment) and inserted in the previously generated plasmid linearized by *NheI*.

P2 plasmid was constructed by insertion of 3'HR1 and 3'HR2 (localized respectively in the end of clamp ORF and in clamp 3'UTR) in genericDownstream plasmid, similar to genericUpstream plasmid except the presence of a single LoxN site downstream the GFP/hDHFR cassette. 3'HR1 was divided into two fragments to allow insertion of Py clamp 3'UTR downstream the gene. Py 3'UTR was chosen to avoid spontaneous recombination with endogenous Pb 3'UTR. Fragment a of 3'HR1 was amplified from Pb ANKA gDNA (862 bp fragment) while fragment b was amplified from Py 17XNL gDNA (559 bp fragment). 3'HR1a represents the end of clamp ORF without stop codon while 3'HR1b represents Py clamp 3'UTR and the linkers of these fragments contain the sequence of the 3xFlag tag fused to clamp ORF. Fragments 3'HR1a and 3'HR1b were inserted in the genericDownstream plasmid linearized by *KpnI* and *XhoI*. Then, 3'HR2 was amplified from Pb ANKA gDNA (999 bp fragment) and inserted in the previously generated plasmid linearized by *NheI*. Plasmids P1 and P2 were linearized with

KpnI and *NheI* prior transfection.

All primers used to construct the four plasmids are listed in **(Table S1)** of supplementary materials.

Transfection and selection. For parasite transfection, schizonts purified from an overnight culture of parasites were transfected with 5–10 µg of linearized plasmid by electroporation using the AMAXA Nucleofector device (program U033), as previously described (Janse et al., 2006), and immediately injected intravenously into the tail vein of SWISS mice. To permit the selection of resistant transgenic parasites, pyrimethamine (35 mg/L) and 5-fluorocytosine (0.5 mg/ml) were added to the drinking water and administered to mice, one day after transfection. The parasitaemia was monitored daily by flow cytometry and the mice sacrificed at a parasitaemia of 2-3%, allowing preparation of frozen blood stocks and isolation of parasites for genomic DNA extraction.

Final transfected parasites were sorted by FACS. Mice were injected intraperitoneally with frozen parasite stocks and monitored until the parasitaemia was between 0.1 and 1%. On the day of sorting, one drop of blood from the tail was collected in 1ml PBS and used for sorting of 100 iRBCs which were recovered in 200 µl RPMI +20% FBS, and then injected intravenously into two mice. The mice were sacrificed at a parasitaemia of 2-3% and the blood recovered for preparation of frozen stocks and genotyping.

Genotyping PCR

Infected mice were sacrificed at a parasitaemia of 2-3% and the infected blood collected and passed through a CF11 column (Whatmann) to deplete leucocytes. The RBCs collected were then centrifuged and lysed with 0.2% saponin (Sigma) to recover parasite material for genomic DNA isolation using a kit (Qiagen DNA Easy Blood and Tissue Kit), according to the manufacturer's instructions. Specific PCR primers were designed to check for wild-type and recombined loci and are listed in **Table S1**. All PCR reactions were carried out using

Recombinant Taq DNA Polymerase (5ug/μl from Thermo Scientific) and standard PCR cycling conditions.

Rapamycin-induced gene excision

As previously described (Fernandes et al., 2020, 2021), complete gene excision was obtained in sporozoites by treatment of gametocytes 24 hours prior transmission to mosquitoes. Infected mice were treated by administration of a single dose of 200 μg rapamycin (Rapamune[®] 1mg/mL (Pfizer)) by oral gavage. Correct treatment is validated the day after, before transmission to mosquitoes, by observation of the decreased GFP fluorescence in circulating blood-stage parasites.

***In vitro* infection assays**

Infection of hepatocytes. HepG2 cells cultured in complete DMEM were seeded at a density of 30.000 cells/well in a 96-well plate for flow cytometry analysis or 50.000 cells/well in 96-well μ-slide (IBIDI) for immunofluorescence assays, 24 hours prior to infection with sporozoites. Culture medium is refreshed with complete DMEM the day of infection, followed by incubation with 3,000 sporozoites for flow cytometry analysis or 1,000 sporozoites for immunofluorescence assays for 3h at 37°C. After 3 hours, cells were washed twice with complete DMEM and then incubated for 24h at 37°C.

Quantification of cell traversal and invasion at 3h. For quantification of traversal events, fluorescein-conjugated dextran (0.5 mg/ml, Life Technologies) was added to the wells along with sporozoites. After 3 hours, cells are washed twice with PBS, trypsinized then resuspended in complete DMEM for analysis by flow cytometry on a Guava EasyCyte 6/2L bench cytometer equipped with 488nm and 532nm lasers (Millipore). Control wells were prepared without sporozoites to measure the basal level of dextran uptake.

Quantification of productive invasion at 24h. For immunofluorescence assays, cells were washed with PBS after 24h of incubation, then fixed with PFA 4% for 10mn, followed by two

washes with PBS. Cells are then quenched with glycine 0,1M for 5 min, washed twice with PBS then permeabilized 5 min with 1% Triton before 2 washes in PBS then blocking in PBS + 3% BSA. Samples are then stained with goat anti-UIS4 primary antibody (1:500, Sicgen), followed by donkey anti-goat Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:1000, Life Technologies), both diluted in 3% BSA in PBS. EEFs are then counted based on the presence of UIS4-stained parasitophorous vacuole.

Imaging of parasites

Live sample such as midguts and salivary glands from infected mosquito were carefully collected and mounted in PBS then visualized live under a fluorescent microscope. Sporozoites collected by disruption of midguts or salivary glands were resuspended in PBS and put on a coverslip then air dried. For immunostaining, samples are rehydrated in PBS for 30 min, then incubated with 3% BSA in PBS for 1h. Sporozoites are then stained with mouse anti-Flag primary antibody (M2 clone, Sigma), washed twice with PBS then incubated with Alexa Fluor anti-mouse 647 secondary antibodies (Invitrogen) and Hoechst 77742. Parasites were imaged on a fluorescent microscope equipped with 63X and 100X objectives. We set the exposure time of FITC, Cy3 and Cy5 according to *clampcKO^{UT}* parasites and maintained the same exposure for *clampcKO^{rapa}* parasites, in order to allow comparisons. All images were acquired using Zen software (Zeiss) and processed with ImageJ for adjustment of contrast.

Motility assay

96-well plate were coated with 3% BSA in PBS at 37°C for 30 min. *clampcKO^{UT}* and *clampcKO^{rapa}* sporozoites were collected from manual dissection of infected mosquitoes, resuspended in cold PBS at a 1:1 ratio and kept on ice until imaging. Sporozoites were resuspended in PBS/BSA for a final concentration of 3% BSA and deposited in the 96-well plate before centrifugation for 2 min at 1000 rpm and immediately placed at 37°C in the

microscope chamber with 5% CO₂. After 10 min to let sporozoites activate, they were imaged every second for 3 min.

Movies were acquired on widefield microscope (Axio Observer 7, Zeiss) with ORCA-Fusion Digital CMOS cameras (High resolution : 2304 x 2304 (5.3 Megapixels), High speed : 100 frames/s (at 2304 X 2048 ROI) and Pixel size : 6.5 x 6.5 μ m) and a Duolink camera adapter for simultaneous two-color acquisition with integrated multi-bandpass emission filter cubes for efficient image acquisition. Microscope was equipped with a 20x objective and ZEN acquisition software. Movies (181 frames per movie) were projected into a single image for each channel and merged using ImageJ. Sporozoites were counted manually based on their movement pattern and divided into four groups : circular gliding, floating, waving or fixed. *clampcKO*^{UT} and *clampcKO*^{rapa} sporozoites were differentiated based on their fluorescence (after merge : red for *clampcKO*^{rapa} and yellow for *clampcKO*^{UT} parasites).

Statistical analysis

Statistical significance was assessed by two-way ANOVA or ratio paired t tests, as indicated in the figure legends. All statistical tests were computed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). *In vitro* experiments were performed with a minimum of three technical replicates per experiment.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Maurel Tefit and Thierry Houpert for rearing of mosquitoes. This work benefited from equipment and services from the CELIS-imaging cell culture core facility (Paris Brain Institute), a platform supported through the ANR grants, ANR-10-IAIHU-06 and ANR-11-INBS-0011-NeurATRIS. ML was supported by a 'DIM 1Health' doctoral fellowship awarded by the Conseil Régional d'Ile-de- France.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, M.L., O.S.; methodology, M.L., O.S.; investigation, M.L., C.E.P., C.M., S.H., B.H.C., D.A., J.F.F; writing – original draft, M.L.; writing – review & editing, M.L., C.E.P., C.M., S.H., B.H.C., D.A., J.F.F., O.S.; supervision, O.S.; funding acquisition, O.S.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS STATEMENT

The authors declare no competing financial interests.

CORRESPONDING AUTHOR

Correspondence and requests for materials should be addressed to OS (olivier.silvie@inserm.fr).

REFERENCES

- Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., and Boothroyd, J.C. (2005). Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles. *PLoS Pathog* 1, e17.
- Bargieri, D., Lagal, V., Andenmatten, N., Tardieux, I., Meissner, M., and Ménard, R. (2014). Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites: The Junction Conundrum. *PLoS Pathog* 10, e1004273.
- Besteiro, S., Dubremetz, J.-F., and Lebrun, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cellular Microbiology* 13, 797–805.
- Bushell, E., Gomes, A.R., Sanderson, T., Anar, B., Girling, G., Herd, C., Metcalf, T., Modrzynska, K., Schwach, F., Martin, R.E., et al. (2017). Functional Profiling of a *Plasmodium* Genome Reveals an Abundance of Essential Genes. *Cell* 170, 260–272.e8.
- Cao, J., Kaneko, O., Thongkukiattkul, A., Tachibana, M., Otsuki, H., Gao, Q., Tsuboi, T., and Torii, M. (2009). Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Parasitology International* 58, 29–35.
- Combe, A., Moreira, C., Ackerman, S., Thiberge, S., Templeton, T.J., and Ménard, R. (2009). TREP, a novel protein necessary for gliding motility of the malaria sporozoite. *International Journal for Parasitology* 39, 489–496.
- Cowman, A.F., Tonkin, C.J., Tham, W.-H., and Duraisingh, M.T. (2017). The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host & Microbe* 22, 232–245.
- Dundas, K., Shears, M.J., Sinnis, P., and Wright, G.J. (2018). Important Extracellular Interactions between *Plasmodium* Sporozoites and Host Cells Required for Infection. *Trends in Parasitology* 35, 129–139.
- Ejigiri, I., Ragheb, D.R.T., Pino, P., Coppi, A., Bennett, B.L., Soldati-Favre, D., and Sinnis, P. (2012). Shedding of TRAP by a Rhomboid Protease from the Malaria Sporozoite Surface Is Essential for Gliding Motility and Sporozoite Infectivity. *PLoS Pathogens* 8, e1002725.
- Fernandes, P., Briquet, S., Patarot, D., Loubens, M., Hoareau-Coudert, B., and Silvie, O. (2020). The dimerisable Cre recombinase allows conditional genome editing in the mosquito stages of *Plasmodium berghei*. *PLoS ONE* 15, e0236616.
- Fernandes, P., Loubens, M., Silvie, O., and Briquet, S. (2021). Conditional Gene Deletion in Mammalian and Mosquito Stages of *Plasmodium berghei* Using Dimerizable Cre Recombinase. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 2369, 101–120.

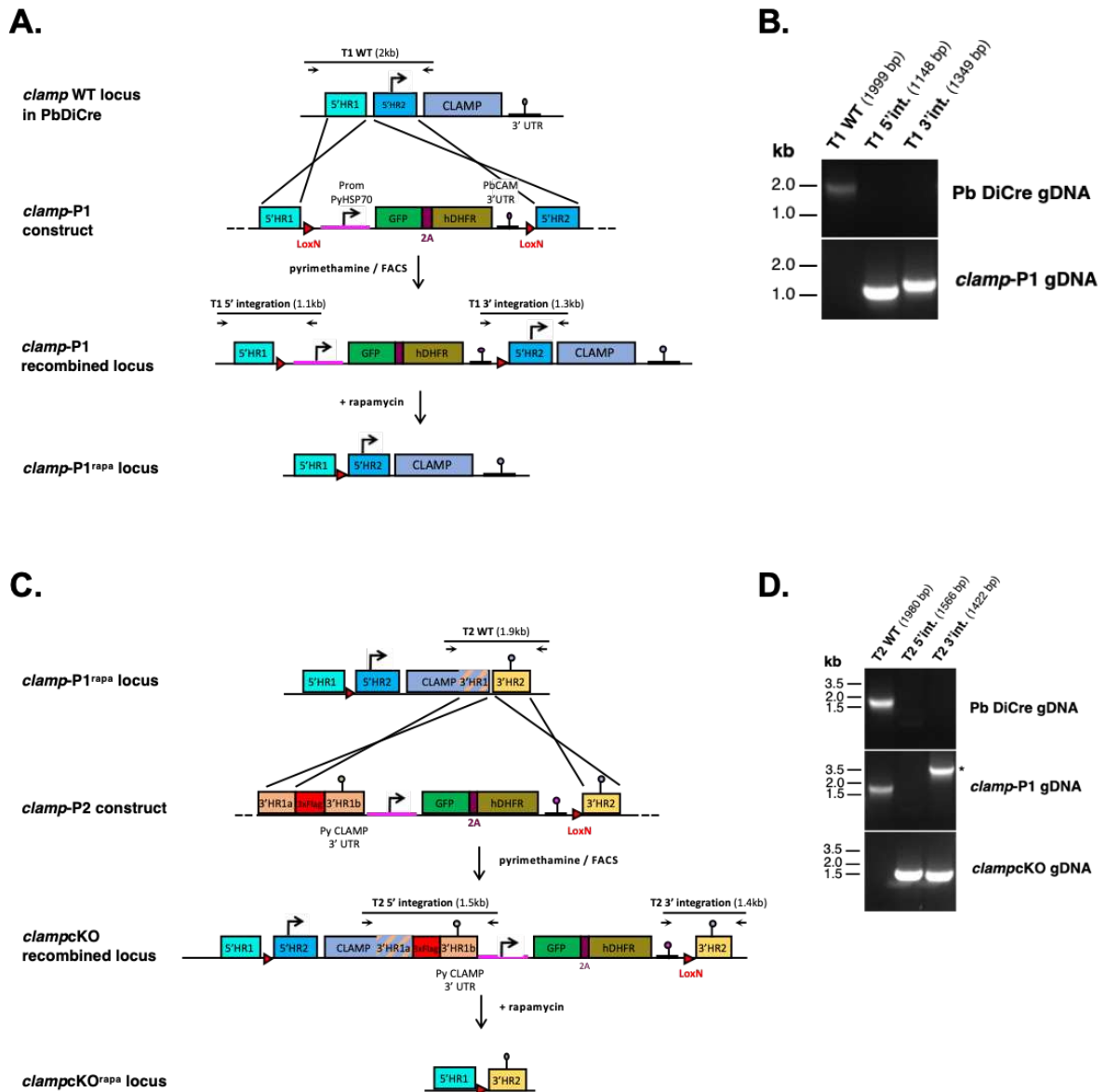
- Frénal, K., Dubremetz, J.-F., Lebrun, M., and Soldati-Favre, D. (2017). Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nature Reviews Microbiology* 15, 645–660.
- Ghosh, A.K., Devenport, M., Jethwaney, D., Kalume, D.E., Pandey, A., Anderson, V.E., Sultan, A.A., Kumar, N., and Jacobs-Lorena, M. (2009). Malaria Parasite Invasion of the Mosquito Salivary Gland Requires Interaction between the Plasmodium TRAP and the Anopheles Saglin Proteins. *PLoS Pathogens* 5, e1000265.
- Giovannini, D., Späth, S., Lacroix, C., Perazzi, A., Bargieri, D., Lagal, V., Lebugle, C., Combe, A., Thiberge, S., Baldacci, P., et al. (2011). Independent Roles of Apical Membrane Antigen 1 and Rhoptry Neck Proteins during Host Cell Invasion by Apicomplexa. *Cell Host & Microbe* 10, 591–602.
- Hamada, S., Pionneau, C., Parizot, C., Silvie, O., Chardonnet, S., and Marinach, C. (2021). In-depth proteomic analysis of Plasmodium berghei sporozoites using trapped ion mobility spectrometry with parallel accumulation-serial fragmentation. *Proteomics* 21, 2000305.
- Ishino, T., Murata, E., Tokunaga, N., Baba, M., Tachibana, M., Thongkukiatkul, A., Tsuboi, T., and Torii, M. (2019). Rhoptry neck protein 2 expressed in Plasmodium sporozoites plays a crucial role during invasion of mosquito salivary glands. *Cellular Microbiology* 21, e12964.
- Janse, C.J., Franke-Fayard, B., Mair, G.R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., Matuschewski, K., Gemert, G.J. van, Sauerwein, R.W., and Waters, A.P. (2006). High efficiency transfection of Plasmodium berghei facilitates novel selection procedures. *Molecular and Biochemical Parasitology* 145, 60–70.
- Jullien, N., Sampieri, F., Enjalbert, A., and Herman, J.-P. (2003). Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic Acids Research* 31, e131.
- Klug, D., Goellner, S., Kehrer, J., Sattler, J., Strauss, L., Singer, M., Lu, C., Springer, T.A., and Frischknecht, F. (2020). Evolutionarily distant I domains can functionally replace the essential ligand-binding domain of Plasmodium TRAP. *ELife* 9, e57572.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J., and Blasig, I.E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 631–645.
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.-F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B.W., et al. (2011). The RON2-AMA1 Interaction is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites. *PLoS Pathog* 7, e1001276.

- Lebrun, M., Carruthers, V.B., and Cesbron-Delauw, M.-F. (2020). Toxoplasma secretory proteins and their roles in parasite cell cycle and infection. In *Toxoplasma Gondii* (Third Edition), (Elsevier), pp. 607–704.
- Lindner, S.E., Swearingen, K.E., Harupa, A., Vaughan, A.M., Sinnis, P., Moritz, R.L., and Kappe, S.H.I. (2013). Total and Putative Surface Proteomics of Malaria Parasite Salivary Gland Sporozoites. *Molecular & Cellular Proteomics* 12, 1127–1143.
- Loubens, M., Vincensini, L., Fernandes, P., Briquet, S., Marinach, C., and Silvie, O. (2021). Plasmodium sporozoites on the move: Switching from cell traversal to productive invasion of hepatocytes. *Mol Microbiol* 115, 870–881.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., and Rodriguez, A. (2001). Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science* 291, 141–144.
- Nozaki, M., Baba, M., Tachibana, M., Tokunaga, N., Torii, M., and Ishino, T. (2020). Detection of the Rhoptry Neck Protein Complex in Plasmodium Sporozoites and Its Contribution to Sporozoite Invasion of Salivary Glands. *MSphere* 5, e00325-20.
- Onzere, C.K., Fry, L.M., Bishop, R.P., Silva, M.G., Bastos, R.G., Knowles, D.P., and Suarez, C.E. (2021). Theileria equi claudin like apicomplexan microneme protein contains neutralization-sensitive epitopes and interacts with components of the equine erythrocyte membrane skeleton. *Sci Rep* 11, 9301.
- Riglar, D.T., Richard, D., Wilson, D.W., Boyle, M.J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D.S., Rogers, K.L., Whitchurch, C.B., et al. (2011). Super-Resolution Dissection of Coordinated Events during Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte. *Cell Host & Microbe* 9, 9–20.
- Santos, J.M., Egarter, S., Zuzarte-Luís, V., Kumar, H., Moreau, C.A., Kehrer, J., Pinto, A., Costa, M. da, Franke-Fayard, B., Janse, C.J., et al. (2017). Malaria parasite LIMP protein regulates sporozoite gliding motility and infectivity in mosquito and mammalian hosts. *ELife* 6.
- Sidik, S.M., Huet, D., Ganesan, S.M., Huynh, M.-H., Wang, T., Nasamu, A.S., Thiru, P., Saeij, J.P.J., Carruthers, V.B., Niles, J.C., et al. (2016). A Genome-wide CRISPR Screen in Toxoplasma Identifies Essential Apicomplexan Genes. *Cell* 166, 1423-1435.e12.
- Steinbuechel, M., and Matuschewski, K. (2008). Role for the Plasmodium sporozoite-specific transmembrane protein S6 in parasite motility and efficient malaria transmission. *Cellular Microbiology* 11, 279–288.

- Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J.H., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S., and Ménard, R. (1997). TRAP Is Necessary for Gliding Motility and Infectivity of Plasmodium Sporozoites. *Cell* 90, 511–522.
- Swearingen, K.E., Lindner, S.E., Flannery, E.L., Vaughan, A.M., Morrison, R.D., Patrapuvich, R., Koepfli, C., Muller, I., Jex, A., Moritz, R.L., et al. (2017). Proteogenomic analysis of the total and surface-exposed proteomes of Plasmodium vivax salivary gland sporozoites. *PLoS Negl Trop Dis* 11, e0005791.
- Tibúrcio, M., Yang, A.S.P., Yahata, K., Suárez-Cortés, P., Belda, H., Baumgarten, S., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G.-J., van Waardenburg, Y., Levashina, E.A., et al. (2019). A Novel Tool for the Generation of Conditional Knockouts To Study Gene Function across the Plasmodium falciparum Life Cycle. *MBio* 10.
- Yahata, K., Hart, M.N., Davies, H., Asada, M., Templeton, T.J., Treeck, M., Moon, R.W., and Kaneko, O. (2020). Gliding motility of Plasmodium merozoites. *Biorxiv* 2020.05.01.072637.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1



Supplementary Figure S1. Generation of *P. berghei clamp*cKO parasites

A. Detailed strategy to insert a LoxN site upstream of CLAMP locus. 5' homology regions (5'HR1 and 5'HR2) corresponding to parts of CLAMP promoter were inserted in the GenericUpstream plasmid at both extremities of a GFP-hDHFR expression cassette flanked by two LoxN sites. This construct was transfected into a PbDiCre line (mCherry+) previously generated (Fernandes 2020). Following parasite transfection and selection with pyrimethamine, mCherry+/GFP+ parasites were sorted by flow cytometry to exclude any residual GFP- population. Rapamycin-induced excision leads to retention of one LoxN site upstream CLAMP locus and the disappearance of GFP fluorescence. Genotyping primers and expected PCR fragments sizes are indicated by arrows and lines. **B.** PCR analysis of genomic DNA isolated from parental PbDiCre and *clamp*-P1 parasites. Confirmation of predicted

recombination events was assessed with primer combinations specific for WT, 5' or 3' integration for the first transfection (T1). Primers used for genotyping are listed in **Table S1**. **C.** Detailed strategy to insert a LoxN site downstream CLAMP locus. 3' homology regions (3'HR1 and 3'HR2) were inserted in the GenericDownstream plasmid at both extremities of a GFP-hDHFR expression cassette followed by one LoxN site. 3'HR1 was divided into two fragments, the first one corresponding to the end of CLAMP ORF fused to 3xFLAG and the second one corresponding to PyCLAMP 3'UTR. This Py 3'UTR was inserted to avoid duplication of Pb CLAMP 3'UTR and spontaneous recombination. Following parasite transfection and selection with pyrimethamine, mCherry+/GFP+ parasites were sorted by flow cytometry to exclude any residual GFP- population. Rapamycin-induced excision leads to deletion of the whole CLAMP locus and the disappearance of GFP fluorescence. Genotyping primers and expected PCR fragments sizes are indicated by arrows and lines. **D.** PCR analysis of genomic DNA isolated from parental PbDiCre, *clamp*-P1 and *clamp*CKO parasites. Confirmation of predicted recombination events was assessed with primer combinations specific for WT, 5' or 3' integration for the second transfection (T2). A band in *clamp*-P1 gDNA for 3'integration is due to the forward primer which can bind to the sequence added during the first transfection and is indicated by an asterisk. Primers used for genotyping are listed in **Table S1**.

Table S1. List of oligonucleotides used in the study.

Table S2. Quantitative data and statistical analysis.

TROISIÈME PARTIE
DISCUSSION

Les apicomplexes sont notamment caractérisés par la présence d'organites sécrétoires apicaux, les micronèmes et les rhoptries, qui déchargent leur contenu de manière séquentielle lors de l'invasion des cellules hôtes (Carruthers & Sibley, 1997). Les micronèmes sont les vésicules sécrétoires les plus abondantes chez les sporozoïtes de *Plasmodium*. Ils contiennent une variété de protéines impliquées dans différentes fonctions biologiques comme la motilité, l'adhérence, l'invasion ou la sortie des parasites des cellules hôtes (Dubois & Soldati-Favre, 2019). Les protéines micronémales sont impliquées dans des processus temporellement et fonctionnellement distincts, néanmoins essentiels pour le parasite, soulignant l'importance d'étudier ces vésicules sécrétoires et leurs mécanismes de sécrétion. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à trois protéines micronémales des sporozoïtes, B9, AMA1 et CLAMP, dont j'ai étudié la fonction à l'aide d'approches génétiques.

I. B9, nouvel acteur de l'invasion productive par les sporozoïtes de *Plasmodium*

Notre étude a permis de révéler le rôle essentiel de B9 dans l'invasion productive des cellules hépatiques par les sporozoïtes de *P. berghei*. Nos résultats montrent que B9 est sécrétée des micronèmes des sporozoïtes, et interagit avec P36 et P52, deux autres membres de la famille des protéines à domaine 6-cystéines également essentielles à l'invasion.

Nos résultats contredisent en partie les conclusions d'une étude précédente, selon lesquelles la protéine B9 n'est pas exprimée au stade sporozoïte et ne joue aucun rôle dans l'invasion, mais permettrait le maintien de la vacuole parasitophore (Annoura et al., 2014). Les différences de résultats observés sur l'expression de la protéine peuvent s'expliquer par les différentes méthodologies utilisées. En effet dans l'étude d'Annoura et al., l'expression de B9 a été analysée chez *P. berghei* par expression de la mCherry sous contrôle des régions régulatrices du gène codant pour B9, régions choisies de façon empirique. Les régions régulatrices telles que définies par Annoura et al. représentent 1500pb en amont et 850pb en aval de l'ORF de b9, ce qui pourrait ne pas représenter l'intégralité des séquences régulatrices. Dans la même étude, des anticorps développés contre la protéine B9 de *P. falciparum* n'ont pas permis de détecter la protéine chez les sporozoïtes, ce qui pourrait refléter un manque de sensibilité des anticorps. Dans notre étude, l'expression de la protéine a été analysée grâce à une étiquette fusionnée à la protéine native, et de plus confirme les données obtenues en protéomique montrant l'expression

de B9 chez les sporozoïtes de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. yoelii* et *P. berghei* (Hamada et al., 2021; Lindner et al., 2019; Swearingen et al., 2017). Les conclusions d'Annoura et al. sur la fonction de B9 dans le développement au stade hépatique proviennent de leur observation de la présence de parasites intracellulaires 3h post-invasion qui disparaissent par la suite. Cependant les méthodes de détection utilisées ne permettent pas d'assurer que les parasites observés résultent bien d'une invasion productive des hépatocytes et non de leur traversée, compliquant leur interprétation.

L'étude de la structure de B9 par modélisation indique la présence d'un domaine propeller et possiblement de deux domaines dérivés des domaines à 6-cystéines contenant chacun 4 cystéines. La structure du domaine propeller de B9 est proche de celle de la protéine CyRPA (Wong et al., 2019) qui agit en complexe avec d'autres protéines parasitaires (Ripr et Rh5) au pôle apical des mérozoïtes lors de l'invasion des érythrocytes (Galaway et al., 2017; Reddy et al., 2015; Volz et al., 2016). L'interaction de Rh5 avec son récepteur érythrocytaire, la basigine, permet la formation d'un pore déclenchant un signal calcique requis pour les étapes ultérieures de l'invasion (Chen et al., 2011; Volz et al., 2016). Des complexes de protéines parasitaires impliquant des protéines à domaine 6-cystéines ont déjà été décrits chez Plasmodium, notamment Pf41 / Pf12 chez les mérozoïtes (Parker et al., 2015; Paul et al., 2017; Taechalertpaisarn et al., 2012; Tonkin et al., 2013), Pfs230 / Pfs48/45 / PfCCPs chez les gamétocytes (N. Kumar, 1987; Simon et al., 2009) ou encore P36 / P52 chez les sporozoïtes (Arredondo et al., 2018). Ces complexes en surface du parasite sont impliqués dans les interactions avec les cellules cibles et sont essentiels aux stades où ils sont exprimés. Chez *P. berghei*, le remplacement de P36 et P52 par les orthologues de *P. falciparum* ou *P. vivax* ne permet pas de restaurer l'infectiosité des sporozoïtes dans des cellules permissives à l'infection par ces espèces (Manzoni et al., 2017), suggérant l'existence d'un complexe protéique plus large que le dimère P36-P52, qui serait nécessaire pour l'invasion. Au vu du rôle découvert B9 dans l'invasion des hépatocytes et de la similarité structurale de son domaine propeller avec CyRPA, nous avons émis l'hypothèse d'une interaction de B9 avec P36 et/ou P52. Nous n'avons identifié aucun partenaire de B9 dans des expériences de co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse à partir de lysats de sporozoïtes exprimant B9-Flag. Cependant, à l'aide d'un système d'expression hétérologue en cellules de mammifères, nous avons pu révéler l'existence d'une interaction entre B9, P36 et P52, suggérant l'existence d'un complexe d'invasion. L'étude de sporozoïtes activés à 37°C en présence de BSA a montré la sécrétion de B9 après activation, de façon similaire à ce qui a déjà été décrit pour P36 (Arredondo et al., 2018). La forme de B9 sécrétée est légèrement plus petite que la forme non sécrétée, ce qui

pourrait s'expliquer par un clivage de la protéine, peut-être au niveau de son ancre GPI. Ainsi B9 pourrait être sécrétée au moment de l'invasion puis clivée et interagirait alors avec le complexe P36/P52 ancré à la surface des sporozoïtes par l'ancre GPI de P52, permettant d'initier l'invasion des hépatocytes. Chez les mérozoïtes de *P. falciparum*, CyRPA n'interagit avec Rh5 et Ripr qu'au moment de l'invasion, après sécrétion des protéines des micronèmes (CyRPA et Ripr) ou des rhoptries (Rh5). Par analogie, il est probable que B9 ne forme un complexe avec P36 et P52 qu'au moment de l'invasion.

De façon similaire à CyRPA chez les mérozoïtes, B9 pourrait réguler l'activité de ligand du complexe P36-P52 à la surface du sporozoïte. Une interaction fonctionnelle entre P36 et des récepteurs de l'hépatocyte a été décrite (Manzoni et al., 2017) puisque P36 est responsable du choix de la voie d'entrée dans les hépatocytes par *P. berghei* et *P. yoelii*. Aucune interaction directe n'a cependant été démontrée à ce jour. L'analyse structure-fonction de B9 chez *P. berghei* a montré que son domaine propeller peut être remplacé par celui de *P. yoelii* mais pas par celui de *P. falciparum*. Une étude du laboratoire a montré qu'un parasite *P. berghei* complémenté avec P36 de *P. yoelii* n'est capable d'envahir les hépatocytes que via CD81, restreignant l'infectiosité des sporozoïtes aux lignées cellulaires HepG2/CD81 (Manzoni et al., 2017). Dans le cas de parasites complémentés avec B9 dont le domaine propeller vient de *P. yoelii*, les sporozoïtes envahissent à la fois les lignées HepG2 et HepG2/CD81, indiquant l'utilisation d'une voie CD81-indépendante à l'instar de *P. berghei*. Ainsi il semblerait que B9, bien qu'essentielle à l'invasion, ne soit pas impliquée dans le choix de la voie d'entrée dans les hépatocytes et n'interagirait donc pas directement avec les récepteurs de la cellule hôte. De nouveaux parasites exprimant des versions tronquées ou chimériques de B9 ont été générés et leur phénotypage va permettre d'approfondir l'étude structure-fonction de la protéine, et notamment de définir le rôle des domaines à 6cys situés en aval du propeller.

L'étiquetage de la protéine nous a également permis de préciser sa localisation en microscopie à super-résolution (STED), révélant un marquage de type micronémale, punctiforme de part et d'autre du noyau des sporozoïtes. Pour confirmer la localisation micronémale, nous avons effectué un co-marquage avec une protéine micronémale connue, AMA1. De façon intéressante les deux protéines présentent le même type de marquage spécifique des micronèmes mais ne co-localisent pas, suggérant une distribution dans des populations différentes de micronèmes. La distribution de B9 par rapport à P36 et P52 reste à déterminer, mais nécessitera le développement de nouveaux outils (lignées doublement étiquetées, anticorps spécifiques).

En conclusion, notre étude a révélé le rôle essentiel de B9 lors de l'invasion productive des hépatocytes par les sporozoïtes. L'analyse de la sécrétion et des partenaires de B9 permet d'émettre l'hypothèse de son implication dans un complexe protéique contenant au moins P36 et P52, et impliqué dans les étapes précoces de l'invasion des hépatocytes, possiblement par interaction avec les récepteurs de la cellule.

II. Une nouvelle fonction des protéines AMA1 et RONs chez le sporozoïte

Nous avons exploité la stratégie DiCre pour analyser le rôle d'AMA1, RON2 et RON4 chez le sporozoïte. Notre étude du rôle de ces protéines dans l'invasion des hépatocytes a dérivé vers l'étude plus générale de leur rôle chez le sporozoïte, aussi bien chez le moustique dans l'invasion des glandes salivaires que dans l'invasion des hépatocytes. La déplétion chez le sporozoïte de ces protéines entraîne en effet une réduction majeure de l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes de l'hémolymphe, et dans une moindre mesure impacte négativement l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes isolés des glandes salivaires.

Au vu de l'importance d'AMA1 et des RONs dans la formation de la jonction mobile pour l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes et de leur conservation chez le sporozoïte (Florens et al., 2002; Hamada et al., 2021), un rôle similaire à ce stade pouvait être prédit. De plus, l'utilisation d'anticorps bloquant AMA1 (Silvie et al., 2004) ou de peptides bloquant l'interaction AMA1/RON2 (Yang, Lopaticki, et al., 2017) inhibe l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *P. falciparum*. Le développement des méthodes de délétion conditionnelle a plus récemment permis d'étudier l'impact de la déplétion de protéines au stade sporozoïte. Les premières études de ce type chez *P. berghei* ont cependant été à l'encontre des résultats précédemment décrits en dissociant les rôles d'AMA1 et des RONs dans l'invasion des hépatocytes, les RONs étant essentielles contrairement à AMA1 (Bargieri et al., 2013; Giovannini et al., 2011). La première de ces études (Giovannini et al., 2011) se basant sur la délétion du 3'UTR du gène d'AMA1 chez *P. berghei*, nous avons cherché à reproduire cette stratégie en ciblant cette région pour l'insertion des sites d'excision par la recombinaison Cre. Entre nos mains, la délétion du 3'UTR du gène d'AMA1 ne s'est pas révélée suffisante pour dépléter la protéine chez les sporozoïtes, n'induisant ainsi aucune perturbation dans le cycle de

vie du parasite. Ce phénomène a déjà été décrit pour d'autres gènes chez *P. berghei* et *P. falciparum*, causé par l'existence de sites alternatifs de régulation permettant au parasite de compenser la perte de séquences régulatrices (Collins et al., 2013; Ecker et al., 2012).

Ainsi la délétion complète du gène codant pour AMA1 semble être la meilleure stratégie à adopter pour dépléter la protéine. Cette stratégie a d'ailleurs été utilisée par Bargieri et al., par une approche directe de délétion du gène au stade sanguin. Cette étude n'a révélé aucun rôle d'AMA1 dans l'invasion des cellules par les sporozoïtes. Dans nos mains, la déplétion de la protéine réduit partiellement l'invasion des cellules hépatiques. La différence des résultats observés dans notre étude et celle de Bargieri et al. peut s'expliquer par leur incapacité à isoler une population pure de parasites délétés pour AMA1 au stade sanguin, probablement en raison de son rôle essentiel à ce stade. L'utilisation de populations mixtes AMA1+ et AMA- de parasites transmis aux moustiques a ainsi pu conduire à des complémentations génétiques dans les oocystes, réduisant d'autant plus la quantité de sporozoïtes réellement délétés pour AMA1 utilisés pour les expériences d'invasion d'hépatocytes. Le phénotype observé dans les hépatocytes est similaire pour les parasites délétés pour RON2 et RON4 dans notre étude, ce qui concorde avec l'étude de Bargieri et al. qui s'est également intéressée à RON4.

La réduction significative mais incomplète de l'invasion des hépatocytes par les parasites délétés pourrait s'expliquer par une sélection des parasites les plus invasifs dès l'invasion des glandes salivaires, par une adaptation des parasites à l'absence des protéines, ou encore par un rôle d'AMA1-RONs moins important au stade hépatique que celui historiquement décrit au stade sanguin. En effet l'étude ayant montré l'inhibition de l'invasion d'hépatocytes par *P. falciparum* en présence d'anticorps anti-AMA1 montre une inhibition partielle même en présence de grandes quantités d'anticorps (Silvie et al., 2004). Entre nos mains, les parasites délétés pour AMA1 ou les RONs ne présentent pas de défaut de traversée des hépatocytes, indiquant l'absence de rôle dans ce processus ce qui contredit ce qui a été décrit pour RON2 par déplétion de la protéine (Ishino et al., 2019) et pour AMA1 en présence de peptide inhibant l'interaction avec RON2 (Yang, Lopaticki, et al., 2017). Ces études concernant *P. falciparum*, la différence observée pourrait provenir d'un rôle différent d'AMA1 et des RONs dans la traversée chez les deux espèces.

Le phénotype le plus prononcé des parasites délétés pour AMA1, RON2 ou RON4 est observé chez le moustique, où une très forte réduction du nombre de sporozoïtes présents dans les glandes salivaires a été observée dans notre étude. Nous avons exclu l'hypothèse d'un défaut

de sortie des oocystes et ainsi révélé un rôle des protéines dans l'invasion des glandes salivaires, confirmant les données déjà publiées pour RON2 et RON4 (Ishino et al., 2019; Nozaki et al., 2020). L'observation en microscopie électronique en 3D de glandes salivaires infectées a permis de révéler une distribution des parasites déplétés pour AMA1 similaire à celle observée pour des parasites WT, suggérant un rôle de la protéine restreint aux étapes initiales de l'entrée dans les glandes salivaires. Les outils actuels ne permettent malheureusement pas encore de déchiffrer précisément les mécanismes d'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes de l'hémolymph mais différentes études ont permis d'en appréhender les mécanismes. Les protéines de rhoptries semblent impliquées comme le prouvent la nécessité de la présence de RON2, RON4 et RON5 (cette étude, Ishino et al., 2019; Nozaki et al., 2020) ainsi que l'observation de la présence de 4 rhoptries ou plus chez les sporozoïtes des oocystes, se réduisant à 2 rhoptries chez les sporozoïtes des glandes salivaires (Ishino et al., 2019; Kudryashev et al., 2010; Nozaki et al., 2020; Schrevel et al., 2008; Tokunaga et al., 2019). Ces différentes observations renforcent l'idée que l'invasion des glandes salivaires implique une sécrétion (au moins partielle) du contenu des rhoptries.

Jusqu'à présent, la seule fonction connue d'AMA1 et des RONS était d'assembler la jonction mobile permettant l'internalisation du zoïte au sein d'une vacuole parasitophore (Lamarque et al., 2011). L'existence d'une jonction lors de l'invasion des glandes salivaires reste à démontrer. Une étude en microscopie électronique de glandes salivaires d'*Aedes aegypti* infectés par *P. gallinaceum* décrit l'entrée des sporozoïtes dans les cellules des glandes salivaires par invagination de la membrane plasmique au niveau d'une zone de jonction entre le parasite et la cellule (Pimenta et al., 1994). Il n'y a cependant aucune preuve structurelle que cette zone de jonction corresponde à une jonction mobile telle que décrite au stade sanguin. Au contraire, il a été décrit chez *P. falciparum* que la pénétration des sporozoïtes se fait via la formation de pores dans la membrane basale des cellules des glandes salivaires (Ando et al., 1999; Meis et al., 1992; Posthuma et al., 1989).

La formation d'une vacuole lors de l'entrée dans les glandes salivaires est également sujet à débat. L'étude sur *P. gallinaceum* décrit la présence autour de certains parasites de vacuoles transitoires aussi bien lors de l'entrée dans les cellules des glandes salivaires que lors de leur sortie pour atteindre les cavités sécrétoires (Pimenta et al., 1994). Tous les parasites n'étant pas observés dans ces vacuoles, l'hypothèse est que le parasite quitterait rapidement la vacuole pour se retrouver dans le cytoplasme de la cellule. Ce mécanisme est à rapprocher des vacuoles transitoires observées lors de la traversée des hépatocytes (Risco-Castillo et al., 2015). D'autres études sur *P. berghei* (Sterling et al., 1973; Wells & Andrew, 2019) ou *P. falciparum*

(Posthuma et al., 1989) décrivent également l'absence de vacuole parasitophore autour des sporozoïtes dans les glandes salivaires. Dans notre étude, nous avons profité de l'acquisition en 3D pour résoudre cette question chez *P. berghei*. Si sur certains plans des parasites semblent entièrement entourés d'une vacuole, l'observation à différentes profondeurs permet de révéler que ces « vacuoles » correspondent en fait à des invaginations de la membrane des cellules entourant en partie des sporozoïtes intracellulaires. Des différentes observations faites, il semblerait que bien que les sporozoïtes interagissent avec la membrane des cellules, ils ne résident pas dans des vacuoles parasitophores au sein des cellules. Ainsi les rôles essentiels d'AMA1, RON2 et RON4 dans l'invasion des glandes salivaires pourrait suggérer une nouvelle fonction inattendue de ces protéines, indépendante de la formation d'une vacuole parasitophore. Nous ne pouvons pas exclure que AMA1 et RONs soient impliquées dans la formation d'une jonction et d'une vacuole transitoire lors de l'entrée dans les glandes salivaires. Lors de la traversée des hépatocytes, les sporozoïtes forment également des vacuoles transitoires. Cependant, ce phénomène n'implique pas la sécrétion des rhoptries, et les parasites déplétés en AMA1 ou RONs ne montrent aucun défaut de traversée cellulaire, ce qui suggère que AMA1 et les RONs ne sont pas impliquées dans la formation des vacuoles transitoires lors de la traversée cellulaire dans le foie.

Chez un autre parasite apicomplexe, *Theileria parva*, les sporozoïtes expriment AMA1 et RON2 (Nyagwange et al., 2018) mais ne forment pas de jonction mobile ni de vacuole parasitophore durant l'invasion des cellules (Shaw, 1997). Les sporozoïtes de *T. parva* pénètrent dans les cellules sans réorientation apicale grâce à un mécanisme indépendant de l'actine appelé « zippering » qui ne nécessite pas de formation de jonction mobile (Shaw, 2003; Shaw et al., 1991). On peut imaginer qu'un processus similaire de zippering intervienne lors de l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes, où le complexe AMA1-RONs servirait non pas à la formation d'une jonction mais à favoriser la juxtaposition des membranes du parasite et de la cellule cible pour initier le processus d'invasion.

La réduction incomplète de l'invasion des glandes salivaires et des hépatocytes interroge sur la possibilité de la présence de ligands alternatifs compensant la perte d'AMA1, RON2 ou RON4. Une telle plasticité a été démontrée chez *Toxoplasma*, où des paralogues d'AMA1 et de RON2 peuvent compenser leur absence (Lamarque et al., 2014; Parker et al., 2016). Il n'existe pas chez *Plasmodium* de paralogue connu de RON2, mais AMA1 possède un paralogue, MAEBL (Membrane Associated Erythrocyte Binding-Like protein), qui n'a jamais été décrit comme acteur de la jonction mobile mais sa similarité de structure avec AMA1 en a

fait un candidat intéressant comme homologue fonctionnel d'AMA1 (Kappe et al., 1998). C'est une protéine chimérique possédant un domaine similaire aux domaines DBL (impliqués dans l'interaction avec les érythrocytes) ainsi qu'un domaine dupliqué en tandem similaire à l'ectodomaine d'AMA1 (Kappe et al., 1998). MAEBL est exprimée chez les mérozoïtes et les sporozoïtes (Ghai et al., 2002). Elle n'est pas essentielle au stade sanguin mais sa délétion entraîne un défaut d'invasion des glandes salivaires et des hépatocytes par les sporozoïtes (Fu et al., 2005; Kariu et al., 2002; Saenz et al., 2008; Yang, Lopaticki, et al., 2017). Des anticorps anti-MAEBL sont détectés dans le sérum de patients infectés et inhibent l'invasion des hépatocytes (Peng et al., 2016). La protéine est présente sous la forme de deux isoformes, une soluble et une transmembranaire, provenant de l'épissage alternatif du gène (Preiser et al., 2004; N. Singh et al., 2004). Il a été montré que l'isoforme transmembranaire est essentielle chez le sporozoïte pour l'invasion des glandes salivaires (Saenz et al., 2008). Nous n'avons cependant pas identifié MAEBL dans des expériences de co-immunoprécipitation du complexe RON chez les sporozoïtes de *P. berghei*. De plus, la réduction majeure de l'invasion des glandes salivaires par les parasites délétés pour AMA1 va à l'encontre d'un rôle compensatoire de MAEBL. Ces protéines pourraient cependant coopérer pour le succès de l'invasion des glandes salivaires ou des hépatocytes par les sporozoïtes.

En conclusion, notre étude montre que le complexe AMA1-RONs joue un rôle majeur chez les sporozoïtes de *P. berghei* lors de l'invasion des glandes salivaires du moustique et des hépatocytes de l'hôte mammifère. Pour la première fois, nous révélons une fonction d'AMA1-RON indépendante de la formation d'une vacuole répliquative. L'importance d'AMA1 au stade sanguin en a fait une cible de choix pour des vaccins ciblant le stade érythrocytaire (Anders et al., 1998; Dutta et al., 2009; Saul et al., 2005; Srinivasan et al., 2017; Stowers et al., 2002) bien que le polymorphisme de ces antigènes freine le succès des essais vaccinaux (Remarque et al., 2008). La démonstration de l'importance d'AMA1 et des RONs chez les sporozoïtes suggère que ces protéines pourraient aussi représenter des cibles potentielles pour des vaccins bloquant la transmission.

III. CLAMP, un nouvel acteur impliqué dans la motilité des sporozoïtes de *P. berghei*

Si CLAMP avait été identifiée par spectrométrie de masse chez les sporozoïtes, son rôle restait inconnu. Notre étude a révélé un nouveau rôle de CLAMP dans la motilité et l'infectiosité des sporozoïtes. En l'absence de CLAMP, les sporozoïtes présentent en effet un défaut majeur de motilité, associé à une réduction drastique de la traversée et de l'invasion cellulaire, aussi bien chez le moustique au niveau des glandes salivaires que chez l'hôte mammifère. Ce rôle dans l'invasion des glandes salivaires et des hépatocytes a déjà été décrit pour d'autres protéines impliquées dans la motilité comme TRAP (Dundas, Shears, Sun, et al., 2018; Ejigiri et al., 2012; Ghosh et al., 2009; Klug et al., 2020; Sultan et al., 1997), TREP/S6/UOS3 (Combe et al., 2009; Steinbuechel & Matuschewski, 2008) ou LIMP (Santos et al., 2017). La motilité du parasite repose sur la présence d'adhésines sécrétées à la surface du parasite et qui se lient au substrat. La translocation de ces adhésines du pôle apical au pôle postérieur grâce au moteur actine/myosine du parasite va fournir au parasite la force nécessaire pour se déplacer.

La topologie prédite de CLAMP décrit 4 domaines transmembranaires reliés notamment par des boucles extracellulaires ainsi qu'un domaine riche en proline (PRD) à son extrémité intracellulaire (Sidik et al., 2016). Cette topologie suggère un positionnement de CLAMP en surface des parasites, avec ses boucles extracellulaires pouvant interagir avec le milieu extérieur. Cette hypothèse semble confirmée par la visualisation de CLAMP au niveau de la jonction mobile lors de l'internalisation de tachyzoïtes de *T. gondii* dans des cellules (Sidik et al., 2016). De plus, une étude chez *Theileria equi* a montré que l'immunisation contre CLAMP produit des anticorps neutralisants (Onzere et al., 2021). Ces anticorps sont comme attendus dirigés contre des peptides situés dans les deux boucles extracellulaires de la protéine. Ces différentes observations suggèrent que CLAMP est bien situé en surface du parasite au moment de l'invasion d'une cellule et est accessible aux anticorps neutralisants. Il serait intéressant d'approfondir l'étude structure-fonction de cette protéine chez *Plasmodium*, pour en identifier précisément les déterminants structurels et fonctionnels, notamment chez les sporozoïtes.

La structure prédite de la protéine se rapproche de la structure des claudines qui sont une famille de protéines conservées impliquées dans la formation des jonctions serrées entre les cellules épithéliales (Krause et al., 2008). Cette similarité de structure pourrait suggérer un rôle de CLAMP chez le sporozoïte dans l'attachement ou l'interaction avec l'environnement qui se révélerait essentiel à son déplacement. Il reste encore à déchiffrer si le défaut de motilité des

parasites en absence de CLAMP est lié à un défaut d'attachement au substrat ou de force nécessaire pour la traction du parasite. L'étude de la sécrétion de protéines micronémales connues comme TRAP ou AMA1 chez les sporozoïtes déplétés pour CLAMP pourrait permettre de vérifier si son absence affecte la sécrétion des micronèmes, ce qui expliquerait la motilité déficiente. Si le phénotype des mutants déficients en CLAMP peut entièrement s'expliquer par un défaut de motilité, y compris chez les mérozoïtes (Yahata et al., 2020), on ne peut cependant pas exclure que CLAMP ait plusieurs fonctions, d'une part dans la motilité, d'autre part dans l'invasion des cellules.

En conclusion, grâce à l'approche DiCre, nous avons révélé le rôle essentiel de CLAMP dans la motilité et l'infectiosité des sporozoïtes de *P. berghei*. De par l'impact de sa délétion sur l'infectiosité du parasite aussi bien chez le moustique que chez le mammifère, CLAMP pourrait représenter une cible vaccinale d'intérêt pour les vaccins bloquant la transmission ou ciblant les phases exo-érythrocytaires et érythrocytaires.

IV. Apport des approches génétiques conditionnelles pour les études fonctionnelles chez les sporozoïtes

Les modifications génétiques se faisant au stade sanguin, la délétion de gènes essentiels à ce stade ou aux stades suivants de développement va affecter la formation des sporozoïtes et limiter leur étude. Le développement des techniques de délétion conditionnelle de gènes a néanmoins permis d'avancer sur l'étude de certaines protéines chez le sporozoïte. Le système DiCre que nous avons mis en place chez *P. berghei* nous a notamment permis d'étudier la fonction d'AMA1, des RONs et de CLAMP chez le sporozoïte, alors qu'une délétion classique au stade sanguin aurait été impossible. Le système DiCre représente donc une méthode robuste pour l'analyse fonctionnelle chez le sporozoïte de protéines essentielles au stade sanguin. Dans nos études, une limitation a été la découverte d'un rôle essentiel de ces protéines dans l'invasion des glandes salivaires du moustique, limitant ainsi le nombre de sporozoïtes récupérés à ce stade. D'autres études ayant fait face à ce problème ont utilisé les sporozoïtes de l'hémolymphe ou de l'estomac pour les tests d'invasion des hépatocytes (Sultan et al., 1997; Yang, Lopaticki, et al., 2017) mais cette méthodologie n'est pas optimale puisque la maturation des sporozoïtes entre l'invasion de l'estomac et la présence dans les glandes salivaires peut impacter

indirectement le phénotype des mutants. Nous avons montré lors de la caractérisation de la lignée PbDiCre la possibilité d'induire l'excision du gène d'intérêt chez le moustique, après l'invasion de l'estomac par les ookinètes (Fernandes et al., 2020 – **Annexe I**). Ainsi le système peut être adapté selon le gène d'intérêt et son rôle à différents stades du cycle de vie du parasite et permettrait de récupérer dans les glandes salivaires un nombre suffisant de sporozoïtes délétés pour des gènes essentiels au stade sanguin, pour la fertilisation des gamètes ou encore chez l'ookinète. Il est cependant à noter une diminution de l'infection des moustiques par des parasites exposés à la rapamycine (inducteur de DiCre), qui en inhibant la voie de signalisation TOR (Target Of Rapamycin) du moustique peut induire une baisse de l'infection et de la survie des moustiques (Feng et al., 2021). Des tests complémentaires sont donc nécessaires pour optimiser la méthodologie, en titrant la rapamycine ou en utilisant des analogues moins toxiques pour le moustique.

V. Hétérogénéité fonctionnelle des micronèmes

Les micronèmes contiennent des protéines impliquées aussi bien dans la motilité du sporozoïte (TRAP, CSP) que pour sa traversée cellulaire (PLP1, SPECT) mais aussi pour l'invasion productive (P36, P52, B9, AMA1) (Loubens et al., 2021). La régulation temporelle de la fonction de ces protéines reste énigmatique mais suggère l'hypothèse de l'existence de sous-populations de micronèmes enrichies en protéines spécifiques d'un processus en particulier.

L'étape d'invasion productive, c'est-à-dire l'entrée des sporozoïtes dans une vacuole parasitophore où ils vont se développer, est précédée d'une phase de traversée cellulaire (Mota et al., 2001). La traversée cellulaire et l'invasion productive sont des phénomènes distincts. Dans les temps précoces des expériences *in vitro*, un sporozoïte intracellulaire peut aussi bien correspondre à un sporozoïte en cours de traversée qu'à un parasite ayant infecté la cellule. Il a été observé chez *P. berghei* et *P. yoelii* la formation de vacuoles transitoires au cours de la traversée de lignées cellulaires (Bindschedler et al., 2021; Risco-Castillo et al., 2015), rendant d'autant plus difficile la distinction entre traversée et invasion productive. La présence d'une vacuole autour du parasite n'est ainsi pas un repère fiable mais la composition de cette vacuole permet en revanche de discriminer quel processus est impliqué. En effet, l'exclusion de protéines de membrane de la cellule hôte est caractéristique de la vacuole parasitophore

(Mordue et al., 1999; Risco-Castillo et al., 2015). Il a également été montré que l'invasion productive est associée à la décharge des rhoptries, contrairement à la formation des vacuoles transitoires (Risco-Castillo et al., 2014, 2015). L'utilisation de parasites et de composés marquant les cellules traversées exhibant des fluorescences différentes permet d'estimer le pourcentage de cellules traversées ou infectées par cytométrie en flux (Mota et al., 2001; Risco-Castillo et al., 2015). Enfin, l'utilisation de lignées permissives et non-permissives est également un bon moyen de distinguer invasion productive et traversée cellulaire, l'invasion productive n'étant observées que dans les lignées cellulaires permissives (Risco-Castillo et al., 2015; Silvie, Greco, et al., 2006).

L'invasion productive des hépatocytes par les sporozoïtes de *P. berghei* et *P. yoelii* débute in vitro avec un délai d'environ 1h après le contact avec les cellules (Manzoni et al., 2017; Risco-Castillo et al., 2015), suggérant un contrôle temporel de l'activation du parasite. En effet in vivo le sporozoïte est injecté dans le derme et doit rejoindre les hépatocytes, la traversée cellulaire lui est donc indispensable dans les premiers temps suivant la sortie du moustique. De plus, la traversée et l'invasion productive reposent sur des facteurs moléculaires différents. La traversée implique notamment l'utilisation de protéines possédant des domaines associés à la déstabilisation des membranes (domaine type-MAC/PF) (Kaiser, Camargo, et al., 2004) comme PLP1 (Ishino, Chinzei, et al., 2004; Risco-Castillo et al., 2015; Tavares et al., 2013; Yang, O'Neill, et al., 2017), SPECT-1 (Ishino, Yano, et al., 2004; Yang, O'Neill, et al., 2017), CelTOS (Jimah et al., 2016; Kariu et al., 2006), GEST (Talman et al., 2011) ou la phospholipase (PL) (Bhanot et al., 2005). L'invasion productive des hépatocytes repose quant à elle sur d'autres facteurs, notamment certaines protéines de la famille des protéines à 6-cystéines comme P36 (Annoura et al., 2012; Labaied et al., 2007; Ploemen et al., 2012; VanBuskirk et al., 2009), P52 (Ishino et al., 2005; van Dijk et al., 2005; van Schaijk et al., 2008) et B9 dont nous avons démontré le rôle dans une étude présentée dans cette thèse. Un lien fonctionnel a été montré entre P36 et des récepteurs de l'hépatocyte (CD81 et SR-B1), l'interaction directe ou indirecte entre ces facteurs déclenchant la décharge des rhoptries (Risco-Castillo et al., 2014) et le début de l'invasion productive. Si la formation d'une jonction mobile à proprement parler n'a jamais été observée dans les hépatocytes, nous montrons ici l'importance des composants de la jonction mobile (AMA1 / RONs) dans l'invasion productive des hépatocytes. La délétion des gènes codant pour AMA1, RON2 ou RON4 ou l'inhibition de l'interaction AMA1-RON2 chez le sporozoïte réduit son infectiosité dans les hépatocytes (Giovannini et al., 2011; Ishino et al.,

2019; Silvie et al., 2004; Yang, Lopaticki, et al., 2017), suggérant un rôle important dans l'invasion productive, qui interviendrait après le contact initial via P36.

Il est intéressant de noter que des parasites déficients en protéines impliquées dans la traversée cellulaire présentent des défauts de migration du parasite dans la peau et au niveau de la barrière sinusoïdale du foie, réduisant leur infectiosité *in vivo*. En revanche ces parasites conservent une capacité normale à infecter les hépatocytes *in vitro*, suggérant que le rôle de la traversée cellulaire est de permettre au parasite de franchir les barrières cellulaires durant son voyage de la peau aux hépatocytes, sans être requis pour l'invasion productive (Ishino, Chinzei, et al., 2004; Ishino, Yano, et al., 2004; Kariu et al., 2006; Risco-Castillo et al., 2015; Steel et al., 2018; Yang, O'Neill, et al., 2017). De la même façon, des parasites déficients pour l'invasion productive ou dans des cellules non-permissives à l'infection gardent la capacité à traverser les cellules (Arredondo et al., 2018; Ishino et al., 2005; Labaied et al., 2007; Manzoni et al., 2017; van Schaijk et al., 2008), ce que nous avons également observé avec des parasites délétés pour B9, AMA1, RON2 ou RON4.

Bien qu'utilisant des facteurs différents, la traversée cellulaire et l'invasion productive reposent sur la motilité du parasite qui lui assure la force nécessaire à se tracter activement dans les cellules. Ainsi, la délétion de protéines impliquées dans la motilité impacte l'infectiosité du parasite comme cela a été montré avec TRAP s (Dundas, Shears, Sinnis, et al., 2018; Ejigiri et al., 2012; Ghosh et al., 2009; Klug et al., 2020; Sultan et al., 1997), TREP (Combe et al., 2009; Steinbuechel & Matuschewski, 2008), LIMP (Santos et al., 2017) ou encore CLAMP dans cette thèse.

L'hétérogénéité fonctionnelle des protéines de micronèmes chez les sporozoïtes suggère une compartimentation spatio-temporelle de ces protéines (**Figure 29**). La sécrétion de micronèmes spécifiques de la migration permettrait le relargage de protéines impliquées dans la traversée cellulaire lors de la traversée des cellules du derme et des hépatocytes (**Figure 29 – rond rouge**). Après activation du sporozoïte au niveau des hépatocytes, ce dernier sécréterait des micronèmes spécifiques de l'invasion permettant le relargage de protéines impliquées dans l'invasion productive (**Figure 29 – ronds verts**). L'interaction directe ou indirecte de P36 avec CD81 ou SR-B1 déclencherait la décharge des rhoptries (Risco-Castillo et al., 2014) conduisant à la formation de la jonction mobile via l'interaction AMA1-RONs. Les protéines impliquées dans la motilité (comme TRAP) seraient présentes dans les différentes sous-populations de micronèmes puisque la motilité du parasite lui est essentielle à la fois pour la traversée cellulaire et pour l'invasion (Lebrun et al., 2020).

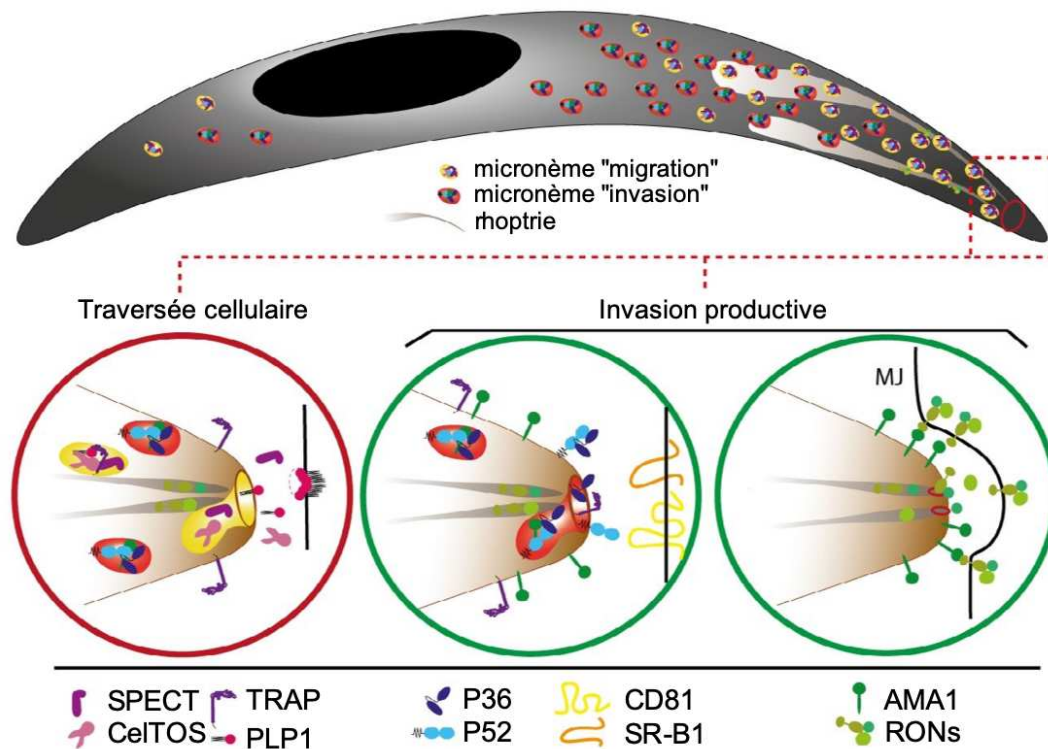


Figure 29 : Modèle hypothétique de la sécrétion de sous-populations distinctes de micronèmes lors de la traversée ou l'invasion productive de cellules par les sporozoïtes de *Plasmodium*. MJ : jonction mobile. (adapté de Loubens et al., 2021)

Cette hypothèse repose en partie sur la description de sous-populations distinctes de micronèmes chez les tachyzoïtes de *Toxoplasma* et les mérozoïtes de *Plasmodium*. En effet une analyse en microscopie à haute résolution a révélé deux sous-populations distinctes de micronèmes dans les tachyzoïtes de *Toxoplasma* dont les protéines sont acheminées par des voies différentes (Kremer et al., 2013). Plusieurs études ont confirmé l'existence de voies indépendantes d'acheminement de différentes protéines micronémales, suggérant l'existence de sous-populations de micronèmes auxquelles elles seraient adressées (Matthiesen et al., 2001; Morlon-Guyot et al., 2018; Venugopal et al., 2017). Les différences de localisation et de trafic de protéines micronémales décrites chez les mérozoïtes de *Plasmodium* vont également dans le sens de cette hypothèse (Ebrahimzadeh et al., 2019; S. Singh et al., 2007). La délétion de protéines impliquées dans l'exocytose des micronèmes chez *Toxoplasma* a de plus révélé qu'elles ne gouvernent pas l'exocytose des mêmes micronèmes, la délétion d'une protéine inhibant le relargage des protéines impliquées dans l'invasion mais pas de celles impliquées dans la motilité ou la traversée cellulaire (Lentini et al., 2019).

Une étude récente s'est intéressée à la distribution de P36, P52 et TRAP dans les micronèmes de sporozoïtes de *P. yoelii* grâce à des doubles immunomarquages observés en microscopie électronique (Arredondo et al., 2018). Elle révèle effectivement une certaine hétérogénéité des micronèmes puisqu'environ 20% d'entre eux ne présentent pas de marquage tandis que les autres présentent des marquages révélant la présence des protéines seules ou à deux (P36/P52, P36/TRAP et P52/TRAP). La distribution de ces protéines n'est donc pas homogène dans les micronèmes. L'étude manque malheureusement d'une co-analyse de la localisation de protéines impliquées dans la traversée comme PLP1 ou SPECT. Notre observation en microscopie à super résolution de la distribution de B9 et AMA1 va dans le sens d'une hétérogénéité des micronèmes puisque les deux protéines présentent le même type de marquage typique des micronèmes mais ne colocalisent pas.

Le parcours du sporozoïte de la peau au foie nécessite certainement plusieurs étapes de sécrétion des micronèmes qui pourraient être liées à des vagues de calcium relâchées par différents organites de stockage du parasite en réponse à des stimuli extérieurs activant les voies de signalisation du parasite. Ce mécanisme de compartimentation temporelle et spatiale des protéines de micronèmes pourrait permettre au parasite d'échapper au système immunitaire de l'hôte en évitant l'exposition prématurée de ses facteurs clés. Les stimuli et cascades de signalisation contribuant à la sécrétion différentielle des sous-populations de micronèmes restent cependant encore à déterminer.

VI. Conclusion

En conclusion, ce travail de thèse a contribué à l'analyse fonctionnelle de protéines des sporozoïtes de *Plasmodium*. Nous avons pu montrer que la protéine à domaine 6-cystéines B9 est essentielle à l'invasion productive des hépatocytes. Elle est sécrétée après activation des parasites et pourrait agir en complexe avec le tandem P36/P52 dans les étapes initiales d'interaction avec la cellule cible. Nous avons également revisité le rôle d'AMA1 et des RONS chez le sporozoïte, démontrant leur rôle non seulement dans l'invasion des hépatocytes chez l'hôte mammifère mais aussi dans la colonisation des glandes salivaires du moustique, indépendamment de la formation d'une vacuole parasitophore. Enfin, nous avons exploré le rôle de la protéine CLAMP, essentielle à la motilité et à l'infectiosité des sporozoïtes.

La caractérisation des facteurs moléculaires à la fois du parasite et de l'hôte est essentielle à la compréhension des mécanismes d'invasion par les sporozoïtes de *Plasmodium*. Ce travail de thèse a participé à la caractérisation de facteurs parasitaires essentiels à l'invasion, qui pourraient constituer des cibles d'intérêt pour des stratégies visant à empêcher l'étape initiale d'infection du foie au cours du paludisme.

ANNEXES

ANNEXE I

Article de recherche – PLoS ONE

The dimerisable Cre recombinase allows conditional genome editing in the mosquito stages of *Plasmodium berghei*

RESEARCH ARTICLE

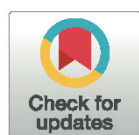
The dimerisable Cre recombinase allows conditional genome editing in the mosquito stages of *Plasmodium berghei*

Priyanka Fernandes¹✉, Sylvie Briquet¹✉, Delphine Patarot¹, Manon Loubens¹, Bénédicte Hoareau-Coudert², Olivier Silvie¹*

1 Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, INSERM, CNRS, CIMI-Paris, Sorbonne Université, Paris, France, **2** UMS PASS, Plateforme de Cytométrie de la Pitié-Salpêtrière (CyPS), Sorbonne Université, Paris, France

✉ These authors contributed equally to this work.

* olivier.silvie@inserm.fr



OPEN ACCESS

Citation: Fernandes P, Briquet S, Patarot D, Loubens M, Hoareau-Coudert B, Silvie O (2020) The dimerisable Cre recombinase allows conditional genome editing in the mosquito stages of *Plasmodium berghei*. PLoS ONE 15(10): e0236616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236616>

Editor: Tobias Spielmann, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, GERMANY

Received: July 10, 2020

Accepted: October 1, 2020

Published: October 12, 2020

Copyright: © 2020 Fernandes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: OS received funding from the Laboratoire d'Excellence ParaFrap (ANR-11-LABX-0024), and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE15-0004 and ANR-16-CE15-0010). ML was supported by a 'DIM1Health' doctoral fellowship awarded by the Conseil Régional d'Ile-de-France. The funders had no role in study design, data

Abstract

Asexual blood stages of the malaria parasite are readily amenable to genetic modification via homologous recombination, allowing functional studies of parasite genes that are not essential in this part of the life cycle. However, conventional reverse genetics cannot be applied for the functional analysis of genes that are essential during asexual blood-stage replication. Various strategies have been developed for conditional mutagenesis of *Plasmodium*, including recombinase-based gene deletion, regulatable promoters, and mRNA or protein destabilization systems. Among these, the dimerisable Cre (DiCre) recombinase system has emerged as a powerful approach for conditional gene deletion in *P. falciparum*. In this system, the bacteriophage Cre is expressed in the form of two separate, enzymatically inactive polypeptides, each fused to a different rapamycin-binding protein. Rapamycin-induced heterodimerization of the two components restores recombinase activity. We have implemented the DiCre system in the rodent malaria parasite *P. berghei*, and show that rapamycin-induced excision of floxed DNA sequences can be achieved with very high efficiency in both mammalian and mosquito parasite stages. This tool can be used to investigate the function of essential genes not only in asexual blood stages, but also in other parts of the malaria parasite life cycle.

Introduction

The life cycle of *Plasmodium* parasites is complex, and involves several stages of development and differentiation within the vertebrate host and *Anopheles* vector. In mammals, infection begins when motile forms of the parasite known as sporozoites are transmitted by infected *Anopheles* mosquitoes to the host. These sporozoites first go through an obligatory intra-hepatic step, where they multiply into thousands of merozoites that are released into the blood stream, where they begin the next round of replication within erythrocytes. Some merozoites develop into gametocytes which fuse to form a motile ookinete in the gut of the mosquito.

collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

These ookinetes encyst on the basal side of the midgut wall, where they further differentiate into sporozoites that invade the salivary glands, and are transmitted by the mosquito during the next blood-meal [1].

Experimental genetics have been instrumental in deciphering key aspects of the parasite biology. However, a thorough understanding of the genes that are critical for several stages of development, is lacking. The *Plasmodium* genome is haploid during the intra-erythrocytic stage of development and is thus easily amenable to genetic modification via homologous recombination. Hence most gene modification systems are adapted to targeting genes at the blood-stage of the parasite life cycle. However, as conventional reverse genetic strategies cannot be used to target genes that are essential for blood-stage replication, the functional analysis of these genes in other stages of development remains largely unexplored.

Various strategies have previously been developed for conditional mutagenesis in *Plasmodium*, including recombinase-based gene deletion [2], regulatable promoters [3], promoter swap strategies with known [4–7] or synthetic promoters [8], and mRNA or protein destabilization systems [9–12]. While most of these strategies are stage-specific, others require a promoter that is expressed by distinct stages of the parasite, thus limiting the investigation of essential genes in multiple developmental stages. In recent years, the dimerisable Cre (DiCre) recombinase system has emerged as an efficient system for conditional gene knockout in *P. falciparum* and other apicomplexans [2, 13]. It consists of the expression of the bacteriophage Cre in the form of two separate, enzymatically inactive polypeptides, each fused to a different rapamycin-binding protein (either FKBP12 or FRB) that heterodimerise after the addition of rapamycin [14]. Heterodimerisation of the two components in turn restores recombinase activity, leading to site-specific excision of Lox-flanked DNA sequences and rapid and efficient rapamycin-induced gene deletion [2, 13].

DiCre-expressing parasite lines have previously been generated in both *P. falciparum* [2, 15] and *P. berghei* [16] and used to investigate the function of genes in asexual or sexual blood stages of development. The introduction of lox sites inside artificial silent introns (LoxPint) further improved the methodology by permitting the floxing of genomic regions without affecting protein expression [17]. A more recent study developed a DiCre-expressing *P. falciparum* parasite line in an attempt to investigate the function of AMA1 in mosquito stages [18]. Here, using a similar approach, we investigated whether the DiCre system can be used for conditional gene manipulation in the insect stages of the rodent parasite *P. berghei*. We generated a *P. berghei* parasite line that stably expresses both components of the DiCre cassette, along with a fluorescent marker to facilitate the phenotyping of excised and non-excised parasites in all developmental stages. After validating that the resulting parasite line showed no phenotypic defect as compared to the parental strain, we show that a single rapamycin dose administered to mice is sufficient to induce efficient excision of a floxed target DNA sequence *in vivo* in mice, including in transmission stages. In addition, we adapted the rapamycin treatment to mosquitoes, and show that Cre-mediated excision can be used to delete genes in mosquito stages, thus demonstrating the versatility and robustness of the DiCre system for conditional genome editing across the parasite life cycle.

Materials and methods

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. Protocols were approved by the Ethical Committee Charles Darwin N°005 (approval #7475–2016110315516522).

Generation of plasmids for transfection

DiCre plasmid. The DiCre plasmid was designed to replace the GFP cassette previously introduced in the *p230p* locus of *P. berghei* ANKA parasites [19] by mCherry, DiCre and *T. gondii* dihydrofolate reductase/thymidylate synthase (TgDHFR/TS) cassettes. The DiCre plasmid was generated by assembling five DNA fragments: a mCherry cassette flanked by a 800-kb 3' fragment of *P. berghei* HSP70 promoter and PbDHFR 3'UTR (DC1); a Cre59 coding sequence followed by PfcAM 3'UTR (DC2); a bidirectional eEF1 α promoter (DC3); a Cre60 coding sequence followed by the 3' UTR of PbHSP70 (DC4); and a sequence corresponding to the 3' UTR of PbDHFR (DC5). All elements of the DiCre plasmid were amplified by PCR using standard PCR conditions (using the CloneAmp HiFi PCR premix) and sequentially ligated (In-Fusion HD Cloning Kit, Clontech) into an acceptor plasmid containing a TgDHFR/TS cassette flanked by two LoxP sites. The DC2 and DC4 fragments were amplified using genomic DNA from DiCre-expressing *P. falciparum* parasites (kind gift of Kai Wengelnik and Mike Blackman). The resulting plasmid sequence was verified by Sanger sequencing (Eurofins Genomics) and linearized with *ScaI* and *DraIII* before transfection. The DC1 and DC5 fragments served as homology regions for double homologous recombination between the HSP70 promoter the PbDHFR 3' UTR sequences flanking GFP at the modified *p230p* locus of PbGFP parasites. All primers used to construct the DiCre plasmid are listed in S1 Table in [S1 File](#).

PbDCIII plasmid. The PbDCIII plasmid was designed to replace the mCherry cassette of the DiCre parental line with a cassette containing two fluorescent markers, GFP and ECFP, separated by a silent intron taken from the *P. berghei* *slarp* gene (PBANKA_0902100) [20] and containing an inserted LoxN site [17]. To permit the selection of transfected parasites, we also included a human dihydrofolate reductase marker (hDHFR) downstream of the GFP cassette, followed by the 3' UTR of *P. berghei* calmodulin (CAM) gene. A 2A skip peptide was introduced between GFP and hDHFR to enable transcription of both cassettes under the control of a single HSP70 promoter. In this construct, the GFP-2A-hDHFR-PbCAM cassette was flanked by two silent introns containing LoxN sites. The LoxN-GFP-2A-hDHFR and LoxN-ECFP fragments were ordered as synthetic genes (Eurofins Genomics). All elements of the PbDCIII plasmid were amplified by PCR using standard PCR conditions (using the CloneAmp HiFi PCR premix) and sequentially ligated into the *SphI*-*SalI* restriction sites of a pUC18 vector (In-Fusion HD Cloning Kit, Clontech). The resulting plasmid sequence was verified by Sanger sequencing (Eurofins Genomics) and linearized with *NarI* before transfection. All primers used to construct the GFP-ECFP plasmid are listed in S1 Table in [S1 File](#).

Experimental animals, parasites and cell lines

Female SWISS mice (6–8 weeks old, from Janvier Labs) were used for all routine parasite infections. Parasite lines were maintained in mice through intraperitoneal injections of frozen parasite stocks and transmitted to *Anopheles stephensi* mosquitoes for experimental purposes. *P. berghei* sporozoites were isolated from infected female *Anopheles* mosquitoes and intravenously injected into C57BL/6J mice (female, 4–6 weeks old, Janvier Labs). A drop of blood from the tail was collected in 1ml PBS daily and used to monitor the parasitaemia by flow cytometry.

For parasite transfection, schizonts purified from an overnight culture of PbGFP or PbDiCre parasites were transfected with 5–10 μ g of linearized plasmid by electroporation using the AMAXA Nucleofector device (program U033), as previously described [21], and immediately injected intravenously into the tail vein of SWISS mice. To permit the selection of resistant transgenic parasites, pyrimethamine (35 mg/L) was added to the drinking water and

administered to mice, one day after transfection. The parasitaemia was monitored daily by flow cytometry and the mice sacrificed at a parasitaemia of 2–3%. The mice were bled and the infected blood collected for preparation of frozen stocks and isolation of parasites for genomic DNA extraction.

Pure transgenic parasite populations were isolated by flow cytometry-assisted sorting of mCherry or GFP-expressing blood stage parasites on a FACSAria II (Becton-Dickinson), as described [19]. Mice were injected intraperitoneally with frozen parasite stocks and monitored until the parasitaemia was between 0.1 and 1%. On the day of sorting, one drop of blood from the tail was collected in 1 ml PBS and used for sorting of 100 pRBCs which were recovered in 200 μ l RPMI +20% foetal calf serum (FCS), and then injected intravenously into two mice (100 μ l each). The mice were sacrificed at a parasitaemia of 2–3% and the blood recovered for preparation of frozen stocks and genotyping.

Anopheles stephensi mosquitoes were reared at 24–26°C with 80% humidity and permitted to feed on infected mice that were anaesthetised, using standard methods of mosquito infection as previously described [22]. Post-feeding, *P. berghei*-infected mosquitoes were kept at 21°C and fed on a 10% sucrose solution. Salivary gland sporozoites were collected between 21 and 28 days post-feeding from infected mosquitoes, by hand dissection and homogenisation of isolated salivary glands in complete DMEM (DMEM supplemented with 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% L-Glutamine). Mosquitoes infected with GFP-expressing parasites were sorted under a fluorescence microscope prior to dissection.

HepG2 cells (ATCC HB-8065) were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% L-Glutamine as previously described [23].

Rapamycin treatment

DiCre recombinase mediated excision of targeted DNA sequences *in vivo* was achieved by administration of 200 μ g Rapamycin (1mg/ml stock, Rapamune, Pfizer) to mice by oral gavage, 24 hours prior to transmission to mosquitoes. In order to achieve excision in the mosquito stages, 10 μ g rapamycin (1 mg/ml stock solution in DMSO, Sigma-Aldrich) was added to 10 ml 10% sucrose solution and used to feed mosquitoes. The rapamycin dose was refreshed every alternate day along with the sucrose solution.

Genotyping PCR

Infected mice were sacrificed at a parasitaemia of 2–3% and the infected blood collected and passed through a CF11 column (Whatman) to deplete leucocytes. The RBCs collected were then centrifuged and lysed with 0.2% saponin (Sigma) to recover parasite material for genomic DNA isolation using a kit (Qiagen DNA Easy Blood and Tissue Kit), according to the manufacturer's instructions. Specific PCR primers were designed to check for wild-type and recombined loci and are listed in S2 Table in [S1 File](#). All PCR reactions were carried out using Recombinant Taq DNA Polymerase (5U/ μ l from Thermo Scientific) and standard PCR cycling conditions.

In vitro infections, immunofluorescence assays and microscopy

Infection of hepatocytes. HepG2 cells were seeded in collagen-coated culture plates, at a density of 30,000 cells/well in a 96-well plate for flow cytometry analysis or 100,000 cells/well in 8 well μ -slide (IBIDI) for immunofluorescence assays, 24 hours prior to infection with sporozoites. On the day of infection, the culture medium in the wells was refreshed with complete DMEM, followed by the addition of 10,000 sporozoites and incubation for 3 hours at 37°C. After 3 hours, the wells were washed twice with complete DMEM and then incubated for another 24–48 hours at 37°C and 5% CO₂.

For quantification of EEF numbers, the cells were trypsinized after two washes with PBS, followed by addition of complete DMEM and one round of centrifugation. After discarding the supernatant, the cells were either directly re-suspended in FACS buffer (PBS + 3% FCS) for flow cytometry, or fixed with 2% PFA for 10 minutes, subsequently washed once with PBS and then re-suspended in PBS. Cells were then analyzed on a Guava EasyCyte 6/2L bench cytometer equipped with 488 nm and 532 nm lasers (Millipore).

Immunofluorescence assays. For immunofluorescence assays, the cells were washed twice with PBS, then fixed with 4% PFA for 10 minutes followed by two washes with PBS, quenching with glycine 0,1 M for 5 minutes, permeabilization with 1% Triton X-100 for 5 minutes before washes with PBS and blocking in PBS with 3% bovine serum albumin (BSA). Cells were then incubated for 1h with goat anti-UIS4 primary antibody (1:500, Sicgen), followed by donkey anti-goat Alexa Fluor 594 or Alexa Fluor 488 secondary antibody (1:1000, Life Technologies).

Fluorescence microscopy. Live samples such as blood-stages, midguts and salivary glands from infected mosquitoes, were mounted in PBS and visualised live using a fluorescence microscope (Zeiss Axio Observer.Z1 fluorescence microscope equipped with a LD Plan-Neofluar 403/0.6 Corr Ph2 M27 objective). Due to spectral overlap between GFP and CFP channels, we set the exposure time according to the positive control and maintained the same exposure for both excised and non-excised parasites, in order to allow comparisons. All images were processed with ImageJ for adjustment of contrast.

Results

Generation of a DiCre-expressing *P. berghei* line

We first generated a parasite line that stably and constitutively expresses both components of the Cre enzyme. We assembled a construct encoding the N-terminal Cre 59 (residues Thr19-Asn59) and C-terminal Cre 60 (Asn60-Asp343) portions of the Cre fused at their N-terminus to FKBP12 and FRB, respectively (Fig 1A). The two components were placed under control of the constitutive bidirectional promoter eEF1alpha, and followed by the 3' untranslated region (UTR) from PfCAM and PbHSP70, respectively. In addition, the construct contained a mCherry cassette under the control of an inactive truncated fragment of HSP70 promoter, and a TgDHFR/TS pyrimethamine resistance cassette. The TgDHFR/TS cassette was flanked by two LoxP sites, to allow Cre-mediated excision and production of drug selectable marker-free parasites (Fig 1A). A sequence corresponding to the 3' UTR of PbDHFR was included at the end of the construct, for homologous recombination at the modified *p230p* locus of GFP-expressing *P. berghei* ANKA parasites (PbGFP) [19] (Fig 1A).

Following transfection of PbGFP parasites, integration of the construct by double homologous recombination resulted in the replacement of GFP by mCherry and reconstitution of a functional HSP70 promoter to drive mCherry expression, along with insertion of the DiCre and TgDHFR/TS cassettes. Transfected parasites were selected with pyrimethamine and mCherry-positive parasites were sorted by FACS. The resulting parasite population was exposed to a single dose of rapamycin that was administered orally to mice. This treatment resulted in excision of the TgDHFR/TS cassette, as demonstrated by PCR genotyping (Fig 1B), and retention of a single LoxP site. Cloning by limiting dilution resulted in the final selectable-marker free mCherry-expressing PbDiCre parasite line.

PbDiCre parasites progress normally across the parasite life cycle

To exclude any interference of the DiCre cassette with parasite life cycle progression, we examined if these parasites could be transmitted to mosquitoes and back to mice. PbDiCre parasites

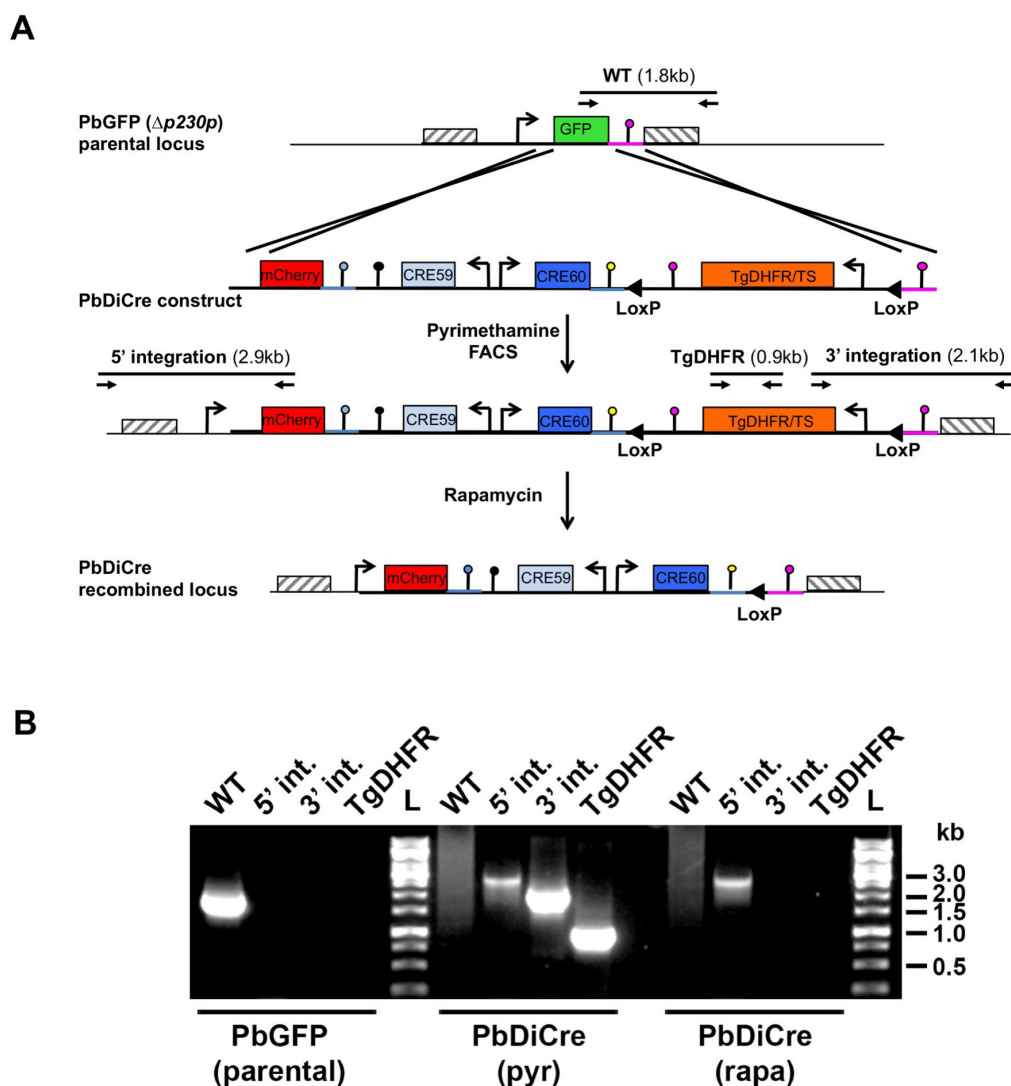


Fig 1. Generation of DiCre-expressing *P. berghei* parasites. A. Replacement strategy to modify the PbGFP locus for DiCre expression. The DiCre plasmid, containing the two Cre components in addition to a mCherry cassette and a TgDHFR/TS pyrimethamine resistance cassette, was integrated into a pre-modified P230p locus in *P. berghei*, where the P230p gene was previously replaced by a GFP cassette [19]. Following parasite transfection and selection with pyrimethamine, mCherry+ parasites were sorted by flow cytometry to exclude any residual GFP+ population. Genotyping primers and expected PCR fragments are indicated by arrows and lines, respectively. B. PCR analysis of genomic DNA isolated from parental PbGFP, pyrimethamine-selected (pyr) and rapamycin-treated (rapa) PbDiCre parasites. Confirmation of the predicted recombination events was achieved with primer combinations specific for WT, 5' or 3' integration. The TgDHFR primer combination was used to confirm the loss of the TgDHFR/TS cassette following rapamycin treatment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236616.g001>

formed oocysts in the midgut of infected mosquitoes and developed into sporozoites that colonized the insect salivary glands (Fig 2A). Similar numbers of salivary gland sporozoites were recovered from mosquitoes infected with PbDiCre and parental PbGFP parasites (Fig 2B), confirming that PbDiCre parasites develop normally in the mosquito. In addition, when incubated with a monolayer of HepG2 cells, PbDiCre sporozoites formed similar numbers of exo-

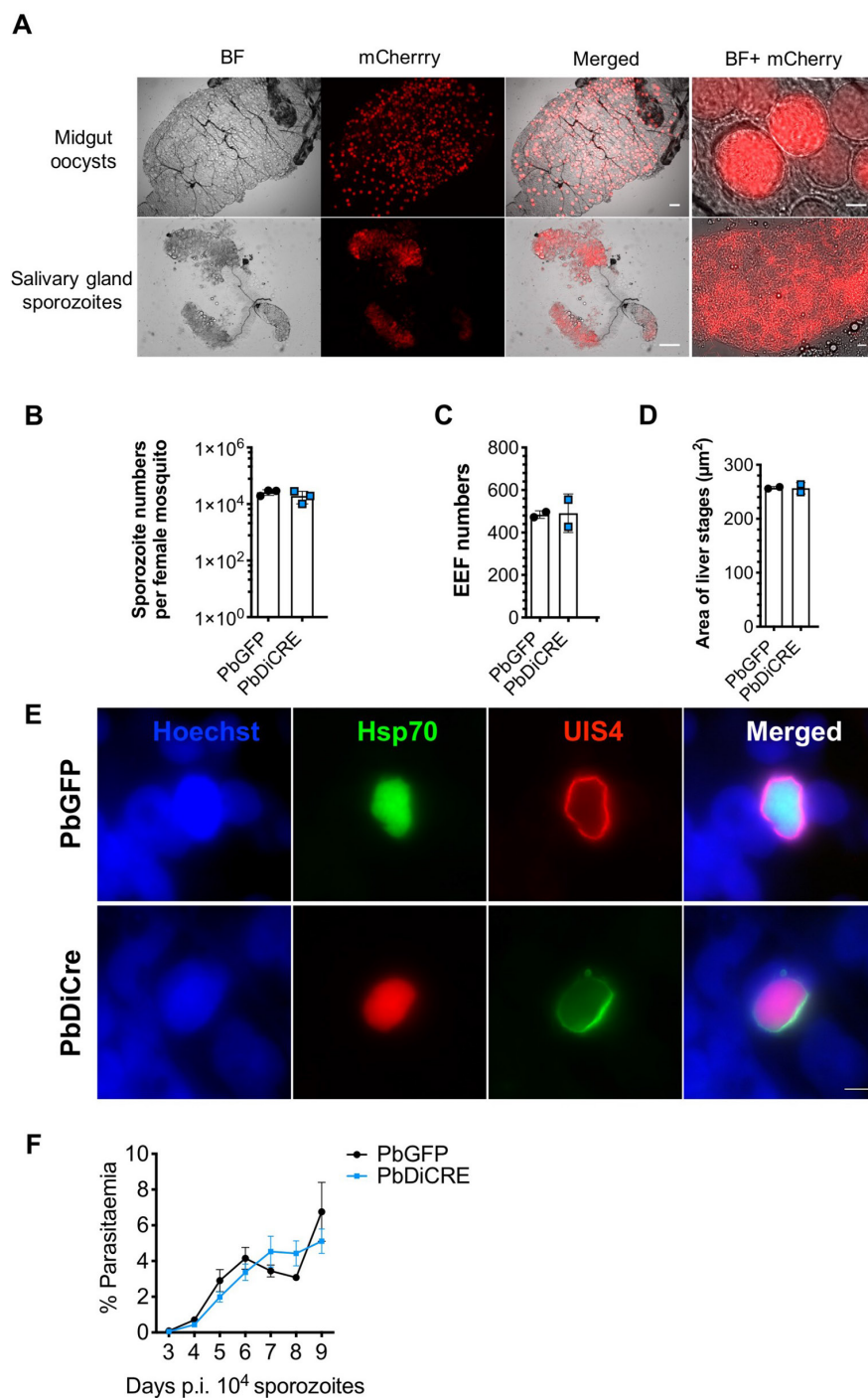


Fig 2. PbDiCre parasites show no defect in mosquito and liver stages. A. Fluorescence microscopy imaging of unfixed midgut oocysts and salivary glands from PbDiCre-infected mosquitoes. Scale bar, 100 µm for the midguts and salivary glands, and 10 µm for the magnified images. B. Comparison of sporozoite numbers isolated from salivary glands of female mosquitoes infected with PbGFP or PbDiCre parasites. Data shown are mean ± SD of three independent experiments. C. Quantification of EEFs in HepG2 cell cultures infected with PbGFP or PbDiCre

sporozoites. Data shown are mean \pm SD of two independent experiments. **D.** Quantification of EEF size (area) in HepG2 cell cultures infected with PbGFP or PbDiCre sporozoites. Data shown are mean \pm SD of two independent experiments. **E.** Images of PbGFP and PbDiCre EEFs in HepG2 infected cell cultures, 48 hours post-infection. Scale bar, 10 μ m. **F.** Comparison of parasite development *in vivo* post-sporozoite injection. C57BL/6J mice ($n = 5$) were injected intravenously with 1×10^4 PbGFP or PbDiCre sporozoites. Parasitemia was then followed daily by FACS. The data shown are mean \pm SEM of 5 mice per group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236616.g002>

erythrocytic forms (EEFs) as PbGFP parasites (Fig 2C). Liver stage development of PbDiCre parasites was comparable to PbGFP, as evidenced by EEF size (Fig 2D) and formation of a UIS4-labeled PVM (Fig 2E). Finally, we injected PbDiCre and PbGFP sporozoites into C57BL/6J mice and observed no difference in either pre-patency or blood-stage parasitaemia between PbGFP- and PbDiCre-infected mice (Fig 2F), showing that PbDiCre parasites are capable of completing the parasite life cycle, similarly to the parental PbGFP parasites.

In summary, these results confirmed that parasites constitutively expressing the DiCre cassette progress normally through the parasite life cycle, and can thus be used as a parental strain to target genes of interest.

Exposure to rapamycin during the mammalian blood stages allows efficient recovery of recombined mosquito stages

In order to assess the efficacy and robustness of the DiCre system to target genes of interest during parasite transmission to the mosquito, we designed a reporter construct that allows a simple assessment of site-specific rapamycin-induced DNA excision, using fluorescent markers. The designed construct replaced the endogenous mCherry cassette in PbDiCre parasites with a gene sequence comprised of GFP-2A-hDHFR-PbCAMutr flanked by LoxN sites, and placed under the inactive truncated fragment of HSP70 promoter (Fig 3A). We selected LoxN sites which are not compatible with LoxP sites, in order to avoid recombination with the single LoxP site, retained after excision of the TgDHFR/TS cassette in the PbDiCre parasite line. An additional eCFP cassette lacking a promoter was inserted downstream of the second LoxN site (Fig 3A) thereby permitting selective expression of GFP or CFP before or after rapamycin-induced excision, respectively. Proper integration of the construct was confirmed by genotyping PCR (Fig 3B), resulting in a PbDCIII parasite line that provided us with a suitable tool to visually monitor rapamycin-induced excision in all developmental stages of the parasite.

In order to verify that exposure of blood-stages to rapamycin results in efficient gene excision, we infected mice with PbDCIII parasitised red blood cells (pRBCs) and treated them with one dose of rapamycin. Untreated mice were used as controls. At 48h post-treatment, direct examination by fluorescence microscopy confirmed the presence of CFP-positive (CFP+) parasites in the blood of rapamycin-treated mice (Fig 4A), while only GFP-positive (GFP+) parasites were observed in untreated mice, suggesting that gene excision in blood-stages was very efficient after rapamycin treatment. Although genotyping PCR confirmed complete excision in rapamycin-treated PbDCIII parasites, excision bands could also be amplified by PCR in untreated PbDCIII parasites (Fig 4B), suggesting some level of activity of the Cre in the absence of rapamycin.

In the next step, we evaluated if DNA excision could also be induced in sexually committed parasites/gametocytes. After verifying the presence of exflagellating gametocytes in the blood by microscopy, mice infected with PbDCIII parasites were administered rapamycin and then transmitted to mosquitoes, 24 hours post-treatment (Fig 5A). Since gametocyte development takes around 24 hours in *P. berghei*, we reasoned that under these conditions all transmitted gametocytes would have undergone excision of the floxed DNA, based on a

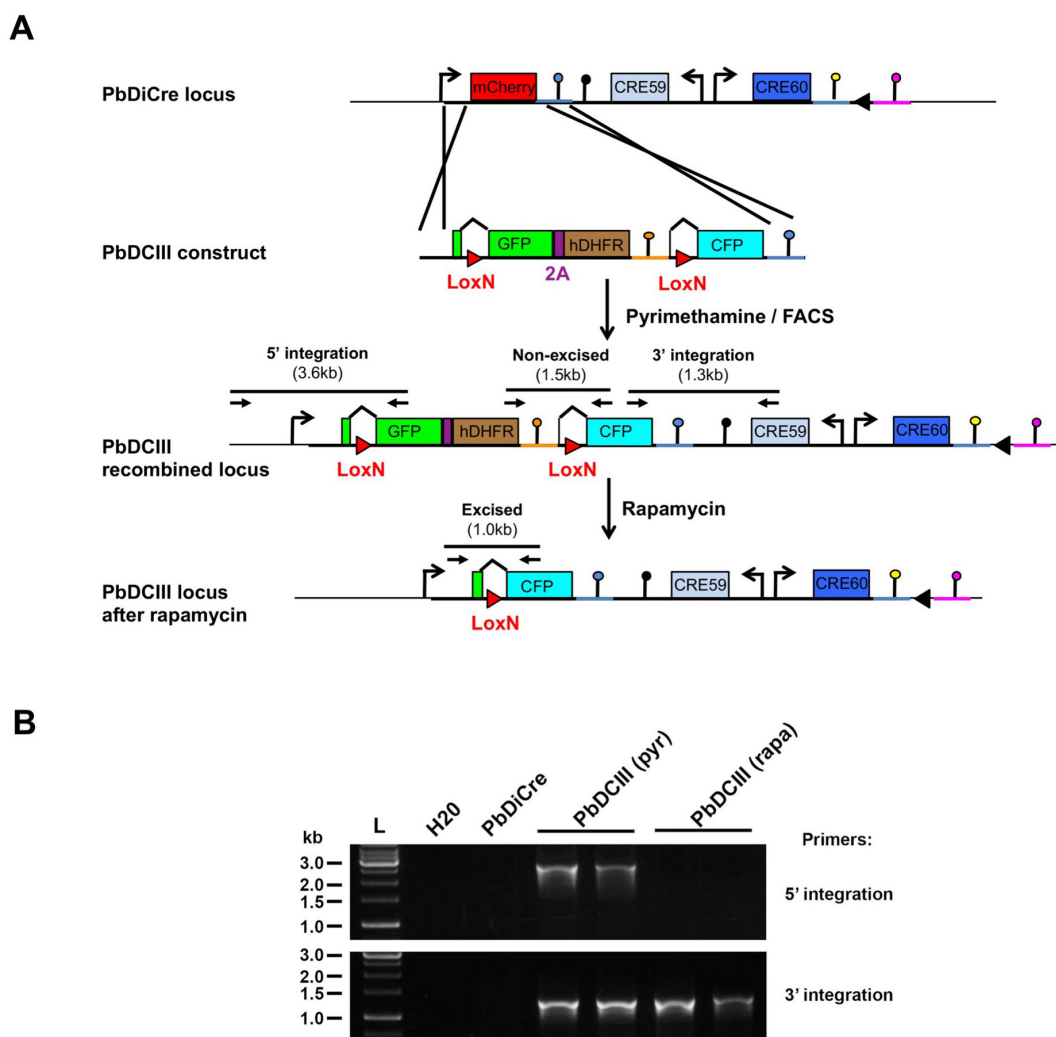


Fig 3. Generation of a PbDCIII reporter line to monitor Cre activity. A. Replacement strategy to modify the mCherry locus in PbDiCre parasites and generate the PbDCIII parasite line. The DCIII construct contains a GFP-hDHFR cassette flanked by LoxN sites, and followed by a CFP cassette. Integration of the construct results in GFP expression instead of mCherry. Following rapamycin treatment, Cre-mediated recombination results in excision of the GFP cassette and expression of CFP. Genotyping primers and expected PCR fragments are indicated by arrows and lines, respectively. B. PCR analysis of genomic DNA isolated from parental PbDiCre, pyrimethamine-selected (pyr) and rapamycin-treated (rapa) PbDCIII parasites. Confirmation of the predicted recombination events was achieved with primer combinations specific for 5' and 3' integration.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236616.g003>

previous study which established that complete DiCre-mediated recombination can be achieved in less than 24 hours in *P. berghei* after rapamycin exposure [16]. Following transmission, infection and development of both treated and untreated parasites in the mosquito was monitored by fluorescence microscopy. We predominantly observed CFP+ oocysts and salivary gland sporozoites in mosquitoes infected with rapamycin-treated PbDCIII parasites, showing that one dose of rapamycin is sufficient to induce efficient excision in transmission stages (Fig 5B).

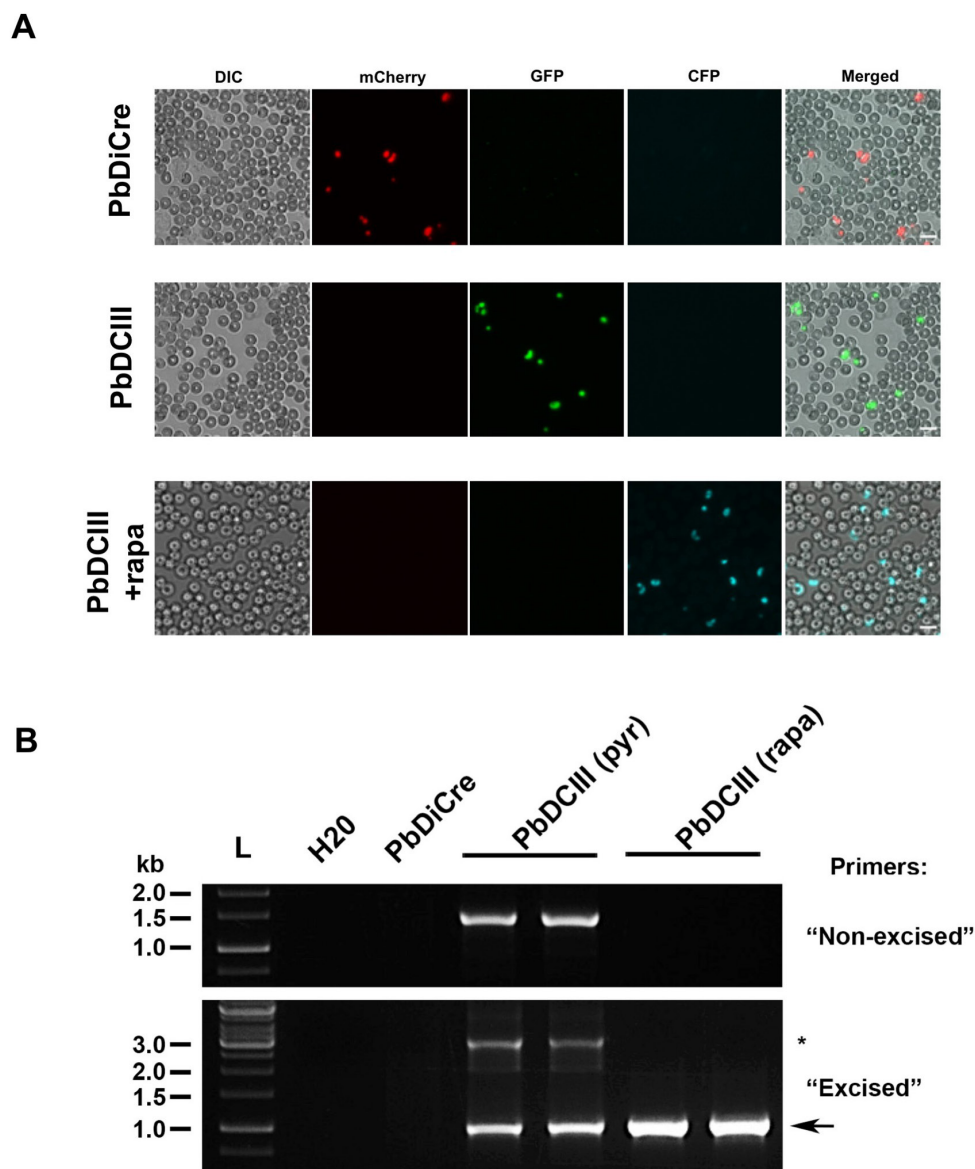


Fig 4. Exposure to rapamycin during the mammalian blood stages. **A.** Fluorescence microscopy of unfixed blood stages in the parental PbDiCre parasites (upper panels) and in PbDCIII parasites before (middle panels) and after (lower panels) rapamycin treatment. Scale bar, 10 μ m. **B.** PCR analysis of genomic DNA isolated from parental PbDiCre, pyrimethamine-selected (pyr) and rapamycin-treated (rapa) PbDCIII parasites, using primer combinations specific for non-excised or excised locus. A band corresponding to a non-excised locus can be amplified with the "excised" primer combination and is indicated with an asterisk.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236616.g004>

Exposure of mosquito stages to rapamycin allows DiCre-mediated gene recombination

Due to optimal activity of the Cre enzyme at 37°C, the DiCre system has only been used so far to manipulate genes in intra-erythrocytic stages of *Plasmodium*. We therefore tested if

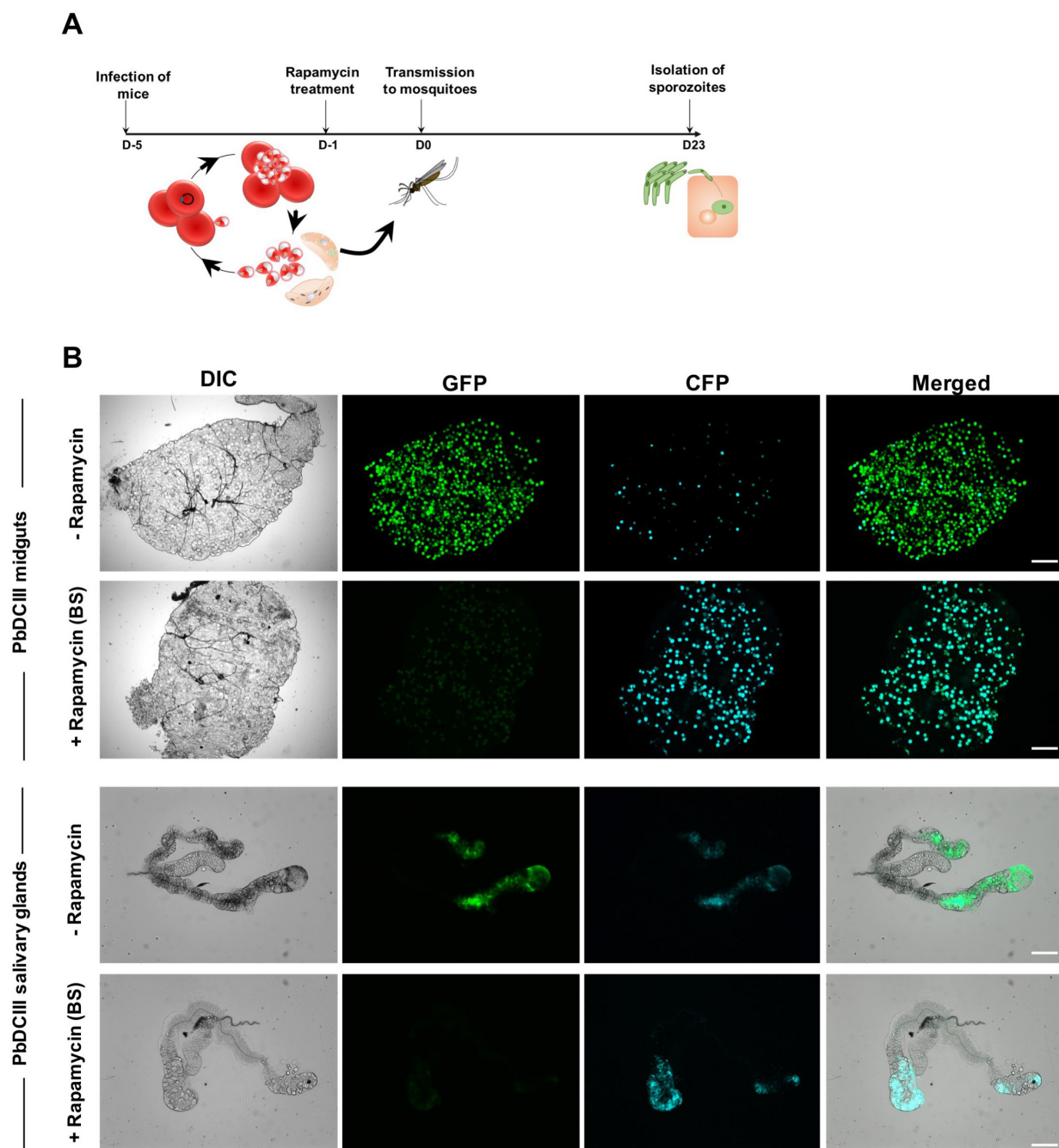


Fig 5. Rapamycin-mediated DNA recombination in sexual blood stages. A. Illustration of the rapamycin treatment protocol applied to sexually committed blood stages prior transmission to mosquitoes. B. Fluorescence microscopy of unfixed midguts and salivary glands isolated from PbDCIII-infected mosquitoes before (-rapamycin) or after blood-stage rapamycin treatment (+ rapamycin BS). Scale bar, 200 μ m for midguts and 100 μ m for the salivary glands.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236616.g005>

exposure to rapamycin of infected mosquitoes, instead of blood-stages, would also result in efficient DNA excision. For this purpose, we fed PbDCIII-infected mosquitoes on a sucrose

solution containing 1 µg/ml rapamycin, for two weeks, starting at day 5 post-transmission (Fig 6A). Interestingly, both oocysts and salivary glands isolated from treated mosquitoes were CFP+, showing that DiCre-mediated DNA excision can also be induced by treating mosquitoes with rapamycin (Fig 6B).

We then dissected the salivary glands of mosquitoes infected with PbDCIII untreated or rapamycin-treated parasites, either at the blood or mosquito stages, and quantified the number of salivary gland sporozoites. In two independent experiments, rapamycin exposure in mice or mosquitoes was associated with a reduction in the number of sporozoites (Fig 6C). We assume this reduction could in part be due to the sorting of untreated PbDCIII infected mosquitoes, based on GFP fluorescence, prior to dissection. While a similar sorting could not be performed after rapamycin treatment due to excision of the GFP cassette, we cannot exclude, however, a detrimental effect of rapamycin on parasite development in the mosquito. Nevertheless, with both protocols, isolated sporozoites remained infectious to HepG2 cell cultures (Fig 6D), and both rapamycin treatment regimens resulted in almost complete parasite DNA recombination as revealed by the switch from GFP to CFP expression (Fig 6E).

Overall, these results showed that the DiCre system can be used to target genes in different developmental stages both in the mammalian host and in the mosquito vector.

Discussion

In spite of numerous advances in gene editing technologies that are currently available to investigate the function of *Plasmodium* genes, the role of blood-stage essential genes in mosquito or mammalian pre-erythrocytic developmental stages remains poorly explored. We implemented the DiCre system in *P. berghei* parasites and illustrate how the system can be used to conditionally delete genes in *P. berghei* mosquito stages. We first generated a marker-free fluorescent parasite line in *P. berghei*, which constitutively expresses both components of the dimerisable Cre recombinase [14], by introducing components of the DiCre along with an mCherry cassette into a non-essential P230p locus [24]. Asexual development, sporogony in the mosquito, sporozoite infectivity in mice and EEF development *in vitro* were comparable to a reference PbGFP line [19], showing that the components of the DiCre did not interfere with parasite development or transmission.

We then confirmed the integrity of the Cre components in inducing excision after rapamycin treatment, using the PbDCIII reporter line. A single dose of rapamycin was sufficient to induce near complete excision in blood-stages, as shown by PCR, consistent with previously published data [2, 16]. However, excision events were also noted in untreated PbDCIII parasites by PCR in blood stages and by microscopy in some oocysts and sporozoites. Although these data suggest some leakiness in a minor proportion of parasites, we cannot exclude that co-housing of untreated and rapamycin-treated mice may have resulted in the exposure of untreated mice to rapamycin excreted in the faeces of treated mice. Nevertheless, rapamycin-induced DNA recombination in gametocytes was very efficient as observed by the lack of GFP+ oocysts in the mosquito, suggesting that targeted deletion of blood-stage essential genes could successfully be achieved in sexual stages for functional studies in the mosquito. In particular, the DiCre system is well-suited to the functional investigation of essential genes shared by merozoites and sporozoites, such as *ama1* [18]. Additionally, gene deletion can be achieved in sexual stages, two to three weeks prior to sporozoite isolation, thus limiting the risk of protein lingering after successful gene excision. The DiCre system therefore has an advantage over the previously described Flp/FRT system [25], where gene excision occurs late during sporozoite development, with the risk of incomplete depletion due to protein carryover after DNA recombination [26].

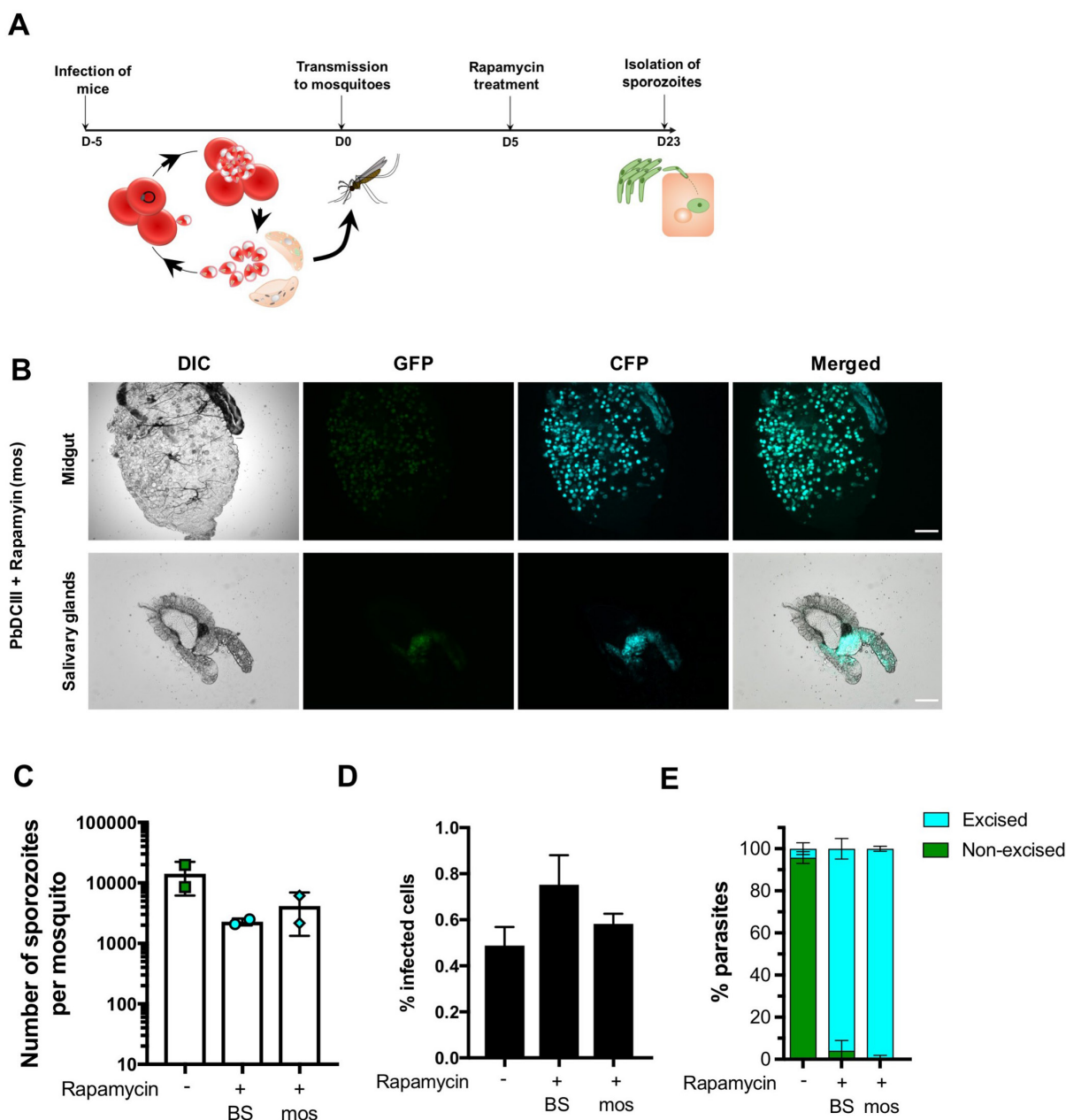


Fig 6. Rapamycin-mediated DNA recombination in mosquito stages. **A.** Illustration of the rapamycin treatment protocol applied to infected mosquitoes. **B.** Fluorescence microscopy of unfixed midguts and salivary glands isolated from PbDCIII-infected rapamycin-treated mosquitoes. Scale bar, 200 μ m for midguts, and 100 μ m for the salivary glands. **C.** Quantification of salivary gland sporozoites in mosquitoes infected with the PbDCIII parasites, after rapamycin exposure of mice (BS) or mosquitoes (mos) in comparison to the untreated parasites. Results shown are mean \pm SD of two independent experiments. **D.** Quantification of infected cells in HepG2 cell cultures infected with the PbDCIII parasite line, after rapamycin exposure of mice (BS) or mosquitoes (mos) in comparison to untreated control. Results shown are mean \pm SD of five technical replicates and are representative of two independent experiments. **E.** Quantification of excised CFP+ and non-excised GFP+ EEFs *in vitro* in infected HepG2 cell cultures, as determined by FACS. Results shown are mean \pm SD of five technical replicates and are representative of two independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236616.g006>

A recent study that generated a *P. falciparum* NF54 DiCre parasite line to conditionally knockout *ama1* and *fikk7.1* genes, reported a significant reduction in oocyst numbers after transmission of rapamycin treated parasites to mosquitoes [18], for which the authors speculated that treatment with rapamycin was mainly responsible. In agreement with these observations, we detected a reduction in salivary gland sporozoite numbers after rapamycin treatment of PbDCIII parasites. In light of these findings, we sought to circumvent the effects of rapamycin on oocyst formation by treating mosquitoes with rapamycin instead of blood-stages. Mosquitoes infected with untreated PbDCIII parasites were fed with rapamycin 5 days after the blood-meal, to avoid any effects on ookinetes and the formation of oocysts. However, a similar reduction of the number of salivary gland sporozoites was observed irrespective of the rapamycin treatment regimen. In our experiments, the observed reduction in sporozoite numbers might stem in part from the sorting procedure for infected mosquitoes, however we cannot exclude the effects of rapamycin on parasite development in the midgut. This detrimental effect could be due to inhibition of the target of rapamycin (TOR) pathway, which is known to play a role in nutritional sensing in the mosquito [27], and may participate in oocyst formation and/or development. It might therefore be possible to mitigate these effects through titrations in the dose of rapamycin used to treat either the mice or mosquitoes, or by using rapamycin analogues with reduced toxicity, thus leaving room for refinement of the procedure.

We only observed excised CFP+ EEFs in infected hepatocytes confirming that excision of GFP in PbDCIII parasites is efficient after rapamycin treatment of both blood- and mosquito stages. This suggests that rapamycin administration to mosquitoes could be successfully applied to conditionally delete genes involved in gametocytogenesis or ookinete formation and study their function during the subsequent stages of parasite development in the mosquito. Furthermore, rapamycin treatment could also be adapted to different stages in the mosquito, such as treatment of midgut sporozoites prior to salivary gland invasion or treatment of salivary gland sporozoites before hepatocyte invasion, although we predict that the percentage of excision might vary with shorter duration times.

In summary, we generated a fluorescent PbDiCre line and show that it can be used to investigate the function of essential blood-stage genes in mosquito stages. By treating parasites with rapamycin in the blood or in the mosquito, we demonstrate the versatility of the DiCre system in targeting genes of interest at multiple stages of development. Overall, our study introduces a new robust and versatile methodology to conditionally delete genes in different stages of *Plasmodium* parasites, which should help deciphering the function of essential genes across the parasite life cycle.

Supporting information

S1 File.

(PDF)

S1 Raw images.

(PDF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Jean-François Franetich, Maurel Tefit, Mariem Choura and Thierry Houpert for rearing of mosquitoes. DNA encoding the Cre elements was a kind gift from Kai Wengelnik and Mike Blackman.

Author Contributions

Conceptualization: Priyanka Fernandes, Sylvie Briquet, Olivier Silvie.

Funding acquisition: Olivier Silvie.

Investigation: Priyanka Fernandes, Sylvie Briquet, Delphine Patarot, Manon Loubens, Bénédicte Hoareau-Coudert, Olivier Silvie.

Methodology: Priyanka Fernandes, Sylvie Briquet, Olivier Silvie.

Project administration: Olivier Silvie.

Supervision: Olivier Silvie.

Validation: Priyanka Fernandes, Sylvie Briquet, Olivier Silvie.

Writing – original draft: Priyanka Fernandes, Olivier Silvie.

Writing – review & editing: Priyanka Fernandes, Sylvie Briquet, Olivier Silvie.

References

1. Bannister L, Mitchell G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends in Parasitology*. 2003; pp. 209–213. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(03)00086-2) PMID: [12763426](#)
2. Collins CR, Das S, Wong EH, Andenmatten N, Stallmach R, Hackett F, et al. Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle. *Mol Microbiol*. 2013; 88: 687–701. <https://doi.org/10.1111/mmi.12206> PMID: [23489321](#)
3. Meissner M, Krejany E, Gilson PR, De Koning-Ward TF, Soldati D, Crabb BS. Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500112102> PMID: [15710888](#)
4. Laurentino EC, Taylor S, Mair GR, Lasonder E, Bartfai R, Stunnenberg HG, et al. Experimentally controlled downregulation of the histone chaperone FACT in *Plasmodium berghei* reveals that it is critical to male gamete fertility. *Cell Microbiol*. 2011; 13: 1956–1974. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01683.x> PMID: [21899698](#)
5. Siden-Kiamos I, Ganter M, Kunze A, Hliscs M, Steinbüchel M, Mendoza J, et al. Stage-specific depletion of myosin A supports an essential role in motility of malarial ookinetes. *Cell Microbiol*. 2011; 13: 1996–2006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01686.x> PMID: [21899701](#)
6. Sebastian S, Brochet M, Collins MO, Schwach F, Jones ML, Goulding D, et al. A *Plasmodium* calcium-dependent protein kinase controls zygote development and transmission by translationally activating repressed mRNAs. *Cell Host Microbe*. 2012; 12: 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.014> PMID: [22817984](#)
7. Ishino T, Murata E, Tokunaga N, Baba M, Tachibana M, Thongkuiatkul A, et al. Rhoptry neck protein 2 expressed in *Plasmodium* sporozoites plays a crucial role during invasion of mosquito salivary glands. *Cell Microbiol*. 2019; 21. <https://doi.org/10.1111/cmi.12964> PMID: [30307699](#)
8. Klug D, Kehrler J, Frischknecht F, Singer M. A synthetic promoter for multi-stage expression to probe complementary functions of *Plasmodium* adhesins. *J Cell Sci*. 2018; 131. <https://doi.org/10.1242/jcs.210971> PMID: [30237220](#)
9. Pino P, Sebastian S, Kim EA, Bush E, Brochet M, Volkmann K, et al. A tetracycline-repressible transactivator system to study essential genes in malaria parasites. *Cell Host Microbe*. 2012; 12: 824–34. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.016> PMID: [23245327](#)
10. Agop-Nersesian C, Pfahler J, Lanzer M, Meissner M. Functional expression of ribozymes in Apicomplexa: Towards exogenous control of gene expression by inducible RNA-cleavage. *Int J Parasitol*. 2008; 38: 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.015> PMID: [18062972](#)
11. Prommana P, Uthairibull C, Wongsombat C, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y, Knuepfer E, et al. Inducible Knockdown of *Plasmodium* Gene Expression Using the glmS Ribozyme. *PLoS One*. 2013; 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073783> PMID: [24023691](#)
12. Armstrong CM, Goldberg DE. An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. *Nat Methods*. 2007; 4: 1007–1009. <https://doi.org/10.1038/nmeth1132> PMID: [17994030](#)

13. Andenmatten N, Egarter S, Jackson AJ, Jullien N, Herman J-P, Meissner M. Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. *Nat Methods*. 2012; 10: 125–127. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2301> PMID: [23263690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23263690/)
14. Jullien N. Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31: 131e – 131. <https://doi.org/10.1093/nar/gng131> PMID: [14576331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14576331/)
15. Yap A, Azevedo MF, Gilson PR, Weiss GE, O'Neill MT, Wilson DW, et al. Conditional expression of apical membrane antigen 1 in *Plasmodium falciparum* shows it is required for erythrocyte invasion by merozoites. *Cell Microbiol*. 2014; 16: 642–56. <https://doi.org/10.1111/cmi.12287> PMID: [24571085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24571085/)
16. Kent RS, Modrzynska KK, Cameron R, Philip N, Billker O, Waters AP. Inducible developmental reprogramming redefines commitment to sexual development in the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nature Microbiology*. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0223-6> PMID: [30177743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30177743/)
17. Jones ML, Das S, Belda H, Collins CR, Blackman MJ, Treeck M. A versatile strategy for rapid conditional genome engineering using loxP sites in a small synthetic intron in *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep*. 2016;6. <https://doi.org/10.1038/s41598-016-0015-2> PMID: [28442741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28442741/)
18. Tibúrcio M, Yang ASP, Yahata K, Suárez-Cortés P, Belda H, Baumgarten S, et al. A Novel Tool for the Generation of Conditional Knockouts To Study Gene Function across the *Plasmodium falciparum* Life Cycle. *MBio*. 2019;10. <https://doi.org/10.1128/mbio.01170-19> PMID: [31530668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31530668/)
19. Manzoni G, Briquet S, Risco-Castillo V, Gaultier C, Topçu S, Ivănescu ML, et al. A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites. *Sci Rep*. 2014; 4:4760: 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep04760> PMID: [24755823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24755823/)
20. Silvie O, Goetz K, Matuschewski K. A sporozoite asparagine-rich protein controls initiation of *Plasmodium* liver stage development. *PLoS Pathog*. 2008;4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000086> PMID: [18551171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18551171/)
21. Janse CJ, Ramesar J, Waters AP. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc*. 2006; 1: 346–356. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.53> PMID: [17406255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406255/)
22. Ramakrishnan C, Delves MJ, Lal K, Blagborough AM, Butcher G, Baker KW, et al. Laboratory maintenance of rodent malaria parasites. *Methods Mol Biol*. 2013; 923: 51–72. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-026-7_5 PMID: [22990771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22990771/)
23. Silvie O, Franetich JF, Boucheix C, Rubinstein E, Mazier D. Alternative invasion pathways for *Plasmodium berghei* sporozoites. *Int J Parasitol*. 2007; 37: 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.10.005> PMID: [17112526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17112526/)
24. van Dijk MR, van Schaijk BCL, Khan SM, van Dooren MW, Ramesar J, Kaczanowski S, et al. Three members of the 6-cys protein family of *Plasmodium* play a role in gamete fertility. *PLoS Pathog*. 2010; 6: e1000853. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000853> PMID: [20386715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20386715/)
25. Carvalho TG, Thiberge S, Sakamoto H, Ménard R. Conditional mutagenesis using site-specific recombination in *Plasmodium berghei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 14931–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404416101> PMID: [15465918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15465918/)
26. Govindasamy K, Jebiwott S, Jaiyyan DK, Davidow A, Ojo KK, Van Voorhis WC, et al. Invasion of hepatocytes by *Plasmodium* sporozoites requires cGMP-dependent protein kinase and calcium dependent protein kinase 4. *Mol Microbiol*. 2016;102. <https://doi.org/10.1111/mmi.13466> PMID: [27425827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27425827/)
27. Arsic D, Guerin PM. Nutrient content of diet affects the signaling activity of the insulin/target of rapamycin/p70 S6 kinase pathway in the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *J Insect Physiol*. 2008;54. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.06.003> PMID: [18634792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18634792/)

ANNEXE II

Chapitre de protocole – Parasite genomics : Methods and Protocols Methods in Molecular Biology

Conditional Gene Deletion in Mammalian and Mosquito Stages
of *Plasmodium berghei* Using Dimerizable Cre Recombinase



Chapter 7

Conditional Gene Deletion in Mammalian and Mosquito Stages of *Plasmodium berghei* Using Dimerizable Cre Recombinase

Priyanka Fernandes, Manon Loubens, Olivier Silvie, and Sylvie Briquet

Abstract

Genome editing in the malaria parasite *Plasmodium* relies on homologous recombination and requires parasite transfection in asexual blood stages. Therefore, conditional genetic approaches are needed to delete genes that are essential during blood stage replication. Among these, the dimerizable Cre (DiCre) recombinase system has emerged as a powerful approach for conditional gene knockout in *Plasmodium* parasites. In this system, the Cre recombinase is expressed in the form of two separate, enzymatically inactive polypeptides. Rapamycin-induced heterodimerization of the two components restores recombinase activity, leading to site-specific excision of floxed DNA sequences. Here, we describe methods to generate genetically modified DiCre-expressing *Plasmodium berghei* mutants by introducing *Lox* sites upstream and downstream of a gene of interest and to induce conditional excision of the floxed gene in different stages of the parasite life cycle. Administration of rapamycin to *P. berghei*-infected mice allows conditional gene deletion in the asexual erythrocytic stages. Rapamycin-induced gene excision can also be achieved in *P. berghei* sexual blood stages prior to transmission to mosquitoes, or during sporogony by treating *P. berghei*-infected mosquitoes, both methods allowing functional studies in *P. berghei* mosquito stages. Finally, rapamycin can be administered to in vitro cell cultures in order to induce gene excision in *P. berghei* liver stages. Subsequent phenotyping allows for the analysis of essential gene function across the parasite life cycle stages.

Key words *Plasmodium*, Mosquito, DiCre recombinase, Conditional gene deletion, Essential genes, Rapamycin

1 Introduction

Genetic engineering in *Plasmodium* is based on the possibility to target genes by homologous recombination and generate transgenic parasites harboring selectable markers [1, 2]. The procedure is restricted to the genetic manipulation of the parasites during the asexual blood stage of development, when parasite replication is exponential and allows selection of recombinant parasites. In addition, *Plasmodium* is haploid at the blood stages, facilitating gene

targeting. However, one limitation of this approach is that genes which are essential in blood stages, for parasite invasion, growth or egress, are refractory to direct gene deletion [3]. A fortiori, it is impossible to gain insights into the function of such genes in other stages of the life cycle, especially mosquito and liver stages [4, 5]. In this context, the development of conditional approaches is expected to enhance the exploration of the parasite biology during progression through the entire life cycle. Moreover, gene knock-outs may not always reveal phenotypes if compensatory changes can occur during selection of mutants [6], an issue that can also be addressed using conditional gene deletion strategies.

Among the tools available for conditional genetic manipulation, the bacteriophage Cre recombinase, based on site-specific recombination [7], has emerged as a versatile and powerful technology for genome engineering in mice [8, 9]. Development of dimerizable Cre (DiCre) has further enriched the geneticist's toolbox to achieve tight temporal control of recombination, especially for conditional gene knockout studies. The DiCre system relies on the expression of the Cre recombinase in the form of two separate enzymatically inactive polypeptides, a N-terminal CRE59 fragment and a C-terminal CRE60 fragment, each fused to a different rapamycin-binding protein (FKBP12 and FRB, respectively) [10] (Fig. 1a). Heterodimerization of the two subunits in the presence of rapamycin restores recombinase activity, inducing site-specific recombination between Lox sites and excision of the floxed target DNA fragment (Fig. 1b). In recent years, the DiCre system has emerged as an efficient system for conditional gene knockout in *Plasmodium* and other apicomplexans [11, 12]. The efficiency of the DiCre system depends on various factors, including the recombination rate, its effects on mRNA and/or protein synthesis in the case of partial gene deletion, as well as mRNA and/or protein stability following DNA excision. All these factors can vary depending on the gene of interest (GOI) and the accessibility of the targeted locus. Several strategies can be envisaged depending on the position of the Lox sites to delete the entire gene or only a portion of it, including 5' or 3' regulatory regions (Fig. 1c). The Lox sites can also be introduced inside the GOI within a natural or artificial intron [13].

The DiCre approach was implemented in the widely used rodent malaria model parasite *P. berghei*, providing a specific, rapid, robust, and tunable conditional system [14, 15]. We have recently reported the generation of a *P. berghei* parasite line (*PbDiCre*), which constitutively expresses a DiCre cassette and the red fluorescent protein mCherry, and is devoid of drug-selectable marker [15]. This *PbDiCre* can thus serve as a mother line for further genetic modifications to insert two Lox sites in a GOI. Since a single LoxP site was retained in the *PbDiCre* genome during recycling of the selectable marker used to generate this line,

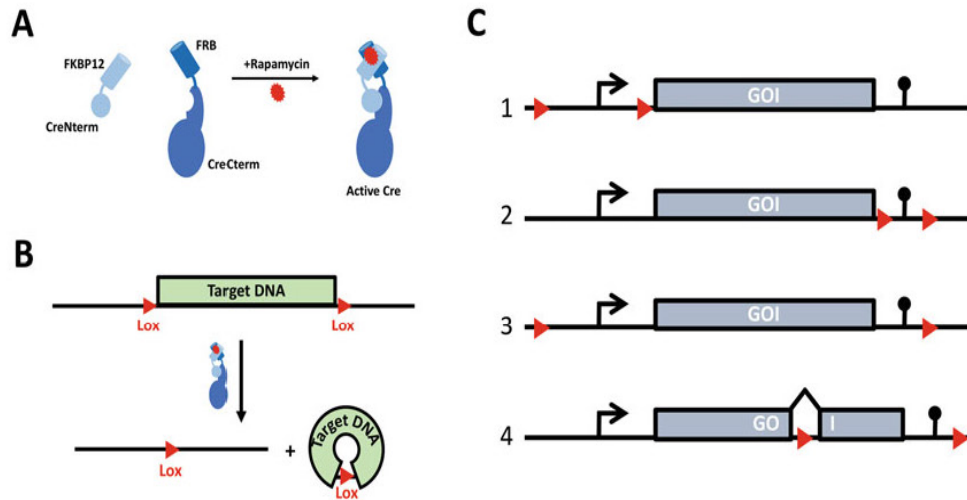


Fig. 1 Schematic of DiCre-mediated conditional gene deletion. (a) The Cre recombinase is expressed as two subunits that dimerize in the presence of rapamycin. (b) Rapamycin-dependent heterodimerization of the two subunits restores recombinase activity, inducing site-specific recombination between Lox sites and excision of the floxed target DNA fragment. (c) For conditional inactivation of a gene of interest (GOI), Lox sites can be introduced upstream of the GOI to delete the gene promoter [1], downstream of the GOI to delete 3' regulatory elements [2], on each side of the GOI for complete gene deletion [3]. The Lox sites can also be introduced inside the GOI within an intron [4]

a distinct Lox sequence (e.g., LoxN) should be used to flox the GOI [15].

The versatility of the DiCre system allows targeting genes at multiple stages of development. We designed a generic strategy based on two successive transfections of *PbDiCre* parasites to introduce LoxN sites on each side of any GOI, allowing gene deletion upon exposure to rapamycin (Fig. 2). Here, we present a series of detailed protocols to generate conditional mutants in the *PbDiCre* mother line and induce gene deletion through exposure to rapamycin during blood stage growth, prior to mosquito transmission, during sporogony, or during liver stage development. Genotyping of the genetically modified parasites is important to confirm correct integration of the Lox sites and monitor efficiency of DNA excision following rapamycin treatment. The parasite genotype can be determined by PCR using primer combinations specific for the WT locus or for the recombined locus before or after excision. In addition, the inclusion of fluorescent markers can facilitate the monitoring of recombination events [15]. The efficiency of the conditional deletion can also be assessed by measuring mRNA and/or protein levels. Subsequent phenotyping allows for the analysis of the functional consequences of gene deletion and relies on specific assays that depend on the targeted developmental stage, such as measuring the parasitemia or the production of

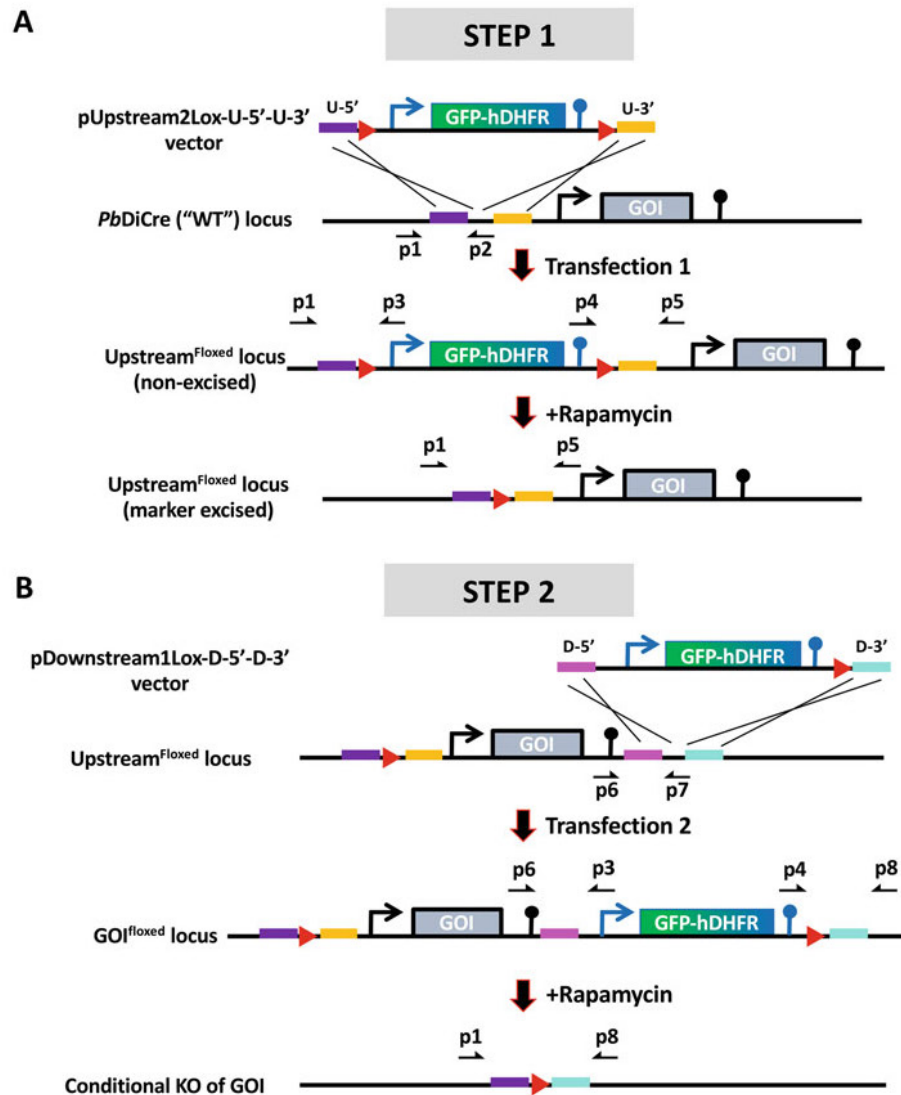


Fig. 2 Generic strategy to introduce *Lox* sites on each side of a gene of interest. **(a)** In a first step, a pUpstream2Lox construct containing two homologous fragments (U-5' and U-3') and a dual cassette driving expression of the green fluorescent protein (GFP) and the human dihydrofolate reductase (hDHFR), which confers resistance to pyrimethamine, flanked by two *LoxN* sites, is inserted into the *PbDiCre* "wild type" (WT) locus by homologous recombination upstream of the GOI **(a)**. GFP⁺ mCherry⁺ parasites are selected with pyrimethamine and exposed to rapamycin to excise the GFP-hDHFR cassette, resulting in GFP⁻ mCherry⁺ recombinant Upstream^{Floxed} parasites harboring a single *LoxN* site upstream of the GOI and devoid of drug-selectable marker. The primers used for genotyping PCR are shown. The p3 (5' insert seq reverse) and p4 (3' insert seq forward) primers are universal primers (see Table 5 for sequence), whereas all other primers are specific for the GOI locus. The p1-p3 and p4-p5 primer combinations are used to check for correct integration of the construct at the 5' and 3' homologous regions, respectively. The p1-p2 combination detects the WT locus. The p1-p5 combination is used to confirm excision of the floxed cassettes. **(b)** Recombinant Upstream^{Floxed} parasites generated in **step 1** are then used in a second transfection to introduce the GFP-hDHFR cassette followed by one *LoxN* site downstream of the GOI. The resulting GFP⁺ mCherry⁺ GOI^{Floxed} parasites

gametocytes, quantifying the numbers of oocysts and sporozoites in the mosquito, defining the sporozoite migratory and invasive capacities, or quantifying liver stage growth.

2 Materials

2.1 Lab Equipment

1. Thermocycler.
2. Gel electrophoresis system.
3. Gel transilluminator.
4. Microcentrifuge and benchtop centrifuge with 15 mL, 50 mL tubes, and plate holders with refrigeration.
5. Heating block for 1.5 mL microtubes.
6. Water bath.
7. Electric Bunsen burner.
8. 4 °C fridge and –20 °C, –80 °C freezers.
9. Staining trays for Giemsa.
10. Vortex mixer.
11. Mouse restrainer.
12. Biosafety Level 2 Cabinet with adapted personal protective equipment.
13. Incubators at 37 °C for bacteria and parasite cultures.
14. Incubator at 37 °C with 5% CO₂ for cell cultures.
15. Incubators at 21 °C for *Anopheles* mosquito housing.
16. Amaxa Nucleofector device II (Lonza).
17. Flow cytometer equipped with appropriate lasers and filters for detection of GFP and mCherry fluorescence.
18. Optical microscope with 40× and 50× or 100× objectives and phase contrast.
19. Fluorescent binocular microscope equipped with appropriate filters to detect GFP and mCherry fluorescence.

Fig. 2 (continued) are then selected with pyrimethamine and purified by flow cytometry and/or parasite cloning by limiting dilution. Conditional gene deletion is then achieved through exposure to rapamycin, which induces excision of both the G0I and the GFP-hDHFR cassette. The primers used for genotyping PCR are shown. Primers are specific for the G0I locus except the universal p3 and p4 primers. The p6-p3 and p4-p8 primer combinations are used to check for correct integration of the construct at the 5' and 3' homologous regions, respectively. The p6-p7 combination detects the unmodified locus. The p1-p8 combination can be used to confirm excision of the floxed G0I upon rapamycin-mediated CRE activation

20. Inverted fluorescence microscope with 20× and 40× objectives and appropriate filters for detection of GFP and mCherry fluorescence.

2.2 Plasticware and Glassware

1. PCR tubes (0.2 mL).
2. Microtubes (1.5 mL and 2 mL).
3. Round bottom 14 mL tubes.
4. 100 mm Petri dishes.
5. Syringes (1 mL and 5 mL).
6. 23G and 26G needles.
7. Insulin syringe 1 mL with 29G needle for mouse injections.
8. Pasteur Pipette and rubber bulb.
9. Cryovials (1.2 mL) for cryopreservation of *Plasmodium* and cell lines.
10. Stericup filtration system 0.22 μm, 250 mL (Millipore), or equivalent filtration system.
11. Glass slides and coverslips.
12. Aspiration pipette (2 mL without filter).
13. 96-well plates flat bottom.
14. Pipettes and pipette tips (10, 20, 200, 1000 μL).
15. Oral gavage needle for mice.

2.3 Animals, Parasites, Bacteria, and Cells

1. SWISS (CD-1) mice, 6-week-old.
2. *Anopheles stephensi* mosquitoes reared at 24–26 °C with 80% humidity.
3. *P. berghei* (ANKA strain) expressing DiCre (*PbDiCre*) [15].
4. Competent *E. coli* Stellar cells (Clontech # 636763).

2.4 Media, Solutions, and Reagents

We list kits and reagents that we have tested and use in routine in our lab, but any other equivalent kit or reagent can be used.

2.4.1 Reagents for DNA Cloning and Genotyping

1. CloneAmp HIFI PCR Premix (Clontech)—for cloning of DNA fragments.
2. FastStart DNA polymerase kit (Roche Applied Science)—for genotyping of mutants.
3. In-Fusion Cloning kit (Clontech).
4. MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)—for purification of insert fragments up to 4 kb.
5. QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)—for purification of vector fragments up to 10 kb.
6. QIAprep Spin Mini Prep Kit (Qiagen).
7. DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).

8. Restriction enzymes and appropriate buffers.
9. dNTPs mix at 10 mM each in water.
10. DNase/RNase-free distilled water.
11. Gene specific and universal forward and reverse primers at 100 μ M in water.
12. Agarose.
13. SYBR Safe nucleic acid staining dye (Invitrogen).
14. TAE 10X electrophoresis buffer.
15. DNA loading dye.
16. DNA ladder.
17. LB broth supplemented with 100 μ g/mL ampicillin, LB agar plates, and S.O.C. medium.
18. 100% ethanol.
19. 70% ethanol.
20. 3 M Sodium acetate, pH 5.5.

2.4.2 *Reagents for Cell Culture, Parasite Transfection, and Selection*

1. RPMI1640 medium with GlutaMAX.
2. DMEM medium.
3. 10,000 U/mL Penicillin-Streptomycin solution.
4. 50 mg/mL Gentamycin solution.
5. 200 mM L-Glutamine solution.
6. Fetal Calf Serum (FCS), heat inactivated.
7. Schizont culture medium: RPMI1640 supplemented with 20% FCS and 0.03% Gentamycin.
8. Cell culture medium (complete DMEM): DMEM supplemented with 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, and 1% L-Glutamine.
9. IX Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4.
10. Nycodenz density-gradient solution: dissolve 110.4 g Nycodenz (Proteogenix #1002424) in 400 mL buffer (5 mM Tris/HCl, 3 mM KCl, 0.3 mM CaNa₂ EDTA; pH 7.5), and sterilize by autoclaving for 20 min at 120 °C. Store at 4 °C.
11. Nucleofector solution 88A6 (Lonza # VPA-1002).
12. Pyrimethamine solution: dissolve pyrimethamine in DMSO to a final concentration of 7 mg/mL (stirring on a vortex). Dilute 100 times in mouse drinking water (final concentration 70 mg/L) and adjust pH to 3.5–5.0 with HCl. Store at 4 °C for a maximum of 7 days.

13. 5-fluorocytosine solution (Ancotil 1% Meda Pharma). Dilute 10 times in the mouse drinking water (final concentration 1 mg/mL).
14. Blood freezing solution: 10% Glycerol in Alsever's solution.

2.4.3 Other Reagents

1. 1 mg/mL Sirolimus (rapamycin), Rapamune[®] (Pfizer). Used to treat mice per os.
2. Rapamycin, Vetranal[®] (Sigma-Aldrich #37094): prepare a stock solution by dissolving 1 mg of rapamycin in 1 mL of DMSO, store at -20°C . Use for the treatment of mosquitoes and cell cultures.
3. Anesthetic solution: 25 mg/mL Ketamine + 2.5 mg/mL Xylazine in PBS, stored at 4°C . The volume to inject intraperitoneally must be adapted to the mouse weight ($4\ \mu\text{L}/\text{g}$).
4. 10% sucrose in water for feeding of mosquitoes. Sterilize by autoclaving for 20 min at 120°C . Store at 4°C .
5. 25,000 units/mL Heparin stock solution. Working solution: dilute 25 times in PBS (final concentration 5000 units/mL).
6. Fibrous cellulose. To prepare a cellulose column, place cotton at the bottom of the barrel of a 5 mL syringe (discard the plunger), fill with cellulose (over 2–3 cm), and add a layer of glass beads (212–300 μm) to maintain the cellulose in the barrel.
7. 0.2% w/v saponin solution in 1X PBS.
8. 100% methanol.
9. Dimethyl sulfoxide (DMSO).
10. Giemsa solution.
11. Gas mixture 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 .
12. Immersion oil.

3 Methods

3.1 Generation of Plasmids

This section describes the method to generate the pUpstream and pDownstream vectors with homologous flanks upstream or downstream of the GOI, respectively.

1. Design primers to amplify two non-overlapping U-5' and U-3' fragments from the upstream region of the GOI, and two non-overlapping D-5' and D-3' fragments from the downstream region of the GOI (*see Note 1*). The fragments should be between 500 and 1000 bp in length. Each primer should contain gene-specific sequence and an appropriate 5' extension to enable recombination in the pUpstream2Lox and pDownstream1Lox plasmids catalyzed by the In-Fusion enzyme (*see Table 1*).

Table 1

Primers for In-Fusion cloning of 5' and 3' gene flanks and sequencing of the vectors. The underlined sequences correspond to the 15-nucleotide overhangs used for In-Fusion recombination for insertion in the pUpstream2Lox and pDownstream1Lox plasmids. The restriction sites are in bold

Primer	Restriction sites	Primer sequence
<i>In-Fusion cloning primers</i>		
5' flank forward	<i>KpnI</i>	<u>TATAGGGCGAATTGGGTA</u> CC-gene-specific sequence
5' flank reverse	<i>XhoI</i>	TTATGAATTCCTCGAG-gene-specific sequence
3' flank forward	<i>NotI</i>	<u>ACGAAGTTATGCTAGGCGGCCGC</u> -gene-specific sequence
3' flank reverse	<i>NheI</i>	ATTAAGTAGTGCTAGC-gene-specific sequence
<i>Sequencing primers</i>		
5' insert seq forward (T7)		TAATACGACTCACTATAGGG
5' insert seq reverse		AGGAAAATATACACATGTATATATAAAGAGG
3' insert seq forward		AATAATGTAAACAGTTATTCAATTTTTTAAGG
3' insert seq reverse		CTCAAAGCACCAGTAATATTTTCATCC

Table 2
PCR reaction

Reagent	Quantity
CloneAmp Hifi PCR Premix 2X	12.5 μ L
Primer mix forward + reverse (10 μ M)	1 μ L
Template genomic DNA	1 μ L (<100 ng)
H ₂ O	10.5 μ L

- Set up a PCR reaction (*see* Table 2) using *P. berghei* genomic DNA as a template, according to the enzyme specifications.
- Perform PCR following program (*see* Table 3).
- Resolve and visualize the amplicons by agarose gel electrophoresis to ensure they are of expected sizes.
- Purify the PCR products using the MinElute PCR purification kit and quantify the DNA concentration.
- Perform double restriction enzyme digestion of the pUpstream2Lox and pDownstream1Lox plasmids using *KpnI* and *XhoI* enzymes.

Table 3
PCR program

Temperature	Time
94 °C	5 min
30–35 cycles:	
94 °C	40 s
55 °C	40 s
60 °C	60 s/kb
60 °C	7 min
4 °C	∞

Table 4
In-Fusion reaction

Reagent	Quantity
Purified PCR product	50–100 ng
Purified linearized plasmid	50–100 ng
5X In-fusion enzyme premix	2 µL
H ₂ O	q.s. 10 µL

7. Purify the digested pUpstream2Lox and pDownstream1Lox plasmids using the Qiaquick purification kit and quantify the DNA concentration.
8. In-Fusion reaction: insert the purified U-5' DNA into the *KpnI/XhoI* digested pUpstream2Lox plasmid or the D-5' DNA into the *KpnI/XhoI* digested pDownstream1Lox plasmid by In-Fusion mediated recombination. Set up the In-Fusion reaction (*see* Table 4). Incubate the reaction at 50 °C for 15 min.
9. Thaw competent Stellar *E. coli* on ice, add 2.5 µL of the In-Fusion reaction product to 50 µL bacteria, and incubate on ice for 30 min.
10. Heat-shock bacteria at 42 °C for 45 s, recover on ice for 2 min, then add 100 µL of S.O.C. medium.
11. Prepare two dilutions of the bacteria at 1/5 and 1/100 with S.O.C. medium and spread 100 µL onto LB agar plates containing 100 µg/mL Ampicillin (in our hands, the 1/100 dilution usually gives the best results). Incubate at 37 °C overnight.

12. Transfer individual colonies into 1 mL LB medium containing 100 µg/mL ampicillin and incubate at 37 °C overnight with shaking at 250 rpm.
13. Purify plasmid DNA using the Qiaprep miniprep kit and quantify the DNA concentration.
14. Perform double restriction enzyme digestion of the plasmids using *KpnI* and *XhoI* enzymes to check for the presence of inserted fragments.
15. Resolve and visualize the digestion products by agarose gel electrophoresis to ensure the plasmids contain the U-5' or D-5' insert of expected size.
16. Perform single restriction enzyme digestion with *NheI* of the pUpstream2Lox plasmid containing the U-5' insert or the pDownstream1Lox plasmid containing the D-5'.
17. Purify the digested plasmid using the Qiaquick purification kit and quantify the DNA concentration.
18. Perform **steps 8–15** to insert the U-3' DNA fragment in the *NheI*-digested pUpstream2Lox-U-5' plasmid or the D-3' DNA fragment in the *NheI*-digested pDownstream1Lox-D-5' plasmid. Verify the presence of the insert by double restriction enzyme digestion using *NotI* and *NheI*.
19. Sequence the final pUpstream2Lox-U-5'-U-3' and pDownstream1Lox-D-5'-D-3' plasmids to verify the absence of errors in the U-5', U-3', D-5', and D-3' DNA inserts.

3.2 Generation of Conditional Deletion Mutants in *Plasmodium berghei*

Two rounds of transfection are performed using the method below. In the first transfection, *PbDiCre* erythrocytic stages are transfected with the Upstream2Lox-U-5'-U-3' construct in order to insert two LoxN sites flanking a GFP-hDHFR cassette upstream of the GOI plasmid. The resulting recombinant parasites are exposed to rapamycin in order to excise the GFP-hDHFR cassette, resulting in a marker-free Upstream^{Floxed} parasite population harboring a single LoxN site retained upstream of the GOI. In the second transfection, the Upstream^{Floxed} parasite is transfected with the Downstream1Lox-D-5'-D-3' construct to insert a GFP-hDHFR cassette and a second LoxN site downstream of the GOI, resulting in the final GOI^{Floxed} parasite (*see Note 2*).

3.2.1 Plasmid Preparation for Transfection

1. Perform a double restriction enzyme digestion of 30 µg of the pUpstream2Lox-U-5'-U-3' and pDownstream1Lox-D-5'-D-3' plasmids with *KpnI* and *NheI* enzymes.
2. Resolve and visualize the digestion products by agarose gel electrophoresis to ensure the plasmids are fully digested.

3. Precipitate the digested plasmids by adding 0.1 volume of 3 M Sodium Acetate (pH 4.8) and 2.5 volumes of 100% ethanol. Mix gently and incubate 30 min at -20°C .
4. Centrifuge at 4°C at $18,000 \times g$ for 30 min.
5. Carefully remove the supernatant, add 500 μL of 70% ethanol on the DNA pellet.
6. Centrifuge at 4°C at $18,000 \times g$ for 10 min.
7. Carefully remove the supernatant and let the DNA pellet dry.
8. Resuspend DNA in RNase/DNase-free water to obtain a final concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, store at -20°C until use.

3.2.2 *Parasite
Transfection and Selection*
(see **Note 3**)

1. Initiate a *PbDiCre* blood stage infection: thaw a frozen parasite cryostock and immediately inject intra-peritoneally into one or two mice (100–150 $\mu\text{L}/\text{mouse}$). Alternatively, inject fresh blood collected from a donor mouse (see **Note 4**).
2. Once the parasitemia has reached 1 to 5% (see **Note 5**), collect 1–2 mL blood from *PbDiCre*-infected mice by cardiac puncture under terminal anesthesia and add the blood to 10 mL schizont culture medium supplemented with 0.3 mL heparin solution.
3. Centrifuge at $450 \times g$ for 8 min, discard the supernatant, and resuspend the erythrocyte pellet in 50 mL schizont culture medium.
4. Add very carefully the 50 mL to the bottom of an Erlenmeyer flask containing 100 mL of schizont culture medium.
5. Flush the Erlenmeyer flask for 90 s at 1.5–2 bar pressure with a 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 gas mixture. Close the Erlenmeyer flask tightly immediately after gassing.
6. Incubate the culture at 36.5°C for 18 h on an orbital shaker set at 70 rpm.
7. Make a smear of the culture and stain with Giemsa to verify the culture quality.
8. Distribute 35 mL of the culture in 50 mL tubes and gently underlay 10 mL of 55% Nycodenz (in PBS) solution to each tube under the culture suspension. A well-defined division must be visible between the two suspensions.
9. Centrifuge for 20 min at $450 \times g$ in a swing-out rotor at room temperature without brake.
10. Carefully collect the brown-grayish layer of schizonts at the interface between the two suspensions using a Pasteur pipette, transfer to a new 50 mL tube, and add schizont culture medium to the collected cell suspension up to a volume of 40 mL.

11. Harvest the schizonts by centrifugation at $450 \times g$ for 8 min, discard the supernatant, and gently resuspend the schizont pellet in 2–10 mL fresh culture medium.
12. Distribute the schizont suspension among Eppendorf tubes (1 mL per tube). The parasites from one Eppendorf tube are used for one transfection.
13. Harvest the schizonts in the Eppendorf tube by centrifugation for 5 s at $16,000 \times g$ in a microcentrifuge and discard as much as possible of the supernatant.
14. Resuspend the schizonts in 100 μ L of Nucleofector solution containing 5–10 μ L of Upstream2Lox-U-5'-U-3' construct solution (5–10 μ g DNA).
15. Transfer the mixture to an electroporation cuvette and transfect in the Amaxa Nucleofector device using program U33.
16. Add 50 μ L schizont culture medium to the cuvette and transfer the solution (150 μ L) to an Eppendorf tube and immediately inject the mixture with an insulin syringe into a tail vein of one mouse.
17. One day after infection with transfected parasites provide the mouse with drinking water supplemented with pyrimethamine (70 mg/L) and 5-fluorocytosine (1 mg/mL) (*see Note 6*), with pH adjusted to 3.5–5.0.
18. Every day starting on day 5 post-injection collect a drop of blood from the mouse tail and check for the presence of GFP⁺ mCherry⁺ parasites by flow cytometry.
19. Once the parasitemia has reached 2–5%, collect the blood by cardiac puncture under terminal anesthesia using a 1 mL syringe containing 0.1 mL of heparin solution, and use the blood to prepare cryostocks, extract parasite genomic DNA to infect a new mouse.
20. Prepare cryostocks by adding 100 μ L of blood to 200 μ L of the blood freezing solution, mix gently and store at -80 °C or lower temperature.
21. Extract parasite DNA to check for construct integration (*see below*).
22. Infect a new mouse by injecting 100 μ L of blood intraperitoneally.
23. Every day after infection collect a drop of blood from the mouse and check for the presence of parasites by flow cytometry.
24. Once the parasitemia is above 0.1%, administer a single dose of 200 μ g rapamycin to the mouse by oral gavage (carefully inject 200 μ L Rapamune using an appropriate feeding needle).

25. Every day after rapamycin treatment collect a drop of blood from the mouse and check for the presence of GFP⁻ mCherry⁺ parasites by flow cytometry.
26. Once the parasitemia has reached 2–5%, collect the blood by cardiac puncture under terminal anesthesia using a 1-mL syringe containing 0.1 mL of heparin solution, and use the blood to prepare cryostocks, extract parasite genomic DNA to infect a new mouse.
27. Isolate pure populations of recombinant excised parasites by flow cytometry assisted sorting of GFP⁻ mCherry⁺ parasites or by parasite cloning by limiting dilution and injection into mice and check the parasite genotype (**Note 7**).
28. For the second transfection round, repeat **steps 1–20** using the Downstream1Lox-D-5'-D-3' construct to transfect Upstream-Floxed parasites generated at **step 27**, in order to generate GOI-Floxed mutants.

3.2.3 Construct Integration Checks

1. Design appropriate primers to confirm the integration of the Upstream2Lox-U-5'-U-3' in the *PbDiCre* genome, the complete excision of the GFP-hDHFR cassette in the Upstream-Floxed parasites, the integration of the Downstream1Lox-D-5'-D-3' in the genome of Upstream-Floxed parasites, and the excision of the GOI upon final conditional gene deletion. To detect construct integration, use a primer that binds outside the homologous flank in combination with a primer that binds inside the integrated construct (*see* Fig. 2 and Table 5). To detect a non-recombined locus, you can use the two primers that bind outside the homologous flanks, or design an additional primer that binds to a DNA sequence located between the two non-overlapping homology regions (*see* **Note 8**).
2. Remove mouse leucocytes from infected blood by filtration through a fibrous cellulose column. Pre-wash the column with PBS then add the blood in the column and elute with 10 mL PBS. Collect the throughput by gravity in a 15 mL tube.

Table 5
Primers that bind inside the construct cassettes for parasite genotyping

Primer	Target recombination events	Primer sequence
5' insert seq reverse	U-5' and D-5' (non-excised)	AGGAAAATATACACATGTATATA TAAAGAGG
3' insert seq forward	U-3' and D-3' (non-excised)	AATAATGTAAACAGTTATTCA TTTTTTAAGG

3. Centrifuge at $450 \times g$ for 8 min, discard the supernatant, resuspend the erythrocyte pellet in 0.2% w/v saponin solution, and gently mix to lyse erythrocytes.
4. Centrifuge at $450 \times g$ for 8 min, discard the supernatant, and resuspend the pellet in 1 mL PBS.
5. Centrifuge at $10,000 \times g$ for 2 min, discard the supernatant, and resuspend the pellet in 200 μ L PBS. At this step, samples can be stored at -20°C or processed for DNA extraction.
6. Extract genomic DNA using the genomic DNA extraction kit.
7. Perform Taq polymerase PCR amplification using gDNA from wild type (WT), pyrimethamine-selected and rapamycin-treated parasites, and primer combinations specific for the WT locus, for the 5' recombination event, for the 3' recombination event, or for DNA excision following rapamycin treatment. Use the same thermocycling program as described in Subheading 3.1 with the FastStart Taq DNA Polymerase (Roche).
8. Resolve and visualize the amplicons by agarose gel electrophoresis to ensure they are of expected size.

3.3 Induction of Conditional Gene Deletion

This section describes protocols to induce conditional deletion of the GOI in different stages of *P. berghei* GOI^{Floxed} parasites, by administering rapamycin to infected mice, infected mosquitoes, or infected cell cultures.

3.3.1 Conditional Gene Deletion in Asexual Blood Stages

1. Initiate a *P. berghei* GOI^{Floxed} blood stage infection: thaw frozen parasite cryostocks and immediately inject intraperitoneally into mice (100–150 μ L/mouse). Alternatively, inject fresh blood collected from a donor mouse. If necessary, include a control group of mice that will not be exposed to rapamycin (*see Note 9*).
2. Check daily the parasitemia: collect a drop of blood from the mouse tail and check for the presence of GFP⁺ mCherry⁺ parasites by flow cytometry, or by microscopy examination of Giemsa-stained blood smears (*see Note 5*).
3. When parasites are detectable in the peripheral blood, administer a single dose of 200 μ g rapamycin to mice by oral gavage (carefully administer 200 μ L Rapamune using an appropriate feeding needle).
4. Following rapamycin treatment, at appropriate time points, collect a drop of blood from the mouse tail and analyze by flow cytometry. The presence of GFP⁻ mCherry⁺ parasites confirms DNA excision (*see Note 10*).
5. Subsequent phenotyping includes the quantification of total parasitemia, the determination of the proportion of excised

(GFP⁻ mCherry⁺) and non-excised (GFP⁺ mCherry⁺) parasites, or any other appropriate assay.

6. If the parasitemia reaches 1%, collect the blood by cardiac puncture under terminal anesthesia using a 1-mL syringe containing 0.1 mL of heparin solution, and use the blood to prepare cryostocks and extract parasite genomic DNA for genotyping, as described in sect. 3.2.3.

3.3.2 *Conditional Gene Deletion in Sexual Blood Stages Prior to Transmission to Mosquitoes*

1. Initiate a *P. berghei* GOI^{Floxed} blood stage infection: thaw frozen parasite cryostocks and immediately inject intraperitoneally into mice (100–150 μ L/mouse). Alternatively, inject fresh blood collected from a donor mouse. If necessary, include a control group of mice that will not be exposed to rapamycin (*see Note 9*).
2. Check daily the parasitemia: collect a drop of blood from the mouse tail and check for the presence of GFP⁺ mCherry⁺ parasites by flow cytometry, or by microscopy examination of Giemsa-stained blood smears (*see Note 5*).
3. Once the parasitemia is above 1%, check for the presence of gametocytes on a Giemsa-stained blood smear and for the presence of exflagellating mature male gametocytes. Collect a drop of blood from the tail directly onto a glass slide and add a coverslip. Incubate the slide at room temperature for 8 min, and then observe it under the 40X objective of a light microscope with Phase Contrast. Search for the presence of exflagellation events in at least 10–15 different fields (*see Note 11*). If gametocytes are detected on the smear and exflagellation events are observed, then proceed to **step 4**.
4. Administer a single dose of 200 μ g rapamycin per mouse by oral gavage (carefully administer 200 μ L Rapamune using an appropriate feeding needle) (*see Note 9*).
5. The next day, quantify parasitemia by flow cytometry and verify the presence of exflagellation events as described in **step 3**, then proceed to mosquito infection.
6. Anesthetize mice by intra-peritoneal injection of 150 μ L ketamine / xylazine solution and place on the top of mosquito cages. Let the mosquitoes feed for 30–60 min on anesthetized mice. After mosquito feeding, euthanize the mice.
7. Keep infected mosquitoes at 21 °C with 70% relative humidity and feed with the 10% sucrose solution.
8. At appropriate time points, dissect mosquitoes and examine midguts and salivary glands for the presence of oocysts and sporozoites. The presence of GFP⁻ mCherry⁺ oocysts and/or sporozoites confirms DNA excision.

9. Subsequent phenotyping includes the quantification of oocyst or sporozoite numbers and the proportion of GFP⁻ mCherry⁺ parasites, or any other appropriate assay (*see Note 12*).

3.3.3 Conditional Gene Deletion in Mosquito Stages

1. Infect mosquitoes as described in Subheading 3.3.2 by feeding on a *P. berghei* GOI^{Floxed}-infected mouse (not exposed to rapamycin).
2. Keep infected mosquitoes at 21 °C with 70% relative humidity and feed with 10% sucrose.
3. Five days after mosquito infection, supplement the 10% sucrose solution with 1 µg/mL rapamycin. Refresh the solution every alternate day.
4. At appropriate time points, dissect mosquitoes and examine midguts and salivary glands for the presence of oocysts and sporozoites. The presence of GFP⁻ mCherry⁺ oocysts and/or sporozoites confirms DNA excision.
5. Subsequent phenotyping includes the quantification of oocyst or sporozoite numbers and the proportion of GFP⁻ mCherry⁺ parasites, or any other appropriate assay (*see Note 12*).

3.3.4 Conditional Gene Deletion in Liver Stages

1. Plate HepG2 cells in a collagen-coated 96-well plate (30,000 cells/well in complete DMEM culture medium).
2. The next day, collect *P. berghei* GOI^{Floxed} sporozoites from mosquito salivary glands and resuspend in complete culture medium at a density between 2×10^4 /mL and 2×10^5 /mL (*see Note 13*).
3. Add sporozoites to the HepG2 cell cultures: remove the medium from the wells and add 50 µL of the sporozoite suspension (10^3 to 10^4 sporozoites/well).
4. Centrifuge the plate at $800 \times g$ for 10 min, at 4 °C, without break, then transfer the plate to an incubator at 37 °C with 5% CO₂, and incubate for 3 h.
5. After 3 h, wash the cells twice with 200 µL of complete DMEM culture medium prewarmed at 37 °C.
6. Add 200 µL of complete DMEM culture medium supplemented with 100 nM rapamycin, then transfer the cells back to the incubator. Include control wells treated with DMSO diluted in culture medium.
7. At appropriate time points, examine cell cultures with a fluorescence microscope to detect GFP⁻ mCherry⁺ liver stage parasites.
8. Subsequent phenotyping includes the quantification of liver stage parasite numbers and the proportion of GFP⁻ mCherry⁺ parasites, by flow cytometry or microscopy, or any other appropriate assay.

4 Notes

1. Selection of homologous flanks upstream and downstream of the GOI must take into account the neighboring genes to avoid interfering with their transcriptional units. Selection can be guided by alignment of transcripts, when available. Please note that the D-5' insert can consist in the terminal portion of the GOI open reading frame followed by a convenient 3' UTR and can also include an epitope tag introduced, for example, at the C-terminus of the encoded protein. Introduction of a tag facilitates monitoring of protein depletion after conditional excision of the GOI. However, one must verify that introduction of the tag has no detrimental effect on the protein function.
2. The production and use of genetically modified organisms must strictly comply with regulatory requirements.
3. More details on the transfection and selection procedure can be found in [16].
4. All animal work must be performed in strict accordance with regulatory requirements, including the approval by an Ethics committee, and comply with the 3Rs rule.
5. We recommend flow cytometry to monitor the presence or absence of the GFP marker among mCherry⁺ parasites and evaluate the excision efficiency. For flow cytometry, collect a drop of blood in PBS in an FACS tube, vortex well and directly acquire at least 10,000 events on a flow cytometer equipped with appropriate lasers and filter sets to detect GFP and mCherry. While the percentage of GFP⁺ and/or mCherry⁺ events can be used to estimate the parasitemia, examination of Giemsa-stained blood smears generally provides more accurate counts.
6. The backbone of the pUpstream2Lox and pDownstream1Lox plasmids contains a yeast cytosine deaminase and uridyl phosphoribosyl transferase (yFCU) cassette, which confers susceptibility to 5-fluorocytosine (5-FC) and can be used as a negative selectable marker to eliminate parasites carrying residual episomal constructs. Please note that the addition of 5-FC is not mandatory.
7. For parasite cloning by limiting dilution, collect blood from a mouse at low parasitemia (0.1–0.5%) and prepare serial dilutions in RPMI medium to obtain a final solution containing 7 iRBCs/mL. Inject 100 µL of this solution (corresponding to 0.7 iRBCs) in a tail vein of 5–10 mice and follow the parasitemia until at least day 7. Once the parasitemia reaches 2%, collect the blood to prepare cryostocks and genomic DNA.

8. To exclude any contamination of the Upstream^{Floxed} parasites used for the second transfection by the mother *Pb*DiCre or by non-excised Upstream^{Floxed} parasites, it is important to perform PCR with specific primer combinations for all three possible genotypes.
9. It is important to isolate rapamycin-treated mice from untreated animals since rapamycin is excreted in the feces. Co-housing of treated and untreated mice can result in exposure of untreated mice to rapamycin due to coprophagy, causing undue excision of the floxed DNA in the parasite.
10. Excision efficiency can be easily assessed by flow cytometry or fluorescence microscopy to determine the proportion of excised (GFP⁻ mCherry⁺) parasites. Phenotyping must take into account that GFP is a very stable protein, and that the excised GOI can persist for a few days in asexual blood stages as an episome. Both phenomena can result in persistence of GFP⁺ mCherry⁺ parasites despite complete rapamycin-induced excision. If episome persistence is an issue, alternative strategies to position the LoxN sites must be considered (*see* Fig. 1c). Alternative methods to determine the efficiency of the conditional deletion include quantitative PCR to quantify excised versus non-excised DNA, and quantification of the GOI products at the mRNA and/or protein levels.
11. We suggest that mosquito feeding should be only performed when at least two exflagellation events are seen in each field. In addition, to avoid the transmission-blocking immune responses of the infected mice, it is preferable to transmit parasites before day 5 post-infection. If the number of parasites and/or exflagellation events are still low on day 4 post-infection, it is preferable to collect and transfer fresh blood into other mice.
12. Phenotyping in mosquito stages must take into account that rapamycin can have detrimental effects on oocyst formation and/or development due to inhibition of the Target Of Rapamycin (TOR) pathway. Typically, this results in a moderate reduction of the number of sporozoites produced in infected mosquitoes. It might be possible to mitigate these effects through adjustments in the rapamycin dose and/or timing of administration.
13. The number of sporozoites inoculated in each well depends on the experiment readout. Considering the fact that around 10–20% of *P. berghei* salivary gland sporozoites are infective *in vitro*, we usually add 1×10^4 sporozoites per well to monitor cell infection by flow cytometry, but only 1×10^3 for microscopy.

Acknowledgments

We thank Delphine Patarot, Béatrice Ardin, and Nathalie Adaes for helping us setting up the methodology. This work was supported by the Laboratoire d'Excellence ParaFrap (ANR-11-LABX-0024), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE15-0004 and ANR-16-CE15-0010), and the Fondation pour la Recherche Médicale (EQU201903007823).

References

1. Wu Y, Sifri CD, Lei HH et al (1995) Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:973–977. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.973>
2. Van Dijk MR, Janse CJ, Waters AP (1996) Expression of a plasmodium gene introduced into subtelomeric regions of *Plasmodium berghei* chromosomes. *Science* 271:662–665. <https://doi.org/10.1126/science.271.5249.662>
3. Cowman AF, Baldi DL, Healer J et al (2000) Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells. *FEBS Lett* 476:84–88
4. Ménard R, Heussler V, Yuda M, Nussenzweig V (2008) Plasmodium pre-erythrocytic stages: what's new? *Trends Parasitol* 24:564–569
5. Lacroix C, Giovannini D, Combe A et al (2011) FLP/FRT-mediated conditional mutagenesis in pre-erythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc* 6:1412–1428. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.363>
6. Bushell E, Gomes AR, Sanderson T et al (2017) Functional profiling of a Plasmodium genome reveals an abundance of essential genes. *Cell* 170:260–272.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.030>
7. Hamilton DL, Abremski K (1984) Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 178:481–486. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90154-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90154-2)
8. Sauer B (1998) Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14:381–392. <https://doi.org/10.1006/meth.1998.0593>
9. Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99–109
10. Jullien N, Sampieri F, Enjalbert A, Herman JP (2003) Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic Acids Res* 31:e131. <https://doi.org/10.1093/nar/gng131>
11. Collins CR, Das S, Wong EH et al (2013) Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle. *Mol Microbiol* 88:687–701. <https://doi.org/10.1111/mmi.12206>
12. Andenmatten N, Egarter S, Jackson AJ et al (2012) Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. *Nat Methods* 10:125–127. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2301>
13. Jones ML, Das S, Belda H et al (2016) A versatile strategy for rapid conditional genome engineering using loxP sites in a small synthetic intron in *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep* 6:21800. <https://doi.org/10.1038/srep21800>
14. Kent RS, Modrzynska KK, Cameron R et al (2018) Inducible developmental reprogramming redefines commitment to sexual development in the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Microbiol* 3:1206–1213
15. Fernandes P, Briquet S, Patarot D et al (2020) The dimerisable Cre recombinase allows conditional genome editing in the mosquito stages of *Plasmodium berghei*. *PLoS One* 15: e0236616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236616>
16. 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*. *Nat Protoc* 1:346–356. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.53>

BIBLIOGRAPHIE

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., & Krieger, M. (1996). Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science*, 271(5248), 518-520. <https://doi.org/10.1126/science.271.5248.518>
- Adeoye, G. O., & Nga, I. C. (2007). Comparison of Quantitative Buffy Coat technique (QBC) with Giemsa-stained thick film (GTF) for diagnosis of malaria. *Parasitology International*, 56(4), 308-312. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.06.007>
- Adini, A., & Warburg, A. (1999). Interaction of Plasmodium gallinaceum ookinetes and oocysts with extracellular matrix proteins. *Parasitology*, 119(4), 331-336. <https://doi.org/10.1017/S0031182099004874>
- Agnandji, S. T., Fernandes, J. F., Bache, E. B., & Ramharter, M. (2015). Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine: A systematic review of clinical Phase I–III trials. *Future Microbiology*, 10(10), 1553-1578. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.90>
- Agop-Nersesian, C., Pfahler, J., Lanzer, M., & Meissner, M. (2008). Functional expression of ribozymes in Apicomplexa: Towards exogenous control of gene expression by inducible RNA-cleavage. *International Journal for Parasitology*, 38(6), 673-681. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.015>
- Aikawa, M., Komata, Y., Asai, T., & Midorikawa, O. (1977). *Transmission and Scanning Electron Microscopy of Host Cell Entry by Toxoplasma gondii*. 87(2), 285-296.
- Aikawa, M., Miller, L., Johnson, J., & Rabbege, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *Journal of Cell Biology*, 77(1), 72-82. <https://doi.org/10.1083/jcb.77.1.72>
- Akaki, M., & Dvorak, J. (2005). A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites. *Journal of Experimental Biology*, 208(16), 3211-3218. <https://doi.org/10.1242/jeb.01756>
- Akhouri, R. R., Bhattacharyya, A., Pattnaik, P., Malhotra, P., & Sharma, A. (2004). Structural and functional dissection of the adhesive domains of Plasmodium falciparum thrombospondin-related anonymous protein (TRAP). *Biochemical Journal*, 379(3), 815-822. <https://doi.org/10.1042/bj20031500>
- Alexander, D. L., Arastu-Kapur, S., Dubremetz, J.-F., & Boothroyd, J. C. (2006). Plasmodium falciparum AMA1 Binds a Rhoptry Neck Protein Homologous to TgRON4, a Component of the Moving Junction in Toxoplasma gondii. *Eukaryotic Cell*, 5(7), 1169-1173. <https://doi.org/10.1128/EC.00040-06>
- Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., & Boothroyd, J. C. (2005). Identification

of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii* : A Collaboration between Distinct Secretary Organelles. *PLoS Pathogens*, 1(2), e17.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010017>

Aliprandini, E., Tavares, J., Panatieri, R. H., Thiberge, S., Yamamoto, M. M., Silvie, O., Ishino, T., Yuda, M., Dartevelle, S., Traincard, F., Boscardin, S. B., & Amino, R. (2018). Cytotoxic anti-circumsporozoite antibodies target malaria sporozoites in the host skin. *Nature Microbiology*, 3(11), 1224-1233. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0254-z>

Aly, A. S. I., & Matuschewski, K. (2005). A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *Journal of Experimental Medicine*, 202(2), 225-230. <https://doi.org/10.1084/jem.20050545>

Aly, A. S. I., Vaughan, A. M., & Kappe, S. H. I. (2009). Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 195-221. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073403>

Amino, R., Giovannini, D., Thiberge, S., Gueirard, P., Boisson, B., Dubremetz, J.-F., Prévost, M.-C., Ishino, T., Yuda, M., & Ménard, R. (2008). Host Cell Traversal Is Important for Progression of the Malaria Parasite through the Dermis to the Liver. *Cell Host & Microbe*, 3(2), 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.12.007>

Amino, R., Thiberge, S., Blazquez, S., Baldacci, P., Renaud, O., Shorte, S., & Ménard, R. (2007). Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nature Protocols*, 2(7), 1705-1712. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.120>

Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., & Ménard, R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, 12(2), 220-224. <https://doi.org/10.1038/nm1350>

Anders, R. F., Crewther, E., Margettst, M., Matthew, M. L. S. M., Pollock, B., & Pye, D. (1998). Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine*, 16(2/3), 240-247. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(97\)88331-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)88331-4)

Ando, K., Kuraishii, K., Nishikubo, K., Asami, T., Waidhet-Kouadio, P., Matsuoka, H., & Chinzei, Y. (1999). Sporozoite invasion of *Plasmodium berghei*, rodent malaria parasite, to the salivary glands of the vector mosquito, *Anopheles stephensi* : An electron microscopic study. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27(1), 7-12. <https://doi.org/10.2149/tmh1973.27.7>

Angrisano, F., Tan, Y.-H., Sturm, A., McFadden, G. I., & Baum, J. (2012). Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut – Placing the *Plasmodium* ookinete centre stage. *International Journal for Parasitology*, 42(6), 519-527. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.004>

- Annoura, T., Ploemen, I. H. J., van Schaijk, B. C. L., Sajid, M., Vos, M. W., van Gemert, G.-J., 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., & Khan, S. M. (2012). Assessing the adequacy of attenuation of genetically modified malaria parasite vaccine candidates. *Vaccine*, *30*(16), 2662-2670. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.010>
- Annoura, T., van Schaijk, B. C. L., Ploemen, I. H. J., Sajid, M., Lin, J., Vos, M. W., Dinmohamed, A. G., Inaoka, D. K., Rijpma, S. R., van Gemert, G.-J., Chevalley-Maurel, S., Kielbasa, S. M., Scheltinga, F., Franke-Fayard, B., Klop, O., Hermsen, C. C., Kita, K., Gego, A., Franetich, J.-F., ... 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), 2158-2170. <https://doi.org/10.1096/fj.13-241570>
- Arai, M., Billker, O., Morris, H. R., Panico, M., Delcroix, M., Dixon, D., Ley, S. V., & Sinden, R. E. (2001). Both mosquito-derived xanthurenic acid and a host blood-derived factor regulate gametogenesis of Plasmodium in the midgut of the mosquito. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *116*(1), 17-24. [http://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00299-7](http://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00299-7)
- Armstrong, C. M., & Goldberg, D. E. (2007). An FKBP destabilization domain modulates protein levels in Plasmodium falciparum. *Nature Methods*, *4*(12), 1007-1009. <https://doi.org/10.1038/nmeth1132>
- Arredondo, S. A., Cai, M., Takayama, Y., MacDonald, N. J., Anderson, D. E., Aravind, L., Clore, G. M., & Miller, L. H. (2012). Structure of the Plasmodium 6-cysteine s48/45 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(17), 6692-6697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204363109>
- Arredondo, S. A., & Kappe, S. H. I. (2017). The s48/45 six-cysteine proteins : Mediators of interaction throughout the Plasmodium life cycle. *International Journal for Parasitology*, *47*(7), 409-423. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.10.002>
- Arredondo, S. A., Swearingen, K. E., Martinson, T., Steel, R., Dankwa, D. A., Harupa, A., Camargo, N., Betz, W., Vigdorovich, V., Oliver, B. G., Kangwanransan, N., Ishino, T., Sather, N., Mikolajczak, S., Vaughan, A. M., Torii, M., Moritz, R. L., & Kappe, S. H. I. (2018). The Micronemal Plasmodium Proteins P36 and P52 Act in Concert to Establish the Replication-Permissive Compartment Within Infected Hepatocytes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00413>
- Ashley, E. A., Pyae Phyo, A., & Woodrow, C. J. (2018). Malaria. *The Lancet*, *391*(10130), 1608-1621. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30324-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30324-6)
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S. H. I., Schnieder, T., & Frevert, U. (2007). Release of Hepatic Plasmodium yoelii Merozoites into the Pulmonary Microvasculature. *PLoS Pathogens*, *3*(11), e171. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030171>

- Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson, A. B., van Rooijen, N., Schnieder, T., & Frevert, U. (2007). Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver. *Cellular Microbiology*, 9(2), 397-412. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00798.x>
- Bai, T., Becker, M., Gupta, A., Strike, P., Murphy, V. J., Anders, R. F., & Batchelor, A. H. (2005). Structure of AMA1 from Plasmodium falciparum reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36), 12736-12741. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501808102>
- Baker, R. P., Wijetilaka, R., & Urban, S. (2006). Two Plasmodium Rhomboid Proteases Preferentially Cleave Different Adhesins Implicated in All Invasive Stages of Malaria. *PLoS Pathogens*, 2(10), e113. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020113>
- Bando, H., Pradipta, A., Iwanaga, S., Okamoto, T., Okuzaki, D., Tanaka, S., Vega-Rodríguez, J., Lee, Y., Ma, J. S., Sakaguchi, N., Soga, A., Fukumoto, S., Sasai, M., Matsuura, Y., Yuda, M., Jacobs-Lorena, M., & Yamamoto, M. (2019). CXCR4 regulates Plasmodium development in mouse and human hepatocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 216(8), 1733-1748. <https://doi.org/10.1084/jem.20182227>
- Bano, N., Romano, J. D., Jayabalasingham, B., & Coppens, I. (2007). Cellular interactions of Plasmodium liver stage with its host mammalian cell. *International Journal for Parasitology*, 37(12), 1329-1341. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.005>
- Bargieri, D. Y., Andenmatten, N., Lagal, V., Thiberge, S., Whitelaw, J. A., Tardieux, I., Meissner, M., & Ménard, R. (2013). Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nature Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms3552>
- Bargieri, D. Y., Andenmatten, N., Tardieux, I., Meissner, M., & Ménard, R. (2014). Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites : The Junction Conundrum. *PLoS Pathogens*, 10(9), e1004273. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004273>
- Bargieri, D. Y., Thiberge, S., Tay, C. L., Carey, A. F., Rantz, A., Hischen, F., Lorthiois, A., Straschil, U., Singh, P., Singh, S., Triglia, T., Tsuboi, T., Cowman, A., Chitnis, C., Alano, P., Baum, J., Pradel, G., Lavazec, C., & Ménard, R. (2016). Plasmodium Merozoite TRAP Family Protein Is Essential for Vacuole Membrane Disruption and Gamete Egress from Erythrocytes. *Cell Host & Microbe*, 20(5), 618-630. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.015>
- Barillas-Mury, C., & Kumar, S. (2005). Plasmodium-mosquito interactions: A tale of dangerous liaisons: Plasmodium-mosquito interactions. *Cellular Microbiology*, 7(11), 1539-1545. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00615.x>
- Barragan, A., Brossier, F., & Sibley, L. D. (2005). Transepithelial migration of Toxoplasma gondii involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the

- parasite adhesin MIC2 : Barrier penetration by Toxoplasma. *Cellular Microbiology*, 7(4), 561-568. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00486.x>
- Bartoloni, A., & Zammarchi, L. (2012). Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1), e2012026. <https://doi.org/10.4084/mjhid.2012.026>
- Baruch, D. I., Gormely, J. A., Ma, C., Howard, R. J., & Pasloske, B. L. (1996). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3497-3502. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3497>
- Beier, J. C., Onyango, F. K., Koros, J. K., Ramadhan, M., Ogwang, R., Wirtz, R. A., Koech, D. K., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1991.tb00523.x>
- Ben Chaabene, R., Lentini, G., & Soldati-Favre, D. (2021). Biogenesis and discharge of the rhoptries : Key organelles for entry and hijack of host cells by the Apicomplexa. *Molecular Microbiology*, 115(3), 453-465. <https://doi.org/10.1111/mmi.14674>
- Bergman, L. W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T. M., Fox, S., Matuschewski, K., Nussenzweig, V., & Kappe, S. H. I. (2003). Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of Plasmodium sporozoites. *Journal of Cell Science*, 116(1), 39-49. <https://doi.org/10.1242/jcs.00194>
- Berna, A. Z., McCarthy, J. S., Wang, R. X., Saliba, K. J., Bravo, F. G., Cassells, J., Padovan, B., & Trowell, S. C. (2015). Analysis of Breath Specimens for Biomarkers of Plasmodium falciparum Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 212(7), 1120-1128. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv176>
- Bertiaux, E., Balestra, A. C., Bournonville, L., Louvel, V., Maco, B., Soldati-Favre, D., Brochet, M., Guichard, P., & Hamel, V. (2021). Expansion microscopy provides new insights into the cytoskeleton of malaria parasites including the conservation of a conoid. *PLOS Biology*, 19(3), e3001020. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001020>
- Besteiro, S., Dubremetz, J.-F., & Lebrun, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites : A key structure for invasion. *Cellular Microbiology*, 13(6), 797-805. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x>
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.-F., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000309>

- Bhanot, P., Frevert, U., Nussenzweig, V., & Persson, C. (2003). Defective sorting of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) inhibits Plasmodium infectivity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *126*(2), 263-273. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00295-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00295-5)
- Bhanot, P., Schauer, K., Coppens, I., & Nussenzweig, V. (2005). A Surface Phospholipase Is Involved in the Migration of Plasmodium Sporozoites through Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(8), 6752-6760. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411465200>
- Bijker, E. M., Bastiaens, G. J. H., Teirlinck, A. C., van Gemert, G.-J., Graumans, W., van de Vegte-Bolmer, M., Siebelink-Stoter, R., Arens, T., Teelen, K., Nahrendorf, W., Remarque, E. J., Roeffen, W., Jansens, A., Zimmerman, D., Vos, M., van Schaijk, B. C. L., Wiersma, J., van der Ven, A. J. A. M., de Mast, Q., ... Sauerwein, R. W. (2013). Protection against malaria after immunization by chloroquine prophylaxis and sporozoites is mediated by preerythrocytic immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(19), 7862-7867. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220360110>
- Billker, O. (2017). Cracking Ali Baba's code. *ELife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.28600>
- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A. E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R. E., & Morris, H. R. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, *392*(6673), 289-292. <https://doi.org/10.1038/32667>
- Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G., & Sinden, R. E. (1997). The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of Plasmodium berghei in vitro. *Parasitology*, *115*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1017/S0031182097008895>
- Bindschedler, A., Wacker, R., Egli, J., Eickel, N., Schmuckli-Maurer, J., Franke-Fayard, B. M., Janse, C. J., & Heussler, V. T. (2021). Plasmodium berghei sporozoites in nonreplicative vacuole are eliminated by a PI3P-mediated autophagy-independent pathway. *Cellular Microbiology*, *23*(1). <https://doi.org/10.1111/cmi.13271>
- Boothroyd, J. C., & Dubremetz, J.-F. (2008). Kiss and spit: The dual roles of Toxoplasma rhoptries. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(1), 79-88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>
- Boothroyd, J. C., Hehl, A., Knoll, L. J., & Manger, I. D. (1998). The surface of Toxoplasma: More and less. *International Journal for Parasitology*, *28*(1), 3-9. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00182-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00182-3)
- Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *58*, 1189-1205. <https://doi.org/10.1007/PL00000933>
- Bozdech, Z., Llinás, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J., & DeRisi, J. L. (2003). The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of Plasmodium falciparum.

PLoS Biology, 1(1), e5. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000005>

- Brennan, J. D. G., Kent, M., Dhar, R., Fujioka, H., & Kumar, N. (2000). Anopheles gambiae salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13859-13864. <https://doi.org/10.1073/pnas.250472597>
- Brundert, M., Ewert, A., Heeren, J., Behrendt, B., Ramakrishnan, R., Greten, H., Merkel, M., & 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. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000149381.16166.c6>
- Buguliskis, J. S., Brossier, F., Shuman, J., & Sibley, L. D. (2010). Rhomboid 4 (ROM4) Affects the Processing of Surface Adhesins and Facilitates Host Cell Invasion by Toxoplasma gondii. *PLoS Pathogens*, 6(4), e1000858. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000858>
- Bullen, H. E., Charnaud, S. C., Kalanon, M., Riglar, D. T., Dekiwadia, C., Kangwanrangsang, N., Torii, M., Tsuboi, T., Baum, J., Ralph, S. A., Cowman, A. F., de Koning-Ward, T. F., Crabb, B. S., & Gilson, P. R. (2012). Biosynthesis, Localization, and Macromolecular Arrangement of the Plasmodium falciparum Translocon of Exported Proteins (PTEX). *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 7871-7884. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.328591>
- Bullen, H. E., Tonkin, C. J., O'Donnell, R. A., Tham, W.-H., Papenfuss, A. T., Gould, S., Cowman, A. F., Crabb, B. S., & Gilson, P. R. (2009). A Novel Family of Apicomplexan Glideosome-associated Proteins with an Inner Membrane-anchoring Role. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25353-25363. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.036772>
- Burt, A. (2014). Heritable strategies for controlling insect vectors of disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1645), 20130432. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0432>
- Buscaglia, C. A., Coppens, I., Hol, W. G. J., & Nussenzweig, V. (2003). Sites of Interaction between Aldolase and Thrombospondin-related Anonymous Protein in Plasmodium. *Molecular Biology of the Cell*, 14(12), 4947-4957. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-06-0355>
- Bushell, E., Gomes, A. R., Sanderson, T., Anar, B., Girling, G., Herd, C., Metcalf, T., Modrzynska, K., Schwach, F., Martin, R. E., Mather, M. W., McFadden, G. I., Parts, L., Rutledge, G. G., Vaidya, A. B., Wengelnik, K., Rayner, J. C., & Billker, O. (2017). Functional Profiling of a Plasmodium Genome Reveals an Abundance of Essential Genes. *Cell*, 170(2), 260-272.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.030>
- Camus, D., & Hadley, T. (1985). A Plasmodium falciparum antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science*, 230(4725), 553-556.

<https://doi.org/10.1126/science.3901257>

- Cao, J., Kaneko, O., Thongkuiatkul, A., Tachibana, M., Otsuki, H., Gao, Q., Tsuboi, T., & Torii, M. (2009). Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Parasitology International*, *58*(1), 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.09.005>
- 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., & Mota, M. M. (2003). Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nature Medicine*, *9*(11), 1363-1369. <https://doi.org/10.1038/nm947>
- Carruthers, V. B., & Boothroyd, J. C. (2007). Pulling together: An integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current Opinion in Microbiology*, *10*(1), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>
- Carruthers, V. B., Giddings, O. K., & Sibley, L. D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cellular Microbiology*, *1*(3), 225-235. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00023.x>
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European Journal of Cell Biology*, *73*, 114-123.
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*, *31*(2), 421-428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01174.x>
- Carruthers, V. B., & Tomley, F. M. (2008). Microneme Proteins in Apicomplexans. In B. A. Burleigh & D. Soldati-Favre (Éds.), *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion* (Vol. 47, p. 33-45). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_2
- Carter, R., & Chen, D. H. (1976). Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria parasite. *Nature*, *263*(5572), 57-60. <https://doi.org/10.1038/263057a0>.
- Carter, R., Coulson, A., Bhatti, S., Taylor, B. J., & Elliott, J. F. (1995). Predicted disulfide-bonded structures for three uniquely related proteins of *Plasmodium falciparum*, Pfs230, Pfs4845 and Pf12. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *71*(2), 203-210. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)00054-Q](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00054-Q)
- Carter, R., Graves, P. M., Keister, D. B., & Quakyi, I. A. (1990). Properties of epitopes of Pfs 48/45, a target of transmission blocking monoclonal antibodies, on gametes of different isolates of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunology*, *12*(6), 587-603. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1990.tb00990.x>
- Carvalho, T. G., Thiberge, S., Sakamoto, H., & Menard, R. (2004). Conditional mutagenesis

- using site-specific recombination in *Plasmodium berghei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(41), 14931-14936. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404416101>
- Catanese, M. T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J. K., Paonessa, G., Rice, C. M., Cortese, R., Vitelli, A., & Nicosia, A. (2010). Role of Scavenger Receptor Class B Type I in Hepatitis C Virus Entry : Kinetics and Molecular Determinants. *Journal of Virology*, *84*(1), 34-43. <https://doi.org/10.1128/JVI.02199-08>
- Cerami, C., Frevert, U., Sinnis, P., Takacs, B., Clavijo, P., Santos, M. J., & Nussenzweig, V. (1992). The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell*, *70*(6), 1021-1033. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90251-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90251-7)
- C  r  de, O., Dubremetz, J. F., So  te, M., Desl  e, D., Vial, H., Bout, D., & Lebrun, M. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *Journal of Experimental Medicine*, *201*(3), 453-463. <https://doi.org/10.1084/jem.20041672>
- Cha, S.-J., Kim, M.-S., Pandey, A., & Jacobs-Lorena, M. (2016). Identification of GAPDH on the surface of *Plasmodium* sporozoites as a new candidate for targeting malaria liver invasion. *Journal of Experimental Medicine*, *213*(10), 2099-2112. <https://doi.org/10.1084/jem.20160059>
- Cha, S.-J., Park, K., Srinivasan, P., Schindler, C. W., van Rooijen, N., Stins, M., & Jacobs-Lorena, M. (2015). CD68 acts as a major gateway for malaria sporozoite liver infection. *Journal of Experimental Medicine*, *212*(9), 1391-1403. <https://doi.org/10.1084/jem.20110575>
- Chakravarty, S., Cockburn, I. A., Kuk, S., Overstreet, M. G., Sacci, J. B., & Zavala, F. (2007). CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nature Medicine*, *13*(9), 1035-1041. <https://doi.org/10.1038/nm1628>
- Charrin, S., Jouannet, S., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2014). Tetraspanins at a glance. *Journal of Cell Science*, jcs.154906. <https://doi.org/10.1242/jcs.154906>
- Charrin, S., Latil, M., Soave, S., Polesskaya, A., Chr  tien, F., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2013). Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81. *Nature Communications*, *4*(1), 1674. <https://doi.org/10.1038/ncomms2675>
- Charron, A. J., & Sibley, L. D. (2004). Molecular Partitioning during Host Cell Penetration by *Toxoplasma gondii* : Membrane Dynamics at the Moving Junction. *Traffic*, *5*(11), 855-867. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00228.x>
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). Babesia and its hosts : Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission.

Veterinary Research, 40(2), 37. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>

- Chen, L., Lopaticki, S., Riglar, D. T., Dekiwadia, C., Uboldi, A. D., Tham, W.-H., O'Neill, M. T., Richard, D., Baum, J., Ralph, S. A., & Cowman, A. F. (2011). An EGF-like Protein Forms a Complex with PfRh5 and Is Required for Invasion of Human Erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathogens*, 7(9), e1002199. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002199>
- Choumet, V., Attout, T., Chartier, L., Khun, H., Sautereau, J., Robbe-Vincent, A., Brey, P., Huerre, M., & Bain, O. (2012). Visualizing Non Infectious and Infectious *Anopheles gambiae* Blood Feedings in Naive and Saliva-Immunized Mice. *PLoS ONE*, 7(12), e50464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050464>
- Clough, B., & Frickel, E.-M. (2017). The *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole : An Evolving Host-Parasite Frontier. *Trends in Parasitology*, 33(6), 473-488. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.007>
- Cohen, J., Nussenzweig, V., Vekemans, J., & Leach, A. (2010). From the circumsporozoite protein to the RTS,S/AS candidate vaccine. *Human Vaccines*, 6(1), 90-96. <https://doi.org/10.4161/hv.6.1.9677>
- Collins, C. R., Das, S., Wong, E. H., Andenmatten, N., Stallmach, R., Hackett, F., Herman, J.-P., Müller, S., Meissner, M., & Blackman, M. J. (2013). Robust inducible Cre recombinase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* enables efficient gene deletion within a single asexual erythrocytic growth cycle. *Molecular Microbiology*, 88(4), 687-701. <https://doi.org/10.1111/mmi.12206>
- Collins, C. R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., & Blackman, M. J. (2009). An Inhibitory Antibody Blocks Interactions between Components of the Malarial Invasion Machinery. *PLoS Pathogens*, 5(1), e1000273. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000273>
- Combe, A., Moreira, C., Ackerman, S., Thiberge, S., Templeton, T. J., & Ménard, R. (2009). TREP, a novel protein necessary for gliding motility of the malaria sporozoite. *International Journal for Parasitology*, 39(4), 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.10.004>
- Coppi, A., Natarajan, R., Pradel, G., Bennett, B. L., James, E. R., Roggero, M. A., Corradin, G., Persson, C., Tewari, R., & Sinnis, P. (2011). The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *Journal of Experimental Medicine*, 208(2), 341-356. <https://doi.org/10.1084/jem.20101488>
- Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J. R., Bennett, B. L., Lawrence, R., Esko, J. D., Billker, O., & Sinnis, P. (2007). Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to *Plasmodium* Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Host Cells. *Cell Host & Microbe*,

- 2(5), 316-327. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.002>
- Counihan, N. A., Kalanon, M., Coppel, R. L., & de Koning-Ward, T. F. (2013). Plasmodium rhoptry proteins: Why order is important. *Trends in Parasitology*, 29(5), 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.03.003>
- Cowman, A. F., Tonkin, C. J., Tham, W.-H., & Duraisingh, M. T. (2017). The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host & Microbe*, 22(2), 232-245. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.003>
- Cox, F. E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors*, 3. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-5>
- Craig, A. G., Grau, G. E., Janse, C., Kazura, J. W., Milner, D., Barnwell, J. W., Turner, G., Langhorne, J., & on behalf of the participants of the Hinxton Retreat meeting on “Animal Models for Research on Severe Malaria”. (2012). The Role of Animal Models for Research on Severe Malaria. *PLoS Pathogens*, 8(2), e1002401. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002401>
- Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D. P., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C., & Wright, G. J. (2011). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *Nature*, 480(7378), 534-537. <https://doi.org/10.1038/nature10606>
- Danforth, H. D., Entzeroth, R., & Chobotar, B. (1992). Scanning and transmission electron microscopy of host cell pathology associated with penetration by Eimeria papillata sporozoites. *Parasitology Research*, 78(7), 570-573. <https://doi.org/10.1007/BF00936454>
- Das, S., Hertrich, N., Perrin, A. J., Withers-Martinez, C., Collins, C. R., Jones, M. L., Watermeyer, J. M., Fobes, E. T., Martin, S. R., Saibil, H. R., Wright, G. J., Treeck, M., Epp, C., & Blackman, M. J. (2015). Processing of Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein MSP1 Activates a Spectrin-Binding Function Enabling Parasite Egress from RBCs. *Cell Host & Microbe*, 18(4), 433-444. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.09.007>
- Dastre, A. (1901). Les sporozoaires. *Revue des Deux Mondes*, 6.
- Datoo, M. S., Natama, M. H., Somé, A., Traoré, O., Rouamba, T., Bellamy, D., Yameogo, P., Valia, D., Tegneri, M., Ouedraogo, F., Soma, R., Sawadogo, S., Sorgho, F., Derra, K., Rouamba, E., Orindi, B., Ramos Lopez, F., Flaxman, A., Cappuccini, F., ... Tinto, H. (2021). Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: A randomised controlled trial. *The Lancet*, 397(10287), 1809-1818. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00943-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00943-0)
- De Niz, M., Burda, P.-C., Kaiser, G., del Portillo, H. A., Spielmann, T., Frischknecht, F., &

- Heussler, V. T. (2017). Progress in imaging methods: Insights gained into Plasmodium biology. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(1), 37-54.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.158>
- Deans, J. A., Alderson, T., Thomas, A. W., Mitchell, G. H., Lennox, E. S., & Cohen, S. (1982). Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of Plasmodium knowlesi. *Clinical & Experimental Immunology*, *49*, 297-309.
- Debacker, M. J. (2000). *Paludisme : Histoire, mythes, croyances et idées reçues*.
- de Boer, J. G., Robinson, A., Powers, S. J., Burgers, S. L. G. E., Caulfield, J. C., Birkett, M. A., Smallegange, R. C., van Genderen, P. J. J., Bousema, T., Sauerwein, R. W., Pickett, J. A., Takken, W., & Logan, J. G. (2017). Odours of Plasmodium falciparum-infected participants influence mosquito-host interactions. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08978-9>
- de Koning-Ward, T. F., Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2015). Advances in molecular genetic systems in malaria. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(6), 373-387.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3450>
- Dietrich, M. H., Chan, L.-J., Adair, A., Keremane, S., Pymm, P., Lo, A. W., Cao, Y.-C., & Tham, W.-H. (2021). Nanobody generation and structural characterization of Plasmodium falciparum 6-cysteine protein Pf12p. *Biochemical Journal*, *478*(3), 579-595.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20200415>
- Dong, Y., Simões, M. L., Marois, E., & Dimopoulos, G. (2018). CRISPR/Cas9 -mediated gene knockout of Anopheles gambiae FREP1 suppresses malaria parasite infection. *PLOS Pathogens*, e1006898. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006898>
- Doolan, D. L., Dobaño, C., & Baird, J. K. (2009). Acquired Immunity to Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(1), 13-36. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08>
- Doud, M. B., Koksai, A. C., Mi, L.-Z., Song, G., Lu, C., & 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205737109>
- Draper, S. J., Sack, B. K., King, C. R., Nielsen, C. M., Rayner, J. C., Higgins, M. K., Long, C. A., & Seder, R. A. (2018). Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host & Microbe*, *24*(1), 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.008>
- Dubois, D. J., & Soldati-Favre, D. (2019). Biogenesis and secretion of micronemes in Toxoplasma gondii. *Cellular Microbiology*, *21*, e13018.
<https://doi.org/10.1111/cmi.13018>
- Dubremetz, J. F. (2007). Rhoptries are major players in Toxoplasma gondii invasion and host cell interaction. *Cellular Microbiology*, *9*(4), 841-848. <https://doi.org/10.1111/j.1462->

- Dumoulin, P. C., Trop, S. A., Ma, J., Zhang, H., Sherman, M. A., & Levitskaya, J. (2015). Flow Cytometry Based Detection and Isolation of Plasmodium falciparum Liver Stages In Vitro. *PLOS ONE*, *10*(6), e0129623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129623>
- Dundas, K., Shears, M. J., Sinnis, P., & Wright, G. J. (2018). Important Extracellular Interactions between Plasmodium Sporozoites and Host Cells Required for Infection. *Trends in Parasitology*, *35*(2), 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.008>
- Dundas, K., Shears, M. J., Sun, Y., Hopp, C. S., Crosnier, C., Metcalf, T., Girling, G., Sinnis, P., Billker, O., & Wright, G. J. (2018). Alpha-v–containing integrins are host receptors for the Plasmodium falciparum sporozoite surface protein, TRAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(17), 4477-4482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719660115>
- Duraisingh, M. T., Triglia, T., Ralph, S. A., Rayner, J. C., Barnwell, J. W., McFadden, G. I., & Cowman, A. F. (2003). Phenotypic variation of Plasmodium falciparum merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *The EMBO Journal*, *22*(5), 1047-1057. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg096>
- Dutta, S., Sullivan, J. S., Grady, K. K., Haynes, J. D., Komisar, J., Batchelor, A. H., Soisson, L., Diggs, C. L., Heppner, D. G., Lanar, D. E., Collins, W. E., & Barnwell, J. W. (2009). High Antibody Titer against Apical Membrane Antigen-1 Is Required to Protect against Malaria in the Aotus Model. *PLoS ONE*, *4*(12), e8138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008138>
- Ebrahimzadeh, Z., Mukherjee, A., Crochetière, M., Sergerie, A., Amiar, S., Thompson, L. A., Gagnon, D., Gaumont, D., Stahelin, R. V., Dacks, J. B., & Richard, D. (2019). A pan-apicomplexan phosphoinositide-binding protein acts in malarial microneme exocytosis. *EMBO Reports*, *20*(6). <https://doi.org/10.15252/embr.201847102>
- Ecker, A., Lewis, R. E., Eklund, E. H., Jayabalasingham, B., & Fidock, D. A. (2012). Tricks in Plasmodium's molecular repertoire – Escaping 3'UTR excision-based conditional silencing of the chloroquine resistance transporter gene. *International Journal for Parasitology*, *42*(11), 969-974. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.003>
- Ejigiri, I., Ragheb, D. R. T., Pino, P., Coppi, A., Bennett, B. L., Soldati-Favre, D., & Sinnis, P. (2012). Shedding of TRAP by a Rhomboid Protease from the Malaria Sporozoite Surface Is Essential for Gliding Motility and Sporozoite Infectivity. *PLoS Pathogens*, *8*(7), e1002725. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002725>
- Eksi, S., Czesny, B., van Gemert, G.-J., Sauerwein, R. W., Eling, W., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05284.x>

- Eksi, S., Suri, A., & Williamson, K. C. (2008). Sex- and stage-specific reporter gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *160*(2), 148-151. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.04.005>
- Eksi, S., & Williamson, K. C. (2002). Male-specific expression of the paralog of malaria transmission-blocking target antigen Pfs230, PfB0400w. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *122*(2), 127-130. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00091-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00091-9)
- Engelmann, S., Sinnis, P., & Matuschewski, K. (2006). Transgenic *Plasmodium berghei* sporozoites expressing β -galactosidase for quantification of sporozoite transmission. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *146*(1), 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.10.015>
- Erdman, L. K., & Kain, K. C. (2008). Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *6*(1-2), 82-99. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2007.10.001>
- Feller, T., Thom, P., Koch, N., Spiegel, H., Addai-Mensah, O., Fischer, R., Reimann, A., Pradel, G., Fendel, R., Schillberg, S., Scheuermayer, M., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079920>
- Fénéant, L., Levy, S., & Cocquerel, L. (2014). CD81 and Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Viruses*, *6*(2), 535-572. <https://doi.org/10.3390/v6020535>
- Feng, Y., Chen, L., Gao, L., Dong, L., Wen, H., Song, X., Luo, F., Cheng, G., & Wang, J. (2021). Rapamycin inhibits pathogen transmission in mosquitoes by promoting immune activation. *PLOS PATHOGENS*, *17*(2), e1009353. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009353>
- Ferguson, D. J. P., Balaban, A. E., Patzewitz, E.-M., Wall, R. J., Hopp, C. S., Poulin, B., Mohammed, A., Malhotra, P., Coppi, A., Sinnis, P., & Tewari, R. (2014). The Repeat Region of the Circumsporozoite Protein is Critical for Sporozoite Formation and Maturation in *Plasmodium*. *PLoS ONE*, *9*(12), e113923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113923>
- Fernandes, P., Briquet, S., Patarot, D., Loubens, M., Hoareau-Coudert, B., & Silvie, O. (2020). The dimerisable Cre recombinase allows conditional genome editing in the mosquito stages of *Plasmodium berghei*. *PLoS ONE*, *15*(10), e0236616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236616>
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S., & 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6235-6244.1999>
- 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., & Carucci, D. J. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, 419(6906), 520-526. <https://doi.org/10.1038/nature01107>
- Flores-Garcia, Y., Nasir, G., Hopp, C. S., Munoz, C., Balaban, A. E., Zavala, F., & Sinnis, P. (2018). Antibody-Mediated Protection against *Plasmodium* Sporozoites Begins at the Dermal Inoculation Site. *MBio*, 9(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02194-18>
- Foquet, L., Hermsen, C. C., Verhoye, L., van Gemert, G.-J., Cortese, R., Nicosia, A., Sauerwein, R. W., Leroux-Roels, G., & 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), 1784-1787. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv019>
- Frénal, K., Dubremetz, J.-F., Lebrun, M., & Soldati-Favre, D. (2017). Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nature Reviews Microbiology*, 15(11), 645-660. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.86>
- Frénal, K., Polonais, V., Marq, J.-B., Stratmann, R., Limenitakis, J., & Soldati-Favre, D. (2010). Functional Dissection of the Apicomplexan Glideosome Molecular Architecture. *Cell Host & Microbe*, 8(4), 343-357. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.002>
- Frevert, U. (1994). Malaria Sporozoite-Hepatocyte Interactions. *Experimental Parasitology*, 79, 206-210.
- Frevert, U., Engelmann, S., Zougbedé, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L., & Yee, H. (2005). Intravital Observation of *Plasmodium berghei* Sporozoite Infection of the Liver. *PLoS Biology*, 3(6), e192. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030192>
- Frevert, U., Galinski, M. R., Hügel, F.-U., Allon, N., Schreier, H., Smulevitch, S., Shakibaei, M., & Clavijo, P. (1998). Malaria circumsporozoite protein inhibits protein synthesis in mammalian cells. *The EMBO Journal*, 17(14), 3816-3826. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3816>
- 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.
- Frevert, U., Usynin, I., Baer, K., & Klotz, C. (2006). Nomadic or sessile : Can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cellular Microbiology*, 8(10), 1537-1546. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00777.x>
- Frevert, U., Usynin, I., Baer, K., & Klotz, C. (2008). *Plasmodium* Sporozoite Passage across

- the Sinusoidal Cell Layer. In B. A. Burleigh & D. Soldati-Favre (Éds.), *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion* (Vol. 47, p. 182-197). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_15
- Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., Olivo-Marin, J.-C., Shorte, S. L., & Ménard, R. (2004). Imaging movement of malaria parasites during transmission by Anopheles mosquitoes: Imaging Plasmodium sporozoites in mosquito salivary glands. *Cellular Microbiology*, 6(7), 687-694. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00395.x>
- Frischknecht, F., & Matuschewski, K. (2017). Plasmodium Sporozoite Biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(5), a025478. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025478>
- Fu, J., Sáenz, F. E., Reed, M. B., Balu, B., Singh, N., Blair, P. L., Cowman, A. F., & Adams, J. H. (2005). Targeted disruption of maeb1 in Plasmodium falciparum. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 141(1), 113-117. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.12.017>
- Galaway, F., Drought, L. G., Fala, M., Cross, N., Kemp, A. C., Rayner, J. C., & Wright, G. J. (2017). P113 is a merozoite surface protein that binds the N terminus of Plasmodium falciparum RH5. *Nature Communications*, 8(1), 14333. <https://doi.org/10.1038/ncomms14333>
- García, J., Curtidor, H., Pinzón, C. G., Vanegas, M., Moreno, A., & Patarroyo, M. E. (2009). Identification of conserved erythrocyte binding regions in members of the Plasmodium falciparum Cys6 lipid raft-associated protein family. *Vaccine*, 27(30), 3953-3962. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.039>
- Garnham, P. C. C., Baker, J. R., & Bird, R. G. (1962). Fine structure of cystic form of Toxoplasma gondii. *British Medical Journal*, 1(5271), 83-84. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5271.83>
- Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., & Beckers, C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in Toxoplasma gondii. *Journal of Cell Biology*, 165(3), 383-393. <https://doi.org/10.1083/jcb.200311137>
- Gerloff, D. L., Creasey, A., Maslau, S., & 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502378102>
- Ghai, M., Dutta, S., Hall, T., Freilich, D., & Ockenhouse, C. (2002). Identification, expression, and functional characterization of MAEBL, a sporozoite and asexual blood stage chimeric erythrocyte-binding protein of Plasmodium falciparum. *Molecular and Biochemical*

- Parasitology*, 123(1), 35-45. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00123-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00123-8)
- Ghosh, A. K., Devenport, M., Jethwaney, D., Kalume, D. E., Pandey, A., Anderson, V. E., Sultan, A. A., Kumar, N., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000265>
- Ghosh, A. K., & Jacobs-Lorena, M. (2009). Plasmodium sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.010>
- Ghosh, A. K., Ribolla, P. E. M., & Jacobs-Lorena, M. (2001). Targeting Plasmodium ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13278-13281. <https://doi.org/10.1073/pnas.241491198>
- Gilson, P. R., Nebl, T., Vukcevic, D., Moritz, R. L., Sargeant, T., Speed, T. P., Schofield, L., & Crabb, B. S. (2006). Identification and Stoichiometry of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(7), 1286-1299. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600035-MCP200>
- Giovannini, D., Späth, S., Lacroix, C., Perazzi, A., Bargieri, D., Lagal, V., Lebugle, C., Combe, A., Thiberge, S., Baldacci, P., Tardieux, I., & Ménard, R. (2011). Independent Roles of Apical Membrane Antigen 1 and Rhoptry Neck Proteins during Host Cell Invasion by Apicomplexa. *Cell Host & Microbe*, 10(6), 591-602. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.012>
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., & 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.333>
- Gonzalez, V., Combe, A., David, V., Malmquist, N. A., Delorme, V., Leroy, C., Blazquez, S., Ménard, R., & Tardieux, I. (2009). Host Cell Entry by Apicomplexa Parasites Requires Actin Polymerization in the Host Cell. *Cell Host & Microbe*, 5(3), 259-272. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.011>
- Govindasamy, K., Jebiwott, S., Jaijyan, D. K., Davidow, A., Ojo, K. K., Van Voorhis, W. C., Brochet, M., Billker, O., & Bhanot, P. (2016). Invasion of hepatocytes by Plasmodium sporozoites requires cGMP-dependent protein kinase and calcium dependent protein kinase 4. *Molecular Microbiology*, 102(2), 349-363. <https://doi.org/10.1111/mmi.13466>
- Grande, R., Antinori, S., Meroni, L., Menegon, M., & Severini, C. (2019). A case of

- Plasmodium malariae recurrence : Recrudescence or reinfection? *Malaria Journal*, 18, 169. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2806-y>
- Gueirard, P., Tavares, J., Thiberge, S., Bernex, F., Ishino, T., Milon, G., Franke-Fayard, B., Janse, C. J., Menard, R., & Amino, R. (2010). Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18640-18645. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009346107>
- Guérin, A., Corrales, R. M., Parker, M. L., Lamarque, M. H., Jacot, D., El Hajj, H., Soldati-Favre, D., Boulanger, M. J., & Lebrun, M. (2017). Efficient invasion by Toxoplasma depends on the subversion of host protein networks. *Nature Microbiology*, 2(10), 1358-1366. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0018-1>
- Guérin, A., El Hajj, H., Penarete-Vargas, D., Besteiro, S., & Lebrun, M. (2017). RON4L1 is a new member of the moving junction complex in Toxoplasma gondii. *Scientific Reports*, 7, 17907. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18010-9>
- Gupta, D. K., Dembele, L., Voorberg-van der Wel, A., Roma, G., Yip, A., Chuenchob, V., Kangwanrangsan, N., Ishino, T., Vaughan, A. M., Kappe, S. H., Flannery, E. L., Sattabongkot, J., Mikolajczak, S., Bifani, P., Kocken, C. H., & Diagana, T. T. (2019). The Plasmodium liver-specific protein 2 (LISP2) is an early marker of liver stage development. *ELife*, 8, e43362. <https://doi.org/10.7554/eLife.43362>
- Gwadz, R. W. (1976). Malaria: Successful Immunization Against the Sexual Stages of Plasmodium gallinaceum. *Science*, 193(4258), 1150-1151. <https://doi.org/10.1126/science.959832>
- Hakansson, S., Charron, A. J., & Sibley, L. D. (2001). Toxoplasma vacuoles : A two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *The EMBO Journal*, 20(12), 3132-3144. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.12.3132>
- Hall, N., Pain, A., Berriman, M., Churcher, C., Harris, B., Harris, D., Mungall, K., Bowman, S., Atkin, R., Baker, S., Barron, A., Brooks, K., Buckee, C. O., Burrows, C., Cherevach, I., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Christodoulou, Z., Clark, L., ... Rabbinowitsch, E. (2002). *Sequence of Plasmodium falciparum chromosomes 1, 3-9 and 13*. 419, pages 527-531.
- Hamada, S., Pionneau, C., Parizot, C., Silvie, O., Chardonnet, S., & Marinach, C. (2021). In-depth proteomic analysis of Plasmodium berghei sporozoites using trapped ion mobility spectrometry with parallel accumulation-serial fragmentation. *PROTEOMICS*, 21(6), 2000305. <https://doi.org/10.1002/pmic.202000305>
- Hänscheid, T., Pinto, B. G., Pereira, I., Cristino, J. M., & Valadas, E. (1999). Avoiding Misdiagnosis of Malaria : A Novel Automated Method Allows Specific Diagnosis, even in the Absence of Clinical Suspicion. *Emerging Infectious Diseases*, 5(6), 836-838.

<https://doi.org/10.3201/eid0506.990621>

- Harper, J. M., Hoff, E. F., & Carruthers, V. B. (2004). Multimerization of the *Toxoplasma gondii* MIC2 integrin-like A-domain is required for binding to heparin and human cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *134*(2), 201-212. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.12.001>
- Hart, R. J., Lawres, L., Fritzen, E., Mamoun, C. B., & Aly, A. S. I. (2015). Plasmodium yoelii Vitamin B5 Pantothenate Transporter Candidate is Essential for Parasite Transmission to the Mosquito. *Scientific Reports*, *4*, 5665. <https://doi.org/10.1038/srep05665>
- Harupa, A. (2015). *Identification and functional analysis of novel sporozoite surface proteins in the rodent malaria parasite Plasmodium yoelii*.
- Hawass, Z., Gad, Y. Z., Ismail, S., Khairat, R., Fathalla, D., Hasan, N., Ahmed, A., Elleithy, H., Ball, M., Gaballah, F., Wasef, S., Fateen, M., Amer, H., Gostner, P., Selim, A., Zink, A., & Pusch, C. M. (2010). Ancestry and pathology in king tutankhamun's family. *Journal of the American Medical Association*, *303*(7), 638-647. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.121>
- Hawking, F. (1948). Pre-erythrocytic stage in mammalian malaria parasites. *Nature*, *161*(4083), 175.
- He, X., Grigg, M. E., Boothroyd, J. C., & Garcia, K. C. (2002). Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nature Structural Biology*, *9*, 606-611. <https://doi.org/10.1038/nsb819>
- Healer, J., Crawford, S., Ralph, S., McFadden, G., & Cowman, A. F. (2002). Independent Translocation of Two Micronemal Proteins in Developing Plasmodium falciparum Merozoites. *Infection and Immunity*, *70*(10), 5751-5758. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5751-5758.2002>
- Healer, J., Triglia, T., Hodder, A. N., Gemmill, A. W., & Cowman, A. F. (2005). Functional Analysis of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 Utilizing Interspecies Domains. *Infection and Immunity*, *73*(4), 2444-2451. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2444-2451.2005>
- Hegge, S., Munter, S., Steinbüchel, M., Heiss, K., Engel, U., Matuschewski, K., & Frischknecht, F. (2010). Multistep adhesion of Plasmodium sporozoites. *The FASEB Journal*, *24*(7), 2222-2234. <https://doi.org/10.1096/fj.09-148700>
- Hegge, S., Uhrig, K., Streichfuss, M., Kynast-Wolf, G., Matuschewski, K., Spatz, J. P., & Frischknecht, F. (2012). Direct Manipulation of Malaria Parasites with Optical Tweezers Reveals Distinct Functions of Plasmodium Surface Proteins. *ACS Nano*, *6*(6), 4648-4662. <https://doi.org/10.1021/nn203616u>
- Hehl, A. B., Lekutis, C., Grigg, M. E., Bradley, P. J., Dubremetz, J.-F., Ortega-Barria, E., &

- Boothroyd, J. C. (2000). Toxoplasma gondii Homologue of Plasmodium Apical Membrane Antigen 1 Is Involved in Invasion of Host Cells. *Infection and Immunity*, 68(12), 7078-7086. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.7078-7086.2000>
- Heintzelman, M. B., & Schwartzman, J. D. (1997). A Novel Class of Unconventional Myosins from Toxoplasma gondii. *Journal of Molecular Biology*, 271(1), 139-146. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1167>
- Heiss, K., Nie, H., Kumar, S., Daly, T. M., Bergman, L. W., & 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. <https://doi.org/10.1128/EC.00089-08>
- Hellmann, J. K., Münter, S., Kudryashev, M., Schulz, S., Heiss, K., Müller, A.-K., Matuschewski, K., Spatz, J. P., Schwarz, U. S., & Frischknecht, F. (2011). Environmental Constraints Guide Migration of Malaria Parasites during Transmission. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002080. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002080>
- Hemingway, J. (2014). The role of vector control in stopping the transmission of malaria : Threats and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1645), 20130431. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0431>
- Herm-Gotz, A., Weiss, S., Stratmann, R., Fujita-Becker, S., Ruff, C., Meyhöfer, E., Soldati, T., Manstein, D. J., Geeves, M. A., & Soldati, D. (2002). Toxoplasma gondii myosin A and its light chain : A fast, single-headed, plus-end-directed motor. *The EMBO Journal*, 21(9), 2149-2158. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2149>
- 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., ... Narum, D. L. (2015). Reversible Conformational Change in the Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein Masks Its Adhesion Domains. *Infection and Immunity*, 83(10), 3771-3780. <https://doi.org/10.1128/IAI.02676-14>
- Hillyer, J. F., Barreau, C., & Vernick, K. D. (2007). Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *International Journal for Parasitology*, 37(6), 673-681. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.12.007>
- 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., & 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.

<https://doi.org/10.1086/339409>

- Hsieh, F.-L., Turner, L., Bolla, J. R., Robinson, C. V., Lavstsen, T., & Higgins, M. K. (2016). The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite. *Nature Communications*, 7, 12837. <https://doi.org/10.1038/ncomms12837>
- Hu, K., Roos, D. S., & Murray, J. M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Biology*, 156(6), 1039-1050. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112086>
- Huynh, M.-H., & Carruthers, V. B. (2006). *Toxoplasma* MIC2 Is a Major Determinant of Invasion and Virulence. *PLoS Pathogens*, 2(8), e84. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020084>
- Huynh, M.-H., Liu, B., Henry, M., Liew, L., Matthews, S. J., & Carruthers, V. B. (2015). Structural Basis of *Toxoplasma gondii* MIC2-associated Protein Interaction with MIC2. *Journal of Biological Chemistry*, 290(3), 1432-1441. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.613646>
- Huynh, M.-H., Rabenau, K. E., Harper, J. M., Beatty, W. L., Sibley, L. D., & Carruthers, V. B. (2003). Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 22(9), 2082-2090. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg217>
- Ishino, T., Chinzei, Y., & Yuda, M. (2004). A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection† : Role of a MACPF-related protein in the malarial life cycle. *Cellular Microbiology*, 7(2), 199-208. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00447.x>
- 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 : Key molecules to commit to hepatocyte infection. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1264-1275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04801.x>
- Ishino, T., Murata, E., Tokunaga, N., Baba, M., Tachibana, M., Thongkukiatkul, A., Tsuboi, T., & Torii, M. (2019). Rhoptry neck protein 2 expressed in Plasmodium sporozoites plays a crucial role during invasion of mosquito salivary glands. *Cellular Microbiology*, 21(1), e12964. <https://doi.org/10.1111/cmi.12964>
- Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020004>
- Itani, S., Torii, M., & Ishino, T. (2014). D-Glucose concentration is the key factor facilitating liver stage maturation of Plasmodium. *Parasitology International*, 63(4), 584-590.

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.03.004>

- Jacot, D., Tosetti, N., Pires, I., Stock, J., Graindorge, A., Hung, Y.-F., Han, H., Tewari, R., Kursula, I., & Soldati-Favre, D. (2016). An Apicomplexan Actin-Binding Protein Serves as a Connector and Lipid Sensor to Coordinate Motility and Invasion. *Cell Host & Microbe*, *20*(6), 731-743. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.020>
- Jager, M. M., Murk, J. L., Piqué, R. D., Hekker, T. A. M., & Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (2011). Five-minute Giemsa stain for rapid detection of malaria parasites in blood smears. *Tropical Doctor*, *41*(1), 33-35. <https://doi.org/10.1258/td.2010.100218>
- Janse, C. J., Franke-Fayard, B., Mair, G. R., Ramesar, J., Thiel, C., Engelmann, S., Matuschewski, K., Gemert, G. J. van, Sauerwein, R. W., & Waters, A. P. (2006). High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *145*(1), 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.09.007>
- Janse, C. J., Kroeze, H., van Wigcheren, A., Mededovic, S., Fonager, J., Franke-Fayard, B., Waters, A. P., & Khan, S. M. (2011). A genotype and phenotype database of genetically modified malaria-parasites. *Trends in Parasitology*, *27*(1), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.016>
- Jewett, T. J., & 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. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00113-8)
- Jimah, J. R., Salinas, N. D., Sala-Rabanal, M., Jones, N. G., Sibley, L. D., Nichols, C. G., Schlesinger, P. H., & Tolia, N. H. (2016). Malaria parasite CelTOS targets the inner leaflet of cell membranes for pore-dependent disruption. *ELife*, *5*, e20621. <https://doi.org/10.7554/eLife.20621>
- Jones, M. L., Das, S., Belda, H., Collins, C. R., Blackman, M. J., & Treeck, M. (2016). A versatile strategy for rapid conditional genome engineering using loxP sites in a small synthetic intron in *Plasmodium falciparum*. *Scientific Reports*, *6*(1), 21800. <https://doi.org/10.1038/srep21800>
- Joy, D. A., Feng, X., Mu, J., Furuya, T., Chotivanich, K., Krettli, A. U., Ho, M., Wang, A., White, N. J., Suh, E., Beerli, P., & Su, X.-Z. (2003). Early Origin and Recent Expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*, *300*(5617), 318-321. <https://doi.org/10.1126/science.1081449>
- Jullien, N., Sampieri, F., Enjalbert, A., & Herman, J.-P. (2003). Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic Acids Research*, *31*(21), e131. <https://doi.org/10.1093/nar/gng131>

- Jung, C., Lee, C. Y.-F., & Grigg, M. E. (2004). The SRS superfamily of Toxoplasma surface proteins. *International Journal for Parasitology*, *34*(3), 285-296.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.004>
- Kadota, K., Ishino, T., Matsuyama, T., Chinzei, Y., Yuda, M., & Law, J. H. (2004). Essential Role of Membrane-Attack Protein in Malarial Transmission to Mosquito Host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(46), 16310-16315.
- Kaiser, K., Camargo, N., Coppens, I., Morrissey, J. M., Vaidya, A. B., & Kappe, S. H. I. (2004). A member of a conserved Plasmodium protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *133*(1), 15-26.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.08.009>
- Kaiser, K., Matuschewski, K., Camargo, N., Ross, J., & Kappe, S. H. I. (2004). Differential transcriptome profiling identifies Plasmodium genes encoding pre-erythrocytic stage-specific proteins. *Molecular Microbiology*, *51*(5), 1221-1232.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03909.x>
- Kan, A., Tan, Y.-H., Angrisano, F., Hanssen, 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., & 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. <https://doi.org/10.1111/cmi.12283>
- Kania, A., & Klein, R. (2016). Mechanisms of ephrin–Eph signalling in development, physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(4), 240-256.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2015.16>
- Kappe, S. H. I., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V., & Ménard, R. (1999). Conservation of a Gliding Motility and Cell Invasion Machinery in Apicomplexan Parasites. *The Journal of Cell Biology*, *147*(5), 937-944.
<https://doi.org/10.1083/jcb.147.5.937>
- 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., & Nussenzweig, V. (2001). Exploring the transcriptome of the malaria sporozoite stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(17), 9895-9900.
<https://doi.org/10.1073/pnas.171185198>
- Kappe, S. H. I., Noe, A. R., Fraser, T. S., Blair, P. L., & Adams, J. H. (1998). A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(3), 1230-1235. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1230>
- Kariu, T., Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y., & Yuda, M. (2006). CelTOS, a novel malarial

- protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts : A protein that mediates malarial transmission. *Molecular Microbiology*, 59(5), 1369-1379.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05024.x>
- Kariu, T., Yuda, M., Yano, K., & Chinzei, Y. (2002). MAEBL Is Essential for Malarial Sporozoite Infection of the Mosquito Salivary Gland. *Journal of Experimental Medicine*, 195(10), 1317-1323. <https://doi.org/10.1084/jem.20011876>
- Karunamoorthi, K. (2014). The counterfeit anti-malarial is a crime against humanity : A systematic review of the scientific evidence. *Malaria Journal*, 13(1), 209. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-209>
- 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., & Kappe, S. H. I. (2015). 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.02230-14>
- Kaushansky, A., Douglass, A. N., Arang, N., Vigdorovich, V., Dambrauskas, N., Kain, H. S., Austin, L. S., Sather, D. N., & Kappe, S. H. I. (2015). Malaria parasites target the hepatocyte receptor EphA2 for successful host infection. *Science*, 350(6264), 1089-1092. <https://doi.org/10.1126/science.aad3318>
- Kaushansky, A., & Kappe, S. H. (2015). Selection and refinement : The malaria parasite's infection and exploitation of host hepatocytes. *Current Opinion in Microbiology*, 26, 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.013>
- Keeley, A., & Soldati, D. (2004). The glideosome : A molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends in Cell Biology*, 14(10), 528-532. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.08.002>
- Kennedy, A. T., Schmidt, C. Q., Thompson, J. K., Weiss, G. E., Taechalertpaisarn, T., Gilson, P. R., Barlow, P. N., Crabb, B. S., Cowman, A. F., & Tham, W.-H. (2016). Recruitment of Factor H as a Novel Complement Evasion Strategy for Blood-Stage Plasmodium falciparum Infection. *The Journal of Immunology*, 196(3), 1239-1248. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501581>
- Kent, R. S., Modrzynska, K. K., Cameron, R., Philip, N., Billker, O., & Waters, A. P. (2018). Inducible developmental reprogramming redefines commitment to sexual development in the malaria parasite Plasmodium berghei. *Nature Microbiology*, 3(11), 1206-1213. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0223-6>
- Kessler, H., Herm-Götz, A., Hegge, S., Rauch, M., Soldati-Favre, D., Frischknecht, F., & Meissner, M. (2008). Microneme protein 8 – a new essential invasion factor in Toxoplasma gondii. *Journal of Cell Science*, 121(7), 947-956. <https://doi.org/10.1242/jcs.022350>

- King, C. A. (1988). Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitology Today*, 4(11), 315-319. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90113-5](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90113-5)
- Klug, D., & Frischknecht, F. (2017). Motility precedes egress of malaria parasites from oocysts. *ELife*, 6, e19157. <https://doi.org/10.7554/eLife.19157>
- Klug, D., Goellner, S., Kehrer, J., Sattler, J., Strauss, L., Singer, M., Lu, C., Springer, T. A., & Frischknecht, F. (2020). Evolutionarily distant I domains can functionally replace the essential ligand-binding domain of Plasmodium TRAP. *ELife*, 9, e57572. <https://doi.org/10.7554/eLife.57572>
- Klug, D., Kehrer, J., Frischknecht, F., & Singer, M. (2018). A synthetic promoter for multi-stage expression to probe complementary functions of Plasmodium adhesins. *Journal of Cell Science*, 131(20), jcs210971. <https://doi.org/10.1242/jcs.210971>
- Kojin, B. B., & Adelman, Z. N. (2019). The Sporozoite's Journey Through the Mosquito : A Critical Examination of Host and Parasite Factors Required for Salivary Gland Invasion. *Frontiers in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00284>
- Kono, M., Prusty, D., Parkinson, J., & Gilberger, T. W. (2013). The apicomplexan inner membrane complex. *Frontiers in Bioscience*, 18, 982-992. <https://doi.org/10.2741/4157>
- Koreny, L., Zeeshan, M., Barylyuk, K., Tromer, E. C., van Hooff, J. J. E., Brady, D., Ke, H., Chelaghma, S., Ferguson, D. J. P., Eme, L., Tewari, R., & Waller, R. F. (2021). Molecular characterization of the conoid complex in Toxoplasma reveals its conservation in all apicomplexans, including Plasmodium species. *PLOS Biology*, 19(3), e3001081. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001081>
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J., & Blasig, I. E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 631-645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.10.018>
- Kremer, K., Kamin, D., Rittweger, E., Wilkes, J., Flammer, H., Mahler, S., Heng, J., Tonkin, C. J., Langsley, G., Hell, S. W., Carruthers, V. B., Ferguson, D. J. P., & Meissner, M. (2013). An Overexpression Screen of Toxoplasma gondii Rab-GTPases Reveals Distinct Transport Routes to the Micronemes. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003213. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003213>
- Krotoski, W. A. (1982). Observations on Early and Late Post-Sporozoite Tissue Stages in Primate Malaria. I. Discovery of a New Latent Form of Plasmodium Cynomolgi (The Hypnozoite), and Failure to Detect Hepatic Forms Within the First 24 Hours After Infection. *Am J Trop Med Hyg*, 31(1), 24-35.
- Krotoski, W. A. (1985). Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(1), 1-11.

[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(85\)90221-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(85)90221-4)

- 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., Noah Sather, D., Murphy, S. C., & Kappe, S. H. I. (2017). Complete attenuation of genetically engineered Plasmodium falciparum sporozoites in human subjects. *Science Translational Medicine*, 9(371), eaad9099. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad9099>
- Kudryashev, M., Lepper, S., Stanway, R., Bohn, S., Baumeister, W., Cyrklaff, M., & Frischknecht, F. (2010). Positioning of large organelles by a membrane-associated cytoskeleton in Plasmodium sporozoites. *Cellular Microbiology*, 12(3), 362-371. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01399.x>
- Kumar, H., Sattler, J. M., Singer, M., Heiss, K., Reinig, M., Hammerschmidt-Kamper, C., Heussler, V., Mueller, A.-K., & Frischknecht, F. (2016). Protective efficacy and safety of liver stage attenuated malaria parasites. *Scientific Reports*, 6(1), 26824. <https://doi.org/10.1038/srep26824>
- Kumar, N. (1987). Target antigens of malaria transmission blocking immunity exist as a stable membrane bound complex. *Parasite Immunology*, 9(3), 321-335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1987.tb00511.x>
- Kumar, N., & Wikel, B. (1992). Further characterization of interactions between gamete surface antigens of Plasmodium falciparum. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 53(1-2), 113-120. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90013-A](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90013-A)
- Labaied, M., Harupa, A., Dumpit, R. F., Coppens, I., Mikolajczak, S. A., & 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.00225-07>
- Lacroix, C., & Ménard, R. (2008). TRAP-like protein of Plasmodium sporozoites: Linking gliding motility to host-cell traversal. *Trends in Parasitology*, 24(10), 431-434. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.07.003>
- Lamarque, M. H., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.-F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., & Lebrun, M. (2011). The RON2-AMA1 Interaction is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites. *PLoS Pathogens*, 7(2), e1001276. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>
- 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., & Lebrun, M. (2014). Plasticity and redundancy among AMA–RON pairs ensure host cell entry of Toxoplasma parasites.

Nature Communications, 5(1), 4098. <https://doi.org/10.1038/ncomms5098>

- Landschulz, K. T., Pathak, R. K., Rigotti, A., Krieger, M., & 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. *Journal of Clinical Investigation*, 98(4), 984-995. <https://doi.org/10.1172/JCI118883>
- Langlois, A.-C., Manzoni, G., Vincensini, L., Coppée, R., Marinach, C., Guérin, M., Huby, T., Carrière, V., Cosset, F.-L., Dreux, M., Rubinstein, E., & Silvie, O. (2020). Molecular determinants of SR-B1-dependent Plasmodium sporozoite entry into hepatocytes. *Scientific Reports*, 10(1), 13509. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70468-2>
- Langlois, A.-C., Marinach, C., Manzoni, G., & Silvie, O. (2018). Plasmodium sporozoites can invade hepatocytic cells independently of the Ephrin receptor A2. *PLOS ONE*, 13(7), e0200032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200032>
- Lasonder, E., Janse, C. J., van Gemert, G.-J., Mair, G. R., Vermunt, A. M. W., Douradinha, B. G., van Noort, V., Huynen, M. A., Luty, A. J. F., Kroeze, H., Khan, S. M., Sauerwein, R. W., Waters, A. P., Mann, M., & Stunnenberg, H. G. (2008). Proteomic Profiling of Plasmodium Sporozoite Maturation Identifies New Proteins Essential for Parasite Development and Infectivity. *PLoS Pathogens*, 4(10), e1000195. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000195>
- Laurentino, E. C., Taylor, S., Mair, G. R., Lasonder, E., Bartfai, R., Stunnenberg, H. G., Kroeze, H., Ramesar, J., Franke-Fayard, B., Khan, S. M., Janse, C. J., & Waters, A. P. (2011). Experimentally controlled downregulation of the histone chaperone FACT in Plasmodium berghei reveals that it is critical to male gamete fertility. *Cellular Microbiology*, 13(12), 1956-1974. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01683.x>
- Laval, G., Peyrégne, S., Zidane, N., Harmant, C., Renaud, F., Patin, E., Prugnolle, F., & Quintana-Murci, L. (2019). Recent Adaptive Acquisition by African Rainforest Hunter-Gatherers of the Late Pleistocene Sickle-Cell Mutation Suggests Past Differences in Malaria Exposure. *The American Journal of Human Genetics*, 104(3), 553-561. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.02.007>
- Laveran, A. (1881). *Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme : Description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre.*
- Lebrun, M., Carruthers, V. B., & Cesbron-Delauw, M.-F. (2020). Toxoplasma secretory proteins and their roles in parasite cell cycle and infection. In *Toxoplasma gondii (third edition)* (p. 607-704). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00014-1>
- Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P. J., Vial, H., & Dubremetz, J. F. (2005). The rhoptry neck protein RON4 relocalizes at the moving junction during Toxoplasma gondii invasion. *Cellular Microbiology*, 7(12), 1823-1833.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00646.x>

- Lee, S.-K., Wang, B., Han, J.-H., Nyunt, M. H., Muh, F., Chootong, P., Ha, K.-S., Park, W. S., Hong, S.-H., Park, J.-H., & Han, E.-T. (2016). Characterization of Pv92, a Novel Merozoite Surface Protein of *Plasmodium vivax*. *The Korean Journal of Parasitology*, *54*(4), 385-391. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.4.385>
- Lekutis, C., Ferguson, D. J. P., Grigg, M. E., Camps, M., & Boothroyd, J. C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: Variations on a theme. *International Journal for Parasitology*, *31*(12), 1285-1292. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00261-2)
- Lengeler, C. (2004). Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000363.pub2>
- Lentini, G., Dubois, D. J., Maco, B., Soldati-Favre, D., & Frénel, K. (2019). The roles of Centrin 2 and Dynein Light Chain 8a in apical secretory organelles discharge of *Toxoplasma gondii*. *Traffic*, *20*(8), 583-600. <https://doi.org/10.1111/tra.12673>
- Lim, L., & McFadden, G. I. (2010). The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1541), 749-763. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0273>
- Lin, J., Annoura, T., Sajid, M., Chevalley-Maurel, S., Ramesar, J., Klop, O., Franke-Fayard, B. M. D., Janse, C. J., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029289>
- Lindner, S. E., Swearingen, K. E., Harupa, A., Vaughan, A. M., Sinnis, P., Moritz, R. L., & Kappe, S. H. I. (2013). Total and Putative Surface Proteomics of Malaria Parasite Salivary Gland Sporozoites. *Molecular & Cellular Proteomics*, *12*(5), 1127-1143. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.024505>
- Lindner, S. E., Swearingen, K. E., Shears, M. J., Walker, M. P., Vrana, E. N., Hart, K. J., Minns, A. M., Sinnis, P., Moritz, R. L., & Kappe, S. H. I. (2019). Transcriptomics and proteomics reveal two waves of translational repression during the maturation of malaria parasite sporozoites. *Nature Communications*, *10*(1), 4964. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12936-6>
- Lisabeth, E. M., Falivelli, G., & Pasquale, E. B. (2013). Eph Receptor Signaling and Ephrins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(9), a009159. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009159>
- Lopaticki, S., Maier, A. G., Thompson, J., Wilson, D. W., Tham, W.-H., Triglia, T., Gout, A., Speed, T. P., Beeson, J. G., Healer, J., & Cowman, A. F. (2011). Reticulocyte and Erythrocyte Binding-Like Proteins Function Cooperatively in Invasion of Human

- Erythrocytes by Malaria Parasites. *Infection and Immunity*, 79(3), 1107-1117.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01021-10>
- Loubens, M., Vincensini, L., Fernandes, P., Briquet, S., Marinach, C., & Silvie, O. (2021). Plasmodium sporozoites on the move : Switching from cell traversal to productive invasion of hepatocytes. *Molecular Microbiology*, 115(5), 870-881.
<https://doi.org/10.1111/mmi.14645>
- Lyke, K. E., Ishizuka, A. S., Berry, A. A., Chakravarty, S., DeZure, A., Enama, M. E., James, E. R., Billingsley, P. F., Gunasekera, A., Manoj, A., Li, M., Ruben, A. J., Li, T., Eappen, A. G., Stafford, R. E., Kc, N., Murshedkar, T., Mendoza, F. H., Gordon, I. J., ... Seder, R. A. (2017). Attenuated PfSPZ Vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(10), 2711-2716.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1615324114>
- Lyon, M., Deakin, J. A., & Gallagher, J. T. (1994). Liver heparan sulfate structure. A novel molecular design. *Journal of Biological Chemistry*, 269(15), 11208-11215.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)78112-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)78112-5)
- MacRaild, C. A., F. Anders, R., Foley, M., & S. Norton, R. (2011). Apical Membrane Antigen 1 as an Anti-Malarial Drug Target. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(16), 2039-2047. <https://doi.org/10.2174/156802611796575885>
- Mahmoudi, S., & Keshavarz, H. (2018). Malaria Vaccine Development : The Need for Novel Approaches : A Review Article. *Iran J Parasitol*, 13(1), 10.
- Maier, A. G., Duraisingh, M. T., Reeder, J. C., Patel, S. S., Kazura, J. W., Zimmerman, P. A., & Cowman, A. F. (2003). Plasmodium falciparum erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nature Medicine*, 9(1), 87-92.
<https://doi.org/10.1038/nm807>
- Manzoni, G., Briquet, S., Risco-Castillo, V., Gaultier, C., Topçu, S., Ivănescu, M. L., Franetich, J.-F., Hoareau-Coudert, B., Mazier, D., & Silvie, O. (2015). A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites. *Scientific Reports*, 4(1), 4760. <https://doi.org/10.1038/srep04760>
- Manzoni, G., Marinach, C., Topçu, S., Briquet, S., Grand, M., Tolle, M., Gransagne, M., Lescar, J., Andolina, C., Franetich, J.-F., Zeisel, M. B., Huby, T., Rubinstein, E., Snounou, G., Mazier, D., Nosten, F., Baumert, T. F., & Silvie, O. (2017). Plasmodium P36 determines host cell receptor usage during sporozoite invasion. *ELife*, 6.
<https://doi.org/10.7554/eLife.25903>
- Marchant, J., Cowper, B., Liu, Y., Lai, L., Pinzan, C., Marq, J. B., Friedrich, N., Sawmynaden, K., Liew, L., Chai, W., Childs, R. A., Saouros, S., Simpson, P., Roque Barreira, M. C., Feizi,

- T., Soldati-Favre, D., & Matthews, S. (2012). Galactose Recognition by the Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(20), 16720-16733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325928>
- Masse, I., Agaësse, G., & Berthier-Vergnes, O. (2016). Les tétraspanines dans la physiopathologie de la peau. *médecine/sciences*, 32(3), 267-273. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163203011>
- Matsuoka, H., Yoshida, S., Hirai, M., & 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. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(01\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(01)00095-2)
- Matthiesen, S. H., Shenoy, S. M., Kim, K., Singer, R. H., & Satir, B. H. (2001). A parafusin-related *Toxoplasma* protein in Ca²⁺-regulated secretory organelles. *European Journal of Cell Biology*, 80(12), 775-783. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00214>
- Matuschewski, K. (2002). *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *The EMBO Journal*, 21(7), 1597-1606. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1597>
- Mayer, D. C. G., Cofie, J., Jiang, L., Hartl, D. L., Tracy, E., Kabat, J., Mendoza, L. H., & Miller, L. H. (2009). Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5348-5352. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900878106>
- Mayer, D. C. G., Jiang, L., Achur, R. N., Kakizaki, I., Gowda, D. C., & Miller, L. H. (2006). The glycophorin C N-linked glycan is a critical component of the ligand for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte receptor BAEBL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2358-2362. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510648103>
- McCormick, C. J., Tuckwell, D. S., Crisanti, A., Humphries, M. J., & Hollingdale, M. R. (1999). Identification of heparin as a ligand for the A-domain of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related adhesion protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 100(1), 111-124. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00052-3)
- McFadden, G. I., Reith, M. E., Munholland, J., & Lang-Unnasch, N. (1996). Plastid in human parasites. *Nature*, 381(6582), 482-482. <https://doi.org/10.1038/381482a0>
- Medica, D. L., & Sinnis, P. (2005). Quantitative Dynamics of *Plasmodium yoelii* Sporozoite Transmission by Infected Anopheline Mosquitoes. *Infection and Immunity*, 73(7), 4363-4369. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4363-4369.2005>
- Meis, J. F. G. M. (1989). *Plasmodium falciparum* ookinetes migrate intercellularly through *Anopheles stephensi* midgut epithelium. *Parasitology Research*, 76, 13-19.

- Meis, J. F. G. M., Verhave, J. P., Jap, P. H. K., & Meuwissen, J. H. E. Th. (1983). An ultrastructural study on the role of Kupffer cells in the process of infection by *Plasmodium berghei* sporozoites in rats. *Parasitology*, *86*(2), 231-242.
<https://doi.org/10.1017/S003118200005040X>
- Meis, J. F. G. M., Wismans, P. G. P., Jap, P. H. K., Lensen, A. H. W., & Ponnudurai, T. (1992). A scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. *Acta Tropica*, *50*(3), 227-236.
[https://doi.org/10.1016/0001-706X\(92\)90079-D](https://doi.org/10.1016/0001-706X(92)90079-D)
- Meissner, M., Krejany, E., Gilson, P. R., de Koning-Ward, T. F., Soldati, D., & Crabb, B. S. (2005). Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(8), 2980-2985. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500112102>
- Menard, D., Barnadas, C., Bouchier, C., Henry-Halldin, C., Gray, L. R., Ratsimbao, A., Thonier, V., Carod, J.-F., Domarle, O., Colin, Y., Bertrand, O., Picot, J., King, C. L., Grimberg, B. T., Mercereau-Puijalon, O., & Zimmerman, P. A. (2010). *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(13), 5967-5971.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0912496107>
- Ménard, R. (2000). The journey of the malaria sporozoite through its hosts : Two parasite proteins lead the way. *Microbes and Infection*, *2*(6), 633-642. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00362-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00362-2)
- Ménard, R. (2001). Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa : Insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cellular Microbiology*, *3*(2), 63-73.
<https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00097.x>
- Ménard, R., Sultan, A. A., Cortes, C., Altszuler, R., van Dijk, M. R., Janse, C. J., Waters, A. P., Nussenzweig, R. S., & Nussenzweig, V. (1997). Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature*, *385*, 336-340.
<https://doi.org/10.1038/385336a0>
- 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*(10), 701-712. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3111>
- Mercier, C., Adjogble, K. D. Z., Däubener, W., & Delauw, M.-F.-C. (2005). Dense granules : Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *International Journal for Parasitology*, *35*(8), 829-849.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.011>
- Michel, R., Schupp, K., Raether, W., & Bierther, F. W. (1980). Formation of a close junction

- during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii* in vitro. *International Journal for Parasitology*, 10(4), 309-313. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(80\)90012-0](https://doi.org/10.1016/0020-7519(80)90012-0)
- Mikolajczak, S. A., Jacobs-Lorena, V., MacKellar, D. C., Camargo, N., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.01.002>
- Miller, R. L., Ikram, S., Armelagos, G. J., Walker, R., Harer, W. B., Shiff, C. J., Baggett, D., Carrigan, M., & 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. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90484-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90484-7)
- Mishra, S., Nussenzweig, R. S., & Nussenzweig, V. (2012). Antibodies to *Plasmodium* circumsporozoite protein (CSP) inhibit sporozoite's cell traversal activity. *Journal of Immunological Methods*, 377(1-2), 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.01.009>
- Mital, J., Meissner, M., Soldati, D., & Ward, G. E. (2005). Conditional Expression of *Toxoplasma gondii* Apical Membrane Antigen-1 (TgAMA1) Demonstrates That TgAMA1 Plays a Critical Role in Host Cell Invasion. *Molecular Biology of the Cell*, 16(9), 4341-4349. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0281>
- Miyazaki, T. (1997). Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *The EMBO Journal*, 16(14), 4217-4225. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.14.4217>
- Molina-Cruz, A., Canepa, G. E., Kamath, N., Pavlovic, N. V., Mu, J., Ramphul, U. N., Ramirez, J. L., & 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520426112>
- Molina-Cruz, A., Garver, L. S., Alabaster, A., Bangiolo, L., Haile, A., Winikor, J., Ortega, C., van Schaijk, B. C. L., Sauerwein, R. W., Taylor-Salmon, E., & Barillas-Mury, C. (2013). The Human Malaria Parasite Pfs47 Gene Mediates Evasion of the Mosquito Immune System. *Science*, 340(6135), 984-987. <https://doi.org/10.1126/science.1235264>
- Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*, 363, 1965-1976.
- Morahan, B. J., Wang, L., & Coppel, R. L. (2009). No TRAP, no invasion. *Trends in Parasitology*, 25(2), 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.11.004>
- Morassin, B., Fabre, R., Berry, A., & Magnaval, J. F. (2002). One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(5), 503-508. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.503>

- Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M., & Sibley, L. D. (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* Establishes a Moving Junction That Selectively Excludes Host Cell Plasma Membrane Proteins on the Basis of Their Membrane Anchoring. *Journal of Experimental Medicine*, *190*(12), 1783-1792. <https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1783>
- Moreira, C. K., Templeton, T. J., Lavazec, C., Hayward, R. E., Hobbs, C. V., Kroeze, H., Janse, C. J., Waters, A. P., Sinnis, P., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01143.x>
- Morita, M., Nagaoka, H., Ntege, E. H., Kanoi, B. N., Ito, D., Nakata, T., Lee, J.-W., Tokunaga, K., Iimura, T., Torii, M., Tsuboi, T., & Takashima, E. (2018). PV1, a novel Plasmodium falciparum merozoite dense granule protein, interacts with exported protein in infected erythrocytes. *Scientific Reports*, *8*(1), 3696. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22026-0>
- Morlon-Guyot, J., El Hajj, H., Martin, K., Fois, A., Carrillo, A., Berry, L., Burchmore, R., Meissner, M., Lebrun, M., & Daher, W. (2018). A proteomic analysis unravels novel CORVET and HOPS proteins involved in *Toxoplasma gondii* secretory organelles biogenesis. *Cellular Microbiology*, *20*(11), e12870. <https://doi.org/10.1111/cmi.12870>
- Morrisette, N. S., & Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *66*(1), 21-38. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002>
- Mota, M. M., Hafalla, J. C. R., & Rodriguez, A. (2002). Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. *Nature Medicine*, *8*(11), 1318-1322. <https://doi.org/10.1038/nm785>
- Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., & Rodriguez, A. (2001). Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science*, *291*(5501), 141-144. <https://doi.org/10.1126/science.291.5501.141>
- Mota, M. M., & Rodriguez, A. (2001). Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes and Infection*, *3*(13), 1123-1128. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01473-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01473-3)
- Mueller, A.-K., Camargo, N., Kaiser, K., Andorfer, C., Frevert, U., Matuschewski, K., & Kappe, S. H. I. (2005). 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408442102>
- Mueller, A.-K., Labaied, M., Kappe, S. H. I., & Matuschewski, K. (2005). Genetically modified Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature*, *433*(7022), 164-167. <https://doi.org/10.1038/nature03188>

- Müller, H. M., Reckmann, I., Hollingdale, M. R., Bujard, H., Robson, K. J., & Crisanti, 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. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05950.x>
- Münter, S., Sabass, B., Selhuber-Unkel, C., Kudryashev, M., Hegge, S., Engel, U., Spatz, J. P., Matuschewski, K., Schwarz, U. S., & Frischknecht, F. (2009). *Plasmodium* Sporozoite Motility Is Modulated by the Turnover of Discrete Adhesion Sites. *Cell Host & Microbe*, *6*(6), 551-562. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.11.007>
- Mwakingwe-Omari, A., Healy, S. A., Lane, J., Cook, D. M., Kalhori, S., Wyatt, C., Kolluri, A., Marte-Salcedo, O., Imeru, A., Nason, M., Ding, L. K., Decederfelt, H., Duan, J., Neal, J., Raiten, J., Lee, G., Hume, J. C. C., Jeon, J. E., Ikpeama, I., ... Duffy, P. E. (2021). Two chemoattenuated PfSPZ malaria vaccines induce sterile hepatic immunity. *Nature*, *595*(7866), 289-294. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03684-z>
- N. Monk, P., & J. Partridge, L. (2012). Tetraspanins—Gateways for Infection. *Infectious Disorders - Drug Targets*, *12*(1), 4-17. <https://doi.org/10.2174/187152612798994957>
- Nacer, A., Underhill, A., & Hurd, H. (2008). The microneme proteins CTRP and SOAP are not essential for *Plasmodium berghei* ookinete to oocyst transformation in vitro in a cell free system. *Malaria Journal*, *7*(1), 82. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-82>
- Narum, D. L., Nguyen, V., Zhang, Y., Glen, J., Shimp, R. L., Lambert, L., Ling, I. T., Reiter, K., Ogun, S. A., Long, C., Holder, A. A., & Herrera, R. (2008). Identification and Characterization of the *Plasmodium yoelii* PyP140/RON4 Protein, an Orthologue of *Toxoplasma gondii* RON4, Whose Cysteine-Rich Domain Does Not Protect against Lethal Parasite Challenge Infection. *Infection and Immunity*, *76*(11), 4876-4882. <https://doi.org/10.1128/IAI.01717-07>
- Narum, D. L., & Thomas, A. W. (1994). Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *67*(1), 59-68. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90096-5)
- Nebi, T., Prieto, J. H., Kapp, E., Smith, B. J., Williams, M. J., Yates, J. R., Cowman, A. F., & Tonkin, C. J. (2011). Quantitative in vivo Analyses Reveal Calcium-dependent Phosphorylation Sites and Identifies a Novel Component of the *Toxoplasma* Invasion Motor Complex. *PLoS Pathogens*, *7*(9), e1002222. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002222>
- 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., Grinstein, S.,

- & Dhe-Paganon, S. (2013). Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature*, *504*(7478), 172-176. <https://doi.org/10.1038/nature12684>
- Nozaki, M., Baba, M., Tachibana, M., Tokunaga, N., Torii, M., & Ishino, T. (2020). Detection of the Rhoptry Neck Protein Complex in Plasmodium Sporozoites and Its Contribution to Sporozoite Invasion of Salivary Glands. *MSphere*, *5*(4), e00325-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00325-20>
- Nyagwange, J., Tijhaar, E., Ternette, N., Mobegi, F., Tretina, K., Silva, J. C., Pelle, R., & Nene, V. (2018). Characterization of the Theileria parva sporozoite proteome. *International Journal for Parasitology*, *48*(3-4), 265-273. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.09.007>
- Obando-Martinez, A. Z., Curtidor, H., Arévalo-Pinzón, G., Vanegas, M., Vizcaino, C., Patarroyo, M. A., & Patarroyo, M. E. (2010). Conserved High Activity Binding Peptides are Involved in Adhesion of Two Detergent-Resistant Membrane-Associated Merozoite Proteins to Red Blood Cells during Invasion. *Journal of Medicinal Chemistry*, *53*(10), 3907-3918. <https://doi.org/10.1021/jm901474p>
- O'Brochta, D. A., Alford, R., Harrell, R., Aluvihare, C., Eappen, A. G., Li, T., Chakravarty, S., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., & Billingsley, P. F. (2019). Is Saglin a mosquito salivary gland receptor for Plasmodium falciparum? *Malaria Journal*, *18*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2634-5>
- Ockenhouse, C. F., & Chulay, J. D. (1988). Plasmodium falciparum Sequestration : OKM5 Antigen (CD36) Mediates Cytoadherence of Parasitized Erythrocytes to a Myelomonocytic Cell Line. *Journal of Infectious Diseases*, *157*(3), 584-587. <https://doi.org/10.1093/infdis/157.3.584>
- Onzere, C. K., Fry, L. M., Bishop, R. P., Silva, M. G., Bastos, R. G., Knowles, D. P., & Suarez, C. E. (2021). Theileria equi claudin like apicomplexan microneme protein contains neutralization-sensitive epitopes and interacts with components of the equine erythrocyte membrane skeleton. *Scientific Reports*, *11*(1), 9301. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88902-4>
- Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., & Seed, B. (1989). CD36 Directly Mediates Cytoadherence of Plasmodium falciparum Parasitized Erythrocytes. *Cell*, *58*(1), 95-101. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90406-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90406-6)
- Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R., & Levy, S. (1990). TAPA-1, the Target of an Antiproliferative Antibody, Defines a New Family of Transmembrane Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(8), 4007-4015. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.8.4007-4015.1990>
- Orfano, A. S., Nacif-Pimenta, R., Duarte, A. P. M., Villegas, L. M., Rodrigues, N. B., Pinto, L. C., Campos, K. M. M., Pinilla, Y. T., Chaves, B., Barbosa Guerra, M. G. V., Monteiro, W.

- M., Smith, R. C., Molina-Cruz, A., Lacerda, M. V. G., Secundino, N. F. C., Jacobs-Lorena, M., Barillas-Mury, C., & Pimenta, P. F. (2016). Species-specific escape of Plasmodium sporozoites from oocysts of avian, rodent and human malarial parasites. *Malaria Journal*, *15*, 394.
- 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: Exported protein of malaria liver-stage parasites. *Molecular Microbiology*, *87*(1), 66-79. <https://doi.org/10.1111/mmi.12083>
- Palacios, G., Quan, P.-L., Jabado, O. J., Conlan, S., Hirschberg, D. L., Liu, Y., Zhai, J., Renwick, N., Hui, J., Hegyi, H., Grolla, A., Strong, J. E., Towner, J. S., Geisbert, T. W., Jahrling, P. B., Büchen-Osmond, C., Ellerbrok, H., Sanchez-Seco, M. P., Lussier, Y., ... Lipkin, W. I. (2007). Panmicrobial Oligonucleotide Array for Diagnosis of Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, *13*(1), 73-81. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060837>
- Paredes-Santos, T. C., de Souza, W., & Attias, M. (2012). Dynamics and 3D organization of secretory organelles of Toxoplasma gondii. *Journal of Structural Biology*, *177*(2), 420-430. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.028>
- Parker, M. L., Penarete-Vargas, D. M., Hamilton, P. T., Guérin, A., Dubey, J. P., Perlman, S. J., Spano, F., Lebrun, M., & Boulanger, M. J. (2016). Dissecting the interface between apicomplexan parasite and host cell: Insights from a divergent AMA–RON2 pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(2), 398-403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515898113>
- Parker, M. L., Peng, F., & 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), e0139407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139407>
- Pasquale, E. B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(6), 462-475. <https://doi.org/10.1038/nrm1662>
- Paul, G., Deshmukh, A., Kaur, I., Rathore, S., Dabral, S., Panda, A., Singh, S. K., Mohammed, A., Theisen, M., & Malhotra, P. (2017). A novel Pfs38 protein complex on the surface of Plasmodium falciparum blood-stage merozoites. *Malaria Journal*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1716-0>
- Pehrson, C., Salanti, A., Theander, T. G., & Nielsen, M. A. (2017). Pre-clinical and clinical development of the first placental malaria vaccine. *Expert Review of Vaccines*, *16*(6), 613-624. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1322512>
- Peng, K., Goh, Y. S., Siau, A., Franetich, J.-F., Chia, W. N., Ong, A. S. M., Malleret, B., Wu,

- Y. Y., Snounou, G., Hermsen, C. C., Adams, J. H., Mazier, D., Preiser, P. R., Sauerwein, R. W., Grüner, A.-C., & Rénia, L. (2016). Breadth of humoral response and antigenic targets of sporozoite-inhibitory antibodies associated with sterile protection induced by controlled human malaria infection : Antigens associated with sterile immunity. *Cellular Microbiology*, *18*(12), 1739-1750. <https://doi.org/10.1111/cmi.12608>
- Pimenta, P. F., Touray, M., & Miller, L. (1994). The Journey of Malaria Sporozoites in the Mosquito Salivary Gland. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *41*(6), 608-624. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1994.tb01523.x>
- Pinder, J. C., Fowler, R. E., Dluzewski, A. R., Bannister, L. H., Lavin, F. M., Mitchell, G. H., Wilson, R. J., & Gratzer, W. B. (1998). Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum* : Implications for red cell invasion. *Journal of Cell Science*, *111*(13), 1831-1839. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.13.1831>
- Pino, P., Sebastian, S., Kim, E. A., Bush, E., Brochet, M., Volkmann, K., Kozłowski, E., Llinás, M., Billker, O., & Soldati-Favre, D. (2012). A Tetracycline-Repressible Transactivator System to Study Essential Genes in Malaria Parasites. *Cell Host & Microbe*, *12*(6), 824-834. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.016>
- Pinzon-Ortiz, C., Friedman, J., Esko, J., & Sinnis, P. (2001). The Binding of the Circumsporozoite Protein to Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Is Required for Plasmodium Sporozoite Attachment to Target Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(29), 26784-26791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104038200>
- Pizarro, J. C., Vulliez-Le Normand, B., Chesne-Seck, M.-L., Collins, C. R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Blackman, M. J., Faber, B. W., Remarque, E. J., Kocken, C. H. M., Thomas, A. W., & Bentley, G. A. (2005). Crystal Structure of the Malaria Vaccine Candidate Apical Membrane Antigen 1. *Science*, *308*(5720), 408-411. <https://doi.org/10.1126/science.1107449>
- Ploemen, I. H. J., Croes, H. J., van Gemert, G.-J. J., Wijers-Rouw, M., Hermsen, C. C., & 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), e50772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050772>
- Pombo, D. J., Lawrence, G., Hirunpetcharat, C., Rzepczyk, C., Bryden, M., Cloonan, N., Anderson, K., Mahakunkijcharoen, Y., Martin, L. B., Wilson, D., Elliott, S., Elliott, S., Eisen, D. P., Weinberg, J. B., Saul, A., & Good, M. F. (2002). Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with Plasmodium falciparum. *The Lancet*, *360*(9333), 610-617. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09784-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09784-2)
- Ponnudurai, T., Lensen, A. H. W., van Gemert, G. J. A., Bolmer, M. G., & Meuwissen, J. H. E. Th. (1991). Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected Anopheles stephensi.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 85(2), 175-180.
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90012-N](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90012-N)

- Popovici, J., Roesch, C., & Rougeron, V. (2020). The enigmatic mechanisms by which *Plasmodium vivax* infects Duffy-negative individuals. *PLOS Pathogens*, 16(2), e1008258.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008258>
- Posthuma, G., Meis, J. F., Verhave, J. P., Gigengack, S., Hollingdale, M. R., Ponnudurai, T., & Geuze, H. J. (1989). Immunogold determination of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in *Anopheles stephensi* salivary gland cells. *European Journal of Cell Biology*, 49(1), 66-72.
- Posthuma, G., Meis, J. F., Verhave, J. P., Hollingdale, M. R., Ponnudurai, T., Meuwissen, J. H., & Geuze, H. J. (1988). Immunogold localization of circumsporozoite protein of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* during sporogony in *Anopheles stephensi* midguts. *European Journal of Cell Biology*, 46(1), 18-24.
- 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., ... El Khoury, J. (2017). A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *The Journal of Immunology*, 198(10), 3775-3789.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700373>
- Pradel, G., & Frevert, U. (2001). Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology*, 33(5), 1154-1165.
<https://doi.org/10.1053/jhep.2001.24237>
- Pradel, G., Garapaty, S., & Frevert, U. (2002). Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver : Malaria sporozoite targeting to the liver. *Molecular Microbiology*, 45(3), 637-651. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03057.x>
- Pradel, G., Garapaty, S., & Frevert, U. (2004). Kupffer and stellate cell proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Comparative Hepatology*, 3(1), S47.
<https://doi.org/10.1186/1476-5926-2-S1-S47>
- Pradel, G., Hayton, K., Aravind, L., Iyer, L. M., Abrahamsen, M. S., Bonawitz, A., Mejia, C., & Templeton, T. J. (2004). A Multidomain Adhesion Protein Family Expressed in *Plasmodium falciparum* Is Essential for Transmission to the Mosquito. *Journal of Experimental Medicine*, 199(11), 1533-1544. <https://doi.org/10.1084/jem.20031274>
- Preiser, P., Renia, L., Singh, N., Balu, B., Jarra, W., Voza, T., Kaneko, O., Blair, P., Torii, M., Landau, I., & Adams, J. H. (2004). Antibodies against MAEBL Ligand Domains M1 and M2 Inhibit Sporozoite Development In Vitro. *Infection and Immunity*, 72(6), 3604-3608.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.6.3604-3608.2004>

- Prommana, P., Uthapibull, C., Wongsombat, C., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., Knuepfer, E., Holder, A. A., & Shaw, P. J. (2013). Inducible Knockdown of Plasmodium Gene Expression Using the glmS Ribozyme. *PLoS ONE*, 8(8), e73783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073783>
- Prudêncio, M., Rodriguez, A., & Mota, M. M. (2006). The silent path to thousands of merozoites : The Plasmodium liver stage. *Nature Reviews Microbiology*, 4(11), 849-856. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1529>
- Pryce, J., Richardson, M., & Lengeler, C. (2018). Insecticide-treated nets for preventing malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11(11), CD000363. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000363.pub3>
- Quadt, K. A., Streichfuss, M., Moreau, C. A., Spatz, J. P., & Frischknecht, F. (2016). Coupling of Retrograde Flow to Force Production During Malaria Parasite Migration. *ACS Nano*, 10(2), 2091-2102. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b06417>
- Ragotte, R. J., Higgins, M. K., & Draper, S. J. (2020). The RH5-CyRPA-Ripr Complex as a Malaria Vaccine Target. *Trends in Parasitology*, 36(6), 545-559. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.003>
- Raja, A. I., Stanisic, D. I., & Good, M. F. (2017). Chemical Attenuation in the Development of a Whole-Organism Malaria Vaccine. *Infection and Immunity*, 85(7), e00062-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00062-17>
- Ramphul, U. N., Garver, L. S., Molina-Cruz, A., Canepa, G. E., & 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423586112>
- Rathore, D., Sacci, J. B., de la Vega, P., & McCutchan, T. F. (2002). Binding and Invasion of Liver Cells by Plasmodium falciparum Sporozoites. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7092-7098. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106862200>
- Rayner, J. C., Vargas-Serrato, E., Huber, C. S., Galinski, M. R., & Barnwell, J. W. (2001). A Plasmodium falciparum Homologue of Plasmodium vivax Reticulocyte Binding Protein (PvRBP1) Defines a Trypsin-resistant Erythrocyte Invasion Pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(11), 1571-1582. <https://doi.org/10.1084/jem.194.11.1571>
- Read, D., Lensen, A. H. W., Begarnie, S., Haley, S., Raza, A., & Carter, R. (1994). Transmission-blocking antibodies against multiple, non-variant target epitopes of the Plasmodium falciparum gamete surface antigen Pfs230 are all complement-fixing. *Parasite Immunology*, 16(10), 511-519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1994.tb00305.x>
- Real, E., Rodrigues, L., Cabal, G. G., Enguita, F. J., Mancio-Silva, L., Mello-Vieira, J., Beatty,

- W., Vera, I. M., Zuzarte-Luis, V., Figueira, T. N., Mair, G. R., & Mota, M. M. (2018). Plasmodium UIS3 sequesters host LC3 to avoid elimination by autophagy in hepatocytes. *Nature Microbiology*, 3(1), 17-25. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0054-x>
- Reddy, K. S., Amlabu, E., Pandey, A. K., Mitra, P., Chauhan, V. S., & Gaur, D. (2015). Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for Plasmodium falciparum erythrocyte invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(4), 1179-1184. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415466112>
- Remarque, E. J., Faber, B. W., Kocken, C. H. M., & Thomas, A. W. (2008). Apical membrane antigen 1 : A malaria vaccine candidate in review. *Trends in Parasitology*, 24(2), 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.002>
- Rener, J., Graves, P. M., Carter, R., Williams, J. L., & Burkot, T. R. (1983). Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of plasmodium falciparum. *The Journal of Experimental Medicine*, 158(3), 976-981. <https://doi.org/10.1084/jem.158.3.976>
- Richard, D., MacRaild, C. A., Riglar, D. T., Chan, J.-A., Foley, M., Baum, J., Ralph, S. A., Norton, R. S., & Cowman, A. F. (2010). Interaction between Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 and the Rhoptry Neck Protein Complex Defines a Key Step in the Erythrocyte Invasion Process of Malaria Parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14815-14822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080770>
- Riglar, D. T., Richard, D., Wilson, D. W., Boyle, M. J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D. S., Rogers, K. L., Whitchurch, C. B., Beeson, J. G., Cowman, A. F., Ralph, S. A., & Baum, J. (2011). Super-Resolution Dissection of Coordinated Events during Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte. *Cell Host & Microbe*, 9(1), 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.12.003>
- Risco-Castillo, V., Topçu, S., Marinach, C., Manzoni, G., Bigorgne, A. E., Briquet, S., Baudin, X., Lebrun, M., Dubremetz, J.-F., & Silvie, O. (2015). Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. *Cell Host & Microbe*, 18(5), 593-603. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.006>
- 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 : CD81 and Plasmodium sporozoite rhoptry discharge. *Cellular Microbiology*, 16(10), 1533-1548. <https://doi.org/10.1111/cmi.12309>
- Roberts, W. L., Speer, C. A., & Hammond, D. M. (1971). Penetration of Eimeria larimerensis Sporozoites into Cultured Cells as Observed with the Light and Electron Microscopes. *The Journal of Parasitology*, 57(3), 615-625. <https://doi.org/10.2307/3277927>
- Robinson, A., Busula, A. O., Voets, M. A., Beshir, K. B., Caulfield, J. C., Powers, S. J., Verhulst, N. O., Winskill, P., Muwanguzi, J., Birkett, M. A., Smallegange, R. C., Masiga,

- D. K., Mukabana, W. R., Sauerwein, R. W., Sutherland, C. J., Bousema, T., Pickett, J. A., Takken, W., Logan, J. G., & de Boer, J. G. (2018). Plasmodium-associated changes in human odor attract mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(18), E4209-E4218. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721610115>
- Robinson, G. G. (1939). The mouthparts and their function in the female mosquito, *Anopheles maculipennis*. *Parasitology*, *31*(2), 212-242. <https://doi.org/10.1017/S0031182000012774>
- 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., & Mota, M. M. (2008). Host Scavenger Receptor SR-BI Plays a Dual Role in the Establishment of Malaria Parasite Liver Infection. *Cell Host & Microbe*, *4*(3), 271-282. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.07.012>
- Roestenberg, M., Walk, J., van der Boor, S. C., Langenberg, M. C. C., Hoogerwerf, M.-A., Janse, J. J., Manurung, M., Yap, X. Z., Garcia, A. F., Koopman, J. P. R., Meij, P., Wessels, E., Teelen, K., van Waardenburg, Y., van de Vegte-Bolmer, M., Van Gemert, G.-J., Visser, L. G., van der Ven, A. J. A. M., de Mast, Q., ... Sauerwein, R. W. (2020). A double-blind, placebo-controlled phase 1/2a trial of the genetically attenuated malaria vaccine PfSPZ-GA1. *Science Translational Medicine*, *12*(544), eaaz5629. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz5629>.
- Rosenberg, R. (1985). Inability of *Plasmodium knowlesi* sporozoites to invade *Anopheles freeborni* salivary glands. *Am J Trop Med Hyg*, *34*(4), 687-691. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.687>
- Rosenberg, R., Wirtz, R. A., Schneider, I., & 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. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90258-G](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90258-G)
- Ross, R. (1897). On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. *The British Medical Journal*, *2*(1929), 1786-1788. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.1929.1786>.
- RTS,S Clinical Trials Partnership members. (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa : Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *The Lancet*, *386*(9988), 31-45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60721-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8)
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Lagaudrière-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H., & Boucheix, C. (1996). CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *European Journal of Immunology*, *26*(11),

2657-2665. <https://doi.org/10.1002/eji.1830261117>

- Rubinstein, E., Ziyat, A., Prenant, M., Wrobel, E., Wolf, J.-P., Levy, S., Le Naour, F., & Boucheix, C. (2006). Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental Biology*, *290*(2), 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.031>
- Russell, D. G., & Sinden, R. E. (1981). The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *Journal of Cell Science*, *50*(1), 345-359. <https://doi.org/10.1242/jcs.50.1.345>
- Sacks, D. (2015). Gateway to deLiver : How malaria sporozoites cross the sinusoidal barrier. *Journal of Experimental Medicine*, *212*(9), 1341-1342. <https://doi.org/10.1084/jem.2129insight3>
- Saenz, F. E., Balu, B., Smith, J., Mendonca, S. R., & Adams, J. H. (2008). The Transmembrane Isoform of Plasmodium falciparum MAEBL Is Essential for the Invasion of Anopheles Salivary Glands. *PLoS ONE*, *3*(5), e2287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002287>
- Sam-Yellowe, T. Y. (1996). Rhoptry organelles of the apicomplexa : Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitology Today*, *12*(8), 308-316. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)10030-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)10030-2)
- Sanders, P. R., Cantin, G. T., Greenbaum, D. C., Gilson, P. R., Nebl, T., Moritz, R. L., Yates, J. R., Hodder, A. N., & Crabb, B. S. (2007). Identification of protein complexes in detergent-resistant membranes of Plasmodium falciparum schizonts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *154*(2), 148-157. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.04.013>
- 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., & Crabb, B. S. (2005). Distinct Protein Classes Including Novel Merozoite Surface Antigens in Raft-like Membranes of Plasmodium falciparum. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(48), 40169-40176. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509631200>
- Santos, J. M., Egarter, S., Zuzarte-Luis, V., Kumar, H., Moreau, C. A., Kehrer, J., Pinto, A., Costa, M. da, Franke-Fayard, B., Janse, C. J., Frischknecht, F., & Mair, G. R. (2017). Malaria parasite LIMP protein regulates sporozoite gliding motility and infectivity in mosquito and mammalian hosts. *eLife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.24109>
- Saul, A., Lawrence, G., Allworth, A., Elliott, S., Anderson, K., Rzepczyk, C., Martin, L. B., Taylor, D., Eisen, D. P., Irving, D. O., Pye, D., Crewther, P. E., Hodder, A. N., Murphy, V. J., & Anders, R. F. (2005). A human phase 1 vaccine clinical trial of the Plasmodium falciparum malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine*, *23*(23), 3076-3083. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.09.040>
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., 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*(19), 5017-5025. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf529>
- Schneider, P., Wolters, L., Schoone, G., Schallig, H., Sillekens, P., Hermsen, R., & Sauerwein, R. (2005). Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Is More Convenient than Real-Time PCR for Quantification of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(1), 402-405. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.402-405.2005>
- Scholl, P. F., Kongkasuriyachai, D., Demirev, P. A., Feldman, A. B., Lin, J. S., Sullivan, D. J., & Kumar, N. (2004). Rapid detection of malaria infection in vivo by laser desorption mass spectrometry. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *71*(5), 546-551. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.546>
- Scholz, S. M., Simon, N., Lavazec, C., Dude, M.-A., Templeton, T. J., & Pradel, G. (2008). PfCCp proteins of *Plasmodium falciparum* : Gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. *International Journal for Parasitology*, *38*(3-4), 327-340. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.08.009>
- Schrevel, J., Asfaux-Foucher, G., Hopkins, J. M., Robert, V., Bourgouin, C., Prensier, G., & Bannister, L. H. (2008). Vesicle trafficking during sporozoite development in *Plasmodium berghei* : Ultrastructural evidence for a novel trafficking mechanism. *Parasitology*, *135*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003629>
- Schwach, F., Bushell, E., Gomes, A. R., Anar, B., Girling, G., Herd, C., Rayner, J. C., & Billker, O. (2015). PlasmoGEM, a database supporting a community resource for large-scale experimental genetics in malaria parasites. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D1176-D1182. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1143>
- 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., ... Diep, L. (2013). Protection Against Malaria by Intravenous Immunization with a Nonreplicating Sporozoite Vaccine. *Science*, *341*(6152), 1359-1365. <https://doi.org/10.1126/science.1241800>
- Shaw, M. K. (1997). The Same but Different : The Biology of *Theileria* Sporozoite Entry into Bovine Cells. *International Journal for Parasitology*, *27*(5), 457-474. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(97\)00015-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00015-5)
- Shaw, M. K. (2003). Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends in Parasitology*, *19*(1), 2-6. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)00015-6)
- Shaw, M. K., Tilney, L. G., & Musoke, A. J. (1991). The entry of *Theileria parva* sporozoites into bovine lymphocytes : Evidence for MHC class I involvement. *Journal of Cell Biology*,

113(1), 87-101. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.1.87>

- Shears, M. J., Sekhar Nirujogi, R., Swearingen, K. E., Renuse, S., Mishra, S., Jaipal Reddy, P., Moritz, R. L., Pandey, A., & Sinnis, P. (2019). Proteomic Analysis of Plasmodium Merosomes : The Link between Liver and Blood Stages in Malaria. *Journal of Proteome Research*, 18(9), 3404-3418. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00324>
- Sheiner, L., Santos, J. M., Klages, N., Parussini, F., Jemmely, N., Friedrich, N., Ward, G. E., & Soldati-Favre, D. (2010). Toxoplasma gondii transmembrane microneme proteins and their modular design : Transmembrane microneme proteins modular function. *Molecular Microbiology*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07255.x>
- Shen, B., Buguliskis, J. S., Lee, T. D., & Sibley, L. D. (2014). Functional Analysis of Rhomboid Proteases during Toxoplasma Invasion. *MBio*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01795-14>
- Shen, B., & Sibley, L. D. (2014). Toxoplasma aldolase is required for metabolism but dispensable for host-cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9), 3567-3572. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315156111>
- Shen, W.-J., Asthana, S., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2018). Scavenger receptor B type 1 : Expression, molecular regulation, and cholesterol transport function. *Journal of Lipid Research*, 59(7), 1114-1131. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083121>
- Shiff, C. J., Premji, Z., & Minjas, J. N. (1993). The rapid manual ParaSighP-F test. A new diagnostic tool for Plasmodium falciparum infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(6), 646-648. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90273-s](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90273-s)
- Shin, S. C. J., Vanderberg, J. P., & Terzakis, J. A. (1982). Direct Infection of Hepatocytes by Sporozoites of Plasmodium berghei. *The Journal of Protozoology*, 29(3), 448-454. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1982.tb05431.x>
- Shortt, H. E., & Garnham, P. C. C. (1948). Pre-erythrocytic Stage in Mammalian Malaria Parasites. *Nature*, 161, 126. <https://doi.org/10.1038/161126a0>
- Siden-Kiamos, I., Ganter, M., Kunze, A., Hliscs, M., Steinbüchel, M., Mendoza, J., Sinden, R. E., Louis, C., & Matuschewski, K. (2011). Stage-specific depletion of myosin A supports an essential role in motility of malarial ookinetes. *Cellular Microbiology*, 13(12), 1996-2006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01686.x>
- Sidik, S. M., Huet, D., Ganesan, S. M., Huynh, M.-H., Wang, T., Nasamu, A. S., Thiru, P., Saeij, J. P. J., Carruthers, V. B., Niles, J. C., & Lourido, S. (2016). A Genome-wide CRISPR Screen in Toxoplasma Identifies Essential Apicomplexan Genes. *Cell*, 166(6), 1423-1435.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.019>
- Sidjanski, S. P., Vanderberg, J. P., & 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. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00124-2)
- Silverstein, R. L., & Febbraio, M. (2009). CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Science Signaling*, *2*(72), re3-re3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.272re3>
- Silvie, O., Briquet, S., Müller, K., Manzoni, G., & Matuschewski, K. (2014). Post-transcriptional silencing of UIS4 in *Plasmodium berghei* sporozoites is important for host switch. *Molecular Microbiology*, *91*(6), 1200-1213. <https://doi.org/10.1111/mmi.12528>
- Silvie, O., Charrin, S., Billard, M., Franetich, J.-F., Clark, K. L., Van Gemert, G.-J., Sauerwein, R., Dautry, F., Boucheix, C., Mazier, D., & Rubinstein, E. (2006). 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. <https://doi.org/10.1242/jcs.02911>
- Silvie, O., Franetich, J.-F., Boucheix, C., Rubinstein, E., & Mazier, D. (2007). Alternative invasion pathways for *Plasmodium berghei* sporozoites. *International Journal for Parasitology*, *37*(2), 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.10.005>
- Silvie, O., Franetich, J.-F., Charrin, S., Mueller, M. S., Siau, A., Bodescot, M., Rubinstein, E., Hannoun, L., Charoenvit, Y., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Van Gemert, G.-J., Sauerwein, R. W., Blackman, M. J., Anders, R. F., Pluschke, G., & Mazier, D. (2004). A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 9490-9496. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311331200>
- 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., & Mazier, D. (2006). Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the *Plasmodium* species. *Cellular Microbiology*, *8*(7), 1134-1146. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00697.x>
- Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J.-F., 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*(1), 93-96. <https://doi.org/10.1038/nm808>
- Simon, N., Kuehn, A., Williamson, K. C., & Pradel, G. (2016). Adhesion protein complexes of malaria gametocytes assemble following parasite transmission to the mosquito. *Parasitology International*, *65*(1), 27-30. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.09.007>
- Simon, N., Scholz, S. M., Moreira, C. K., Templeton, T. J., Kuehn, A., Dude, M.-A., & Pradel,

- G. (2009). Sexual Stage Adhesion Proteins Form Multi-protein Complexes in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(21), 14537-14546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808472200>
- Simonetti, A. B. (1996). The biology of malarial parasite in the mosquito : A review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(5), 519-541. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000500001>
- Sinden, R. E. (1974). Excystment by sporozoites of malaria parasites. *Nature*, 252(5481), 314. <https://doi.org/10.1038/252314a0>
- Sinden, R. E., & 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), 477-491. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90167-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90167-0)
- Singh, B., Sung, L. K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S., Cox-Singh, J., Thomas, A., & Conway, D. J. (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*, 363(9414), 1017-1024. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15836-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15836-4)
- Singh, N., Preiser, P., Rénia, L., Balu, B., Barnwell, J., Blair, P., Jarra, W., Voza, T., Landau, I., & Adams, J. H. (2004). Conservation and Developmental Control of Alternative Splicing in *maeb1* Among Malaria Parasites. *Journal of Molecular Biology*, 343(3), 589-599. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.047>
- Singh, S., Plassmeyer, M., Gaur, D., & Miller, L. H. (2007). Mononeme : A new secretory organelle in *Plasmodium falciparum* merozoites identified by localization of rhomboid-1 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 20043-20048. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709999104>
- Sinnis, P., Clavijo, P., Fenyő, D., Chait, B. T., Cerami, C., & Nussenzweig, V. (1994). Structural and Functional Properties of Region II-Plus of the Malaria Circumsporozoite Protein. *Journal of Experimental Medicine*, 180(1), 297-306. <https://doi.org/10.1084/jem.180.1.297>
- Sinnis, P., & Coppi, A. (2007). A long and winding road : The *Plasmodium* sporozoite's journey in the mammalian host. *Parasitology International*, 56(3), 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.04.002>
- Sinnis, P., & Febbraio, M. (2002). *Plasmodium yoelii* Sporozoites Infect CD36-Deficient Mice. *Experimental Parasitology*, 100(1), 12-16. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4676>
- Sinnis, P., Willnow, T. E., Briones, M. R. S., Herz, J., & Nussenzweig, V. (1996). Remnant Lipoproteins Inhibit Malaria Sporozoite Invasion of Hepatocytes. *Journal of Experimental*

Medicine, 184(3), 945-954. <https://doi.org/10.1084/jem.184.3.945>

- Song, G., Koksal, A. C., Lu, C., & Springer, T. A. (2012). Shape change in the receptor for gliding motility in Plasmodium sporozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(52), 21420-21425. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218581109>
- Speer, C. A., Dubey, J. P., Blixt, J. A., & Prokop, K. (1997). Time Lapse Video Microscopy and Ultrastructure of Penetrating Sporozoites, Types 1 and 2 Parasitophorous Vacuoles, and the Transformation of Sporozoites to Tachyzoites of the Veg Strain of Toxoplasma gondii. *The Journal of Parasitology*, 83(4), 565. <https://doi.org/10.2307/3284226>
- Spielmann, T., Montagna, G. N., Hecht, L., & Matuschewski, K. (2012). Molecular make-up of the Plasmodium parasitophorous vacuolar membrane. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(4-5), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.011>
- Srinivasan, P., Baldeviano, G. C., Miura, K., Diouf, A., Ventocilla, J. A., Leiva, K. P., Lugo-Roman, L., Lucas, C., Orr-Gonzalez, S., Zhu, D., Villasante, E., Soisson, L., Narum, D. L., Pierce, S. K., Long, C. A., Diggs, C., Duffy, P. E., Lescano, A. G., & Miller, L. H. (2017). A malaria vaccine protects Aotus monkeys against virulent Plasmodium falciparum infection. *Npj Vaccines*, 2(1), 14. <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0015-7>
- 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., & 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110303108>
- Stanczyk, N. M., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2019). Can we use human odors to diagnose malaria? *Future Microbiology*, 14(1), 5-9. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0312>
- Stanway, R. R., Bushell, E., Chiappino-Pepe, A., Roques, M., Sanderson, T., Franke-Fayard, B., Caldelari, R., Golomingi, M., Nyonda, M., Pandey, V., Schwach, F., Chevalley, S., Ramesar, J., Metcalf, T., Herd, C., Burda, P.-C., Rayner, J. C., Soldati-Favre, D., Janse, C. J., ... Heussler, V. T. (2019). Genome-Scale Identification of Essential Metabolic Processes for Targeting the Plasmodium Liver Stage. *Cell*, 179(5), 1112-1128.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.030>
- Starnes, G. L., Jewett, T. J., Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (2006). Two Separate, Conserved Acidic Amino Acid Domains within the Toxoplasma gondii MIC2 Cytoplasmic Tail Are Required for Parasite Survival. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30745-30754. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606523200>
- Steel, R. W. J., Pei, Y., Camargo, N., Kaushansky, A., Dankwa, D. A., Martinson, T., Nguyen, T., Betz, W., Cardamone, H., Vigdorovich, V., Dambrauskas, N., Carbonetti, S., Vaughan, A. M., Sather, D. N., & Kappe, S. H. I. (2018). Plasmodium yoelii S4/CeITOS is important

- for sporozoite gliding motility and cell traversal. *Cellular Microbiology*, 20(4), e12817. <https://doi.org/10.1111/cmi.12817>
- Steel, R. W. J., Vigdorovich, V., Dambrauskas, N., Wilder, B. K., Arredondo, S. A., Goswami, D., Kumar, S., Carbonetti, S., Swearingen, K. E., Nguyen, T., Betz, W., Camargo, N., Fisher, B. S., Soden, J., Thomas, H., Freeth, J., Moritz, R. L., Noah Sather, D., & Kappe, S. H. I. (2021). Platelet derived growth factor receptor β (PDGFR β) is a host receptor for the human malaria parasite adhesin TRAP. *Scientific Reports*, 11(1), 11328. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90722-5>
- Steinbuechel, M., & Matuschewski, K. (2008). Role for the Plasmodium sporozoite-specific transmembrane protein S6 in parasite motility and efficient malaria transmission. *Cellular Microbiology*, 11(2), 279-288. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01252.x>
- Sterling, C. R., Aikawa, M., & Vanderberg, J. P. (1973). The Passage of Plasmodium berghei Sporozoites through the Salivary Glands of Anopheles stephensi : An Electron Microscope Study. *The Journal of Parasitology*, 59(4), 593. <https://doi.org/10.2307/3278847>
- Stewart, M. J., Nawrot, R. J., Schulman, S., & Vanderberg, J. P. (1986). Plasmodium berghei sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. *Infection and Immunity*, 51(3), 859-864. <https://doi.org/10.1128/iai.51.3.859-864.1986>
- Stewart, M. J., & Vanderberg, J. P. (1991). Malaria Sporozoites Release Circumsporozoite Protein from Their Apical End and Translocate It along Their Surface. *The Journal of Protozoology*, 38(4), 411-421. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1991.tb01379.x>
- Stowers, A. W., Kennedy, M. C., Keegan, B. P., Saul, A., Long, C. A., & Miller, L. H. (2002). Vaccination of Monkeys with Recombinant Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 Confers Protection against Blood-Stage Malaria. *Infection and Immunity*, 70(12), 6961-6967. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6961-6967.2002>
- Straub, K. W., Cheng, S. J., Sohn, C. S., & Bradley, P. J. (2009). Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cellular Microbiology*, 11(4), 590-603. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01276.x>
- Stubbs, J., Simpson, K. M., Triglia, T., Plouffe, D., Tonkin, C. J., Duraisingh, M. T., Maier, A. G., Winzeler, E. A., & Cowman, A. F. (2005). Molecular Mechanism for Switching of P. falciparum Invasion Pathways into Human Erythrocytes. *Science*, 309(5739), 1384-1387. <https://doi.org/10.1126/science.1115257>
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.-M., Menard, R., & Heussler, V. T. (2006). Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science*, 313(5791), 1287-1290. <https://doi.org/10.1126/science.1129720>

- Sultan, A. A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K. J. H., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. S., & Ménard, R. (1997). TRAP Is Necessary for Gliding Motility and Infectivity of Plasmodium Sporozoites. *Cell*, *90*(3), 511-522. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80511-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80511-5)
- Swearingen, K. E., Lindner, S. E., Flannery, E. L., Vaughan, A. M., Morrison, R. D., Patrapuvich, R., Koepfli, C., Muller, I., Jex, A., Moritz, R. L., Kappe, S. H. I., Sattabongkot, J., & Mikolajczak, S. A. (2017). Proteogenomic analysis of the total and surface-exposed proteomes of Plasmodium vivax salivary gland sporozoites. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(7), e0005791. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005791>
- Swearingen, K. E., Lindner, S. E., Shi, L., Shears, M. J., Harupa, A., Hopp, C. S., Vaughan, A. M., Springer, T. A., Moritz, R. L., Kappe, S. H. I., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005606>
- 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., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041937>
- Talaat, K. R., Ellis, R. D., Hurd, J., Hentrich, A., Gabriel, E., Hynes, N. A., Rausch, K. M., Zhu, D., Muratova, O., Herrera, R., Anderson, C., Jones, D., Aebig, J., Brockley, S., MacDonald, N. J., Wang, X., Fay, M. P., Healy, S. A., Durbin, A. P., ... Duffy, P. E. (2016). Safety and Immunogenicity of Pfs25-EPA/Alhydrogel®, a Transmission Blocking Vaccine against Plasmodium falciparum: An Open Label Study in Malaria Naïve Adults. *PLoS ONE*, *11*(10), e0163144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163144>
- Talman, A. M., Lacroix, C., Marques, S. R., Blagborough, A. M., Carzaniga, R., Ménard, R., & Sinden, R. E. (2011). PbGEST mediates malaria transmission to both mosquito and vertebrate host: PbGEST mediates malaria transmission. *Molecular Microbiology*, *82*(2), 462-474. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07823.x>
- Tan, K., Duquette, M., Liu, J., Dong, Y., Zhang, R., Joachimiak, A., Lawler, J., & Wang, J. (2002). Crystal structure of the TSP-1 type 1 repeats: A novel layered fold and its biological implication. *Journal of Cell Biology*, *159*(2), 373-382. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206062>
- Tanabe, K., Mita, T., Jombart, T., Eriksson, A., Horibe, S., Palacpac, N., Ranford-Cartwright, L., Sawai, H., Sakihama, N., Ohmae, H., Nakamura, M., Ferreira, M. U., Escalante, A. A.,

- Prugnolle, F., Björkman, A., Färnert, A., Kaneko, A., Horii, T., Manica, A., ... Balloux, F. (2010). Plasmodium falciparum Accompanied the Human Expansion out of Africa. *Current Biology*, 20(14), 1283-1289. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.053>
- Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., & Krudsood, S. (2009). Malaria Diagnosis : A Brief Review. *The Korean Journal of Parasitology*, 47(2), 93. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.2.93>
- Tannenbaum, J., & Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs Then and Now : The Need for Clarity in Definition and Purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(2), 120-132.
- Tarun, A. S., Baer, K., Dumpit, R. F., Gray, S., Lejarcegui, N., Frevert, U., & Kappe, S. H. I. (2006). Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. *International Journal for Parasitology*, 36(12), 1283-1293. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.009>
- Tavares, J., Formaglio, P., Thiberge, S., Mordelet, E., Van Rooijen, N., Medvinsky, A., Ménard, R., & Amino, R. (2013). Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(5), 905-915. <https://doi.org/10.1084/jem.20121130>
- Templeton, T. J., & 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. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00066-3)
- Tewari, R., Spaccapelo, R., Bistoni, F., Holder, A. A., & Crisanti, A. (2002). Function of Region I and II Adhesive Motifs of Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein in Sporozoite Motility and Infectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47613-47618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208453200>
- Tham, W.-H., Wilson, D. W., Lopaticki, S., Schmidt, C. Q., Tetteh-Quarcoo, P. B., Barlow, P. N., Richard, D., Corbin, J. E., Beeson, J. G., & Cowman, A. F. (2010). Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for Plasmodium falciparum PfRh4 invasion ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17327-17332. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008151107>
- Thathy, V., Fujioka, H., Gantt, S., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., & Ménard, R. (2002). Levels of circumsporozoite protein in the Plasmodium oocyst determine sporozoite morphology. *The EMBO Journal*, 21(7), 1586-1596. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1586>
- Thompson, J., Janse, C. J., & 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. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00377-2](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00377-2)

- Tibúrcio, M., Yang, A. S. P., Yahata, K., Suárez-Cortés, P., Belda, H., Baumgarten, S., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G.-J., van Waardenburg, Y., Levashina, E. A., Sauerwein, R. W., & Treeck, M. (2019). A Novel Tool for the Generation of Conditional Knockouts To Study Gene Function across the Plasmodium falciparum Life Cycle. *MBio*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01170-19>
- Tokunaga, N., Nozaki, M., Tachibana, M., Baba, M., Matsuoka, K., Tsuboi, T., Torii, M., & Ishino, T. (2019). Expression and Localization Profiles of Rhoptry Proteins in Plasmodium berghei Sporozoites. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 316. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00316>
- 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., & 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455667>
- Tonkin, M. L., Roques, M., Lamarque, M. H., Pugniere, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., & Boulanger, M. J. (2011). Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites : Insights from the Co-Structure of AMA1 with a RON2 Peptide. *Science*, 333(6041), 463-467. <https://doi.org/10.1126/science.1204988>
- Tordai, H., Bányai, L., & Patthy, L. (1999). The PAN module : The N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. *FEBS Letters*, 461(1-2), 63-67. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01416-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01416-7)
- Treeck, M., Zacherl, S., Herrmann, S., Cabrera, A., Kono, M., Struck, N. S., Engelberg, K., Haase, S., Frischknecht, F., Miura, K., Spielmann, T., & Gilberger, T. W. (2009). Functional Analysis of the Leading Malaria Vaccine Candidate AMA-1 Reveals an Essential Role for the Cytoplasmic Domain in the Invasion Process. *PLoS Pathogens*, 5(3), e1000322. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000322>
- Triglia, T., Duraisingh, M. T., Good, R. T., & Cowman, A. F. (2004). Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by Plasmodium falciparum : Function of Plasmodium erythrocyte binding proteins. *Molecular Microbiology*, 55(1), 162-174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04388.x>
- Triglia, T., Healer, J., Caruana, S. R., Hodder, A. N., Anders, R. F., Crabb, B. S., & Cowman, A. F. (2000). Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species. *Molecular Microbiology*, 38(4), 706-718.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02175.x>

- Tse, E. G., Korsik, M., & Todd, M. H. (2019). The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malaria Journal*, 18(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>
- Tucker, R. P. (2004). The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(6), 969-974. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.011>
- Tyler, J. S., & Boothroyd, J. C. (2011). The C-Terminus of Toxoplasma RON2 Provides the Crucial Link between AMA1 and the Host-Associated Invasion Complex. *PLoS Pathogens*, 7(2), e1001282. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001282>
- Urban, S., Zieseniss, S., Werder, M., Hauser, H., Budzinski, R., & Engelmann, B. (2000). Scavenger Receptor BI Transfers Major Lipoprotein-associated Phospholipids into the Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33409-33415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004031200>
- VanBuskirk, K. M., O'Neill, M. T., De La Vega, P., Maier, A. G., Krzych, U., Williams, J., Dowler, M. G., Sacci, J. B., Kangwanrangsang, N., Tsuboi, T., Kneteman, N. M., Heppner, D. G., Murdock, B. A., Mikolajczak, S. A., Aly, A. S. I., Cowman, A. F., & 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906387106>
- Vanderberg, J. P. (1974). Studies on the Motility of Plasmodium Sporozoites. *The Journal of Protozoology*, 21(4), 527-537. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1974.tb03693.x>
- Vanderberg, J. P., Chew, S., & Stewart, M. J. (1990). Plasmodium Sporozoite Interactions with Macrophages In Vitro : A Videomicroscopic Analysis. *The Journal of Protozoology*, 37(6), 528-536. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1990.tb01260.x>
- Vanderberg, J. P., Rdodin, J., & Yoeli, M. (1967). Electron Microscopic and Histochemical Studies of Sporozoite Formation in Plasmodium berghei*. *The Journal of Protozoology*, 14(1), 82-103. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb01452.x>
- Vanderberg, J. P., & Rhodin, J. (1967). Differentiation of nuclear and cytoplasmic fine structure during sporogonic development of Plasmodium berghei. *The Journal of Cell Biology*, 32(3), C7-10. <https://doi.org/10.1083/jcb.32.3.C7>
- van Dijk, M. R., Douradinha, B., Franke-Fayard, B., Heussler, V., van Dooren, M. W., van Schaijk, B., van Gemert, G.-J., Sauerwein, R. W., Mota, M. M., Waters, A. P., & 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500925102>

- 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. (2001). A Central Role for P48/45 in Malaria Parasite Male Gamete Fertility. *Cell*, *104*(1), 153-164. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00199-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00199-4)
- 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., Eling, W. M., Sauerwein, R. W., Waters, A. P., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000853>
- van Schaijk, B. C. L., Janse, C. J., van Gemert, G.-J., van Dijk, M. R., Gego, A., Franetich, J.-F., van de Vegte-Bolmer, M., Yalaoui, S., Silvie, O., Hoffman, S. L., Waters, A. P., Mazier, D., Sauerwein, R. W., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003549>
- van Schaijk, B. C. L., Ploemen, I. H. J., Annoura, T., Vos, M. W., Foquet, L., van Gemert, G.-J., Chevalley-Maurel, S., van de Vegte-Bolmer, M., Sajid, M., Franetich, J.-F., Lorthois, A., Leroux-Roels, G., Meuleman, P., Hermsen, C. C., Mazier, D., Hoffman, S. L., Janse, C. J., Khan, S. M., & Sauerwein, R. W. (2014). A genetically attenuated malaria vaccine candidate based on P. falciparum b9/slarp gene-deficient sporozoites. *ELife*, *3*, e03582. <https://doi.org/10.7554/eLife.03582>
- van Schaijk, B. C. L., van Dijk, M. R., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G.-J., van Dooren, M. W., Eksi, S., Roeffen, W. F. G., Janse, C. J., Waters, A. P., & 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*(2), 216-222. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.05.015>
- Vaughan, A. M., Aly, A. S. I., & Kappe, S. H. I. (2008). Malaria Parasite Pre-Erythrocytic Stage Infection: Gliding and Hiding. *Cell Host & Microbe*, *4*(3), 209-218. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.08.010>
- Vaughan, A. M., & Kappe, S. H. I. (2017). Malaria Parasite Liver Infection and Exoerythrocytic Biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(6), a025486. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025486>
- Venugopal, K., Werkmeister, E., Barois, N., Saliou, J.-M., Poncet, A., Huot, L., Sindikubwabo, F., Hakimi, M. A., Langsley, G., Lafont, F., & Marion, S. (2017). Dual role of the Toxoplasma gondii clathrin adaptor AP1 in the sorting of rhoptry and microneme proteins and in parasite division. *PLOS Pathogens*, *13*(4), e1006331.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006331>

- Vlachou, D., Lycett, G., Sidén-Kiamos, I., Blass, C., Sinden, R. E., & Louis, C. (2001). Anopheles gambiae laminin interacts with the P25 surface protein of Plasmodium berghei ookinetes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 112(2), 229-237. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00371-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00371-6)
- Vlachou, D., Schlegelmilch, T., Runn, E., Mendes, A., & Kafatos, F. C. (2006). The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(4), 384-391. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.06.012>
- Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T. Y., Whitehead, L. W., Chen, L., Lampe, M., Tham, W.-H., Wilson, D., Nebl, T., Marapana, D., Triglia, T., Wong, W., Rogers, K. L., & Cowman, A. F. (2016). Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *Cell Host & Microbe*, 20(1), 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.004>
- Vulliez-Le Normand, B., Tonkin, M. L., Lamarque, M. H., Langer, S., Hoos, S., Roques, M., Saul, F. A., Faber, B. W., Bentley, G. A., Boulanger, M. J., & Lebrun, M. (2012). Structural and Functional Insights into the Malaria Parasite Moving Junction Complex. *PLoS Pathogens*, 8(6), e1002755. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002755>
- Wade, K. R., & Tweten, R. K. (2015). The Apicomplexan CDC/MACPF-like pore-forming proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 26, 48-52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.001>
- Wall, R. J., Roques, M., Katris, N. J., Koreny, L., Stanway, R. R., Brady, D., Waller, R. F., & Tewari, R. (2016). SAS6-like protein in Plasmodium indicates that conoid-associated apical complex proteins persist in invasive stages within the mosquito vector. *Scientific Reports*, 6(1), 28604. <https://doi.org/10.1038/srep28604>
- Wang, J., Zhang, Y., Zhao, Y. O., Li, M. W. M., Zhang, L., Dragovic, S., Abraham, N. M., & Fikrig, E. (2013). Anopheles gambiae Circumsporozoite Protein–Binding Protein Facilitates Plasmodium Infection of Mosquito Salivary Glands. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(7), 1161-1169. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit284>
- Wang, Q., Fujioka, H., & Nussenzweig, V. (2005). Exit of Plasmodium Sporozoites from Oocysts Is an Active Process That Involves the Circumsporozoite Protein. *PLoS Pathogens*, 1(1), e9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010009>
- Wang, Y., Fang, R., Yuan, Y., Hu, M., Zhou, Y., & Zhao, J. (2014). Identification of host proteins interacting with the integrin-like A domain of Toxoplasma gondii micronemal protein MIC2 by yeast-two-hybrid screening. *Parasites & Vectors*, 7, 543. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0543-1>

- Warburg, A., & Miller, L. (1992). Sporogonic development of a malaria parasite in vitro. *Science*, 255(5043), 448-450. <https://doi.org/10.1126/science.1734521>
- Wasmuth, J. D., Pszeny, V., Haile, S., Jansen, E. M., Gast, A. T., Sher, A., Boyle, J. P., Boulanger, M. J., Parkinson, J., & Grigg, M. E. (2012). Integrated Bioinformatic and Targeted Deletion Analyses of the SRS Gene Superfamily Identify SRS29C as a Negative Regulator of Toxoplasma Virulence. *MBio*, 3(6), e00321-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00321-12>
- Wasmuth, J., Daub, J., Peregrin-Alvarez, J. M., Finney, C. A. M., & Parkinson, J. (2009). The origins of apicomplexan sequence innovation. *Genome Research*, 19(7), 1202-1213. <https://doi.org/10.1101/gr.083386.108>
- Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W.-H., de Jong, N. W. M., Harvey, K. L., Fowkes, F. J. I., Barlow, P. N., Rayner, J. C., Wright, G. J., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2015). Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *PLOS Pathogens*, 11(2), e1004670. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004670>
- Wells, M. B., & Andrew, D. J. (2019). Anopheles Salivary Gland Architecture Shapes Plasmodium Sporozoite Availability for Transmission. *MBio*, 10(4), e01238-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01238-19>
- White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., & Dondorp, A. M. (2014). Malaria. *The Lancet*, 383(9918), 723-735. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60024-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0)
- WHO. (2015). *Guidelines for the treatment of malaria*.
- WHO. (2019a). *Guidelines for malaria vector control*.
- WHO. (2019b). *Model List of Essential Medicines (21th list)*.
- WHO. (2020). *World malaria report 2020—20 years of global progress & challenges*.
- Williamson, K. C., Criscio, M. D., & 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. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90058-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90058-6)
- Wisse, E., Braet, F., Dianzhong Luo, De Zanger, R., Jans, D., Crabbe, E., & Vermoesen, A. (1996). Structure and Function of Sinusoidal Lining Cells in the Liver. *Toxicologic Pathology*, 24(1), 100-111. <https://doi.org/10.1177/019262339602400114>
- Wong, W., Huang, R., Menant, S., Hong, C., Sandow, J. J., Birkinshaw, R. W., Healer, J., Hodder, A. N., Kanjee, U., Tonkin, C. J., Heckmann, D., Soroka, V., Søgaard, T. M. M., Jørgensen, T., Duraisingh, M. T., Czabotar, P. E., de Jongh, W. A., Tham, W.-H., Webb, A. I., ... Cowman, A. F. (2019). Structure of Plasmodium falciparum Rh5–CyRPA–Ripr

- invasion complex. *Nature*, 565(7737), 118-121. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0779-6>
- Wright, K. A. (1969). The anatomy of salivary glands of *Anopheles stephensi* Liston. *Canadian Journal of Zoology*, 47(4), 579-587. <https://doi.org/10.1139/z69-101>
- Wu, Y., Ellis, R. D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E. M., Mahanty, S., Fay, M. P., Narum, D., Rausch, K., Miles, A. P., Aebig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., ... Durbin, A. P. (2008). Phase 1 Trial of Malaria Transmission Blocking Vaccine Candidates Pfs25 and Pvs25 Formulated with Montanide ISA 51. *PLoS ONE*, 3(7), e2636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002636>
- Yahata, K., Hart, M. N., Davies, H., Asada, M., Templeton, T. J., Treeck, M., Moon, R. W., & Kaneko, O. (2020). Gliding motility of Plasmodium merozoites. *Biorxiv*, 2020.05.01.072637. <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.072637>
- 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., & Froissard, P. (2008). Scavenger Receptor BI Boosts Hepatocyte Permissiveness to Plasmodium Infection. *Cell Host & Microbe*, 4(3), 283-292. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.07.013>
- Yalaoui, S., Zougbedé, S., Charrin, S., Silvie, O., Arduise, C., Farhati, K., Boucheix, C., Mazier, D., Rubinstein, E., & Froissard, P. (2008). 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000010>
- Yamauchi, L. M., Coppi, A., Snounou, G., & Sinnis, P. (2007). Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology*, 9(5), 1215-1222. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00861.x>
- Yang, A. S. P., & Boddey, J. A. (2017). Molecular mechanisms of host cell traversal by malaria sporozoites. *International Journal for Parasitology*, 47(2-3), 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.002>
- Yang, A. S. P., Lopaticki, S., O'Neill, M. T., Erickson, S. M., Douglas, D. N., Kneteman, N. M., & Boddey, J. A. (2017). AMA1 and MAEBL are important for Plasmodium falciparum sporozoite infection of the liver. *Cellular Microbiology*, 19(9), e12745. <https://doi.org/10.1111/cmi.12745>
- 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., Tweedell, R. E., Dinglasan, R. R., Douglas, D. N., Kneteman, N. M., & Boddey, J. A. (2017). Cell Traversal Activity Is Important for Plasmodium falciparum Liver Infection in Humanized Mice. *Cell Reports*, 18(13), 3105-3116. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.017>

- Yap, A., Azevedo, M. F., Gilson, P. R., Weiss, G. E., O'Neill, M. T., Wilson, D. W., Crabb, B. S., & Cowman, A. F. (2014). Conditional expression of apical membrane antigen 1 in *Plasmodium falciparum* shows it is required for erythrocyte invasion by merozoites. *Cellular Microbiology*, *16*(5), 642-656. <https://doi.org/10.1111/cmi.12287>
- Yu, M., Romer, K. A., Nieland, T. J. F., Xu, S., Saenz-Vash, V., Penman, M., Yesilaltay, A., Carr, S. A., & Krieger, M. (2011). Exoplasmic cysteine Cys384 of the HDL receptor SR-BI is critical for its sensitivity to a small-molecule inhibitor and normal lipid transport activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(30), 12243-12248. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109078108>
- Yuda, M., & Ishino, T. (2004). Liver invasion by malarial parasites—How do malarial parasites break through the host barrier? *Cellular Microbiology*, *6*(12), 1119-1125. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00474.x>
- Yuda, M., Sakaida, H., & 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), 1711-1716. <https://doi.org/10.1084/jem.190.11.1711>
- Zani, I., Stephen, S., Mughal, N., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S., & Ponnambalam, S. (2015). Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells*, *4*(2), 178-201. <https://doi.org/10.3390/cells4020178>
- Zhang, H., Compaore, M. K. A., Lee, E., Liao, M., Zhang, G., Sugimoto, C., Fujisaki, K., Nishikawa, Y., & Xuan, X. (2007). Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites☆. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *151*(2), 205-212. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.11.005>
- Zheng, J., Pan, H., Gu, Y., Zuo, X., Ran, N., Yuan, Y., Zhang, C., & Wang, F. (2019). Prospects for Malaria Vaccines : Pre-Erythrocytic Stages, Blood Stages, and Transmission-Blocking Stages. *BioMed Research International*, *2019*, 9751471. <https://doi.org/10.1155/2019/9751471>
- Zimmerman, P. A. (2017). *Plasmodium vivax* Infection in Duffy-Negative People in Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *97*(3), 636-638. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0461>

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : CYCLE DE VIE DES DIFFERENTS APICOMPLEXES. (ADAPTE DE WASMUTH 2009)	5
FIGURE 2 : CYCLE DE VIE DE <i>PLASMODIUM</i> . (MENARD 2013)	9
FIGURE 3 : CARTE MONDIALE DE REPARTITION DU PALUDISME. (WHO MALARIA REPORT 2020).....	10
FIGURE 4 : SYMPTOMES D'ACCES SEVERES A <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> SELON L'AGE. (ADAPTE DE WHITE 2014).....	14
FIGURE 5 : PLANCHES D'ANALYSE MICROSCOPIQUE DES DIFFERENTES ESPECES DE <i>PLASMODIUM</i> INFECTANT L'HUMAIN. (ADAPTE DE ASHLEY 2018).....	15
FIGURE 6 : VACCINS CANDIDATS CONTRE LE PALUDISME ET LES STADES CIBLES. (DRAPER 2018).....	26
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MORPHOLOGIE DES APICOMPLEXES. (MORRISSETTE 2002).....	30
FIGURE 8 : STRUCTURE SUBCELLULAIRE ET FORME DU SPOROZOÏTE DE <i>PLASMODIUM</i> . (ADAPTE DE FRISCHKNECHT 2017)	32
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DEVELOPPEMENT DE <i>PLASMODIUM</i> CHEZ LE MOUSTIQUE. (ADAPTE DE VLACHOU 2006).....	34
FIGURE 10 : ANALYSE MICROSCOPIQUE DE L'INVASION DES GLANDES SALIVAIRES PAR LES SPOROZOÏTES. (ADAPTE DE MEISS 1992) ..	39
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS CONSTITUANTS DU GLIDEOSOME DES APICOMPLEXES. (ADAPTE DE FRENAL 2017).....	41
FIGURE 12 : DOMAINES FONCTIONNELS DES PROTEINES DE LA FAMILLE TRAP. (ADAPTE DE KLUG 2017).....	43
FIGURE 13 : MODELE DES INTERACTIONS LIGANDS-RECEPTEURS PERMETTANT LA SEQUESTRATION DANS LE SINUSOÏDE HEPATIQUE DES SPOROZOÏTES. (ADAPTE DE SACKS 2015)	49
FIGURE 14 : MODELE DES DIFFERENTES CONFORMATIONS DE LA CSP CHEZ LE SPOROZOÏTE, DU DEVELOPPEMENT CHEZ LE MOUSTIQUE A L'INVASION DES HEPATOCYTES DE L'HOTE MAMMIFERE. (ADAPTE DE COPPI 2011)	51
FIGURE 15 : MODELE DE LA TRAVERSEE DES HEPATOCYTES PAR LES SPOROZOÏTES. (ADAPTE DE RISCO-CASTILLO 2015)	54
FIGURE 16 : MODELE DE L'INVASION PRODUCTIVE D'UNE CELLULE HOTE PAR LES TACHYZOÏTES DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> . (ADAPTE DE FRENAL 2017).....	58
FIGURE 17 : MODELE DE L'INVASION PRODUCTIVE D'UNE CELLULE HOTE PAR LES MEROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i> . (ADAPTE DE FRENAL 2017)	59
FIGURE 18 : LIGANDS PARASITAIRES ET RECEPTEURS DE L'HOTE IMPLIQUES DANS L'INVASION DES ERYTHROCYTES PAR LES MEROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i> . (ADAPTE DE COWMAN 2017)	60
FIGURE 19 : MODELE DE LA JONCTION MOBILE ET SON INTERACTION AVEC LA CELLULE HOTE LORS DE L'INVASION PAR UN TACHYZOÏTE DE <i>TOXOPLASMA</i> . (ADAPTE DE GUERIN 2017)	62
FIGURE 20 : MODELE DE L'INVASION DES HEPATOCYTES PAR LES SPOROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i> . (ADAPTE DE KAUSHANSKY 2015). 65	65
FIGURE 21 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SORTIE DES HEPATOCYTES PAR <i>PLASMODIUM</i> . (PRUDENCIO 2016)	68
FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE MOLECULAIRE COMMUNE AUX PROTEINES DE LA FAMILLE DES TETRASPANINES. (MASSE 2016).....	70
FIGURE 23 : STRUCTURE DES RECEPTEURS Eph. (ADAPTÉ DE LISABETH 2013)	75
FIGURE 24 : MODELE D'ENTREE DANS LES HEPATOCYTES PAR LES SPOROZOÏTES DE DIFFERENTES ESPECES DE <i>PLASMODIUM</i> . (MANZONI 2017)	77
FIGURE 25 : LA FAMILLE DES PROTEINES A DOMAINE 6-CYSTEINES CHEZ <i>PLASMODIUM</i> . (ADAPTE DE ARREDONDO 2017).....	78
FIGURE 26 : STRUCTURE DES PROTEINES DE LA FAMILLE DES PROTEINES A DOMAINE 6-CYSTEINES CHEZ <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> . (ADAPTE DE ARREDONDO 2017)	79
FIGURE 27 : SCHEMA DES ETAPES D'ANALYSE DE MUTANTS CONDITIONNELS PAR L'APPROCHE DiCre.	94
FIGURE 28 : ANALYSE PHENOTYPIQUE DES SPOROZOÏTES.....	95
FIGURE 29 : MODELE HYPOTHETIQUE DE LA SECRETION DE SOUS-POPULATIONS DISTINCTES DE MICRONEMES LORS DE LA TRAVERSEE OU L'INVASION PRODUCTIVE DE CELLULES PAR LES SPOROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i> . (ADAPTE DE LOUBENS 2020)	258

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	i
RÉSUMÉ / ABSTRACT	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	iv
SOMMAIRE	vii
PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION.....	1
I. GENERALITES SUR LE PALUDISME ET <i>PLASMODIUM</i>.....	2
1. Historique de la maladie.....	2
(1) Hypothèses sur l'origine.....	2
(2) Dates clés.....	3
2. Le phylum des Apicomplexa	4
3. Les différentes espèces de <i>Plasmodium</i>.....	6
(1) Espèces infectant l'homme	6
(2) Espèces modèles en laboratoire.....	7
4. Cycle de vie du parasite	8
5. Épidémiologie.....	9
(1) Répartition géographique	9
(2) Populations à risque de paludisme sévère.....	10
i. Femmes enceintes	11
ii. Nourrissons.....	11
iii. Enfants de moins de cinq ans	11
iv. Individus séropositifs (VIH).....	12
v. Voyageurs.....	12
6. Signes cliniques	12
(1) Forme simple.....	12
(2) Formes graves	13
7. Diagnostic.....	14
(1) Microscopie.....	15
(2) Test de diagnostic rapide	16
(3) Sérologie	17
(4) Amplification d'acides nucléiques	17
(5) Spectrométrie de masse	18
(6) Cytométrie en flux	18
(7) Détection de composés volatiles.....	19
8. Moyens de lutte	19
(1) Traitements.....	19
i. Artémisinine et dérivés	20
ii. Autres molécules anti-paludiques.....	21
iii. Sur le terrain	22
(2) Prévention.....	23

i.	Lutte anti-vectorielle	23
ii.	Prophylaxie	24
iii.	Vaccins.....	25
	Vaccins ciblant le stade érythrocytaire	25
	Vaccin ciblant la transmission	27
	Vaccin ciblant les stades pré-érythrocytaires.....	27
II.	BIOLOGIE DES SPOROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i>	30
1.	Structure cellulaire des sporozoïtes.....	30
(1)	Organites communs aux apicomplexes.....	30
(2)	Spécificités des sporozoïtes de <i>Plasmodium</i>	32
2.	Développement des sporozoïtes chez le moustique	33
(1)	De l'hôte vertébré à l'estomac du moustique	33
(2)	Développement dans l'oocyste	35
(3)	L'invasion des glandes salivaires.....	36
i.	Reconnaissance des glandes salivaires.....	36
ii.	Invasion des glandes salivaires	38
3.	La motilité du parasite : le gliding	39
(1)	La motilité du sporozoïte	39
(2)	La machinerie responsable de la motilité des apicomplexes : le glidéosome	40
(3)	TRAP, protéine de surface des sporozoïtes impliquée dans la motilité	42
i.	Les domaines fonctionnels des protéines de la famille TRAP	43
ii.	Le rôle de TRAP chez les sporozoïtes	44
iii.	Autres protéines de la famille TRAP.....	45
4.	Invasion de l'hôte : de la peau à l'hépatocyte.....	46
(1)	De l'injection à la circulation sanguine : la phase cutanée.....	46
i.	La transmission du moustique à l'hôte vertébré	46
ii.	Du site d'injection au flux sanguin	47
(2)	La séquestration dans le foie.....	48
i.	Reconnaissance de ligands spécifiques du sinusoiide hépatique	49
ii.	Importance de l'antigène de surface du sporozoïte, la CSP, dans la séquestration hépatique	50
(3)	Le passage de la barrière sinusoiidale	52
5.	Invasion des hépatocytes.....	52
(1)	La traversée cellulaire.....	53
i.	Importance de la traversée cellulaire chez les apicomplexes.....	53
ii.	Mécanisme de traversée des hépatocytes par les sporozoïtes.....	53
iii.	Rôle de la traversée des hépatocytes.....	55
iv.	Facteurs parasitaires impliqués	56
(2)	Invasion productive	57
i.	Les mécanismes d'invasion productive chez les apicomplexes	58
	L'attachement et la réorientation	58
	La jonction mobile	61
	Au sein de la vacuole	63
ii.	L'invasion productive par les sporozoïtes de <i>Plasmodium</i>	64
	L'attachement et l'interaction initiale avec l'hépatocyte	64
	Une jonction mobile putative chez le sporozoïte	66
(3)	Dans l'hépatocyte.....	67
i.	Marqueurs des stades hépatiques	67
ii.	Libération des mérozoïtes	67

III. ACTEURS MOLECULAIRES DE L'INVASION PRODUCTIVE DES CELLULES PAR LES SPOROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i>	69
1. Facteurs de l'hôte impliqués dans l'invasion.....	69
(1) CD81	69
i. Généralités sur les tétraspanines.....	69
ii. CD81.....	71
(2) SRB1 et les Scavenger Receptor type B.....	72
i. Généralités sur les récepteurs scavengers	72
ii. LIMP-2	72
iii. CD36.....	73
iv. SR-B1.....	74
(3) EphA2.....	75
i. Généralités sur les récepteurs Eph.....	75
ii. EphA2.....	76
2. Facteurs spécifiques du sporozoïte impliqués dans l'invasion : les protéines à domaine 6-cystéines.....	77
(1) La famille de protéines à domaine 6-cystéines	78
(2) Structure du domaine à 6-cystéines	79
(3) Les protéines exprimées chez le sporozoïte.....	81
i. P36	81
ii. P52	82
iii. B9	83
iv. P12p	84
v. P38	84
(4) Protéines exprimées à d'autres stades dont la fonction est connue	85
i. P230 et P48/45	85
ii. P12 et P41.....	86
iii. P92	86
iv. LISP2.....	87
v. P47	87
vi. P230p	87
OBJECTIFS.....	89
MÉTHODOLOGIE.....	92
DEUXIÈME PARTIE : RÉSULTATS.....	96
I. IDENTIFICATION DE B9 COMME ACTEUR DE L'INVASION PRODUCTIVE PAR LES SPOROZOÏTES.....	97
(1) Contexte.....	97
(2) Stratégies et résultats.....	97
(3) Conclusion.....	99
(4) Manuscrit B9 finalisé	99
II. ÉTUDE DES PROTEINES ESSENTIELLES A L'INVASION CHEZ LES MEROZOÏTES ET LES SPOROZOÏTES..	148
1. Mise en place de la stratégie DiCre chez <i>P. berghei</i> pour l'étude chez le sporozoïte de gènes essentiels au stade sanguin.....	148
(1) Contexte.....	148
(2) Stratégie et résultats.....	149
(3) Conclusion.....	150
2. Étude d'AMA1 et des RONS, protéines de la jonction mobile.....	151
(1) Contexte.....	151

(2) Stratégie et résultats.....	152
(3) Conclusion.....	153
(4) Manuscrit AMA1-RONs finalisé	154
3. Étude de la protéine CLAMP (Claudin-Like Apicomplexan Microneme Protein).....	210
(1) Contexte.....	210
(2) Stratégie et résultats.....	210
(3) Conclusion.....	211
(4) Manuscrit CLAMP	212
TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION.....	244
I. B9, NOUVEL ACTEUR DE L'INVASION PRODUCTIVE PAR LES SPOROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i>	245
II. UNE NOUVELLE FONCTION DES PROTEINES AMA1 ET RONS CHEZ LE SPOROZOÏTE	248
III. CLAMP, UN NOUVEL ACTEUR IMPLIQUÉ DANS LA MOTILITÉ DES SPOROZOÏTES DE <i>P. BERGHEI</i>	253
IV. APPORT DES APPROCHES GÉNÉTIQUES CONDITIONNELLES POUR LES ÉTUDES FONCTIONNELLES CHEZ LES SPOROZOÏTES.....	254
V. HÉTÉROGÉNÉITÉ FONCTIONNELLE DES MICRONEMES	255
VI. CONCLUSION	259
ANNEXES	261
ANNEXE I : Article de recherche – “The dimerisable Cre recombinase allows conditional genome editing in the mosquito stages of <i>Plasmodium berghei</i> ”	261
ANNEXE II : Chapitre de protocole – Conditional Gene Deletion in Mammalian and Mosquito Stages of <i>Plasmodium berghei</i> Using Dimerizable Cre Recombinase	278
BIBLIOGRAPHIE	300
LISTE DES FIGURES	357
TABLE DES MATIÈRES.....	358