

## Phase hépatique du paludisme : voies d'entrée des sporozoïtes de *Plasmodium*

Veronica Risco-Castillo<sup>1,2</sup>, Olivia Son<sup>1,2</sup>, Jean-François Franetich<sup>1,2</sup>, Eric Rubinstein<sup>3,4</sup>,  
Dominique Mazier<sup>1,2,5</sup> et Olivier Silvie<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Inserm, UMR S 945, 91 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

<sup>2</sup> Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, 91 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

<sup>3</sup> Inserm, U1004, Hôpital Paul Brousse, 14 avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif, France

<sup>4</sup> Université Paris-Sud, Institut André Lwoff, 14 avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif, France

<sup>5</sup> Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service Parasitologie-Mycologie, 75013 Paris, France

Auteur correspondant : Olivier Silvie, [olivier.silvie@inserm.fr](mailto:olivier.silvie@inserm.fr)

Reçu le 29 janvier 2013

**Résumé** – Les sporozoïtes de *Plasmodium* sont transmis par des moustiques du genre *Anopheles*, migrent jusqu'au foie et infectent les hépatocytes de l'hôte, où les parasites se multiplient et se différencient avant d'infecter les globules rouges : il s'agit de la phase pré-érythrocytaire de l'infection, asymptomatique et obligatoire. L'invasion des hépatocytes constitue une cible idéale pour des approches anti-paludiques prophylactiques, mais les mécanismes impliqués dans cette étape restent mal connus. Les parasites du phylum *Apicomplexa* infectent leurs cellules cibles à travers une structure spécifique, appelée jonction, pour former une vacuole parasitophore, essentielle au développement du parasite. La tétraspanine CD81, l'un des récepteurs du virus de l'hépatite C, joue un rôle crucial lors de l'infection du foie par les sporozoïtes de *Plasmodium*. CD81 intervient à la phase précoce de l'infection, probablement au niveau de l'entrée du sporozoïte. Le rôle précis de CD81 au cours de l'infection reste à définir, mais l'hypothèse actuelle est que CD81 intervient indirectement, en régulant l'activité d'un ou plusieurs autres facteurs essentiels, d'origine hépatocytaire ou parasitaire, au sein de microdomaines membranaires enrichis en tétraspanines.

**Mots clés** : Paludisme / *Plasmodium* / sporozoïtes / hépatocytes / tétraspanine CD81

**Abstract** – *Plasmodium* sporozoite entry pathways during malaria liver infection.

*Plasmodium* parasites, the causative agents of malaria, are transmitted by female *Anopheles* mosquitoes, which inject sporozoites into the skin of the host. The motile sporozoites enter the blood stream and, upon reaching the liver, transform into liver stages inside hepatocytes. The parasites enter host cells actively, using their actomyosin motor machinery to propel themselves through a specialized structure called junction. Penetration inside an invagination of the host cell plasma membrane results in the formation of the parasitophorous vacuole, which is essential for parasite further development. The mechanisms of sporozoite entry into host cells remain poorly understood at the molecular level. We reported for the first time a host factor required for infection of hepatocytes by *Plasmodium* sporozoites, the tetraspanin CD81, which also serves as a receptor for the hepatitis C virus. CD81 is involved at an early step of the infection, however no evidence for a direct interaction between CD81 and the parasite could be found. Although sporozoites can use several independent pathways to enter hepatocytes, depending on the parasite species and the host cell type, we showed that *P. falciparum*, the deadliest human malaria parasite, depends on CD81 to infect hepatocytes. We identified structural determinants in the CD81 large extracellular domain, and demonstrated that CD81 function is regulated by its molecular

**environment in specialized tetraspanin-enriched membrane microdomains. Based on these data we propose that CD81 acts indirectly during malaria infection, by interacting with other essential but still unidentified factor(s), possibly a receptor for the sporozoites, within specific microdomains of the hepatocyte plasma membrane.**

**Key words:** Malaria / *Plasmodium* / sporozoites / hepatocytes / tetraspanin CD81

## Abréviations

5A6 : Anticorps anti-hCD81  
 AMA-1 : *Apical Membrane Antigen-1*  
 CD81LEL : grande boucle extracellulaire de CD81  
 CD9 : tétraspanine structurellement très proche de CD81  
 CSP : *CircumSporozoite Protein*  
 ERM : *Ezrin-Radixin-Moesin*  
 EWI-2 et EWI-F/CD9P-1 : molécules à domaines d'immunoglobulines, caractérisées par la présence d'une séquence EWI  
 hCD81 : CD81 humain  
 Hepa1-6 : lignée d'hépatome de souris  
 HepG2 : lignée d'hépatocarcinome humain n'exprimant pas CD81  
 MBCD : Méthyl Béta CycloDextrine  
 MT81 et MT81 $\underline{w}$  : anticorps monoclonaux de rat spécifiques de CD81 murin  
 RON : *RhOptry Neck protein*  
 siRNA : ARN interférent  
 SR-BI : *Scavenger Receptor BI*  
 TEM : microdomaine enrichi en tétraspanines  
 Tétraspanine CD81 : un des récepteurs du virus de l'hépatite C  
 TRAP : *Thrombospondin Related Anonymous Protein*  
 VHC : Virus de l'Hépatite C

## Introduction

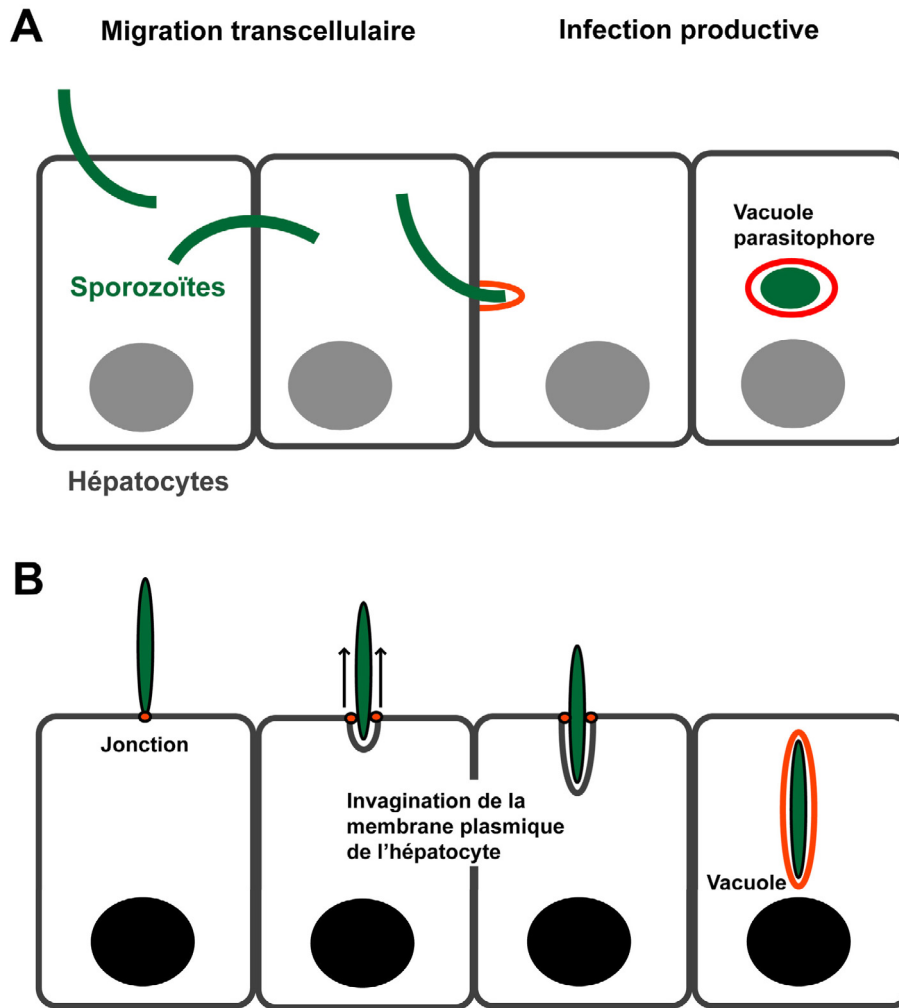
Le paludisme est dû à l'infection par un protozoaire du genre *Plasmodium* et reste un problème majeur de santé publique dans le monde, responsable de 200 à 300 millions de cas et de 0,5 à 1 million de morts chaque année, essentiellement en Afrique subsaharienne (WHO, 2011). *Plasmodium* a un cycle de vie complexe alternant entre un moustique vecteur et un hôte vertébré. La transmission du parasite intervient à l'occasion d'une piqûre par un moustique femelle de genre *Anopheles*, qui injecte des formes plasmodiales appelées sporozoïtes dans la peau de l'hôte. Les sporozoïtes motiles migrent activement à travers la peau, puis gagnent la circulation sanguine pour atteindre rapidement le foie. Ils traversent ensuite la barrière sinusoidale hépatique, migrent à travers plusieurs cellules puis finalement pénètrent dans un hépatocyte en formant une vacuole parasitophore. C'est au sein de ce compartiment membranaire

particulier que les sporozoïtes se différencient en formes exo-érythrocytaires (schizontes hépatiques). Après une phase de réplication de 2 à 10 jours selon l'espèce, ces formes libèrent dans le sang des milliers de mérozoïtes, qui infectent les globules rouges et initient la phase érythrocytaire de l'infection, associée à la symptomatologie du paludisme.

Dans les conditions naturelles de transmission, le développement pré-érythrocytaire de *Plasmodium* est une phase initiale, obligatoire et asymptomatique de l'infection, et représente donc une cible idéale pour des approches anti-paludiques prophylactiques. Le principal vaccin anti-paludique en cours de développement, RTS,S, cible une protéine majeure de la surface des sporozoïtes, la *circumsporozoite protein* (CSP). Ce vaccin est actuellement en phase III d'essai clinique en Afrique, mais n'induit qu'une protection partielle contre *P. falciparum* (Agnandji *et al.*, 2011). Par ailleurs, le nombre de médicaments actifs contre les stades hépatiques de *Plasmodium* reste très limité (Mazier *et al.*, 2009). Il est clair que le développement rationnel de nouvelles stratégies anti-paludiques prophylactiques requiert une meilleure compréhension des mécanismes impliqués aux stades pré-érythrocytaires de *Plasmodium*.

## Mécanismes d'entrée

Les sporozoïtes de *Plasmodium* infectent les hépatocytes en formant une vacuole parasitophore, indispensable à la différenciation des sporozoïtes en schizontes, libérant à maturité des mérozoïtes capables d'initier une phase d'infection érythrocytaire (figure 1A). L'invasion par les sporozoïtes de *Plasmodium* reste très mal caractérisée d'un point de vue moléculaire. *Plasmodium* appartient au phylum des *Apicomplexa*, qui infectent leurs cellules cibles de manière active *via* un mécanisme spécifique impliquant la machinerie parasitaire de la motilité. Les formes invasives des *Apicomplexa* possèdent des organelles apicales spécialisées, les micronèmes et les rhoptries. Ces vésicules secrètent leur contenu de façon séquentielle lors du déplacement du parasite et de l'invasion des cellules. Certaines des protéines sécrétées contiennent des domaines adhésifs potentiellement impliqués dans les interactions avec les cellules de l'hôte. Selon le modèle actuel, fondé surtout sur



**Fig. 1.** (A) Après inoculation à l'hôte par un moustique, les sporozoïtes de *Plasmodium* migrent à travers plusieurs cellules, dans la peau puis dans le foie, avant d'infecter un hépatocyte en formant une vacuole parasitophore, où le parasite se multiplie (infection productive). (B) La formation de la vacuole parasitophore implique la formation initiale d'une jonction entre l'extrémité apicale du sporozoïte et la membrane de la cellule hôte. La mobilisation active de cette jonction par une machinerie motrice parasitaire propulse le sporozoïte au sein d'une invagination de la membrane plasmique de l'hépatocyte, aboutissant à l'individualisation de la vacuole parasitophore.

des observations faites avec d'autres stades de *Plasmodium* (mérozoïtes) ou avec le parasite *Toxoplasma gondii* (Baum *et al.*, 2008a; Santos *et al.*, 2009), l'invasion des cellules implique la formation d'une jonction à travers laquelle le sporozoïte se propulse de manière active vers l'intérieur de la cellule, grâce à son moteur actine-myosine (Sattler *et al.*, 2011). En toute hypothèse, cette jonction pourrait résulter de l'interaction de protéines adhésives de la surface du sporozoïte avec des récepteurs de l'hépatocyte, qui n'ont pas été identifiés à ce jour. L'invasion à travers une jonction aboutit à la formation de la vacuole parasitophore, dont la membrane dérive principalement de la membrane plasmique de la cellule

hépatique (Bano *et al.*, 2007), et qui est essentielle au développement des formes hépatiques du parasite (Mota *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2005; Silvie *et al.*, 2006b) (figure 1B).

La phase d'invasion productive est précédée d'une phase de migration transcellulaire (ou transmigration), pendant laquelle les sporozoïtes traversent plusieurs cellules dont ils rompent la membrane plasmique (Mota *et al.*, 2001) (figure 1A). La transmigration permet au sporozoïte d'atteindre sa niche finale, l'hépatocyte. En effet, les sporozoïtes sont injectés dans la peau par le moustique, et doivent migrer dans le derme jusqu'à ce qu'ils pénètrent dans un vaisseau sanguin et gagnent la circulation

sanguine (Vanderberg & Frevvert, 2004; Amino *et al.*, 2006, 2008; Yamauchi *et al.*, 2007). Une fois dans l'espace sinusoiéde hépatique, les sporozoïtes doivent traverser la barrière sinusoiéde pour atteindre les hépatocytes sous-jacents (Ishino *et al.*, 2004; Frevvert *et al.*, 2005). Dans le parenchyme hépatique, les sporozoïtes continuent de migrer à travers plusieurs hépatocytes avant de passer à un mode d'invasion productive, caractérisée par la formation d'une vacuole parasitophore (Mota *et al.*, 2001; Frevvert *et al.*, 2005).

### Implication de CD81 au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*

Dans le cadre d'une étude de facteurs d'hôte potentiellement impliqués dans l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*, nous nous sommes intéressés au rôle des tétraspanines, et plus particulièrement CD81. Les tétraspanines forment une famille de protéines transmembranaires caractérisées par leur structure (Charrin *et al.*, 2009a). Elles sont impliquées dans de nombreux processus, notamment dans des phénomènes de remaniement membranaire et au cours de certaines maladies infectieuses, et plus spécialement CD81, qui est nécessaire à l'infection des hépatocytes par le virus de l'hépatite C (VHC). Nous avons découvert que CD81 joue également un rôle essentiel au cours de l'infection par les sporozoïtes du parasite humain *P. falciparum* et du parasite de rongeurs *P. yoelii* (Silvie *et al.*, 2003). CD81 est la première molécule de l'hôte identifiée comme essentielle à l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*.

Le rôle de CD81 a été initialement démontré avec le parasite de rongeur *P. yoelii*, dans un modèle d'infection *in vivo* de souris *knockout* pour CD81 (Silvie *et al.*, 2003). Alors que l'injection de sporozoïtes de *P. yoelii* engendre un paludisme chez les souris  $cd81^{+/+}$ , les souris  $cd81^{-/-}$  sont totalement réfractaires à l'infection (Silvie *et al.*, 2003). Par contre, les souris déficientes en CD9, une autre tétraspanine structurellement très proche de CD81, sont sensibles à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*, ce qui indique un rôle spécifique de CD81 au cours de l'infection par *Plasmodium*. Des expériences d'infection *in vitro* de cultures primaires d'hépatocytes isolés de souris  $cd81^{-/-}$  ont ensuite permis de démontrer que la résistance des souris  $cd81^{-/-}$  à l'infection par *P. yoelii* est due à un défaut d'invasion productive par formation d'une vacuole, alors que la transmigration des sporozoïtes n'est pas modifiée par l'absence de CD81 (Silvie *et al.*, 2003). Des anticorps monoclonaux spécifiques de CD81, mais pas de CD9, bloquent complètement l'infection lorsqu'ils sont ajoutés avant ou en même temps que les sporozoïtes,

mais n'ont aucun effet lorsqu'ils sont ajoutés après l'entrée des parasites dans les cellules. Les souris  $cd81^{-/-}$  restent sensibles à *P. yoelii* lorsque l'infection est induite par inoculation de globules rouges infectés, qui court-circuite la phase de développement dans le foie. Cette observation est en accord avec l'absence d'expression de CD81 dans les érythrocytes, et montre que CD81 est spécifiquement impliqué lors de l'étape d'infection du foie. CD81 est également nécessaire à l'infection par *P. yoelii* des cellules de la lignée d'hépatome de souris Hepa1-6, où les anticorps anti-CD81 et l'inhibition d'expression de CD81 par interférence à ARN (*siRNA*) inhibent l'entrée des sporozoïtes (Silvie *et al.*, 2006a, 2006b). *P. yoelii* infecte les hépatocytes humains *in vitro*, et le CD81 humain (hCD81) permet l'entrée des sporozoïtes de *P. yoelii* dans des hépatocytes de souris transgéniques exprimant la version humaine (mais pas murine) de CD81, ainsi que dans des cellules Hepa1-6 transfectées pour exprimer le CD81 humain (Silvie *et al.*, 2006a, 2006b). De plus, l'expression ectopique de CD81 dans les cellules HepG2, qui n'expriment pas CD81 (Flint *et al.*, 1999; Charrin *et al.*, 2001), suffit à les rendre sensibles à l'infection par *P. yoelii* (Silvie *et al.*, 2006b). Dans les cellules HepG2/CD81, le niveau d'infection est corrélé au niveau d'expression de CD81 (Silvie *et al.*, 2006b).

Nous avons également démontré le rôle essentiel de CD81 dans l'infection par les sporozoïtes de *P. falciparum* (Silvie *et al.*, 2003), dans un modèle d'infection d'hépatocytes primaires humains (Mazier *et al.*, 1985). Des anticorps spécifiques de CD81 bloquent efficacement l'infection par *P. falciparum* (Silvie *et al.*, 2003), de manière dose-dépendante, et l'inhibition d'expression de CD81 par *siRNA* permet également d'inhiber l'infection par *P. falciparum* dans les hépatocytes primaires humains (Silvie *et al.*, 2006a). Alors que l'expression ectopique de CD81 suffit à rendre les HepG2 sensibles à *P. yoelii*, les HepG2/CD81 restent réfractaires à l'infection par *P. falciparum*, ce qui montre que d'autres molécules de l'hôte sont impliquées spécifiquement lors de l'infection par le parasite humain (Silvie *et al.*, 2006b).

Bien que très proche de *P. yoelii*, le parasite de rongeur *P. berghei* infecte la lignée HepG2 aussi bien que la lignée transgénique HepG2/CD81, ce qui démontre que ce parasite peut utiliser des voies CD81-indépendantes pour infecter les cellules (Hollingdale *et al.*, 1983; Silvie *et al.*, 2006a). En accord avec cette notion, nous avons montré que les hépatocytes des souris  $cd81^{-/-}$  sont sensibles à l'infection par *P. berghei*, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Silvie *et al.*, 2003). CD81 ne semble pas impliqué au cours de l'infection de différentes cellules d'origine humaine par *P. berghei*, comme le montre l'absence d'inhibition par anticorps ou *siRNA* spécifiques de CD81 dans les lignées hépatocytaires HepG2 et Huh-7, ou

dans la lignée non-hépatocytaire HeLa (Silvie *et al.*, 2006a; Silvie *et al.*, 2007). Par contre, dans la lignée d'hépatome murin Hepa1-6, l'infection par *P. berghei* dépend de CD81 et est inhibée par des anticorps ou des *siRNA* spécifiques de CD81 de souris (Silvie *et al.*, 2007). *P. berghei* peut utiliser à la fois des voies CD81-dépendantes et CD81-indépendantes dans les hépatocytes primaires de souris *in vitro*, comme le montre l'inhibition partielle induite par anticorps anti-CD81 dans ces cellules (Silvie *et al.*, 2007; Yalaoui *et al.*, 2008a). La contribution relative de ces deux voies varie selon le fond génétique de la souris (Silvie *et al.*, 2007).

## CD81 et barrière d'espèce

CD81 humain restaure la sensibilité à l'infection par *P. yoelii* dans des cellules murines où CD81 murin est soit absent (souris *knockout* transgéniques pour hCD81), soit neutralisé par des anticorps (Silvie *et al.*, 2006a, 2006b; Yalaoui *et al.*, 2008b). De plus, *P. yoelii*, comme *P. berghei*, infecte très bien les cellules humaines, y compris les hépatocytes primaires humains, ce qui démontre l'absence de barrière d'espèce pour l'infection du foie par ces parasites, contrairement aux érythrocytes (Hollingdale *et al.*, 1983; Calvo-Calle *et al.*, 1994; Silvie *et al.*, 2006b, 2007). Par contre, il existe une barrière d'espèce pour *P. falciparum*, qui infecte les hépatocytes humains mais pas ceux de souris (Silvie *et al.*, 2006b). Les sporozoïtes de *P. falciparum* n'infectent pas les hépatocytes des souris transgéniques pour hCD81, ce qui montre que CD81 seul ne suffit pas à expliquer cette barrière d'espèce, et que d'autres facteurs sont impliqués (Silvie *et al.*, 2006b).

## Déterminants moléculaires de CD81 impliqués dans l'infection

En nous appuyant sur l'observation que CD81 humain mais pas CD9 permet l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*, nous avons réalisé une étude des déterminants moléculaires de CD81 à l'aide de molécules chimériques hCD9/hCD81 (Yalaoui *et al.*, 2008b). Cette étude a montré que, comme pour le VHC, la grande boucle extracellulaire de CD81 (CD81LEL) est essentielle à la fonction de CD81 au cours de l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*. CD81LEL est formée de cinq hélices, A à E. Les hélices A, B et E forment une structure conservée chez les tétraspanines, où vient s'insérer un domaine variable formé chez CD81 par les hélices C et D. Nous avons pu montrer que la première moitié de CD81LEL,

comprenant les hélices A et B, joue un rôle essentiel dans l'infection. L'hélice C, bien que non essentielle, contribue également à la fonction de CD81 au cours de l'infection par *P. yoelii*. Par contre, l'hélice D, qui est nécessaire à la fixation de la protéine d'enveloppe E2 du VHC (Higginbottom *et al.*, 2000), ne joue aucun rôle dans l'infection par les sporozoïtes. De façon remarquable, une chimère dans laquelle la fin de l'hélice A et toute l'hélice B de CD9 ont été remplacées par les 21 acides aminés correspondants de CD81 est fonctionnelle au cours de l'infection par *Plasmodium* (Yalaoui *et al.*, 2008b). Des expériences de mutagenèse dirigée sur des résidus sélectionnés dans cette région ont permis de démontrer le rôle de la jonction A-B. Les mutations de cette jonction inhibent la fonction de CD81 au cours de l'infection par *Plasmodium*, mais n'empêchent pas la fixation d'anticorps monoclonaux anti-CD81, à l'exception de 5A6 (Yalaoui *et al.*, 2008b). Ce résultat démontre que les mutants ont conservé une conformation correcte et que l'épitope reconnu par 5A6 implique la jonction A-B de CD81LEL. De façon intéressante, 5A6 est le seul anticorps anti-hCD81 qui ne bloque pas l'infection par *P. yoelii*. Cela suggère que la région A-B de CD81 n'interagit pas *in trans* avec un ligand du sporozoïte mais plutôt *in cis* avec un autre facteur de la cellule, qui pourrait entrer en compétition avec l'anticorps pour la fixation à CD81.

## Rôle des partenaires de CD81 et des microdomaines enrichis en tétraspanines au cours de l'infection par *Plasmodium*

Contrairement au cas du VHC (Pileri *et al.*, 1998; Flint *et al.*, 1999; Higginbottom *et al.*, 2000), nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction directe entre CD81 et les sporozoïtes de *Plasmodium*. En particulier, des formes recombinantes solubles de la grande boucle extracellulaire de CD81 humain ou murin n'inhibent pas l'infection par *P. falciparum* ou *P. yoelii*, et n'interagissent pas avec les sporozoïtes dans des expériences d'immunofluorescence et de *far-western* (Silvie *et al.*, 2003). Ces observations suggèrent que CD81 n'est pas un récepteur pour les sporozoïtes mais agit de manière indirecte. CD81 appartient à la superfamille des tétraspanines, dont une caractéristique majeure est la capacité de s'associer à de nombreuses molécules de surface, dont elles peuvent réguler la fonction (Charrin *et al.*, 2009a). Les tétraspanines interagissent de façon directe et spécifique avec des molécules dites partenaires. Dans la plupart des cellules, CD81 est associé à EWI-F (aussi appelé CD9P-1, FPRP ou CD315) et EWI-2 (aussi appelé PGRL, IgSF8 ou CD316)



(Charrin *et al.*, 2001, 2003; Clark *et al.*, 2001; Stipp *et al.*, 2001a, 2001b). Ces deux protéines appartiennent à une famille récemment décrite de molécules à domaines d'immunoglobulines, caractérisées par la présence d'une séquence EWI (acide glutamique, tryptophane, isoleucine) (Stipp *et al.*, 2001a; Charrin *et al.*, 2003). EWI-2 et EWI-F/CD9P-1 étant les deux partenaires majeurs de CD81 dans les hépatocytes (Charrin *et al.*, 2001, 2003), nous avons analysé leur rôle au cours de l'infection par *Plasmodium*.

Nos travaux ont montré que EWI-2 et EWI-F/CD9P-1 ne sont pas nécessaires à l'infection par *P. yoelii*. Au contraire, EWI-F/CD9P-1 joue un rôle négatif au cours de l'infection (Charrin *et al.*, 2009b). En effet, l'inhibition de l'expression de EWI-F/CD9P-1 par *siRNA* entraîne une augmentation du nombre de cellules infectées par *P. yoelii* dans les lignées Hepa1-6 et HepG2. Inversement, la surexpression de EWI-F/CD9P-1 dans des cellules Hepa1-6 transfectées inhibe l'infection. Un mutant de EWI-F/CD9P-1 qui n'est plus capable d'interagir avec CD81 perd cette capacité à inhiber l'infection, ce qui démontre que EWI-F/CD9P-1 régule négativement l'infection en interagissant avec CD81 (Charrin *et al.*, 2009b). L'effet inhibiteur de CD9P-1 sur l'infection par *Plasmodium* rappelle celui d'une forme tronquée de EWI-2, appelée *EWI-2wint*, sur l'infection par le VHC (Rocha-Perugini *et al.*, 2008). EWI-2 n'est pas impliqué au cours de l'infection par *P. yoelii*, comme le montre l'absence d'effet sur l'infection de la sur-expression d'EWI-2 ou de l'inhibition de EWI-2 par anticorps ou *siRNA* (Charrin *et al.*, 2009b).

Nos résultats suggèrent que EWI-F/CD9P-1 n'entre pas en compétition avec un récepteur potentiel pour s'associer à CD81, d'une part parce que la réduction d'expression induite par *siRNA* augmente l'infection malgré le faible niveau d'expression basal de EWI-F/CD9P-1 dans les hépatocytes, d'autre part parce que la surexpression de EWI-F/CD9P-1 ne bloque que partiellement l'infection, même dans des cellules exprimant très fortement EWI-F/CD9P-1 après transfection (Charrin *et al.*, 2009b). De plus, l'interaction de EWI-F/CD9P-1 implique le quatrième domaine transmembranaire de CD81, situé à l'opposé de la jonction critique A-B de la région extracellulaire (Seigneuret, 2006; Yalaoui *et al.*, 2008b). EWI-F/CD9P-1 pourrait donc plutôt former un complexe avec CD81 et un autre partenaire, encore non identifié, dont la fonction serait altérée en présence de EWI-F/CD9P-1. Une molécule EWI-F/CD9P-1 chimérique où la région cytoplasmique a été remplacée par celle d'une molécule HLA garde sa capacité à s'associer à CD81 et à inhiber l'infection par *P. yoelii*, ce qui exclut un rôle de l'extrémité C-terminale de EWI-F/CD9P-1 dans l'inhibition de l'infection (Charrin *et al.*, 2009b).

La région cytoplasmique de EWI-F/CD9P-1 interagit avec les protéines ERM (*Ezrin-Radixin-Moesin*), dont la fonction est de connecter la membrane au cytosquelette d'actine (Sala-Valdes *et al.*, 2006). Le cytosquelette d'actine de la cellule est impliqué au cours de l'invasion par les sporozoïtes, avec formation d'une structure transitoire de F-actine au niveau du site d'entrée (Gonzalez *et al.*, 2009). Le fait que la région cytoplasmique de EWI-F/CD9P-1 ne soit pas nécessaire pour inhiber l'infection par *P. yoelii* montre que l'interaction de EWI-F/CD9P-1 avec les protéines ERM ne contribue pas à cet effet négatif sur l'infection (Charrin *et al.*, 2009b).

L'effet inhibiteur de EWI-F/CD9P-1 sur CD81 au cours de l'infection par *Plasmodium* démontre que l'activité de CD81 est contrôlée par son environnement moléculaire. À la membrane cellulaire, CD81 s'associe aux autres tétraspanines au sein d'un environnement lipidique particulier riche en cholestérol et en gangliosides, les microdomaines enrichis en tétraspanines (TEMs) (Charrin *et al.*, 2009a). Afin de mieux caractériser ces microdomaines, nous avons produit deux nouveaux anticorps monoclonaux de rat spécifiques de CD81 murin, MT81 et MT81w. Alors que MT81 reconnaît toutes les molécules de CD81, MT81w présente la particularité de se fixer sélectivement à la fraction de CD81 associée aux TEMs (Silvie *et al.*, 2006a). En utilisant cet anticorps comme marqueur des TEMs, et la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (MBCD), un agent permettant d'extraire le cholestérol des membranes, nous avons pu démontrer le rôle du cholestérol membranaire dans l'organisation des TEMs ainsi que dans l'invasion CD81-dépendante par les sporozoïtes de *Plasmodium* (Silvie *et al.*, 2006a). Tout d'abord, MT81w inhibe l'infection des cellules Hepa1-6 par les sporozoïtes de *P. yoelii*. Bien que cette inhibition soit partielle (pas plus de 70 %), elle démontre que la fraction de CD81 engagée dans les TEMs est fonctionnelle (Silvie *et al.*, 2006a). Par ailleurs, la déplétion du cholestérol membranaire par la MBCD diminue non seulement le marquage de surface des cellules par MT81w, confirmant le rôle du cholestérol dans l'organisation de CD81 à la surface des cellules, mais aussi le niveau d'infection par *P. yoelii* (Silvie *et al.*, 2006a). Cette inhibition est observée en absence de diminution du niveau de CD81 total à la surface des cellules, déterminé grâce à l'anticorps MT81, et est complètement réversible après apport de cholestérol (Silvie *et al.*, 2006a). La déplétion en cholestérol inhibe aussi l'infection d'hépatocytes primaires murins et humains par *P. yoelii* et *P. falciparum*, respectivement (Silvie *et al.*, 2006a). Dans le cas de *P. berghei*, qui infecte les cellules soit par une voie CD81-dépendante, soit par une voie CD81-indépendante, selon le type cellulaire, seule la voie dépendant de CD81 est inhibée par la MBCD, ce qui démontre le lien fonctionnel entre

cholestérol et CD81 pendant l'infection par *Plasmodium* (Silvie *et al.*, 2006a, 2007).

Le rôle du cholestérol membranaire au cours de l'infection par *Plasmodium* a été récemment confirmé par deux études montrant qu'un récepteur de lipoprotéines, le *Scavenger Receptor BI* (SR-BI), joue un rôle important au cours de l'infection par les sporozoïtes (Rodrigues *et al.*, 2008; Yalaoui *et al.*, 2008a). Bien que les souris SR-BI *knockout* restent sensibles à l'infection *in vivo*, les hépatocytes primaires isolés des souris *srbI*<sup>-/-</sup> sont moins sensibles à l'infection que les cellules isolées de souris wt, ce qui est corrélé à une baisse du cholestérol membranaire, une diminution d'expression de surface de CD81 et une réduction de sa localisation dans les TEMs (Yalaoui *et al.*, 2008a). Des anticorps anti-SR-BI bloquent l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* et *P. falciparum* dans les hépatocytes et entraînent une baisse du cholestérol membranaire (Rodrigues *et al.*, 2008; Yalaoui *et al.*, 2008a). À la différence de CD81, les anticorps anti-SR-BI ne bloquent l'infection que lorsqu'ils sont ajoutés avant, mais pas en même temps que les sporozoïtes (Yalaoui *et al.*, 2008a). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle indirect de SR-BI au cours de l'infection par *P. yoelii*, via la régulation du niveau de cholestérol membranaire et l'expression et l'organisation de CD81 à la surface des cellules. Il est intéressant de noter que l'inhibition de SR-BI par *siRNA* diminue l'entrée des sporozoïtes de *P. berghei* dans les cellules Huh-7 (Rodrigues *et al.*, 2008), un modèle où l'invasion ne dépend pas de CD81 (Silvie *et al.*, 2007), ce qui suggère un rôle possible supplémentaire de SR-BI pendant l'infection. Par ailleurs, SR-BI intervient après l'invasion dans la croissance intracellulaire du parasite (Rodrigues *et al.*, 2008; Yalaoui *et al.*, 2008a). Comme les autres *Apicomplexa*, *Plasmodium* ne peut pas synthétiser de stérols *de novo*, et dépend des apports de la cellule hôte (Bano *et al.*, 2007; Labaied *et al.*, 2011). En permettant le transfert du cholestérol circulant vers l'hépatocyte, SR-BI pourrait participer indirectement à l'acquisition de lipides par le parasite intracellulaire.

### Facteurs parasitaires impliqués dans l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*

De manière générale, les molécules parasitaires impliquées dans l'invasion par les *Apicomplexa* proviennent d'organelles sécrétoires spécialisées, les micronèmes et les rhoptries, qui libèrent leur contenu de manière séquentielle (Baum *et al.*, 2008a; Santos *et al.*, 2009). Schématiquement, les protéines des micronèmes seraient plutôt impliquées dans la motilité, l'adhérence aux substrats et la reconnaissance

des cellules cibles, tandis que les protéines des rhoptries seraient plutôt impliquées dans la formation de la jonction et de la vacuole parasitophore (Baum *et al.*, 2008a; Santos *et al.*, 2009). En particulier, des protéines de rhoptries appelées RONs (*rhoptry neck proteins*) sont redistribuées à la jonction au moment de l'invasion par les mérozoïtes de *Plasmodium* et les tachyzoïtes de *Toxoplasma* (Alexander *et al.*, 2005; Lebrun *et al.*, 2005; Baum *et al.*, 2008b; Besteiro *et al.*, 2009; Straub *et al.*, 2009; Lamarque *et al.*, 2011; Riglar *et al.*, 2011; Tyle & Boothroyd, 2011). Chez *Toxoplasma*, les RONs (dont RON-2) sont exportées à la membrane plasmique de la cellule hôte, où RON-2 peut ensuite interagir *in trans* avec une protéine sécrétée par les micronèmes, AMA-1 (*Apical Membrane Antigen-1*) à la surface des parasites (Besteiro *et al.*, 2009; Straub *et al.*, 2009; Lamarque *et al.*, 2011). Ces observations suggèrent un modèle selon lequel *Toxoplasma* utiliserait des récepteurs d'origine parasitaire (notamment RON2) plutôt qu'issus de la cellule hôte, ce qui expliquerait l'absence de spécificité cellulaire qui caractérise l'infection par *Toxoplasma*. La validité de ce modèle au cours de l'infection par *Plasmodium* reste à démontrer.

Les sporozoïtes de *Plasmodium* expriment les protéines AMA-1, RON-2 et RON-4 (Silvie *et al.*, 2004; Srinivasan *et al.*, 2004; Tufet-Bayona *et al.*, 2009), et des anticorps anti-AMA-1 bloquent partiellement l'infection des hépatocytes humains par les sporozoïtes de *P. falciparum* (Silvie *et al.*, 2004). Si RON-4 semble requise lors de l'entrée des sporozoïtes, une approche de mutagenèse conditionnelle a récemment permis de montrer que AMA-1 n'est pas essentiel à l'infection des hépatocytes, du moins dans le cas du parasite de rongeurs *P. berghei* (Giovannini *et al.*, 2011). D'autres molécules des sporozoïtes sont impliquées dans l'infection du foie par les sporozoïtes, notamment TRAP (*Thrombospondin Related Anonymus Protein*), une protéine transmembranaire des micronèmes, dont la sécrétion est stimulée au contact des cellules (Gantt *et al.*, 2000; Silvie *et al.*, 2004). TRAP joue un rôle essentiel dans la motilité par glissement, en connectant le moteur actine-myosine sous-cortical à la surface du sporozoïte (Kappe *et al.*, 1999). TRAP possède deux domaines adhésifs dans sa région extracellulaire, qui pourraient interagir avec des récepteurs des glandes salivaires chez le moustique et des hépatocytes chez l'hôte vertébré (Matuschewski *et al.*, 2002). Deux autres protéines des sporozoïtes, P36 et P36p/P52, sont essentielles à l'infection productive des hépatocytes, mais leur rôle exact est controversé (Ishino *et al.*, 2005; van Dijk *et al.*, 2005; Labaied *et al.*, 2007; van Schaijk *et al.*, 2008). P36 et P52 pourraient être nécessaires au maintien précoce de la vacuole parasitophore après l'invasion plutôt que dans le processus d'invasion lui-même. Enfin, certains

membres des familles EBLs et Rh, impliquées dans les interactions mérozoïte-érythrocyte, ont été décrits comme exprimés au stade sporozoïte, et pourraient jouer un rôle au cours de l'infection des hépatocytes (Gruner *et al.*, 2001; Preiser *et al.*, 2002). Dans le cas des sporozoïtes de *Plasmodium*, l'invasion des cellules par formation d'une vacuole est difficile à étudier, notamment parce qu'il s'agit d'un événement bref (probablement quelques dizaines de secondes), et surtout asynchrone. En effet, ce n'est qu'après une phase de migration transcellulaire, au cours de laquelle les sporozoïtes perforent la membrane plasmique des cellules traversées, qu'ils passent à un mode d'invasion productif, avec formation d'une jonction et d'une vacuole parasitophore (Mota *et al.*, 2001; Amino *et al.*, 2008). Le passage du mode transmigratoire au mode d'invasion productive est associé au clivage de la partie N-terminale de la CSP (Coppi *et al.*, 2005, 2007, 2011), mais les mécanismes impliqués restent à élucider.

## Conclusions et perspectives

Les résultats de nos travaux démontrent clairement que CD81 est nécessaire pour l'infection des hépatocytes par formation d'une vacuole parasitophore, mais le mécanisme précis par lequel CD81 intervient demeure inconnu. CD81 intervient vraisemblablement de manière indirecte, en régulant l'activité d'une ou plusieurs molécules localisées au sein des microdomaines membranaires enrichis en tétraspanines, mais dont l'identité reste inconnue. CD81 pourrait jouer un rôle (1) dans l'attachement du sporozoïte et l'induction de la sécrétion du contenu des rhoptries; (2) dans la formation et/ou la fonction de la jonction, peut-être *via* l'interaction avec les protéines RONs; (3) dans l'invagination de la membrane plasmique de l'hépatocyte et l'individualisation de la vacuole parasitophore; ou encore (4) dans le maintien précoce de la vacuole après sa formation. L'étape de transmigration des sporozoïtes qui précède l'infection a jusqu'à présent empêché d'analyser en détail les cinétiques de pénétration des sporozoïtes dans les cellules. Afin de caractériser le rôle de CD81 au cours de l'infection des hépatocytes, nous développons actuellement une approche de transgénése visant à produire des parasites mutants, infectant les cellules directement sans migration transcellulaire préalable, et exprimant des marqueurs de la jonction et/ou de la vacuole parasitophore. Grâce à cette approche, nous espérons améliorer notre connaissance du processus d'entrée des sporozoïtes, et permettre le développement de nouvelles approches prophylactiques, notamment vaccinales, pour bloquer de façon efficace l'infection du foie par *Plasmodium*.

## Références

- Agnandji S.T., Lell B., Soulanoudjingar S.S., Fernandes J.F., Abossolo B.P., Conzelmann C., Methogo B.G., Doucka Y., Flamen A., Mordmuller B., Issifou S., Kreamsner P.G., Sacarlal J., Aide P., Lanaspas M., Aponte J.J., Nhamuave A., Quelhas D., Bassat Q., Mandjate S., Macete E., Alonso P., Abdulla S., Salim N., Juma O., Shomari M., Shubis K., Machera F., Hamad A.S., Minja R., Mtoro A., Sykes A., Ahmed S., Urassa A.M., Ali A.M., Mwangoka G., Tanner M., Tinto H., D'Alessandro U., Sorgho H., Valea I., Tahita M.C., Kabore W., Ouedraogo S., Sandrine Y., Guiguemde R.T., Ouedraogo J.B., Hamel M.J., Kariuki S., Odero C., Oneko M., Otieno K., Awino N., Omoto J., Williamson J., Muturi-Kioi V., Laserson K.F., Slutsker L., Otieno W., Otieno L., Nekoye O., Gondi S., Otieno A., Ogutu B., Wasuna R., Owira V., Jones D., Onyango A.A., Njuguna P., Chilengi R., Akoo P., Kerubo C., Gitaka J., Maingi C., Lang T., Olotu A., Tsofa B., Bejon P., Peshu N., Marsh K., Owusu-Agyei S., Asante K.P., Osei-Kwakye K., Boahen O., Ayamba S., Kayan K., Owusu-Ofori R., Dosoo D., Asante I., Adjei G., Adjei G., Chandramohan D., Greenwood B., Lusingu J., Gesase S., Malabeja A., Abdul O., Kilavo H., Mahende C., Liheluka E., Lemnge M., Theander T., Drakeley C., Ansong D., Agbenyega T., Adjei S., Boateng H.O., Rettig T., Bawa J., Sylverken J., Sambian D., Agyekum A., Owusu L., Martinson F., Hoffman I., Mvalo T., Kamthunzi P., Nkomo R., Msika A., Jumbe A., Chome N., Nyakuipa D., Chintedza J., Ballou W.R., Bruls M., Cohen J., Guerra Y., Jongert E., Lapiere D., Leach A., Lievens M., Ofori-Anyinam O., Vekemans J., Carter T., Leboulloux D., Loucq C., Radford A., Savarese B., Schellenberg D., Sillman M., Vansadia P., First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med*, 2011, 365, 1863–1875.
- Alexander D.L., Mital J., Ward G.E., Bradley P., Boothroyd J.C., Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog*, 2005, 1, e17.
- Amino R., Giovannini D., Thiberge S., Gueirard P., Boisson B., Dubremetz J.F., Prévost M.C., Ishino T., Yuda M., Ménard R., Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe*, 2008, 3, 88–96.
- Amino R., Thiberge S., Martin B., Celli S., Shorte S., Frischknecht F., Ménard R., Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*, 2006, 12, 220–224.
- Bano N., Romano J.D., Jayabalasingham B., Coppens I., Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. *Int J Parasitol*, 2007, 37, 1329–1341.



- Baum J., Gilberger T.W., Frischknecht F., Meissner M., Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends Parasitol*, 2008a, 24, 557–563.
- Baum J., Tonkin C.J., Paul A.S., Rug M., Smith B.J., Gould S.B., Richard D., Pollard T.D., Cowman A.F., A malaria parasite formin regulates actin polymerization and localizes to the parasite-erythrocyte moving junction during invasion. *Cell Host Microbe*, 2008b, 3, 188–198.
- Besteiro S., Michelin A., Poncet J., Dubremetz J.F., Lebrun M., Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *PLoS Pathog*, 2009, 5, e1000309.
- Calvo-Calle J.M., Moreno A., Eling W.M., Nardin E.H., *In vitro* development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* malaria in human cell lines. *Exp Parasitol*, 1994, 79, 362–373.
- Charrin S., Le Naour F., Oualid M., Billard M., Faure G., Hanash S.M., Boucheix C., Rubinstein E., The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem*, 2001, 276, 14329–14337.
- Charrin S., Le Naour F., Labas V., Billard M., Le Caer J.P., Émile J.F., Petit M.A., Boucheix C., Rubinstein E., EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J*, 2003, 373, 409–421.
- Charrin S., le Naour F., Silvie O., Milhiet P.E., Boucheix C., Rubinstein E., Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J*, 2009a, 420, 133–154.
- Charrin S., Yalaoui S., Bartosch B., Cocquerel L., Franetich J.F., Boucheix C., Mazier D., Rubinstein E., Silvie O., The Ig domain protein CD9P-1 down-regulates CD81 ability to support *Plasmodium yoelii* infection. *J Biol Chem*, 2009b, 284, 31572–31578.
- Clark K.L., Zeng Z., Langford A.L., Bowen S.M., Todd S.C., PGRL is a major CD81-associated protein on lymphocytes and distinguishes a new family of cell surface proteins. *J Immunol*, 2001, 167, 5115–5121.
- Coppi A., Pinzon-Ortiz C., Hutter C., Sinnis P., The *Plasmodium* circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. *J Exp Med*, 2005, 201, 27–33.
- Coppi A., Tewari R., Bishop J.R., Bennett B.L., Lawrence R., Esko J.D., Billker O., Sinnis P., Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host Microbe*, 2007, 2, 316–327.
- Coppi A., Natarajan R., Pradel G., Bennett B.L., James E.R., Roggero M.A., Corradin G., Persson C., Tewari R., Sinnis P., The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med*, 2011, 208, 341–356.
- Flint M., Maidens C., Loomis-Price L.D., Shotton C., Dubuisson J., Monk P., Higginbottom A., Levy S., McKeating J.A., Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol*, 1999, 73, 6235–6244.
- Frevort U., Engelmann S., Zougbede S., Stange J., Ng B., Matuschewski K., Liebes L., Yee H., Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol*, 2005, 3, e192.
- Gantt S., Persson C., Rose K., Birkett A.J., Abagyan R., Nussenzweig V., Antibodies against thrombospondin-related anonymous protein do not inhibit *Plasmodium* sporozoite infectivity in vivo. *Infect Immun*, 2000, 68, 3667–3673.
- Giovannini D., Spath S., Lacroix C., Perazzi A., Bargieri D., Lagal V., Lebugle C., Combe A., Thiberge S., Baldacci P., Tardieux I., Ménard R., Independent roles of apical membrane antigen 1 and rhoptry neck proteins during host cell invasion by *Apicomplexa*. *Cell Host Microbe*, 2011, 10, 591–602.
- Gonzalez V., Combe A., David V., Malmquist N.A., Delorme V., Leroy C., Blazquez S., Ménard R., Tardieux I., Host cell entry by *Apicomplexa* parasites requires actin polymerization in the host cell. *Cell Host Microbe*, 2009, 5, 259–272.
- Gruner A.C., Brahimi K., Letourneur F., Renia L., Eling W., Snounou G., Druilhe P., Expression of the erythrocyte-binding antigen 175 in sporozoites and in liver stages of *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*, 2001, 184, 892–897.
- Higginbottom A., Quinn E.R., Kuo C.C., Flint M., Wilson L.H., Bianchi E., Nicosia A., Monk P.N., McKeating J.A., Levy S., Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol*, 2000, 74, 3642–3649.
- Hollingdale M.R., Leland P., Schwartz A.L., *In vitro* cultivation of the exoerythrocytic stage of *Plasmodium berghei* in a hepatoma cell line. *Am J Trop Med Hyg*, 1983, 32, 682–684.
- Ishino T., Yano K., Chinzei Y., Yuda M., Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol*, 2004, 2, E4.
- 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*, 2005, 58, 1264–1275.
- Kappe S., Bruderer T., Gantt S., Fujioka H., Nussenzweig V., Ménard R., Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in *Apicomplexan* parasites. *J Cell Biol*, 1999, 147, 937–944.
- Labaied M., Harupa A., Dumpit R.F., Coppens I., Mikolajczak S.A., Kappe S.H., *Plasmodium yoelii* sporozoites with simultaneous deletion of P52 and P36 are completely attenuated and confer sterile immunity against infection. *Infect Immun*, 2007, 75, 3758–3768.
- Labaied M., Jayabalasingham B., Bano N., Cha S.J., Sandoval J., Guan G., Coppens I., *Plasmodium* salvages cholesterol internalized by LDL and synthesized *de novo* in the liver. *Cell Microbiol*, 2011, 13, 569–586.
- Lamarque M., Besteiro S., Papoin J., Roques M., B., V.-L.N., 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., The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by Apicomplexan parasites. *PLoS Pathog*, 2011, 7, e1001276.
- Lebrun M., Michelin A., El Hajj H., Poncet J., Bradley P.J., Vial H., Dubremetz J.F., The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol*, 2005, 7, 1823–1833.
- Matuschewski K., Nunes A.C., Nussenzweig V., Ménard R., *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *Embo J*, 2002, 21, 1597–1606.
- Mazier D., Beaudoin R.L., Mellouk S., Druilhe P., Texier B., Trosper J., Miltgen F., Landau I., Paul C., Brandicourt O., Guguen-Guillouzo C., Langlois P., Complete development of hepatic stages of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Science*, 1985, 227, 440–442.
- Mazier D., Renia L., Snounou G., A pre-emptive strike against malaria's stealthy hepatic forms. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8, 854–864.
- Mota M.M., Pradel G., Vanderberg J.P., Hafalla J.C., Frevert U., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V., Rodriguez A., Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 2001, 291, 141–144.
- Mueller A.K., Camargo N., Kaiser K., Andorfer C., Frevert U., Matuschewski K., Kappe S.H., *Plasmodium* liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102, 3022–3027.
- Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., Galli G., Falugi F., Petracca R., Weiner A.J., Houghton M., Rosa D., Grandi G., Abrignani S., Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998, 282, 938–941.
- Preiser P.R., Khan S., Costa F.T., Jarra W., Belnoue E., Ogun S., Holder A.A., Voza T., Landau I., Snounou G., Renia L., Stage-specific transcription of distinct repertoires of a multigene family during *Plasmodium* life cycle. *Science*, 2002, 295, 342–345.
- 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., Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe*, 2011, 9, 9–20.
- Rocha-Perugini V., Montpellier C., Delgrange D., Wychowski C., Helle F., Pillez A., Drobecq H., Le Naour F., Charrin S., Lévy S., Rubinstein E., Dubuisson J., Cocquerel L., The CD81 partner EWI-2 inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One*, 2008, 3, e1866.
- Rodrigues C.D., Hannus M., Prudencio M., Martin C., Goncalves L.A., Portugal S., Epiphany S., Akinc A., Hadwiger P., Jahn-Hofmann K., Rohl I., van Gemert G.J., Franetich J.F., Luty A.J., Sauerwein R., Mazier D., Koteliensky V., Vornlocher H.P., Echeverri C.J., Mota M.M., Host scavenger receptor SR-BI plays a dual role in the establishment of malaria parasite liver infection. *Cell Host Microbe*, 2008, 4, 271–282.
- Sala-Valdes M., Ursa A., Charrin S., Rubinstein E., Hemler M.E., Sanchez-Madrid F., Yanez-Mo M., EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem*, 2006, 281, 19665–19675.
- Santos J.M., Lebrun M., Daher W., Soldati D., Dubremetz J.F., Apicomplexan cytoskeleton and motors: key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. *Int J Parasitol*, 2009, 39, 153–162.
- Sattler J.M., Ganter M., Hliscs M., Matuschewski K., Schuler H., Actin regulation in the malaria parasite. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90, 966–971.
- Seigneuret M., Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily. *Biophys J*, 2006, 90, 212–227.
- Silvie O., Rubinstein E., Franetich J.F., Prenant M., Belnoue E., Renia L., Hannoun L., Eling W., Lévy S., Boucheix C., Mazier D., Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat Med*, 2003, 9, 93–96.
- 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., A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem*, 2004, 279, 9490–9496.
- Silvie O., Charrin S., Billard M., Franetich J.F., Clark K.L., van Gemert G.J., Sauerwein R.W., Dautry F., Boucheix C., Mazier D., Rubinstein E., Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *J Cell Sci*, 2006a, 119, 1992–2002.
- Silvie O., Greco C., Franetich J.F., Dubart-Kupperschmitt A., Hannoun L., van Gemert G.J., Sauerwein R.W., Lévy S., Boucheix C., Rubinstein E., Mazier D., Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the *Plasmodium* species. *Cell Microbiol*, 2006b, 8, 1134–1146.
- Silvie O., Franetich J.F., Boucheix C., Rubinstein E., Mazier D., Alternative invasion pathways for *Plasmodium berghei* sporozoites. *Int J Parasitol*, 2007, 37, 173–182.
- Srinivasan P., Abraham E.G., Ghosh A.K., Valenzuela J., Ribeiro J.M., Dimopoulos G., Kafatos F.C., Adams J.H., Fujioka H., Jacobs-Lorena M., Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptomes during oocyst differentiation. *J Biol Chem*, 2004, 279, 5581–5587.
- Stipp C.S., Kolesnikova T.V., Hemler M.E., EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel

- Ig protein subfamily. *J Biol Chem*, 2001a, 276, 40545–40554.
- Stipp C.S., Orlicky D., Hemler M.E., FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9-associated protein. *J Biol Chem*, 2001b, 276, 4853–4862.
- Straub K.W., Cheng S.J., Sohn C.S., Bradley P.J., Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cell Microbiol*, 2009, 11, 590–603.
- Tufet-Bayona M., Janse C.J., Khan S.M., Waters A.P., Sinden R.E., Franke-Fayard B., Localisation and timing of expression of putative *Plasmodium berghei* rhoptry proteins in merozoites and sporozoites. *Mol Biochem Parasitol*, 2009, 166, 22–31.
- Tyler J.S., Boothroyd J.C., The C-terminus of *Toxoplasma* RON2 provides the crucial link between AMA1 and the host-associated invasion complex. *PLoS Pathog*, 2011, 7, e1001282.
- 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., Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102, 12194–12199.
- van Schaijk B.C., 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., Gene disruption of *Plasmodium falciparum* p52 results in attenuation of malaria liver stage development in cultured primary human hepatocytes. *PLoS One*, 2008, 3, e3549.
- Vanderberg J.P., Frevert U., Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int J Parasitol*, 2004, 34, 991–996.
- WHO., World Malaria Report. *World Health Organisation*, Geneva, 2011.
- 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., Vaillant J.C., Hannoun L., Chapman J., Mazier D., Froissard P., Scavenger receptor BI boosts hepatocyte permissiveness to *Plasmodium* infection. *Cell Host Microbe*, 2008a, 4, 283–292.
- Yalaoui S., Zougbede S., Charrin S., Silvie O., Arduise C., Farhati K., Boucheix C., Mazier D., Rubinstein E., Froissard P., Hepatocyte permissiveness to *Plasmodium* infection is conveyed by a short and structurally conserved region of the CD81 large extracellular domain. *PLoS Pathog*, 2008b, 4, e1000010.
- Yamauchi L.M., Coppi A., Snounou G., Sinnis P., *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol*, 2007, 9, 2093.