



INSTITUT DE FRANCE  
Académie des sciences

# *Comptes Rendus*

---

## *Biologies*

Isabelle Bouyssou, Francisco José Martínez, Pascal Campagne,  
Laurence Ma, Cécile Doderer-Lang, Chetan E. Chitnis and Didier  
Ménard

***Plasmodium vivax* blood stage invasion pathways: Contribution of  
omics technologies in deciphering molecular and cellular mechanisms**

Volume 345, issue 2 (2022), p. 91-133

Published online: 24 November 2022

Issue date: 8 December 2022

<https://doi.org/10.5802/crbiol.95>



This article is licensed under the  
CREATIVE COMMONS ATTRIBUTION 4.0 INTERNATIONAL LICENSE.  
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



*Les Comptes Rendus. Biologies* sont membres du  
Centre Mersenne pour l'édition scientifique ouverte  
[www.centre-mersenne.org](http://www.centre-mersenne.org)  
e-ISSN : 1768-3238



Review Article / Article de revue

# *Plasmodium vivax* blood stage invasion pathways: Contribution of omics technologies in deciphering molecular and cellular mechanisms

*Voies d'invasion de Plasmodium vivax au stade  
intra-érythrocytaire : Contribution des technologies  
dites « omiques » au décryptage des mécanismes moléculaires  
et cellulaires*

Isabelle Bouyssou<sup>®\*, a, b</sup>, Francisco José Martínez<sup>® c, d</sup>, Pascal Campagne<sup>® e</sup>,  
Laurence Ma<sup>® f</sup>, Cécile Doderer-Lang<sup>® g</sup>, Chetan E. Chitnis<sup>® c</sup> and Didier Ménard<sup>® a, g</sup>

<sup>a</sup> Institut Pasteur, Université Paris Cité, Malaria Genetics and Resistance Unit,  
INSERM U1201, F-75015 Paris, France

<sup>b</sup> Sorbonne Université, École Doctorale ED515 'Complexité du Vivant', F-75005 Paris,  
France

<sup>c</sup> Institut Pasteur, Université Paris Cité, Malaria Parasite Biology and Vaccines Unit,  
F-75015 Paris, France

<sup>d</sup> Paris Cité Université, École Doctorale ED562 'BioSPC', F-75006 Paris, France

<sup>e</sup> Institut Pasteur, Université Paris Cité, Hub de Bioinformatique et Biostatistique,  
Département Biologie Computationnelle, USR 3756, F-75015, Paris, France

<sup>f</sup> Institut Pasteur, Université Paris Cité, Biomix Platform, C2RT, F-75015 Paris, France

<sup>g</sup> Université de Strasbourg, Institute of Parasitology and Tropical Diseases, UR7292  
Dynamics of Host-Pathogen Interactions, F-67000 Strasbourg, France

*E-mails:* isabelle.bouyssou@pasteur.fr (I. Bouyssou),  
francisco-jose.martinez-blazquez@pasteur.fr (F. J. Martínez),  
pascal.campagne@pasteur.fr (P. Campagne), laurence.ma@pasteur.fr (L. Ma),  
cecile.lang@unistra.fr (C. Doderer-Lang), chetan.chitnis@pasteur.fr (C. E. Chitnis),  
dmenard@unistra.fr (D. Ménard)

\* Corresponding author.

**Abstract.** *Vivax* malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium vivax*, a parasitic protozoan transmitted by female Anopheline mosquitoes. Historically, *vivax* malaria has often been regarded as a benign self-limiting infection due to the observation of low parasitemia in Duffy-positive patients in endemic transmission areas and the virtual absence of infections in Duffy-negative individuals in Sub Saharan Africa. However, the latest estimates show that the burden of the disease is not decreasing in many countries and cases of *vivax* infections in Duffy-negative individuals are increasingly reported throughout Africa. This raised questions about the accuracy of diagnostics and the evolution of interactions between humans and parasites. For a long time, our knowledge on *P. vivax* biology has been hampered due to the limited access to biological material and the lack of robust *in vitro* culture methods. Consequently, little is currently known about *P. vivax* blood stage invasion mechanisms. The introduction of omics technologies with novel and accessible techniques such as third generation sequencing and RNA sequencing at single cell level, two-dimensional electrophoresis, liquid chromatography, and mass spectrometry, has progressively improved our understanding of *P. vivax* genetics, transcripts, and proteins. This review aims to provide broad insights into *P. vivax* invasion mechanisms generated by genomics, transcriptomics, and proteomics and to illustrate the importance of integrated multi-omics studies.

**Résumé.** Le paludisme à *Plasmodium vivax* est une maladie infectieuse causée par un parasite protozoaire *Plasmodium vivax*, transmis par les moustiques *Anophele* femelles. Historiquement, le paludisme à *P. vivax* a souvent été considéré comme une infection bénigne en raison de l'observation d'une faible parasitémie chez les patients Duffy-positifs dans les zones d'endémie et de la quasi-absence d'infections chez les individus Duffy-négatifs vivant majoritairement en Afrique subsaharienne. Cependant, les dernières estimations montrent que le poids de la maladie ne diminue pas dans de nombreux pays et que des cas d'infections à *P. vivax* chez des individus Duffy-négatifs sont de plus en plus souvent observés en Afrique. Cela soulève des interrogations sur la précision des diagnostics et l'évolution des interactions hôte-parasite. Pendant longtemps, nos connaissances sur la biologie de *P. vivax* ont été entravées par un accès limité au matériel biologique et un manque de méthodes robustes pour la culture *in vitro*. Par conséquent, nous n'avons encore que peu d'informations concernant les mécanismes d'invasion des stades sanguins de *P. vivax*. L'introduction des technologies dites « omiques », avec le développement de techniques innovantes et abordables telles que le séquençage d'ADN de troisième génération, le séquençage ARN à l'échelle de la cellule « single-cell », l'électrophorèse bidimensionnelle, la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse, a progressivement amélioré notre compréhension des gènes, des transcrits et des protéines de *P. vivax*. Cette revue a non seulement pour but de fournir un aperçu général des mécanismes d'invasion de *P. vivax* acquis grâce aux techniques génomiques, transcriptomiques et protéomiques mais également d'illustrer l'importance de la complémentarité de ces approches.

**Keywords.** Malaria, *P. vivax*, Invasion, Duffy negativity, Omics.

**Mots-clés.** Paludisme, *P. vivax*, Invasion, Duffy-négativité, Technologies omiques.

**Note.** Didier Ménard is the 2021 laureate of the Prix de Mme Jules Martin, née Louise Basset by the Académie des sciences. / Didier Ménard est lauréat 2021 du Prix de Mme Jules Martin, née Louise Basset par l'Académie des sciences.

*Published online: 24 November 2022, Issue date: 8 December 2022*

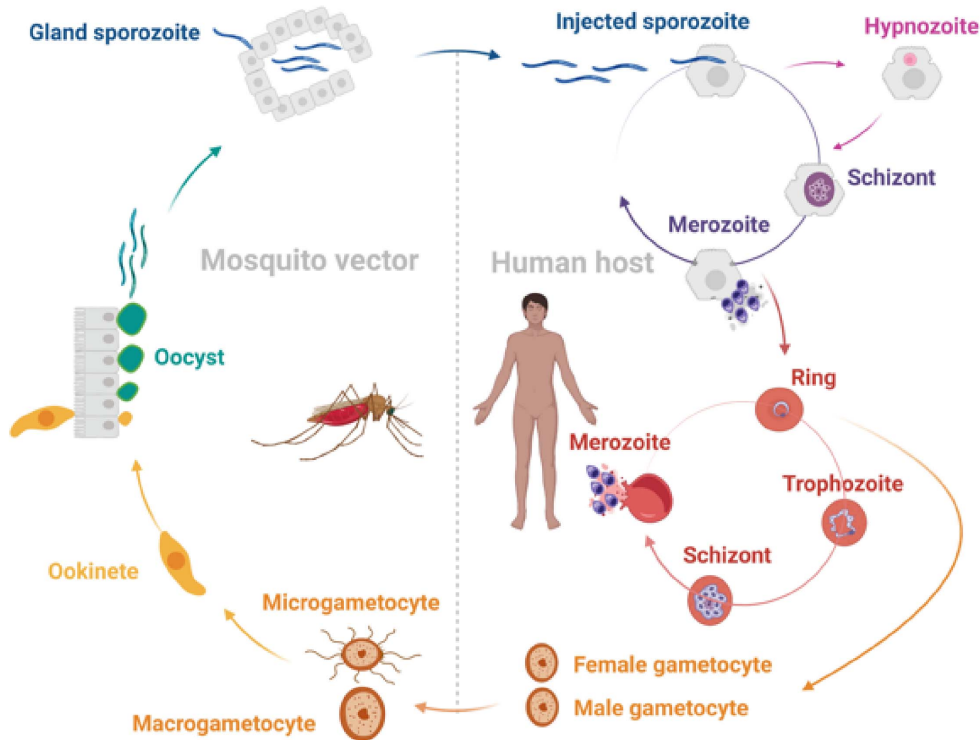
## La version française de l'article est disponible à la suite de la version anglaise

### 1. Introduction

Malaria is an acute debilitating illness that is caused by parasitic protozoans from the genus *Plasmodium* that are transmitted by *Anopheles* mosquitoes. According to the latest report of the World Health Organization (WHO), the disease accounted for 241 million cases and 627,000 deaths worldwide in 2020. The estimated number of malaria deaths stood at 627,000 in 2020 (an increase of 69,000 deaths over the previous year). Sub Saharan African countries continue

to carry a disproportionately high share of the global malaria burden, with 95% of all malaria cases and 96% of deaths. Children under 5 years of age accounted for about 80% of all malaria deaths in this region [1].

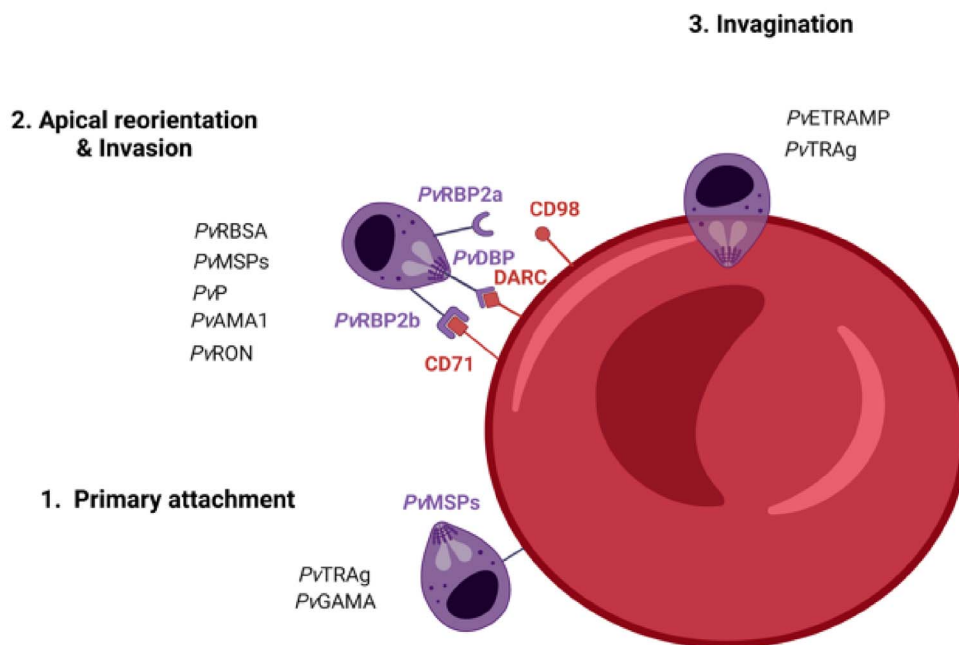
Among the species responsible for human infection, *Plasmodium vivax* is the most geographically widespread and the leading cause of disease outside Sub Saharan Africa, in Southeast Asia, South America and Northeast Africa [2]. *P. vivax* has a com-



**Figure 1.** *P. vivax* life cycle. The life cycle of *P. vivax* involves the cyclical infection of a Anopheline mosquito vector and a human host. When a malaria-infected mosquito takes a blood meal, it injects sporozoites into the human host. They migrate through the dermis to the liver and invade hepatocytes. They mature into tissue schizonts and establish a stock of latent hypnozoites. When schizonts rupture, they release merozoites that migrate to the bloodstream and invade reticulocytes. They develop into rings, trophozoites and blood-stage schizonts. When the schizonts rupture, they lyse the infected reticulocytes and release new merozoites. A small proportion of the parasite population differentiates into male and female gametocytes. When a mosquito takes a new blood meal, it ingests gametocytes. In the midgut, the microgametocytes and macrogametocytes fertilize, undertake sexual division, and transform into ookinets that mature into oocysts. When the oocysts rupture, they release sporozoites that migrate to the salivary glands to perpetuate the life cycle. Figure created with BioRender.com.

plex life cycle consisting of the cyclical infection of a human host and a female *Anopheline* mosquito vector. Following the bite of an infected mosquito, sporozoites migrate through the dermis into capillaries, reach the liver and invade hepatocytes [3]. While most sporozoites undertake an asexual maturation into schizonts, some of them diverge to form quiescent hypnozoites. These hypnozoites can emerge weeks or months after the primary infection and give rise to relapsing episodes of malaria [4]. When schizonts eventually rupture, they release merozoites that migrate into the bloodstream and invade reticulocytes. They develop into rings, trophozoites and

then schizonts [2]. Again, schizonts rupture and release new merozoites out of the infected reticulocytes to invade healthy ones. This results in a continuous round of asexual multiplications increasing the number of parasites [5]. Alternatively, some parasites differentiate into male or female gametocytes. When they infect new mosquitoes, they undergo fertilization inside the midgut and produce ookinets that mature into oocysts. These oocysts release sporozoites that migrate to salivary glands and can be inoculated into new hosts by female mosquitoes during a bloodmeal. Thereby, *P. vivax* life cycle is perpetuated (Figure 1) [6].



**Figure 2.** *P. vivax* invasion mechanisms within Duffy-positive reticulocytes. (1) Primary attachment & Reorientation—when *P. vivax* merozoites are released in the blood circulation, the primary attachment involves *PvMSPs*. Other proteins such as *PvTRAg*56.2 and *PvGAMA* may play a role in the adhesion and stabilization of the parasite. (2) Ligand binding & Receptors—the *PvDBP* is gradually coupled to *DARC* (region II) to create a stable heterotetramer consisting of two *PvDBP* molecules and two *DARC* molecules. The recognition and selection of reticulocytes for invasion are mediated by *PvRBPs*, notably through the interactions *PvRBP2b*-*CD71* and *PvRBP2a*-*CD98*. In absence of biological evidence and based on observations during red blood cell invasion by *P. falciparum* or *P. knowlesi* merozoites, we suppose that many *P. vivax* proteins including *PvMSPs*, *PvRBSA* and other proteins may play a role to ensure *P. vivax* apical reorientation. (3) Tight junction & Engagement—*P. vivax* merozoites penetrate the reticulocytes via glideosome activity. Proteins such as *PvAMA1* and *PvRON* might lead either directly or indirectly to the formation of a tight and irreversible junction and mediate invasion. Several *P. vivax* surface proteins may be rapidly degraded whereas others such as *PvTRAg*36.6 and *PvETRAPM* may be expressed to form a parasitophorous vacuole and support the development of the parasite. Of note, the *P. vivax* merozoite invasion mechanisms described here are so far largely limited to a comparison with *P. falciparum* and *P. knowlesi* invasion homologs and a handful of known *P. vivax* invasion gene families. The role of *P. vivax* ligands present in purple bold font have been confirmed, while the others present in black font are only suspected. Figure created with BioRender.com.

While it may be cryptic, *P. vivax* is the most widely distributed cause of malaria across the globe [7]. Indeed, its ability to develop at low temperatures (18–25 °C) provides potential for infectivity and transmission in both tropical and temperate areas [8]. Interestingly, the intra-erythrocytic cycle of *P. vivax* is characterized by low parasitemia and asynchrony, which contribute to missed diagnoses [9]. Low parasitemia, commonly observed in *P. vivax*

infection, is probably due to the unique tropism of *P. vivax* merozoites for reticulocytes and the specific physiological and/or metabolic needs of the parasite for blood-stage growth and survival [2]. In absence of biological evidence, a model for invasion by *P. vivax* has been proposed, based on observations during red blood cell invasion by *P. falciparum* or *P. knowlesi* merozoites. It suggests that during the invasion process, *P. vivax* expresses adhesins to bind receptors on

the surface of reticulocytes and establish an initial and reversible attachment. This results in the deformation of the reticulocyte membrane and the apical reorientation of merozoites. Then, they activate organelles and release invasion-related proteins to form a tight and irreversible junction [10]. The merozoites are propelled by an actin-myosin motor and the junction moves from the apical to posterior pole. That forms the parasitophorous vacuole in which the parasites will develop after the invasion pore and reticulocyte membrane are resealed [11, 12] (Figure 2 and Table 1 for details).

For many years, scientists have sought to identify the key host-parasite interactions leading to the invasion of human reticulocytes by *P. vivax*. Between 1920 and 1960, clinical and field trials carried out with individuals of African or African American ancestry demonstrated that they were highly resistant to *vivax* malaria when challenged with human blood or mosquitoes infected with limited numbers of *P. vivax* strains [13–16]. Following the identification of the Duffy blood groups [17, 18], it was established that the natural resistance to *vivax* infection was related to the absence of Duffy antigen receptors for chemokines (DARC) on the surface of human erythrocytes [19]. The molecular basis of Duffy-negativity was later demonstrated as a single point mutation in the GATA1 (tct>cct) sequence located in the 5' promoter region of the *ackr1* gene [20,21]. Seminal works with controlled experimental infections of volunteers through sporozoite challenges [19] and *in vitro* studies using *P. knowlesi* (a zoonotic malaria parasite closely related to *P. vivax*) as a model [22] subsequently confirmed that DARC was required as a receptor for *P. vivax* merozoites to invade erythrocytes. In parallel, the parasite ligand that specifically binds DARC was identified as *P. vivax* Duffy binding protein (*PvDBP*) [23]. Hence, the scientific paradigm by which *P. vivax* exclusively invades Duffy-positive erythrocytes through the interaction between *PvDBP* and DARC was established and *vivax* malaria was assumed to be seldom transmitted or even absent in regions where Duffy-negativity is predominant such as Sub Saharan Africa [19]. However, over the last two decades, many studies have reported cases of *P. vivax* infection within Duffy-negative individuals from Sub Saharan countries such as Angola [24], Benin [25], Cameroon [26, 27], Equatorial Guinea [24, 28], Ethiopia [29], Kenya [30],

Madagascar [31], Mali [32], Mauritania [33] and Sudan [34]. Although such unexpected observations are still scarce, they raise questions about the actual invasion mechanisms used by *P. vivax* to infect Duffy-negative individuals. They also challenge common assumptions such as the central role played by the *PvDBP*-DARC interaction in blood-stage infections, the limit of detection of current diagnostic tools and the evolution of host-pathogen interactions [35]. At present, we do not know whether these cases represent a pre-existing phenomenon that was overlooked in the past or a newly evolved DARC-independent invasion pathway that could lead to an expansion of *vivax* malaria within Duffy-negative populations [36].

Because the collection of field samples from remote endemic areas is difficult, time demanding and expensive, research has long been restricted to direct sampling from patient donors or the study of closely related *Plasmodium* species such as *P. knowlesi* [37, 38] or *P. cynomolgi* [39]. Furthermore, the development of reproducible long-term *in vitro* culture methods is still impaired by *P. vivax* low parasitemia and strong tropism for reticulocytes [40].

Nevertheless, recent omics technologies have revolutionized *vivax* malaria research with the development of innovative and affordable techniques enabling a more comprehensive characterization of *P. vivax* genes, transcripts, and proteins. This review aims to provide broad insights into *P. vivax* invasion mechanisms enabled by genomics, transcriptomics, and proteomics and to illustrate the importance of integrated multi-omics studies.

## 2. *P. vivax* molecular mechanisms of invasion

In 2004, the *P. vivax* genome sequencing project provided the first reference sequence *P. vivax* Salvador-1 (Sal-1) using a whole genome shotgun strategy [41, 42]. In the last twenty years, a few additional field and clinical *P. vivax* isolates have been sequenced through microarray, high-depth sequencing, or whole genome sequencing. All these sequences are publicly available on online database such as PlasmoDB (<https://plasmodb.org/plasmo/app>) and are regularly annotated. Overall, the analysis of these *P. vivax* sequences has contributed to the identification of potential invasion-related genes.

**Table 1.** List of *P. vivax* invasion-related ligands characterized by omics technologies

Step	Pv ligands	Accession numbers	Role (confirmed/ potential)	Erythrocyte receptor	Vaccine candidates (blood stage)	Genomics	Evidence from Transcriptomics	Proteomics
Primary attachment & reorientation	MSP1	PVP01_0728900	Confirmed		Yes	<i>pvmSP1</i> is highly polymorphic (SNPs) [43]	Among all genes, <i>pvmSP1</i> is one of the most expressed gene in <i>P. vivax</i> schizonts [44]	Based on the study of homologous PfMSPs in <i>P. falciparum</i> , it has been hypothesized that <i>PvMSP1</i> may recognize a cogent receptor on the surface of reticulocytes [45]
	MSP7	PVP01_1219500, PVP01_1219700, PVP01_1219400, PVP01_1219600, PVP01_1220300, PVP01_1220300, PVP01_1220400, PVP01_1219900	Potential			<i>pvmSP7</i> is highly polymorphic (SNPs) [46]. <i>pvmSP3</i> presented copy number variations ranging from 1–4 copies	<i>pvmSP7</i> transcript peaks during the late trophozoite-schizont transition [47]. <i>pvmSP3</i> transcripts were detected in very late schizonts [5]. Among all genes, <i>pvmSP9</i> is one of the most expressed gene in <i>P. vivax</i> schizonts [44]	Based on homology with <i>PfMSP7</i> , <i>PvMSP7</i> may be a specific ligand for the receptor P-selectin [48]
	GAMA	PVP01_0505600	Potential			<i>pvgama</i> displays a size polymorphism [49]		Functional assays: <i>PvGAMA</i> may play a role in the adhesion of <i>P. vivax</i> merozoites to reticulocytes [49] and binds to Band3 and ANK1 [50]

(continued on next page)

Table 1. (continued)

Step	Pv ligands	Accession numbers	Role (confirmed/potential)	Erythrocyte receptor	Vaccine candidates (blood stage)	Evidence from	
						Genomics	Transcriptomics
Ligand bindings	MSP1P	PVP01_0728800	Potential				<i>Pv</i> MSP1P may play an important role in the adhesion of <i>P. vivax</i> merozoites to reticulocytes through interaction with its C-terminal region [43]
	TRAg56.2	PVX_088850	Potential			The <i>pvrtrag</i> gene family is seldom polymorphic [51]	Immunoprecipitation and mass spectrometry: <i>Pv</i> TRAg56.2 seems to co-localize with <i>Pv</i> MSP1 and interact with <i>Pv</i> MSP7 to play a stabilizing role [52]
	DBP	PVP01_0623800	Confirmed	DARC	Yes	<i>pvdhp</i> is highly polymorphic (SNPs, CNVs) [53]	Single cell RNA sequencing; different expression levels for different members of the <i>pvrtrag</i> gene family [5]
							Binding and functional assays
	EBP	PVP01_0102300	Potential			<i>pvebp</i> is highly polymorphic but less than <i>pvdhp</i> (SNPs, CNVs) [55]	<i>pvdhp</i> gene amplification was associated with an increase in messenger RNA (mRNA) level, suggesting a potential increase in <i>Pv</i> DBP protein level [54]
						<i>pvebp</i> transcripts were found to be highly expressed during <i>P. vivax</i> schizont stage [55,56]	<i>Pv</i> EBP11 binds preferentially immature Duffy-positive reticulocytes, but a minimal binding was observed in immature Duffy-negative reticulocytes [57,58]

(continued on next page)



**Table 1.** (continued)

Step	Pv ligands	Accession numbers	Role (confirmed/potential)	Erythrocyte receptor	Vaccine candidates (blood stage)	Evidence from		
						Genomics	Transcriptomics	Proteomics
Tight junction formation	<i>RBP2b</i>	PVP01_0800700	Confirmed	CD71		<i>pvrhp2a</i> has conserved regions but is relatively polymorphic [59,60]		<i>Ex vivo</i> culture system: the interaction <i>PvRBP2b</i> -CD71 plays a crucial role in the recognition of reticulocytes [61]
	<i>RBP2a</i>	PVP01_1402400	Confirmed	CD98		<i>pvrhp2a</i> has conserved regions but is relatively polymorphic [59,60]		Binding assays: CD98 is the cogent receptor of <i>PvRBP2a</i> and the interaction <i>PvRBP2a</i> -CD98 is involved in the recognition of reticulocytes [62]
	<i>RBSA</i>	PVP01_0004240	Potential			<i>pvrbsa</i> presents less genetic diversity than other <i>P. vivax</i> merozoite surface genes [63]		<i>PvRBSA</i> specifically binds to Duffy-positive reticulocytes, but its cogent receptor is unknown [63]
	<i>P12</i>	PVP01_1136400	Potential					The <i>PvP</i> protein family is expressed on the surface of <i>P. vivax</i> merozoites and may play a role in the invasion of reticulocytes [64]
	<i>AMA1</i>	PVP01_0934200	Potential		Yes			Functional assays: conserved functions for <i>PfAMA1</i> and <i>PvAMA1</i> [65]. May be involved with <i>PvRON2</i> in the formation of the tight junction [66]

(continued on next page)

**Table 1.** (continued)

Step	Pv ligands	Accession numbers	Role (confirmed/potential)	Erythrocyte receptor	Vaccine candidates (blood stage)	Genomics	Evidence from	
							Transcriptomics	Proteomics
	<i>RON</i>	PVP01_0916600	Potential			Identification of <i>pvrpn4</i> by homology to <i>pfrpn4</i> and <i>pkrpn4</i> in <i>P. vivax</i> VCG-1 [67]	<i>pvrpn4</i> presents a similar transcription pattern to the one reported for <i>pfrpn4</i> [67], <i>pvrpn5</i> transcripts were found in schizonts [66]	Indirect immunofluorescence and immunoassays: <i>Pv</i> RON4 may be expressed in <i>P. vivax</i> VCG-1 apical pole and may participate in the formation of a tight junction [67]. <i>Pv</i> RON5 has a marked binding preference for reticulocytes and is thus suspected to be involved in the invasion process [66]
	<i>ETRAMP</i>	PVP01_0532300	Potential					<i>Pv</i> ETRAMP could be involved in the formation of parasitophorous vacuole
	<i>TRAg36.6</i>	PVX_112690	Potential			DNA sequencing: the <i>pvrtrag</i> gene family is seldom polymorphic [51]	Single cell RNA sequencing: different expression levels for different members of the <i>pvrtrag</i> gene family [5]	Immunoprecipitation and mass spectrometry: <i>Pv</i> TRAg36.6 seems to colocalize with <i>Pv</i> ETRAMP to form and/or maintain the parasitophorous vacuole membrane [52]
Unknown function	<i>MSA180</i>	PVP01_0814200	Potential				Among all genes, <i>pumsa180</i> is one of the most expressed gene in <i>P. vivax</i> schizonts [44]	

(continued on next page)

Table 1. (continued)

Step	Pv ligands	Accession numbers	Role (confirmed/potential)	Erythrocyte receptor	Vaccine candidates (blood stage)	Genomics	Evidence from Transcriptomics	Proteomics
	<i>P92</i>	PVP01_1107900	Potential				Among all genes, <i>purama</i> is one of the most expressed gene in <i>P. vivax</i> schizonts [44]	
	<i>RAMA</i>	PVP01_0107500	Potential					
	<i>RBP1a</i>	PVP01_0701200	Potential			DNA sequencing: genetic diversity of <i>purbp1a</i> seems to be low [68]	<i>purbp1</i> transcripts were found to be highly expressed during <i>P. vivax</i> schizont stage [55, 56]	Native <i>PvRBP1</i> and <i>PvRBP2</i> may function as an adhesive protein complex [69]
	<i>RBP1b</i>	PVP01_0701100	Potential			DNA sequencing: genetic diversity of <i>purbp1b</i> seems to be low [68]	<i>purbp1</i> transcripts were found to be highly expressed during <i>P. vivax</i> schizont stage [55, 56]	Native <i>PvRBP1</i> and <i>PvRBP2</i> may function as an adhesive protein complex [69]
	<i>RBP2c</i>	PVP01_0534300	Potential			DNA sequencing: <i>purbp2c</i> is highly polymorphic [51, 59, 70]		
	<i>RBP1p1 (partial)</i>	?	Potential			DNA sequencing: identification of the partial gene <i>purbp1p1</i>		
	<i>RBP2p1 (partial)</i>	PVP01_0534400	Potential			DNA sequencing: identification of the partial gene <i>purbp2p1</i>		
	<i>RBP2p2 (partial)</i>	PVX_101590	Potential			DNA sequencing: identification of the partial gene <i>purbp2p2</i>		

(continued on next page)

**Table 1.** (continued)

Step	Pv ligands	Accession numbers	Role (confirmed/ potential)	Erythrocyte receptor	Vaccine candidates (blood stage)	Evidence from	
						Genomics	Proteomics
	<i>RBP2d (pseudo)</i>	PVP01_1471400	Potential			DNA sequencing: identification of the pseudogene <i>pvrbp2d</i>	
	<i>RBP2e (pseudo)</i>	PVP01_0700500	Potential			DNA sequencing: identification of the pseudogene <i>pvrbp2e</i>	
	<i>RBP3 (pseudo)</i>	PVP01_1469400	Potential			DNA sequencing: identification of the pseudogene <i>pvrbp3</i>	
	<i>RhopH3</i>	PVP01_0703800	Potential			Among all genes, <i>pvrhoph3</i> is one of the most expressed gene in <i>P. vivax</i> schizonts [44]	
	<i>RON5</i>	KP026121	Potential			The <i>pvrpn5</i> transcript is found in schizonts in <i>P. vivax</i> VCG-1 [66]	Binding, Western blot and immunofluorescence assays: <i>PvRON5</i> is expressed in <i>P. vivax</i> apical pole and preferentially binds reticulocytes [66]

Accession numbers starting from PVP01 are from *PvP01* reference strain while accession numbers starting from PVX are from Sal-1 reference strain (<https://plasmodb.org/plasmo/app>). Accession numbers starting from KP are from VCG-1 reference strain (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## 2.1. The crucial role of *pvd* gene in the invasion of Duffy-positive reticulocytes

The *P. vivax* Duffy Binding Protein (*pvd*) gene encodes the invasion-related ligand *P. vivax* Duffy Binding Protein (*PvDBP*) [71]. The *pvd* gene displays coding sequences for a N-terminal signal peptide domain, a conserved cysteine-rich Duffy binding domain referred to as region II, another conserved cysteine-rich domain referred to as region VI, followed by a transmembrane domain and a C-terminal cytoplasmic tail [72]. Based on current high throughput sequencing data, our appreciation of genetic diversity is less and less limited by the nature and/or density of markers studied along the genome. Notably, the recent publication of more than two hundred *P. vivax* genomes showed that the *pvd* gene sequences were highly polymorphic irrespective of their geographic origin. Interestingly, many non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found in the DARC binding domain region II (*PvDBPII*) [53]. The diversity and localization of these SNPs suggest that the *pvd* gene may be under differential selective pressure due to antibody responses and its function in receptor-binding and invasion [51].

In addition, copy number variations (CNVs) at the *pvd* locus were found to be one of the most common gene expansions to occur across multiple alleles worldwide [73]. While the detection of CNVs relied, in the past, on labour intensive and costly techniques such as *in situ* hybridization, recent advances in high throughput sequencing enabled their direct detection based on sequencing data. Notably, whole genome sequencing approaches revealed two distinct duplications in parasites from Madagascar and Cambodia. In Madagascar, *P. vivax* isolates from Duffy-positive and Duffy-negative patients exhibited a common duplication with two copies of *pvd* next to each other [74]. In Cambodia, a different duplication of the *pvd* gene was commonly detected in *P. vivax* isolates from Duffy-positive patients. Furthermore, the proportion of *P. vivax* isolates carrying the duplication was found to be significantly higher in homozygous Duffy-positive patients than in heterozygous Duffy-positive patients who are expected to exhibit a lower expression of DARC on the surface of their reticulocytes. However, the latter analysis could not completely rule out that patients could

carry multiple *P. vivax* clones while the estimation of CNVs by quantitative PCR can only reflect the major clone [53]. More recently, a geographical survey demonstrated that these two distinct duplications of *pvd* were circulating in Asia, South America, and East Africa. While Duffy negativity is prevalent in some regions, duplications of the *pvd* gene were also largely found in regions where Duffy negativity was almost absent [51]. In contrast, a concurrent genomic analysis showed that no duplication of *pvd* was found in one hundred eighty-two *P. vivax* isolates from eleven endemic countries. However, it was noticed that this discrepancy was probably due to the primers used for CNV validation by PCR [75].

Despite the specificity and distribution of the duplications of *pvd*, there was no evidence that *P. vivax* genomes bypassed the barrier of Duffy negativity through this genetic variation. Larger expansions of *pvd* were also detected worldwide. They clustered separately but presented similar patterns. High haplotype diversity was also observed between the copies while the 5' and 3' flanking sequences displayed moderate diversity [76]. In the Asia-Pacific region, sequencing of more than two hundred *P. vivax* isolates from Duffy-positive patients revealed the common presence of two to three copies of the *pvd* gene [73]. In Ethiopia, sequences of two *P. vivax* isolates from Duffy-negative patients exhibited the presence of three and eight copies of the *pvd* gene [57]. Later on, another common expansion of the *pvd* gene, quite similar to those previously described in Madagascar and Cambodia but ranging from three to five copies, was also detected [51]. These findings have therefore allowed to hypothesize that the expansion of *pvd* may allow for mutation arising in the second copy. Such expansions may facilitate the binding to an alternative erythrocytic receptor with a lower affinity for *PvDBP* ligand [57]. However, there is no evidence of localized-selected CNVs that would enhance invasion efficiency and induce selective pressure. Since the invasion of Duffy-positive erythrocytes depends on the interaction between *PvDBP* and DARC, it is likely that the expansions of *pvd* may be driven by genetic variations in DARC or inhibitory antibody responses to *PvDBPII* [75]. Nonetheless, it is unclear whether these expansions do provide an enhanced ability to the parasite to invade Duffy-negative erythrocytes.

## 2.2. The potential role of *pvebp* gene in an alternative invasion pathway

The *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein (*pvebp*) gene was discovered through *de novo* assembly of one *P. vivax* isolate from Cambodia. It encodes the putative *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein (PvEBP) ligand and is present in most *P. vivax* genomes. The organization of the *pvebp* gene is similar to the *pvdhp* gene with an N-terminal signal peptide, a Duffy binding like domain referred to as region II, another cysteine-rich domain referred to as region VI followed by a transmembrane domain and cytoplasmic tail [55]. Despite these similarities, *pvebp* appears to cluster separately from all known *Plasmodium* Duffy binding protein like genes. DNA sequencing of ten *P. vivax* genomes from Asia, South Pacific, Africa, Central and South America showed that *pvebp* is polymorphic though less diverse than *pvdhp*. Indeed, the *pvebp* gene displayed only 11 polymorphic sites in 2412 positions while the *pvdhp* gene displayed 32 polymorphic sites in 3213 positions for the same samples. Most of the SNPs detected were non-synonymous [55]. Furthermore, the genomic analysis of two hundred nineteen *P. vivax* isolates from Duffy-positive patients in Cambodia and Madagascar confirmed that *pvebp* was less diverse than *pvdhp* (12 vs. 33 alleles observed from the same isolates) but presented only non-synonymous mutations indicating the existence of a strong selective pressure. Indeed, eleven non-synonymous point mutations were found in *pvebp* sequences and led to twelve different alleles. Some SNPs were observed in both countries whereas others were specific to Cambodia and Madagascar. These SNPs were distributed across the Duffy binding like domain [53]. Just as for *pvdhp*, the diversity and distribution of SNPs in *pvebp* reflected the likely existence of a selective pressure in the *pvebp* gene though it seemed to operate at a lower level than in the *pvdhp* gene [58].

The genomic analysis of *P. vivax* isolates from Cambodia, Madagascar and Ethiopia also revealed the existence of copy number variations in the *pvebp* gene. In Madagascar, *pvebp* expansions were observed, ranging from two to five copies. A bimodal distribution of parasites with a specific population presenting more than three copies was found. However, no significant difference in susceptibility to *vivax* infection was observed between

homozygous and heterozygous Duffy-positive individuals. In Cambodia, *pvebp* expansions ranged from one to two copies. The proportion of *P. vivax* isolates with multiple gene copies was more important in high transmission areas [53]. Overall, a high proportion of *P. vivax* isolates with multiple gene copies was found in Madagascar where Duffy-negativity and Duffy-positivity coexist as compared to Cambodia where Duffy-negativity is virtually absent. In contrast, no *pvebp* expansion was found in Ethiopia where Duffy-negativity is also frequent [51]. Considering the similarities observed between the *pvdhp* and *pvebp* genes, the polymorphism and expansion of *pvebp* may correlate with the expression of a new ligand interacting with erythrocyte membrane proteins other than DARC and therefore contribute to an alternative invasion pathway [55]. However, no evidence that such variations confer any abilities to infect Duffy-negative individuals have been provided so far.

## 2.3. The role of *pvrpb* and *pvrbsa* genes in reticulocyte selectivity

The *P. vivax* Reticulocyte Binding Protein (*pvrpb*) gene family was identified based on the annotation of adhesive ligands of *P. vivax* genome [69]. Genome sequencing of several *P. vivax* isolates identified eleven members in the *pvrpb* gene family including five full-length genes (*pvrpb1a*, *pvrpb1b*, *pvrpb2a*, *pvrpb2b* and *pvrpb2c*), three partial genes (*pvrpb1p1*, *pvrpb2p1* and *pvrpb2p2*) and three pseudogenes (*pvrpb2d*, *pvrpb2e* and *pvrpb3*) [77]. The *pvrpb* genes are constituted of two exons with one exon encoding a signal peptide at the N-terminal region and another exon encoding a transmembrane domain at the C-terminal region [56]. Recent investigations reported that their genetic diversity seems to be generally low, except for the *pvrpb2* genes [68]. The analysis of *P. vivax* isolates from China, Thailand and Ethiopia confirmed that *pvrpb2c* was highly polymorphic [51, 59, 70]. Although *pvrpb2a* and *pvrpb2b* presented highly conserved regions, the genomic analysis of *P. vivax* isolates from Papua New Guinea and Thailand showed that they were also relatively polymorphic [59, 60]. As observed for the *pvdhp* and *pvebp* genes, non-synonymous SNPs clustered around three main sites including the reticulocyte

binding domain. This may reflect the functional importance of this binding site and the existence of a selective pressure [60].

Furthermore, CNVs affecting both *pvrbp2a* and *pvrbp2b* were observed in two *P. vivax* isolates from Thailand. While a strain presented duplication of both genes (*pvrbp2a* and *pvrbp2b*), the other strain had two copies of *pvrbp2b* only [59]. These findings suggest that the *pvrbp* genes may encode ligands involved in the recognition of target cells. The *P. vivax* reticulocyte binding surface antigen (*pvrbsa*) gene has also been identified as a gene potentially involved in the recognition of reticulocytes though it displays less genetic diversity than other *P. vivax* merozoite surface genes [63].

#### 2.4. The potential role of *pvm* genes in primary attachment

The *P. vivax* merozoite surface protein (*pvm*) gene family encodes multiple antigenic determinants that are suspected to mediate the primary attachment between *P. vivax* merozoites and human reticulocytes [11]. These *pvm* genes are highly polymorphic. In particular, *pvm1* [43], *pvm3* [43, 78] and *pvm7* [46] exhibit numerous non-synonymous SNPs indicating that they may be under selective immune pressure [51]. Analysis of *P. vivax* isolates from Ethiopia revealed that *pvm3* presented copy number variations ranging from one to four copies. Interestingly, the expansions of *pvd* and *pvm3* were often observed as tandem copies. The functional relevance of this expansion of copy numbers is still not known.

#### 2.5. The other genes and their potential role in *P. vivax* invasion pathway

Other *P. vivax* genes are suspected to be involved in the invasion process. For instance, the *P. vivax* tryptophan-rich antigen (*pvtrag*) gene family is thought to encode thirty-six proteins that can bind to human erythrocytes [79]. The genomic analysis of *P. vivax* strains from Ethiopia revealed that the *pvtrag* gene family seems to bear only a few genetic polymorphisms [51]. Similarly, the *P. vivax* glycosylphosphatidylinositol-anchored micronemal antigen (*pvgama*) gene encodes the *P. vivax*

glycosylphosphatidylinositol-anchored micronemal antigen (*PvGAMA*) that binds erythrocytes regardless of Duffy antigen status [43]. This protein may play a role in the adhesion of *P. vivax* merozoites to its target cells [49]. Finally, the *P. vivax* rhoptry neck protein (*pvrn*) gene family encodes for *P. vivax* rhoptry neck proteins (*PvRON*) that may participate in the formation of the tight junction as demonstrated for the *P. falciparum* homologs [67].

Genomic technologies clearly contributed to refine *vivax* malaria research by reducing the cost of sequencing as well as improving the quality and availability of sequences. However, only a few hundred *P. vivax* genomes have been sequenced so far. Field and clinical isolates present low parasitemia and high human DNA contamination that still make the acquisition of sufficient amount of high-quality parasite DNA difficult. Yet, the available genomic sequences have enabled the identification of a few potential invasion-related genes. Single nucleotide polymorphisms and copy number variations found in these genes may lead to structural differences and result in selective pressures, but the functional consequences of these variations remain unknown. Analysis of *P. vivax* genomes should be combined with the identification of their transcriptomic profiles and characterization of their putative proteins to detect specific signatures, which may provide insights into function. But the lack of *in vitro* culture methods for *P. vivax* makes functional analysis difficult.

### 3. Transcription of *P. vivax* invasion-related genes

Constant advances of high throughput sequencing associated with the recent ability to mature one cycle *ex vivo* isolates have opened the way to transcriptomic studies. The profiling of *P. vivax* blood stage transcriptome through microarray and RNA sequencing (bulk and at single cell level) is progressively unveiling new experimental abilities and elucidating the transcription, function, and regulation of invasion-related genes.

#### 3.1. Stage-specific expression of *P. vivax* invasion-related genes

Generating high quality transcriptomes across multiple *P. vivax* isolates is essential to explore the changes

in gene expression throughout the intraerythrocytic cycle and leading to invasion. Recently, the single cell transcriptomics profiling in *P. vivax* isolates from bloodstream infections of *Aotus* and *Saimiri* monkeys revealed that most of the genes had a stage-specific expression and were strongly over-expressed, in contrast to housekeeping genes [5]. Given that most clinical infections were asynchronous, the analysis of *P. vivax* transcriptomes identified distinct populations. Rings and early trophozoites mainly expressed genes involved in transcription and translation whereas late trophozoites and schizonts possibly expressed invasion-related genes [5]. For instance, the *pvebp* and *pvrhp1* transcripts were found to be highly expressed during *P. vivax* schizont stage [55, 56]. Similarly, the *pvmosp3* transcripts were detected in very late schizonts [5] and the *pvmosp7* transcript generally peaked during the late trophozoite-schizont transition, when merozoites are being formed [47]. In the primate model-adapted *P. vivax* strain (VCG-1), the *pvrn5* transcripts were found in schizonts [66]. Moreover, RNA sequencing experiments conducted with *ex vivo* *P. vivax* isolates from Brazil showed a wide variation in the expression of genes that were suspected to be involved either in the host-parasite interaction, reticulocyte selectivity or invasion. In particular, *pvmosp1*, *pvmosp9*, *P. vivax* merozoite surface antigen 180 (*pvmisa180*), *P. vivax* rhoptry-associated membrane antigen (*pvrma*) and *P. vivax* rhoptry H3 (*pvrhoph3*) were the most expressed among all genes [44]. The expression of invasion-related genes in late schizonts implies the key importance of merozoite development and reticulocyte invasion for *P. vivax* survival.

### 3.2. Selective expression of *P. vivax* invasion-related genes

The current *P. vivax* genome contains many gene families that were defined based on sequence homology and conservation of amino acid domains. Single-cell RNA sequencing analyses demonstrated that selective gene expression may be due to its specific role or additional functions. While most of the *pvmosp* genes are expressed during late developmental stages, *pvmosp3* was found to be exclusively expressed in very late schizonts suggesting its role in the invasion process. More surprisingly,

a *pvmosp7* like gene appeared to be exclusively expressed in gametocytes implying a functional difference [5]. Comparable results were reported using clinical *P. vivax* isolates from Thailand. While the expression of most of the *pvmosp7* genes was associated with schizonts, the *pvmosp7a* and *pvmosp7f* genes maintained high expression levels throughout the entire intraerythrocytic cycle. Such findings suggest that these paralogs may have additional functions besides their established role on the surface of merozoites [47]. Similarly, different expression levels were observed among members of the *pvrtrg* gene family but their significance is unknown [5]. Despite their sequence homology, members of a gene family may also have different functions at specific time points [5]. Finally, a directional and amplification-free transcriptome (DAFT) sequencing of four *P. vivax* isolates from Cambodia revealed that transcription may be a selective process where the parasites would select particular members of a gene family in response to the host [80]. The authors showed that genes that were the most variably expressed among isolates physically clustered along chromosomal regions. For instance, the *pvmosp3* locus presented many paralogs which were likely to be of functionally redundant thus increasing antigenic diversity and enhancing immune evasion during the invasion process. Within clusters, gene expression appears to arise as if parasites were choosing the gene version to be expressed within a given host [80]. Overall, these findings reflect a developmental regulation and functional differentiation within specific gene families.

### 3.3. Amplification of *P. vivax* invasion-related genes

In *Plasmodium* species, gene amplification may provide a simple way to increase gene expression and thereby changing invasion phenotypes. Previous genomic studies demonstrated that some *P. vivax* strains had amplification of invasion-related genes. Notably, the *pvdhp* gene is highly variable in the number of gene copies. For instance, transcriptomic profiling of schizonts from Cambodian *P. vivax* isolates revealed that the *pvdhp* gene amplification was associated with an increase in messenger RNA (mRNA) level, suggesting a potential increase in *Pv* DBP protein level [54]. Given that *Pv*DBP protein



plays a crucial role in the invasion of Duffy-positive reticulocytes, it was hypothesized that the parasites capable of infecting Duffy-negative reticulocytes may have been selected for their ability to use multiple copies of *pvdhp* in order to bind an alternative receptor [69]. However, *P. vivax* strains with multiple copies of *pvdhp* have also been commonly detected in regions where Duffy-negativity is rare. On another note, even though *pvebp* presents many similarities with *pvdhp*, there is no evidence that its amplification leads to increased mRNA and/or protein levels [53]. Thus, the functional consequences of invasion-related gene expansion are uncertain and require further investigations with a high number of *P. vivax* isolates.

### 3.4. A complex and dynamic regulation system

Transcriptomic data from individual parasites suggested that *P. vivax* exhibited a tightly regulated transcriptional cascade during its intraerythrocytic cycle [81]. Investigations showed that co-expressed genes presented conserved motifs, and potential sites for regulatory binding proteins [82]. For instance, long 5' and 3' untranslated transcribed regions (UTRs) were observed in genes suspected to be involved in the invasion and the formation of parasitophorous vacuole [80]. In addition, variations of 5'-UTRs seemed to lead to a differential selection of transcription start sites (TSS) reflecting the dispersed patterns of transcription that could arise [83]. The presence of bidirectional promoters to regulate the expression of adjacent gene pairs has also been frequently observed. Lastly, post-transcriptional modifications such as chromatin structure, non-coding transcripts and alternative splicing may play an important role in regulation, but the mechanisms remain unclear. Notably, the putative spatial relationship between genes which are variably expressed suggests that chromatin structure and access may be important for gene regulation [83]. Thus, *P. vivax* has an elusive and complex regulatory network that may govern invasion-related genes and thereby allow the parasite to thrive within infected human reticulocytes.

Transcriptomics provides precious insights into the dynamics of *P. vivax* invasion-related genes. It is likely that *P. vivax* schizonts selectively express specific genes to initiate the invasion process. However,

the small sample sizes, lack of reliable *in vitro* culture methods and paucity of constantly expressed genes complicate the identification of new transcripts and regulatory motifs. In the future, single-cell profiling and long read sequencing of *P. vivax* isolates from geographically distinct regions should be combined with proteomic approaches to assess the full diversity of invasion-related ligand expression.

## 4. *P. vivax* cellular invasion mechanisms

Proteomics data for *P. vivax* infections are minimal due to the limited access to biological material and lack of robust *in vitro* culture system. The list of proteins expressed in *P. vivax* merozoites has thus not been clearly defined. This has generated critical knowledge gaps in the understanding of *P. vivax* invasion mechanisms. Given that the basic structure of merozoites is similar across *Plasmodium* species, most of the researchers based the investigation of *P. vivax* invasion mechanisms on the hypothesis that the parasite may use the same steps despite having different cell tropism and engaging different receptor-ligand interactions.

### 4.1. Primary attachment

The invasion process may be initiated by the reversible attachment of *P. vivax* merozoites to reticulocytes. This binding may be mediated by *P. vivax* Merozoite Surface Proteins (*Pv*MSPs), which may form large complexes constituted of glycoposphatidylinositol anchored proteins and transmembrane proteins covering the surface of *P. vivax* merozoites. Based on the study of homologous *Pf*MSPs in *P. falciparum*, it has been hypothesized that *Pv*MSP1 may recognize a cogent receptor on the surface of reticulocytes. The C-terminal sub-unit (MSP-1<sub>42</sub>) could be cleaved and most of the complex may be shed, leaving only a small C-terminal sub-unit (MSP-1<sub>19</sub>) on the surface. Similarly, its paralog *Pv*MSP1P may play an important role in the adhesion of *P. vivax* merozoites to reticulocytes through interaction with its C-terminal region [43]. Furthermore, it has been hypothesized that *Pv*MSP7 may be a specific ligand for the receptor P-selectin which acts as a cell adhesion molecule [48] and that *Pv*MSP1 and *Pv*MSP7 could bind together to form a multi-protein complex that enhances invasion efficiency [47].

Other ligands may be involved in this step, but their ability to trigger attachment or abrogate recognition by the host immune system are unknown. For instance, the *Pv*TRAg56.2 protein seems to co-localize with *Pv*MSP1 on the merozoite surface and interact with *Pv*MSP7 to play a stabilizing role [52]. In the same vein, the micronemal *Pv*GAMA protein may bind to specific receptors on the surface of reticulocytes and thus play a role in the adhesion of *P. vivax* merozoites to their target host cells [65]. Indeed, the proteomic analysis of ankyrin 1 (ANK1) and Band 3 by various biochemical approaches, including liquid chromatography-mass spectrometry, showed that the fragment 2 of the membrane binding domain of ANK1 and the extracellular loop 5 of Band 3 bind to *Pf*GAMA and *Pv*GAMA. In addition, anti-Band 3-P5 antibodies block the binding of *Pf*GAMA to erythrocytes [50]. Furthermore, field and laboratory studies showed that *P. vivax* exposure induce robust IgG responses to *Pv*GAMA in natural exposure [84, 85] and that anti *Pv*GAMA antibodies inhibit *in vitro* *P. knowlesi* invasion and growth [86], although knockout of the *pkgama* gene had a minimal effect on *P. knowlesi* growth. Thus, the primary attachment of *P. vivax* merozoites to reticulocytes or erythrocytes involves specific and reversible interactions to guarantee an efficient encounter.

#### 4.2. Apical reorientation

Following primary attachment, *P. vivax* may undergo apical reorientation which triggers various ligand-receptor interactions. As *P. vivax* merozoites have a strong tropism for reticulocytes (0.2–2% of the total erythrocyte population), the chances to encounter a cell permissive to invasion are low. Thus, it was hypothesized that a host cell selection step occurs during apical reorientation to prevent the merozoites from invading non-target cells [87]. Based on the study of homologous proteins in other *Plasmodium* species, the *Pv*RBP protein family is believed to mediate *P. vivax* tropism for reticulocytes. Previous works showed that native *Pv*RBP1 and *Pv*RBP2 may function as an adhesive protein complex [69] and *Pv*RBP2a and *Pv*RBP2b can bind reticulocytes independently of their Duffy phenotype [60]. In 2015, an *ex vivo* study confirmed that *P. vivax* merozoites preferentially target immature

reticulocytes expressing the marker CD71 [61]. In 2018, another study showed that CD71 was the co-gent receptor for the ligand *Pv*RBP2b [88]. Analyses by cryo-electron microscopy, immunoprecipitation and fluorescence resonance energy transfer confirmed that the binding of *Pv*RBP2b to CD71 is specific and directly proportional to the level of CD71 expression [89]. Finally, functional studies identified the marker CD98, expressed on the surface of immature reticulocytes, as the cogent receptor of *Pv*RBP2a [62]. Both interactions *Pv*RBP2b—CD71 and *Pv*RBP2a—CD98 seem to drive the strict tropism of *P. vivax* for reticulocytes. Their action may be independent or combined, suggesting the potential existence of alternative invasion pathways. Apart from the *Pv*RBP proteins, the *P. vivax* reticulocyte binding surface antigenic adhesin (*Pv*RBSA) may also play a role in the recognition of reticulocytes. A recent study showed that the recombinant *Pv*RBSA (r*Pv*RBSA) binds specifically to Duffy-positive reticulocytes. But its cogent receptor is still unknown [63]. In addition to their adhesive function, *Pv*MSP proteins may also help in the recognition of reticulocytes. Indeed, recent investigations showed that peptides from *Pv*MSP1 have higher binding activity to reticulocytes than erythrocytes [45]. Although the mechanisms remain unclear, the recognition of immature reticulocytes by *P. vivax* merozoites seems to be governed by *Pv*RBP2a and/or *Pv*RBP2b, potentially in conjunction with *Pv*RBSA and *Pv*MSPs. The *Pv*RBP proteins may also trigger subsequent steps of invasion such as the modulation of erythrocyte cytoskeleton, assembly of the tight junction or signalling for the secretion of rhoptry proteins.

##### 4.2.1. Invasion

The apical reorientation is followed by the formation of a tight and irreversible junction between *P. vivax* merozoites and reticulocytes. Within Duffy-positive individuals, in absence of evidence, we do not know whether the *P. vivax* Duffy Binding Protein (*Pv*DBP) localizes to the tight junction between merozoites surface and the receptor Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC). Indeed, for *P. falciparum*, *Pf*EBA175 (a *P. falciparum* erythrocyte-binding ligand) binds Glycophorin A to trigger release of *Pf*RH5 and other rhoptry proteins, but *Pf*EBA175 itself does not participate in junction

formation. The *PvDBP* binding site is monomeric in the absence of DARC but dimerizes upon receptor engagement and forms a homodimer with the N-terminal extracellular domain of DARC [60]. The formation of the tight junction may also be facilitated by the secretion of the ligand *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1 (*PvAMA1*) to the merozoite surface, the injection of *P. vivax* rhoptry neck protein (*PvRON*) complexes to the reticulocyte surface and their binding. Notably, it has been shown that *PvRON5* has a marked binding preference for reticulocytes and is thus suspected to be involved in the invasion process [66]. Finally, the expression of various members of the *P. vivax* 6-cysteine protein (*PvP*) family on the merozoite surface is also thought to play a role in this step [64].

Within Duffy-negative individuals, the mechanisms and factors involved in the formation of the tight junction are unknown, but several hypotheses are currently discussed (Figure 3). In Madagascar, the evidence of *vivax* infections in Duffy-negative patients correlated with the existence of a common *pvdhp* gene duplication. This supported the hypothesis that the *pvdhp* gene amplification may enhance the binding of the *PvDBP* protein to another receptor with lower affinity. However, such an alternative receptor has not been identified yet. Further *P. vivax* strains presenting multiple *pvdhp* copies are frequently found in endemic zones where Duffy-negativity is rare [53]. A second hypothesis is that the *PvEBP* ligand may work as an alternate ligand for the invasion of Duffy-negative reticulocytes. Indeed, *PvEBP* appears to share structural similarities with *PvDBP* such as a Duffy binding site and a C-terminal domain with conserved cysteine positions, and likely similar functions [55]. Based on these structural similarities, a recombinant receptor binding site for *PvEBP* (*rPvEBP*) was produced. Results of binding assays showed that *PvEBP* binds preferentially immature Duffy-positive reticulocytes, but a minimal binding was observed in immature Duffy-negative reticulocytes. In contrast, no binding was observed for mature erythrocytes [57, 58]. Recently, a functional study performed on *P. vivax* isolates from Ethiopia confirmed that *PvEBP* can bind both Duffy-positive and Duffy-negative reticulocytes though at a lower frequency than *PvDBP*. This finding indicates that *PvEBP* may not have the same binding capacities

as *PvDBP* despite their structural similarities [51]. As the cognate receptor of *PvEBP* is still unknown, it is unclear whether this potential alternate ligand plays a role in the invasion of Duffy-negative reticulocytes. Finally, it was recently alleged that Duffy-negative reticulocytes may express low and/or transient levels of DARC on the surface of their reticulocytes. Preliminary data suggest that DARC may be expressed on the surface of erythroid precursor cells from Duffy-negative individuals but require to be confirmed [90].

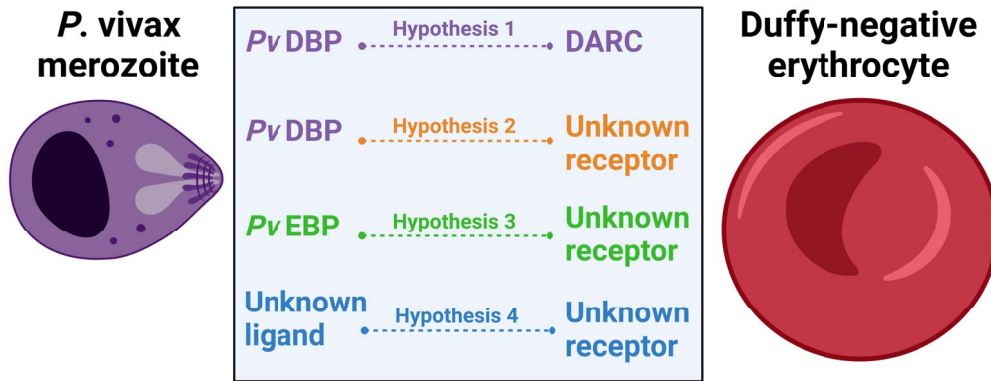
### 4.3. Invagination

Once *P. vivax* merozoites are irreversibly committed to invasion, they can penetrate the reticulocytes via glideosome activity and seal themselves within the parasitophorous vacuole. Although these mechanisms remain unclear, it seems that *PvTRAg36.6* and *P. vivax* early transcribed membrane protein (*PvETRAP*) colocalize in the apical region of the merozoites to form and/or maintain the parasitophorous vacuole membrane [52].

While proteomic technologies are not yet fully exploited, they seem essential to answer long-standing questions about *P. vivax* invasion mechanisms. The constant improvement of techniques (two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, yeast two-hybrids screens, etc.), high-throughput approach, computational prediction programs and data processing capabilities offers great promises to study the expression, interaction, and modification of *P. vivax* invasion-related ligands. However, proteomic data alone may be insufficient to establish a fine analysis of the invasion process and propose testable models. They require to be integrated into a more global and fundamental knowledge of *P. vivax* biology [91].

## 5. Conclusion

For a long time, *vivax* malaria has been considered a benign infection. Consequently, research on *P. vivax* received lower priority from researchers, policy makers and funding agencies. In addition, the limited access to biological material and lack of robust *in vitro* culture systems hampered the development of functional studies.



**Figure 3.** Hypothetical *P. vivax* invasion mechanisms within Duffy-negative reticulocytes. Hypothesis 1. *P. vivax* merozoites invade Duffy-negative reticulocytes through the interaction between the ligand PvDBP and the receptor DARC implying that Duffy-negative reticulocytes may express DARC at low and/or transient level. Hypothesis 2. *P. vivax* merozoites invade Duffy-negative reticulocytes through the interaction between the ligand PvDBP and an unknown receptor expressed on the surface of Duffy-negative reticulocytes. Hypothesis 3. *P. vivax* merozoites invade Duffy-negative reticulocytes through the interaction between the ligand PvEBP and an unknown receptor expressed on the surface of Duffy-negative reticulocytes. Hypothesis 4. *P. vivax* merozoites invade Duffy-negative reticulocytes through the interaction between an unknown ligand expressed on the surface of *P. vivax* merozoites and an unknown receptor expressed on the surface of Duffy-negative reticulocytes. Figure created with BioRender.com.

To address this issue, scientists have considered evidence from homologous protein families in other *Plasmodium* species and produced recombinant proteins to study *P. vivax* invasion-related ligands. But these methods have not fully provided comprehensive information on the actual functions of native ligands. In fact, the critical question for *vivax* malaria research cut across several disciplines. Indeed, genomics technologies shed some light on *P. vivax* genetic diversity. But they may not be sufficient to understand the functional consequences of these variations. While transcriptomic technologies are powerful tools to characterize *P. vivax* stage-specific and highly regulated transcripts, data analysis is limited by the small sample sizes and paucity in constantly expressed genes. However, recent applications of single-cell technologies have enabled to profile both liver-stage parasites and host cells to explore host-parasite interactions [92] and this technology could be applied to study host factors in the reticulocyte invasion pathway. In addition to omics studies, various *in vivo* models have been utilized for studying *P. vivax* invasion pathways. Non-human primate models (NHP) have been widely used in the past, despite

their inherent limitations such as ethical concerns and the variations of host susceptibility to infection with *P. vivax* field isolates, necessitating adaption before replication, likely modifying the biological features of the adapted strains [55]. More recently, efforts have been made to develop humanized mouse systems as models to replicate *in vivo* *P. vivax* infections [93]. Although encouraging, this highly fragile and expensive system still remains in its infancy and needs further refinement to allow continuous maintenance of asexual blood stage infection and develop genetically modified *P. vivax* parasites [94].

In this context, proteomic technologies focus on deciphering the various interactions between *P. vivax* invasion-related ligands and cogent receptors. Nevertheless, they fail to provide a general picture of *P. vivax* invasion mechanisms, especially explaining how *P. vivax* is capable to invade Duffy-negative reticulocytes. Thus, the development of integrated and complementary multi-omics studies together with *in vitro* invasion studies should allow us to better understand the biology of this parasite and support the future implementation of prevention, control, and eradication strategies worldwide.

## Conflicts of interest

Authors have no conflict of interest to declare.

## Acknowledgements

This review was supported by a grant overseen by the French National Research Agency (VPeRs, ANR-18-

CE15-0026), by the Institut Pasteur, Paris, the Laboratoire d'Excellence (LabEx) "French Parasitology Alliance for Health Care" (ANR-11-15 LABX-0024-PARAFRAP) and the University of Strasbourg through the Programme IdEX 2022 (Attractivité — Dotation d'accueil des professeurs d'université recrutés en 2021).

## Version française

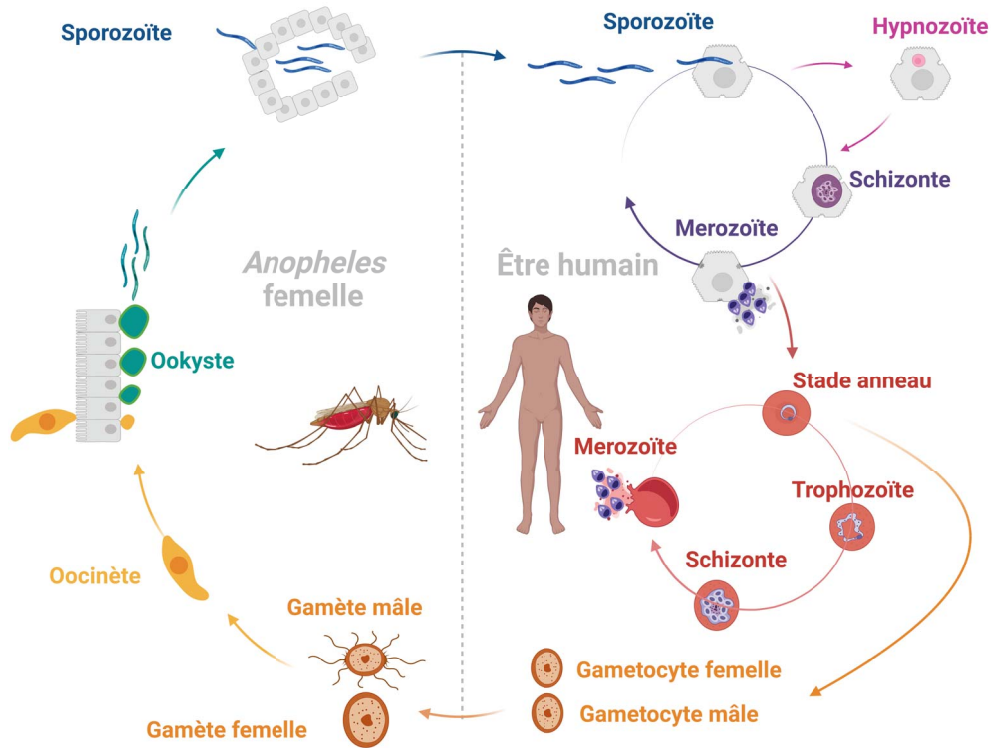
### 1. Introduction

Le paludisme est une maladie débilitante aiguë causée par des parasites protozoaires du genre *Plasmodium* qui sont transmis par des moustiques *Anopheles* femelles. Selon le dernier rapport de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), cette maladie a été responsable de 241 millions de cas et de 627,000 décès dans le monde en 2020. Le nombre estimé de décès dus au paludisme s'élevait à 627,000 en 2020 (soit une augmentation de 69,000 décès par rapport à l'année précédente). Les pays d'Afrique subsaharienne continuent de supporter une part disproportionnée de la charge mondiale du paludisme, avec 95% de tous les cas de paludisme et 96% des décès. Les enfants de moins de 5 ans représentent environ 80% de tous les décès dus au paludisme dans cette région [1].

Parmi les espèces responsables de l'infection humaine, *Plasmodium vivax* est la plus répandue géographiquement et la principale cause de maladie en dehors de l'Afrique subsaharienne, en Asie du Sud-Est, en Amérique du Sud et en Afrique du Nord-Est [2]. *P. vivax* présente un cycle de vie complexe consistant en l'infection cyclique d'un hôte humain et d'un moustique vecteur anophèle femelle. Après la piqûre d'un moustique infecté, les sporozoïtes migrent à travers le derme dans les capillaires, atteignent le foie et envahissent les hépatocytes [3]. Alors que la plupart des sporozoïtes entreprennent une maturation asexuée en schizontes, certains d'entre eux divergent pour former des formes quiescentes, les hypnozoïtes. Ces hypnozoïtes sont capables d'émerger des semaines voire des mois après la primo-infection pour donner lieu à des épisodes récurrents de paludisme [4]. Lorsque les schizontes finissent par se rompre, ils

libèrent des mérozoïtes qui migrent dans la circulation sanguine et envahissent les réticulocytes. Ils se transforment en anneaux, en trophozoïtes, puis en schizontes [2]. Les schizontes se rompent et libèrent de nouveaux mérozoïtes qui vont envahir les réticulocytes sains. Il en résulte un cycle continu de multiplications asexuées, ce qui augmente progressivement le nombre de parasites dans la circulation sanguine [5]. Par ailleurs, certains parasites se différencient en gamétocytes mâles ou femelles. Lorsqu'un moustique prélève son repas sanguin chez un hôte infecté, les gamétocytes entreprennent une fécondation à l'intérieur de l'intestin moyen du moustique et produisent des ookinètes qui se transforment en oocystes. Ces oocystes libèrent ensuite des sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires pour être inoculés chez de nouveaux hôtes par les moustiques femelles lors d'un repas sanguin. Ainsi, le cycle de vie de *P. vivax* se perpétue (Figure 1) [6].

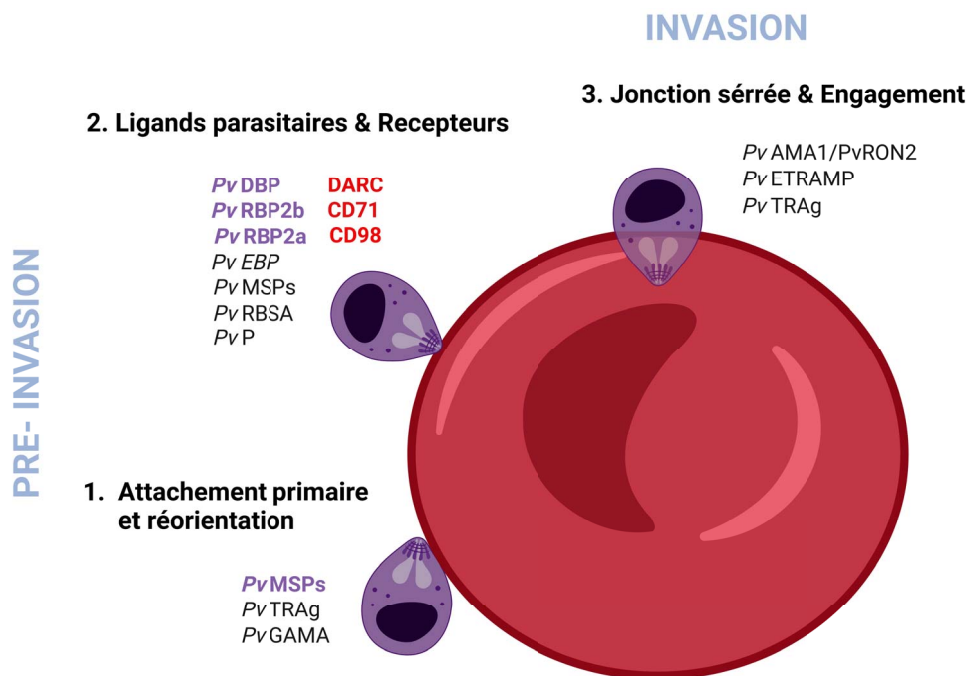
Bien que cryptique, *P. vivax* est la cause de paludisme la plus répandue dans le monde [7]. En effet, sa capacité à se développer à basse température (18–25 °C) lui confère un potentiel d'infectivité et de transmission dans les zones tropicales et tempérées [8]. Par ailleurs, son cycle intra-érythrocytaire est caractérisé par une faible parasitémie et une asynchronie, ce qui contribue probablement à des erreurs de diagnostic (faux négatifs) [9]. En effet, la faible parasitémie, couramment observée dans les infections à *P. vivax*, est probablement due au fort tropisme des mérozoïtes de *P. vivax* pour les réticulocytes et aux besoins physiologiques et/ou métaboliques spécifiques des stades sanguins du parasite pour sa croissance et sa survie [2]. En l'absence de solides preuves biologiques, un modèle d'invasion par *P. vivax* a été proposé, sur la base des observations



**FIGURE 1.** Cycle de vie de *P. vivax*. Le cycle de vie de *P. vivax* implique l'infection cyclique d'un moustique vecteur Anophèle et d'un hôte humain. Lorsqu'un moustique infecté par *P. vivax* prend un repas sanguin, il injecte des sporozoïtes dans l'hôte humain. Ces sporozoïtes migrent à travers le derme jusqu'au foie et envahissent les hépatocytes. Ils mûrissent en schizontes tissulaires et établissent un stock d'hypnozoïtes latents. Lorsque les schizontes se rompent, ils libèrent des mérozoïtes qui migrent vers la circulation sanguine et envahissent les réticulocytes. Ils se développent en anneaux, en trophozoïtes et en schizontes intra-érythrocytaires. Lorsque les schizontes se rompent, ils lysent les réticulocytes infectés et libèrent de nouveaux mérozoïtes. Une petite proportion de la population parasitaire se différencie en gamétocytes mâles et femelles. Lorsqu'un moustique prend un nouveau repas sanguin, il ingère des gamétocytes. Dans l'intestin moyen, les microgamétocytes et les macrogamétocytes se fécondent, entreprennent une division sexuelle et se transforment en ookinètes qui mûrissent en oocystes. Lorsque les oocystes se rompent, ils libèrent des sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires pour perpétuer le cycle de vie. Figure créée avec BioRender.com.

faites lors de l'invasion d'érythrocytes humains par les mérozoïtes de *P. falciparum* ou *P. knowlesi*. Ce modèle suggère qu'au cours du processus d'invasion, *P. vivax* exprime des adhésines qui se lieraient à des récepteurs présents à la surface des réticulocytes et établiraient une fixation initiale et réversible. Cela entraînerait la déformation de la membrane des réticulocytes et la réorientation apicale des mérozoïtes. Ensuite, ils activeraient des organelles et li-

béreraient des protéines pour former une jonction serrée et irréversible [10]. Les mérozoïtes seraient propulsés par un moteur actine-myosine et la jonction se déplacerait du pôle apical au pôle postérieur. Cela formerait la vacuole parasitophore dans laquelle les parasites se développeraient après la fermeture du pore d'invasion et de la membrane réticulocytaire [11, 12] (Figure 2 et Tableau 1 pour les détails).



**FIGURE 2.** Mécanismes d'invasion de *P. vivax* dans les réticulocytes Duffy-positifs. (1) Attachement primaire et réorientation — Lorsque les mérozoïtes de *P. vivax* sont libérés dans la circulation sanguine, la fixation primaire implique les protéines *PvMSPs*. D'autres protéines telles que *PvTRAg*56.2 et *PvGAMA* pourraient jouer un rôle dans l'adhésion et la stabilisation du parasite. (2) Liaison au ligand et récepteurs — Le ligand *PvDBP* est progressivement couplé au récepteur DARC (région II) pour créer un hétérotétramère stable constitué de deux molécules de *PvDBP* et de deux molécules de DARC. La reconnaissance et la sélection des réticulocytes pour l'invasion sont médiées par les protéines *PvRBPs*, notamment par les interactions *PvRBP2b*-CD71 et *PvRBP2a*-CD98. En l'absence de preuves biologiques et sur la base des observations faites pendant l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *P. falciparum* ou de *P. knowlesi*, nous supposons que de nombreuses protéines de *P. vivax*, y compris les *PvMSPs*, les *PvRBSAs* et autres, pourraient jouer un rôle dans la réorientation apicale de *P. vivax*. (3) Jonction serrée et engagement — Les mérozoïtes de *P. vivax* pénètrent dans les réticulocytes via l'activité du glidésome. Des protéines telles que *PvAMA1* et *PvRON* pourraient conduire directement ou indirectement à la formation d'une jonction serrée et irréversible et servir de médiateurs à l'invasion. Plusieurs protéines de surface de *P. vivax* pourraient être rapidement dégradées alors que d'autres, comme *PvTRAg*36.6 et *PvETRAMP*, pourraient être exprimées pour former une vacuole parasitophore et favoriser le développement du parasite. Il est important de noter que les mécanismes d'invasion des mérozoïtes de *P. vivax* décrits ici sont jusqu'à présent largement limités à une comparaison avec les homologues d'invasion de *P. falciparum* et *P. knowlesi* et une poignée de familles de gènes d'invasion de *P. vivax* connues. Le rôle des ligands de *P. vivax* présents en caractères gras violets a été confirmé, tandis que les autres présents en caractères noirs sont seulement suspectés. Figure créée avec BioRender.com.

TABLEAU 1. Liste des ligands liés à l'invasion de *P. vivax* caractérisés par les technologies omiques

Etape	Ligands parasitaires	Numéro d'accension	Rôle (confirmer/ potentiel)	Recepteur érythrocytaire vaccins (stade sanguin)	Candidats	Preuves biologiques obtenues par des études		
						Genomiques	Transcriptomiques	Proteomiques
Primary attachment & reorientation	<i>MSP1</i>	PVP01_0728900	Confirmer	Oui		<i>pumsp1</i> est fortement polymorphe (mutations) [43]	Parmi tous les gènes, <i>pumsp1</i> est un des plus exprimé au stade schizonte [44]	Par homologie avec les protéines PfMSPs chez <i>P. falciparum</i> , il a été émis comme hypothèse que <i>PfMSP1</i> pourrait reconnaître un recepteur situé à la surface des réticulocytes [45]
						<i>pumsp7</i> est fortement polymorphe (mutations) [46]. <i>pumsp3</i> présente un nombre de copie amplifiée allant de 1 à 4 copies	Les ARN messagers de <i>pumsp7</i> transcript sont les plus élevés au stade trophozoïte âgé-schizonte [47]. Les ARN messagers de <i>pumsp3</i> sont détectés au stade schizonte âgé [5]. Parmi tous les gènes, <i>pumsp9</i> est un des plus exprimé au stade schizonte [44]	Par homologie avec les protéines PfMSP7 chez <i>P. falciparum</i> , <i>PfMSP7</i> serait un ligand spécifique des récepteurs P-selectin [48]
						<i>pugama</i> présente un polyphisme de taille [49]		
	<i>GAMA</i>	PVP01_0505600	Potentiel					Etudes fonctionnelles: , <i>PfGAMA</i> pourrait jouer un rôle dans l'adhésion des mérozoïtes de <i>P. vivax</i> aux réticulocytes [49] et se lier aux protéines Band3 et ANK1 [50]

(suite à la page suivante)



TABLEAU 1. (Suite)

Etape	Ligands parasitaires	Numéro d'accension	Rôle (confirmer/ potentiel)	Recepteur érythrocytaire vaccins (stade sanguin)	Candidats	Preuves biologiques obtenues par des études		
						Genomiques	Transcriptomiques	Proteomiques
	<i>MSP1P</i>	PVP01_0728800	Potentiel					<i>Pv</i> MSP1P pourrait jouer un rôle dans l'adhésion des mérozoïtes de <i>P. vivax</i> aux réticulocytes grâce à une interaction avec sa région C terminale [43]
	<i>TRAg56.2</i>	PVX_088850	Potentiel			la famille des gènes <i>pvrtrag</i> est peu polymorphe [51]	Séquencage à l'échelle cellulaire: des niveaux d'expression des ARN messagers différents ont été observés entre les membres des gènes de la famille <i>pvrtrag</i> [5]	Immunoprecipitation et spectrométrie de masse: <i>Pv</i> TRAg56.2 semble se co-localiser avec <i>Pv</i> MSP1 et interagir avec <i>Pv</i> MSP7 et jouer un rôle stabilisateur [52]
Ligand bindings	<i>DBP</i>	PVP01_0623800	Confirmer	DARC	Oui	<i>pvdbp</i> est fortement polymorphe (mutations et variation du nombre de copie de gène) [53]	L'amplification du gène <i>pvdbp</i> serait associée à une augmentation de l'expression des ARN messagers, suggérant une augmentation de l'expression de la protéine <i>Pv</i> DBP [54]	Etudes de liaison et études fonctionnelles
	<i>EBP</i>	PVP01_0102300	Potentiel			<i>pueb</i> est fortement polymorphe mais moins que <i>pvdbp</i> (mutations et variation du nombre de copie de gène) [55]	Les ARN messagers de <i>pueb</i> sont fortement exprimés au stade schizonte [55, 56]	<i>Pv</i> EBP se lie préférentiellement aux réticulocytes Duffy-positifs immatures. La liaison avec les réticulocytes Duffy-négatifs immatures est minime [57, 58].

(suite à la page suivante)

TABLEAU 1. (Suite)

TABLEAU 1. (Suite)

Etape	Ligands parasitaires	Numéro d'accession	Rôle (confirmer/ potentiel)	Recepteur érythrocytaire	Candidats vaccins (stade sanguin)	Preuves biologiques obtenues par des études		
						Genomiques	Transcriptomiques	Proteomiques
Tight junction formation	AMAI	PVP01_0934200	Potentiel		Oui			Etudes fonctionnelles: La fonction de <i>PvAMAI</i> semble similaire à celle de <i>PfAMAI</i> [65] et <i>PvAMAI</i> pourrait être impliquée avec RON2 dans la formation de la jonction serrée [66]
	RON	PVP01_0916600	Potentiel			<i>pvrn4</i> a été identifié par homologie avec <i>pfrn4</i> et <i>pkrn4</i> dans la souche VCG-1 de <i>P.</i> <i>vivax</i> [67]	<i>pvrn4</i> présente un profil de transcription similaire à celui de <i>pfrn4</i> [67]. <i>pvrn5</i> est exprimé au stade schizonte [66]	Immunofluorescence indirecte et immunoassays: <i>PvRON4</i> serait exprimée au niveau du pôle apical de <i>P. vivax</i> (souche VCG-1) et pourrait participer à la formation de la jonction serrée [67]. <i>PvRON5</i> présente une préférence de liaison avec les réticulocytes et est donc fortement suspecté d'être impliqué dans le processus d'invasion des réticulocytes [66].
	ETRAPM	PVP01_0532300	Potentiel					ETRAPM serait impliqué dans la formation de la vacuole parasitophore,

(suite à la page suivante)

TABLEAU 1. (Suite)

Etape	Ligands parasitaires	Numéro d'accension	Rôle (confirmer/ potentiel)	Recepteur érythrocytaire	Candidats vaccins (stade sanguin)	Preuves biologiques obtenues par des études		
						Genomiques	Transcriptomiques	Proteomiques
Unknown function	<i>TRAg36.6</i>	PVX_112690	Potentiel			Séquencage de l'ADN: la famille de gène <i>pvrtrag</i> est rarement polymorphe [51]	Séquencage à l'échelle cellulaire: des niveaux d'expression des ARN messagers différents ont été observés entre les membres des gènes de la famille <i>pvrtrag</i> [5]	Immunoprecipitation et spectrométrie de masse: <i>PvTRAg36.6</i> semble se co localiser avec <i>PvETRAMP</i> pour former et/ou maintenir l'intégrité de la membrane de la vacuole parasitophore [52]
	<i>MSA180</i>	PVP01_0814200	Potentiel				Parmi tous les gènes, <i>pvmisa180</i> est un des plus exprimé au stade schizonte [44]	
	<i>P92</i>	PVP01_1107900	Potentiel					
	<i>RAMA</i>	PVP01_0107500	Potentiel				Parmi tous les gènes, <i>pvrrama</i> est un des plus exprimé au stade schizonte [44]	
	<i>RBP1a</i>	PVP01_0701200	Potentiel			Séquencage de l'ADN: la diversité génétique de <i>pvrbbp1a</i> semble réduite [68]	Les ARN messagers de <i>pvrbbp1</i> sont fortement exprimés au stade schizonte [55, 56].	Les protéines <i>PvRBP1</i> et <i>PvRBP2</i> natives pourraient être impliquées dans un complexe protéique d'adhésion [69]
	<i>RBP1b</i>	PVP01_0701100	Potentiel			Séquencage de l'ADN: la diversité génétique de <i>pvrbbp1b</i> semble réduite [68]	Les ARN messagers de <i>pvrbbp1</i> sont fortement exprimés au stade schizonte [55, 56].	Les protéines <i>PvRBP1</i> et <i>PvRBP2</i> natives pourraient être impliquées dans un complexe protéique d'adhésion [69]

(suite à la page suivante)

TABLEAU 1. (Suite)

Etape	Ligands parasitaires	Numéro d'accession	Rôle (confirmer/ potentiel)	Recepteur érythrocytaire	Candidats vaccins (stade sanguin)	Preuves biologiques obtenues par des études	
						Genomiques	Transcriptomiques Proteomiques
	<i>RBP2c</i>	PVP01_0534300	Potentiel			Séquencage de l'ADN: <i>pvrhp2c</i> est fortement polymorphe [51, 59, 70]	
	<i>RBP1p1 (partial)</i>	-	Potentiel			Séquencage de l'ADN: identification partielle du gène <i>pvrhp1p1</i>	
	<i>RBP2p1 (partial)</i>	PVP01_0534400	Potentiel			Séquencage de l'ADN: identification partielle du gène <i>pvrhp2p1</i>	
	<i>RBP2p2 (partial)</i>	PVX_101590	Potentiel			Séquencage de l'ADN: identification partielle du gène <i>pvrhp2p2</i> .	
	<i>RBP2d (pseudo)</i>	PVP01_1471400	Potentiel			Séquencage de l'ADN: identification du pseudogène <i>pvrhp2d</i> .	
	<i>RBP2e (pseudo)</i>	PVP01_0700500	Potentiel			Séquencage de l'ADN: identification du pseudogène <i>pvrhp2e</i> .	

(suite à la page suivante)

TABLEAU 1. (Suite)

Etape	Ligands parasitaires	Numéro d'accension	Rôle (confirmer/potentiel)	Recepteur érythrocytaire	Candidats vaccins (stage sanguin)	Preuves biologiques obtenues par des études		
						Genomiques	Transcriptomiques	Proteomiques
	<i>RBP3 (pseudo)</i>	PVP01_1469400	Potentiel			Séquencage de l'ADN: identification du pseudogène <i>pvrtp3</i> .		
	<i>RhopH3</i>	PVP01_0703800	Potentiel			Parmi tous les gènes, <i>pvrhop3</i> est un des plus exprimé au stade schizonte [44]		
	<i>RON5</i>		Potentiel			Les ARN messagers de <i>pvrton5</i> sont fortement exprimés au stade schizonte dans la souche VCG-1 [66]	Etudes de liaison, Western blot et tests d'immunofluorescence: <i>PvRON5</i> serait exprimée au niveau du pôle apical de <i>P. vivax</i> (souche VCG-1) and présente une préférence de liaison avec les réticulocytes [66]	

Les numéros d'accension commençant par PVP01 proviennent de la souche de référence *PvP01*, tandis que les numéros d'accension commençant par PVX proviennent de la souche de référence Sal-I (<https://plasmodb.org/plasmo/app>). Les numéros d'accension commençant par KP proviennent de la souche de référence VCG-1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pendant longtemps, les scientifiques ont cherché à identifier les principales interactions hôte-parasite conduisant à l'invasion des réticulocytes humains par *P. vivax*. Entre 1920 et 1960, des essais cliniques et de terrain ont été menés sur des individus d'origine africaine ou afro-américaine. Ces essais ont démontré que ces individus étaient hautement résistants au paludisme à *P. vivax* lorsqu'ils étaient exposés à du sang humain ou à des moustiques infectés par un nombre limité de souches de *P. vivax* [13–16]. Après l'identification des groupes sanguins Duffy [17, 18], il a été établi que la résistance naturelle à l'infection à *P. vivax* était liée à l'absence de la protéine Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC) à la surface des érythrocytes humains [19]. La base moléculaire de l'absence d'expression de l'antigène Duffy à la surface des globules rouges a ensuite été démontrée comme étant due à une mutation ponctuelle unique dans la séquence *GATA1* (tct>cct) située dans la région promotrice 5' du gène *ackr1* [20, 21]. Des travaux novateurs portant sur des infections expérimentales contrôlées de volontaires à l'aide de sporozoïtes de *P. vivax* [19] et des études *in vitro* utilisant *P. knowlesi* (un parasite responsable du paludisme zoonotique étroitement apparenté à *P. vivax*) comme modèle [22] ont ensuite confirmé que l'interaction entre DARC et les mérozoïtes de *P. vivax* était cruciale pour permettre l'invasion des réticulocytes. Parallèlement, le ligand du parasite qui se lie spécifiquement à DARC a été identifié comme étant la protéine *P. vivax* Duffy Binding Protein (*PvDBP*) [23]. Ainsi, le paradigme scientifique selon lequel *P. vivax* envahit exclusivement les érythrocytes Duffy-positifs par le biais de l'interaction entre *PvDBP* et DARC était établi. Il a également été supposé que le paludisme à *P. vivax* était rarement transmis ou même absent dans les régions où la proportion d'individus Duffy-négatifs est prédominante comme en Afrique subsaharienne [19]. Cependant, au cours des deux dernières décennies, de nombreuses études ont rapporté des cas d'infection à *P. vivax* chez des individus Duffy-négatifs dans des pays subsahariens comme l'Angola [24], le Bénin [25], le Cameroun [26, 27], la Guinée équatoriale [24, 28], l'Éthiopie [29], le Kenya [30], Madagascar [31], le Mali [32], la Mauritanie [33] et le Soudan [34]. Bien que ces observations soient encore parcellaires, elles soulèvent des interrogations quant aux mécanismes d'invasion utilisés par *P. vivax* pour infecter les individus

Duffy-négatifs. Elles remettent également en question certaines hypothèses telles que le rôle central et unique joué par l'interaction *PvDBP*-DARC dans l'invasion des réticulocytes, la limite de détection des outils de diagnostic actuels et l'évolution des interactions hôte-pathogène [35]. À l'heure actuelle, nous ne savons toujours pas si ces cas représentent un phénomène préexistant qui a été négligé dans le passé ou une nouvelle voie d'invasion indépendante de DARC, qui pourrait potentiellement conduire à une expansion du paludisme à *P. vivax* au sein des populations Duffy-négatives [36].

La collecte d'échantillons de terrain dans des zones endémiques éloignées étant difficile, longue et coûteuse, la recherche s'est longtemps limitée à l'échantillonnage direct de patients donneurs ou à l'étude d'espèces de *Plasmodium* étroitement apparentées telles que *P. knowlesi* [37, 38] ou *P. cynomolgi* [39]. En outre, le développement de méthodes de culture *in vitro* reproductibles est encore entravé par la faible parasitémie de *P. vivax* et son fort tropisme pour les réticulocytes humains [40].

Néanmoins, les récentes technologies dites « omiques » ont révolutionné la recherche sur le paludisme à *P. vivax* avec le développement de techniques innovantes et abordables permettant une caractérisation plus complète des gènes, des transcrits et des protéines de *P. vivax*. Cette revue a non seulement pour but de fournir un aperçu général des mécanismes d'invasion de *P. vivax* grâce aux techniques génomiques, transcriptomiques et protéomiques mais également d'illustrer l'importance de la complémentarité de ces approches.

## 2. Mécanismes moléculaires d'invasion de *P. vivax*

En 2004, le projet de séquençage du génome de *P. vivax* a fourni la première séquence de référence *P. vivax* Salvador-1 (Sal-1) en utilisant une stratégie de séquençage du génome entier [41, 42]. Au cours des vingt dernières années, plusieurs autres isolats de terrain et cliniques de *P. vivax* ont été séquençés par microarray, séquençage profond ou séquençage du génome entier. Toutes ces séquences sont disponibles publiquement sur des bases de données en ligne telles que PlasmoDB (<https://plasmodb.org/plasmo/app>) et sont régulièrement annotées. Globalement, l'analyse de ces séquences de *P. vivax* a

contribué à l'identification de gènes potentiellement liés à l'invasion.

### 2.1. Le rôle crucial du gène *pvd*bp dans l'invasion des réticulocytes Duffy-positifs

Le gène *P. vivax* Duffy binding protein (*pvd*bp) code pour le ligand *PvDBP* [71]. Il présente des séquences de codage pour un domaine peptidique N-terminal, un domaine d'attachement Duffy riche en cystéines (*PvDBPII*), un autre domaine riche en cystéines (*PvDBPVI*), un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique C-terminale [72]. Sur la base des données actuelles de séquençage à haut débit, notre appréciation de la diversité génétique est de moins en moins limitée par la nature et/ou la densité des marqueurs génomiques étudiés. Notamment, la publication récente de plus de deux cents génomes de *P. vivax* a montré que les séquences du gène *pvd*bp étaient hautement polymorphes, quelle que soit leur origine géographique. Il est intéressant de noter que de nombreux polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) non synonymes ont été trouvés dans le domaine *PvDBPII* [53]. La diversité et la localisation de ces SNPs suggèrent que le gène *pvd*bp pourrait subir une pression sélective différentielle en raison des réponses des anticorps et de sa fonction dans la liaison aux récepteurs et l'invasion [51].

En outre, les variations du nombre de copies (CNV) au niveau du locus *pvd*bp se sont révélées être l'une des expansions génétiques les plus courantes, avec des allèles multiples [73]. Alors que la détection des CNVs reposait dans le passé, sur des techniques coûteuses et nécessitant une main-d'œuvre importante comme l'hybridation *in situ*, les progrès récents du séquençage à haut débit ont permis leur détection directe à partir des données de séquençage. Notamment, les approches de séquençage du génome entier ont révélé deux duplications distinctes chez les souches *P. vivax* circulant à Madagascar et au Cambodge. À Madagascar, les isolats de *P. vivax* provenant de patients Duffy-positifs et Duffy-négatifs présentaient une duplication commune avec deux copies de *pvd*bp l'une à côté de l'autre [74]. Au Cambodge, une duplication différente du gène *pvd*bp a été couramment détectée dans les isolats de *P. vivax* provenant de patients Duffy-positifs. De plus, la proportion d'isolats de *P. vivax* portant la duplication s'est avérée être significativement plus élevée chez

les patients homozygotes Duffy-positifs que chez les patients hétérozygotes Duffy-positifs qui devraient présenter une plus faible expression de DARC à la surface de leurs réticulocytes. Cependant, cette dernière analyse n'a pas permis d'exclure complètement que les patients puissent être porteurs de plusieurs clones de *P. vivax*, alors que l'estimation des CNVs par PCR quantitative ne reflète que le clone principal [53]. Récemment, une étude géographique a démontré que les deux duplications distinctes du gène *pvd*bp circulaient en Asie, en Amérique du Sud et en Afrique de l'Est. Alors que la Duffy-négativité est prévalente dans certaines régions, les duplications du gène *pvd*bp ont également été largement trouvées dans des régions où la Duffy-négativité était presque absente [51]. En revanche, une analyse génomique simultanée a montré qu'aucune duplication de *pvd*bp n'a été trouvée dans cent quatre-vingt-deux isolats de *P. vivax* provenant de onze pays endémiques. Cependant, il a été remarqué que cette divergence était probablement due aux amorces utilisées pour la validation des CNVs par PCR [75].

Malgré la spécificité et la distribution des duplications du gène *pvd*bp, rien n'indique que les génomes de *P. vivax* aient contourné la barrière de la Duffy-négativité grâce à cette variation génétique. Des expansions plus importantes de *pvd*bp ont également été détectées dans le monde entier. Elles se regroupent séparément mais présentent des schémas similaires. Une grande diversité d'haplotypes a également été observée entre les copies, tandis que les séquences flanquantes 5' et 3' présentaient une diversité modérée [76]. Dans la région Asie-Pacifique, le séquençage de plus de deux cents isolats de *P. vivax* provenant de patients Duffy-positifs a révélé la présence commune de deux à trois copies du gène *pvd*bp [73]. En Ethiopie, les séquences de deux isolats de *P. vivax* provenant de patients Duffy-négatifs ont montré la présence de trois et huit copies du gène *pvd*bp [57]. Par la suite, une autre expansion commune du gène *pvd*bp, assez similaire à celles précédemment décrites à Madagascar et au Cambodge mais allant de trois à cinq copies, a également été détectée [51]. Ces résultats suggèrent que l'expansion du gène *pvd*bp pourrait permettre la survenue de mutations dans la deuxième copie du gène. De telles expansions pourraient faciliter la liaison à un autre récepteur érythrocytaire ayant une affinité plus faible pour le ligand *PvDBP* [57]. Cependant, il n'y a



aucune preuve de l'existence de CNVs localisés et sélectionnés qui amélioreraient l'efficacité de l'invasion et induiraient une pression sélective. Étant donné que l'invasion des érythrocytes Duffy-positifs dépend de l'interaction entre *PvDBP* et *DARC*, il est probable que les expansions du gène *pvdhp* soient dues à des variations génétiques de *DARC* ou à des réponses à des anticorps inhibant l'attachement au domaine *PvDBPII* [75]. Néanmoins, il ne semble pas que ces expansions donnent au parasite une capacité accrue pour envahir les érythrocytes Duffy-négatifs.

## 2.2. Le potentiel rôle du gène *pvebp* dans une voie d'invasion alternative

Le gène *P. vivax* erythrocyte binding protein (*pvebp*) a été découvert grâce à l'assemblage *de novo* d'un isolat de *P. vivax* du Cambodge. Il code pour un ligand putatif de la protéine *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein (*PvEBP*) et est présent dans la plupart des génomes de *P. vivax*. L'organisation du gène *pvebp* est similaire à celle du gène *pvdhp* avec un peptide signal N-terminal, un domaine d'attachement Duffy *PvEBPII* semblable au domaine *PvDBPII*, un autre domaine riche en cystéines *PvEBPVI*, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique C-terminale [55]. Malgré ces similitudes, le gène *pvebp* semble se regrouper séparément de tous les gènes possédant un domaine d'attachement Duffy-binding like. Le séquençage de l'ADN de dix génomes de *P. vivax* provenant d'Asie, du Pacifique Sud, d'Afrique, d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud a montré que le gène *pvebp* est polymorphe bien que moins divers que le gène *pvdhp*. En effet, le gène *pvebp* ne présente que 11 sites polymorphes sur 2412 positions alors que le gène *pvdhp* présente 32 sites polymorphes sur 3213 positions pour les mêmes échantillons. La plupart des SNPs détectés étaient non synonymes [55]. De plus, l'analyse génomique de deux cent dix-neuf isolats de *P. vivax* provenant de patients Duffy-positifs au Cambodge et à Madagascar a confirmé que le gène *pvebp* était moins diversifié que le gène *pvdhp* (12 vs. 33 allèles observés à partir des mêmes isolats) et ne présentait que des mutations non synonymes indiquant l'existence d'une forte pression sélective. En effet, onze mutations ponctuelles non synonymes ont été trouvées dans les séquences *pvebp* et ont conduit à douze allèles différents. Certains SNPs ont été observés dans

les deux pays alors que d'autres étaient spécifiques au Cambodge et à Madagascar. Ces SNPs étaient distribués dans le domaine d'attachement [53]. Tout comme pour le gène *pvdhp*, la diversité et la distribution des SNPs dans le gène *pvebp* reflètent l'existence probable d'une pression sélective, bien qu'elle semble opérer à un niveau plus faible [58].

L'analyse génomique des isolats de *P. vivax* du Cambodge, de Madagascar et d'Éthiopie a également révélé l'existence de variations du nombre de copies dans le gène *pvebp*. À Madagascar, des expansions du gène *pvebp* ont été observées, allant de deux à cinq copies. Une distribution bimodale des parasites avec une population spécifique présentant plus de trois copies a été trouvée. Cependant, aucune différence significative de susceptibilité à l'infection à *P. vivax* n'a été observée entre les individus homozygotes et hétérozygotes Duffy-positifs. Au Cambodge, les expansions de *pvebp* variaient d'une à deux copies. La proportion d'isolats de *P. vivax* présentant des copies multiples du gène était plus importante dans les zones de forte transmission [53]. Dans l'ensemble, une proportion élevée d'isolats de *P. vivax* avec des copies de gènes multiples a été trouvée à Madagascar où la Duffy-négativité et la Duffy-positivité coexistent par rapport au Cambodge où la Duffy-négativité est pratiquement absente. En revanche, aucune expansion de *pvebp* n'a été trouvée en Éthiopie où la Duffy-négativité est également fréquente [51]. Compte tenu des similitudes observées entre les gènes *pvdhp* et *pvebp*, le polymorphisme et l'expansion du gène *pvebp* pourraient être corrélés à l'expression d'un nouveau ligand interagissant avec des protéines membranaires érythrocytaires autres que *DARC* et contribuer ainsi à une voie d'invasion alternative [55]. Cependant, aucune preuve que ces variations confèrent des capacités à infecter des individus Duffy-négatifs n'a été fournie jusqu'à présent.

## 2.3. Le rôle des gènes *pvrhp* et *pvrbsa* dans la sélectivité des réticulocytes

La famille de gènes *P. vivax* reticulocyte binding protein (*pvrhp*) a été identifiée sur la base de l'annotation des ligands adhésifs du génome de *P. vivax* [69]. Le séquençage du génome de plusieurs isolats de *P. vivax* a identifié onze membres de la famille *pvrhp*, dont cinq gènes complets (*pvrhp1a*, *pvrhp1b*, *pvrhp2a*, *pvrhp2b* et *pvrhp2c*), trois gènes partiels

(*pvrpb1p1*, *pvrpb2p1* et *pvrpb2p2*) et trois pseudo-gènes (*pvrpb2d*, *pvrpb2e* et *pvrpb3*) [77]. Les gènes *pvrpb* sont constitués de deux exons, l'un codant pour un peptide signal dans la région N-terminale et l'autre pour un domaine transmembranaire dans la région C-terminale [56]. Des études récentes ont montré que leur diversité génétique semble être généralement faible, sauf pour les gènes *pvrpb2* [68]. L'analyse des isolats de *P. vivax* de Chine, de Thaïlande et d'Éthiopie a confirmé que le gène *pvrpb2c* était hautement polymorphe [51, 59, 70]. Bien que *pvrpb2a* et *pvrpb2b* présentent des régions hautement conservées, l'analyse génomique des isolats de *P. vivax* de Papouasie-Nouvelle-Guinée et de Thaïlande a montré qu'ils étaient également relativement polymorphes [59, 60]. Comme observé pour les gènes *pvdhp* et *pvehp*, les SNPs non synonymes se sont regroupés autour de trois sites principaux, dont le domaine de liaison aux réticulocytes. Cela peut refléter l'importance fonctionnelle de ce site de liaison et l'existence d'une pression sélective [60].

De plus, des CNVs affectant à la fois *pvrpb2a* et *pvrpb2b* ont été observés dans deux isolats de *P. vivax* de Thaïlande. Alors qu'une souche présentait une duplication des deux gènes (*pvrpb2a* et *pvrpb2b*), l'autre souche avait deux copies de *pvrpb2b* seulement [59]. Ces résultats suggèrent que les gènes *pvrpb* peuvent coder des ligands impliqués dans la reconnaissance de cellules cibles. Le gène *P. vivax* *reticulocyte binding surface antigen* (*pvrbsa*) a également été identifié comme un gène potentiellement impliqué dans la reconnaissance des réticulocytes, bien qu'il présente moins de diversité génétique que les autres gènes de surface des mérozoïtes de *P. vivax* [63].

#### 2.4. Le rôle potentiel des gènes *pvmisp* dans l'attachement primaire

La famille de gènes *P. vivax* *merozoite surface protein* (*pvmisp*) code pour de multiples déterminants antigéniques qui sont suspectés être les médiateurs de l'attachement primaire entre les mérozoïtes de *P. vivax* et les réticulocytes humains [11]. Ces gènes *pvmisp* sont hautement polymorphes. En particulier, *pvmisp1* [43], *pvmisp3* [43, 78] et *pvmisp7* [46] présentent de nombreux SNPs non synonymes indiquant qu'ils peuvent être soumis à une pression immunitaire sélective [51]. L'analyse des isolats de

*P. vivax* d'Éthiopie a révélé que *pvmisp3* présentait des CNVs allant d'une à quatre copies. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les expansions de *pvdhp* et *pvmisp3* ont souvent été observées en tandem. La pertinence fonctionnelle de cette expansion du nombre de copies n'est pas encore connue.

#### 2.5. Les autres gènes et leur rôle potentiel dans la voie d'invasion de *P. vivax*

D'autres gènes de *P. vivax* sont suspectés d'être impliqués dans le processus d'invasion. Par exemple, la famille des gènes *P. vivax* tryptophan rich antigen (*pvtrag*) coderait pour trente-six protéines qui peuvent se lier aux érythrocytes humains [79]. L'analyse génomique de souches de *P. vivax* en Éthiopie a révélé que la famille de gènes *pvtrag* ne semble porter que quelques polymorphismes génétiques [51]. De même, le gène *P. vivax* *glycosylphosphatidylinositol-anchored micronemal antigen* (*pvgama*) code pour l'antigène micronémique ancré dans le glycosylphosphatidylinositol de *P. vivax* (*PvGAMA*) qui se lie aux érythrocytes indépendamment du statut Duffy [43]. Cette protéine peut jouer un rôle dans l'adhésion des mérozoïtes de *P. vivax* à leurs cellules cibles [49]. Enfin, la famille de gènes *P. vivax* *rhostry neck protein* (*pvrn*) code pour les protéines *P. vivax* *Rhostry Neck* (*PvRON*) qui pourraient participer à la formation de la jonction serrée comme cela a été démontré pour les homologues de *P. falciparum* [67].

Les technologies génomiques ont clairement contribué à affiner la recherche sur le paludisme à *P. vivax* en réduisant le coût du séquençage ainsi qu'en améliorant la qualité et la disponibilité des séquences. Cependant, seules quelques centaines de génomes de *P. vivax* ont été séquencés jusqu'à présent. Les isolats de terrain et cliniques présentent une faible parasitémie et une forte contamination par l'ADN humain, ce qui rend toujours difficile l'acquisition d'une quantité suffisante d'ADN parasitaire de bonne qualité. Pourtant, les séquences génomiques disponibles à ce jour ont permis l'identification de quelques gènes potentiellement liés à l'invasion. Les polymorphismes de nucléotides simples (SNPs) et les variations du nombre de copies (CNVs) trouvés dans ces gènes peuvent conduire à des différences structurelles et entraîner des pressions sélectives. Cependant, les conséquences fonctionnelles de ces variations restent inconnues.

L'analyse des génomes de *P. vivax* devrait être combinée à l'identification de leurs profils transcriptomiques et à la caractérisation de leurs protéines putatives afin de détecter des signatures spécifiques, susceptibles de fournir des informations sur leur fonction. Mais l'absence de méthodes robustes permettant de cultiver *in vitro* *P. vivax* rend l'analyse fonctionnelle difficile.

### 3. Transcription des gènes d'invasion de *P. vivax*

Les progrès constants du séquençage à haut débit associés à la capacité récente de maturer des isolats de *P. vivax* par culture *ex vivo* pendant un cycle ont ouvert la voie aux études transcriptomiques. Le profil transcriptomique des stades sanguins de *P. vivax* via l'utilisation de microarrays et d'un séquençage ARN (à l'échelle de la population ou de l'individu) dévoile progressivement de nouvelles capacités expérimentales et permet d'élucider la transcription, la fonction et la régulation des gènes liés à l'invasion.

#### 3.1. Expression spécifique des gènes liés à l'invasion

La génération de transcriptomes de haute qualité à travers l'utilisation de multiples isolats de *P. vivax* est essentielle pour explorer les changements dans l'expression des gènes tout au long du cycle intra-érythrocytaire. Récemment, les profils transcriptomiques d'isolats de *P. vivax* d'infections sanguines provenant de singes *Aotus* et *Saimiri* ont révélé que la plupart des gènes de *P. vivax* avaient une expression spécifique à un stade parasitaire et étaient fortement surexprimés, contrairement aux gènes domestiques [5]. Étant donné que la plupart des infections cliniques étaient asynchrones, l'analyse des transcriptomes de *P. vivax* a permis d'identifier des populations distinctes. Les anneaux et les trophozoïtes précoces exprimaient principalement des gènes impliqués dans la transcription et la traduction, tandis que les trophozoïtes tardifs et les schizontes exprimaient des gènes potentiellement liés à l'invasion [5]. Par exemple, les transcrits *pvebp* et *pvrpb1* ont été trouvés fortement exprimés pendant le stade schizonte de *P. vivax* [55, 56]. De même, les transcrits *pvmisp3* ont été détectés dans les schizontes très tardifs [5] et le transcrit *pvmisp7* a généralement atteint

un pic pendant la transition trophozoïte tardif vers schizonte, lorsque les mérozoïtes sont formés [47]. Dans la souche de *P. vivax* adaptée au modèle primate (VCG-1), les transcrits *pvrpn5* ont été trouvés dans les schizontes [66]. De plus, des expériences de séquençage ARN menées avec des isolats de *P. vivax* cultivés *ex vivo* provenant du Brésil ont montré une grande variation dans l'expression des gènes suspectés d'être impliqués dans l'interaction hôte-parasite, la sélectivité des réticulocytes ou l'invasion. En particulier, *pvmisp1*, *pvmisp9*, *P. vivax merozoite surface antigen 180* (*pvmisa180*), *P. vivax rhoptry-associated membrane antigen* (*pvrma*) et *P. vivax rhoptry H3* (*pvrhoph3*) étaient les plus exprimés parmi tous les gènes [44]. L'expression des gènes liés à l'invasion dans les schizontes tardifs implique l'importance du développement des mérozoïtes et de l'invasion des réticulocytes pour la survie de *P. vivax*.

#### 3.2. Expression sélective des gènes liés à l'invasion de *P. vivax*

Le génome actuel de *P. vivax* contient de nombreuses familles de gènes qui ont été définies sur la base de l'homologie de séquence et de la conservation des domaines d'acides aminés. Les analyses de séquençage RNA à l'échelle de la cellule (single cell) ont démontré que l'expression sélective des gènes peut être due à leur rôle spécifique ou à des fonctions supplémentaires. Alors que la plupart des gènes *pvmisp* sont exprimés au cours des stades de développement tardifs, on a constaté que *pvmisp3* était exclusivement exprimé dans les schizontes très tardifs, ce qui suggère son rôle dans le processus d'invasion. Étonnamment, un gène similaire à *pvmisp7* s'est avéré être exprimé exclusivement dans les gamétocytes, ce qui implique une différence fonctionnelle [5]. Des résultats comparables ont été rapportés en utilisant des isolats cliniques de *P. vivax* provenant de Thaïlande. Alors que l'expression de la plupart des gènes *pvmisp7* était associée aux schizontes, les gènes *pvmisp7a* et *pvmisp7f* ont maintenu des niveaux d'expression élevés pendant tout le cycle intra-érythrocytaire. Ces résultats suggèrent que ces paralogues peuvent avoir des fonctions supplémentaires en plus de leur rôle établi à la surface des mérozoïtes [47].

De même, des niveaux d'expression différents ont été observés parmi les membres de la famille

de gènes *pvtrag*, mais leur signification est inconnue [5]. Malgré leur homologie de séquence, les membres d'une famille de gènes peuvent également avoir des fonctions différentes à des moments spécifiques [5]. Enfin, un séquençage du transcriptome sans amplification et directionnel (*DAFT*) de quatre isolats de *P. vivax* du Cambodge a révélé que la transcription peut être un processus sélectif dans lequel les parasites sélectionneraient des membres particuliers d'une famille de gènes en réponse à l'hôte [80]. Les auteurs ont montré que les gènes dont l'expression variait le plus entre les isolats étaient physiquement regroupés le long de régions chromosomiques. Par exemple, le locus *pvmSP3* présente de nombreux paralogues qui étaient susceptibles d'être fonctionnellement redondants, augmentant ainsi la diversité antigénique et améliorant l'évasion immunitaire pendant le processus d'invasion. Au sein des clusters, l'expression des gènes semble se produire comme si les parasites choisissaient la version du gène à exprimer chez un hôte donné [80]. Globalement, ces résultats reflètent une régulation du développement et une différenciation fonctionnelle au sein de familles de gènes spécifiques.

### 3.3. Amplification des gènes liés à l'invasion de *P. vivax*

Chez les espèces de *Plasmodium*, l'amplification des gènes peut constituer un moyen simple d'augmenter le niveau d'expression des gènes et de modifier ainsi les phénotypes d'invasion. Des études génomiques antérieures ont démontré que certaines souches de *P. vivax* présentaient une amplification des gènes liés à l'invasion. Notamment, le gène *pvdBP* est très variable dans le nombre de copies du gène. Par exemple, le profil transcriptomique de schizontes d'isolats cambodgiens de *P. vivax* a révélé que l'amplification du gène *pvdBP* était associée à une augmentation de l'expression d'ARN messager (ARNm), ce qui suggère une augmentation potentielle du niveau de la protéine PvDBP [54]. Étant donné que la protéine PvDBP joue un rôle crucial dans l'invasion des réticulocytes Duffy-positifs, on a émis l'hypothèse que les parasites capables d'infecter les réticulocytes Duffy-négatifs ont pu être sélectionnés pour leur capacité à utiliser des copies multiples de *pvdBP* afin de se lier à un récepteur alternatif [69]. Cependant, des souches de *P. vivax* avec des copies

multiples de *pvdBP* ont également été couramment détectées dans des régions où la Duffy-négativité est rare. Par ailleurs, même si le gène *pveBP* présente de nombreuses similitudes avec le gène *pvdBP*, rien ne prouve que son amplification entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm et/ou de protéines [53]. Ainsi, les conséquences fonctionnelles de l'expansion des gènes liés à l'invasion sont incertaines et nécessitent des investigations supplémentaires avec un nombre élevé d'isolats de *P. vivax*.

### 3.4. Un système de régulation complexe et dynamique

Les données transcriptomiques des parasites suggèrent que *P. vivax* présente une cascade transcriptionnelle étroitement régulée pendant son cycle intra-érythrocytaire [81]. Des études ont montré que les gènes co-exprimés présentaient des motifs conservés et des sites potentiels pour des protéines de liaison régulatrices [82]. Par exemple, de longues régions transcrites non traduites (UTR) 5' et 3' ont été observées dans des gènes suspectés être impliqués dans l'invasion et la formation de la vacuole parasitophore [80]. De plus, les variations des 5'-UTRs semblent conduire à une sélection différentielle des sites de début de transcription (TSS) reflétant la variation du niveau d'expression des gènes [83]. La présence de promoteurs bidirectionnels pour réguler l'expression de paires de gènes adjacents a également été fréquemment observée. Enfin, les modifications post-transcriptionnelles telles que la structure de la chromatine, les transcrits non codants et l'épissage alternatif peuvent jouer un rôle important dans la régulation, mais les mécanismes restent encore mal compris. Notamment, la relation spatiale présumée entre les gènes qui sont exprimés de manière variable suggère que la structure et l'accès à la chromatine peuvent être importants pour la régulation des gènes [83]. Ainsi, *P. vivax* dispose d'un réseau de régulation insaisissable et complexe qui peut régir l'expression des gènes liés à l'invasion et permettre ainsi au parasite de se développer dans les réticulocytes humains infectés.

La transcriptomique fournit des informations précieuses sur la dynamique des gènes liés à l'invasion de *P. vivax*. Il est probable que les schizontes de *P. vivax* expriment sélectivement des gènes spécifiques pour initier le processus d'invasion. Cependant, la

petite taille des échantillons, le manque de méthodes de culture *in vitro* fiables et la dynamique d'expression des gènes de ménage compliquent l'identification de nouveaux transcrits et de motifs régulateurs. À l'avenir, l'exploration des profils transcriptomiques à l'échelle cellulaire et le séquençage à longue lecture d'isolats de *P. vivax* provenant de régions géographiquement distinctes devraient être combinés à des approches protéomiques pour évaluer toute la diversité de l'expression des ligands liés à l'invasion.

#### 4. Mécanismes cellulaires d'invasion de *P. vivax*

Les données protéomiques concernant les infections à *P. vivax* sont minimales en raison de l'accès limité au matériel biologique et au manque de système robuste permettant de cultiver *in vitro* le parasite. La liste des protéines exprimées par les mérozoïtes de *P. vivax* n'a donc toujours pas été clairement définie. Cela a généré des lacunes importantes dans la compréhension des mécanismes d'invasion de *P. vivax*. Étant donné que la structure de base des mérozoïtes est similaire chez toutes les espèces de *Plasmodium*, la plupart des chercheurs ont basé l'étude des mécanismes d'invasion de *P. vivax* sur l'hypothèse que le parasite établit les mêmes étapes malgré un tropisme cellulaire différent et des interactions récepteur-ligand différentes.

##### 4.1. Attachement primaire

Le processus d'invasion semble être initié par l'attachement réversible des mérozoïtes de *P. vivax* aux réticulocytes. Cette fixation peut être médiée par les protéines de surface des mérozoïtes de *P. vivax* (*PvMSP*), qui peuvent former de grands complexes constitués de protéines ancrées au glycosphosphatidylinositol et de protéines transmembranaires couvrant la surface des mérozoïtes de *P. vivax*. Sur la base de l'étude des protéines de surface des mérozoïtes de *P. falciparum* (*PfMSP*) homologues aux *PvMSPs* de *P. vivax*, on a émis l'hypothèse que la protéine *PvMSP1* pourrait reconnaître un récepteur à la surface des réticulocytes humains. La sous-unité C-terminale (MSP-142) de *PvMSP1* pourrait être clivée et la plus grande partie du complexe pourrait être éliminée, laissant seulement une petite sous-unité C-terminale (MSP-119) à la surface.

De même, son paralogue *PvMSP1P* pourrait jouer un rôle important dans l'adhésion des mérozoïtes de *P. vivax* aux réticulocytes par interaction avec sa région C-terminale [43]. De plus, on a émis l'hypothèse que la protéine *PvMSP7* pourrait être un ligand spécifique au récepteur P-sélectine qui agit comme une molécule d'adhésion cellulaire [48]. De même, la protéine *PvMSP1* et la protéine *PvMSP7* pourraient se lier ensemble pour former un complexe afin d'augmenter l'efficacité de l'invasion [47].

D'autres ligands pourraient être impliqués dans cette étape, mais leur capacité à déclencher l'attachement ou à abroger la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte est inconnue. Par exemple, la protéine *PvTRAg56.2* semble se localiser avec la protéine *PvMSP1* à la surface du mérozoïte et interagir avec la protéine *PvMSP7* pour jouer un rôle stabilisateur [52]. De la même façon, la protéine micronémale *PvGAMA* pourrait se lier à des récepteurs spécifiques à la surface des réticulocytes et ainsi jouer un rôle dans l'adhésion des mérozoïtes de *P. vivax* à leurs cellules hôtes cibles [65]. En effet, l'analyse protéomique de la protéine ankyrine 1 (ANK1) et de la protéine Band 3 par diverses approches biochimiques incluant la chromatographie liquide-spectrométrie de masse, a montré que le fragment 2 du domaine de liaison à la membrane de l'ANK1 et la boucle extracellulaire 5 de Band 3 se lient à la protéine *PfGAMA* et à la protéine *PvGAMA*. En outre, les anticorps anti-Band 3-P5 bloquent la liaison *PfGAMA* aux érythrocytes [50]. Par ailleurs, des études sur le terrain et en laboratoire ont montré que l'exposition à *P. vivax* induit des réponses IgG robustes à *PvGAMA* dans le cadre d'une exposition naturelle [84, 85] et que les anticorps anti-*PvGAMA* inhibent l'invasion et la croissance *in vitro* de *P. knowlesi* [86], bien que le knock-out du gène *pkgama* ait un effet minime sur la croissance de *P. knowlesi*. Ainsi, l'attachement primaire des mérozoïtes de *P. vivax* aux réticulocytes ou aux érythrocytes implique des interactions spécifiques et réversibles permettant la réorientation apicale.

##### 4.2. Réorientation apicale

Après la fixation primaire, il se pourrait que *P. vivax* subisse une réorientation apicale qui déclenche diverses interactions ligand-récepteur. Comme les mérozoïtes de *P. vivax* ont un fort tropisme pour les

réticulocytes (qui représentent entre 0,2% et 2% de la population érythrocytaire totale), les chances de rencontrer une cellule permissive à l'invasion sont faibles. On a donc émis l'hypothèse qu'une étape de sélection de la cellule hôte se produisait pendant la réorientation apicale pour empêcher les mérozoïtes d'envahir des cellules non ciblées [87]. D'après l'étude de protéines homologues chez d'autres espèces de *Plasmodium*, on pense que la famille de protéines *PvRBP* est responsable du tropisme de *P. vivax* pour les réticulocytes. Des travaux récents ont montré que les protéines *PvRBP1* et *PvRBP2* natives peuvent fonctionner comme un complexe protéique adhésif [69] et que les protéines *PvRBP2a* et *PvRBP2b* peuvent se lier aux réticulocytes indépendamment de leur phénotype Duffy [60]. En 2015, une étude *ex vivo* a confirmé que les mérozoïtes de *P. vivax* ciblent préférentiellement les réticulocytes immatures exprimant le marqueur CD71 [61]. En 2018, une autre étude a montré que CD71 était le récepteur du ligand *PvRBP2b* [88]. Des analyses par microscopie cryo-électronique, immunoprécipitation et transfert d'énergie par résonance de fluorescence ont confirmé que la liaison de *PvRBP2b* à CD71 était spécifique et directement proportionnelle au niveau d'expression de CD71 [89]. Enfin, des études fonctionnelles ont identifié le marqueur CD98, exprimé à la surface des réticulocytes immatures, comme étant le principal récepteur du *PvRBP2a* [62]. Les deux interactions *PvRBP2b* - CD71 et *PvRBP2a* - CD98 semblent être à l'origine du tropisme strict de *P. vivax* pour les réticulocytes. Leur action pourrait être indépendante ou combinée, ce qui suggère l'existence potentielle de voies d'invasion alternatives. Outre les protéines *PvRBP*, l'adhésine antigénique de surface liant les réticulocytes de *P. vivax* (*PvRBSA*) pourrait également jouer un rôle dans la reconnaissance des réticulocytes. Une étude récente a montré que la protéine *PvRBSA* recombinante (*rPvRBSA*) se lie spécifiquement aux réticulocytes Duffy-positifs. Mais son récepteur est encore inconnu [63]. En plus de leur fonction adhésive, les protéines *PvMSPs* peuvent également contribuer à la reconnaissance des réticulocytes. En effet, des études récentes ont montré que les peptides de la protéine *PvMSP1* ont une activité de liaison plus élevée avec les réticulocytes qu'avec les érythrocytes [45]. Bien que les mécanismes ne soient pas encore clairs, la reconnaissance des réticulocytes

immatures par les mérozoïtes de *P. vivax* semble être gouvernée par *PvRBP2a* et/ou *PvRBP2b*, potentiellement en conjonction avec la protéine *PvRBSA* et les protéines *PvMSPs*. Les protéines *PvRBPs* pourraient également déclencher des étapes ultérieures de l'invasion, telles que la modulation du cytosquelette érythrocytaire, l'assemblage de la jonction serrée ou la signalisation de la sécrétion de protéines *PvRhops*.

#### 4.3. Invasion

La réorientation apicale pourrait être suivie par la formation d'une jonction serrée et irréversible entre les mérozoïtes de *P. vivax* et les réticulocytes. Chez les individus Duffy-positifs, en l'absence de preuves, nous ne savons pas si la protéine *PvDBP* se localise à la jonction serrée entre la surface des mérozoïtes et le récepteur DARC. En effet, pour *P. falciparum*, *PfEBA175* (un ligand de liaison aux érythrocytes de *P. falciparum*) se lie à la Glycophorine A pour déclencher la libération de *PfRH5* et d'autres protéines *PfRhops*. Mais *PfEBA175* lui-même ne participe pas à la formation de la jonction. Le site de liaison de *PvDBP* est monomérique en l'absence de DARC mais se dimérise lors de l'engagement du récepteur et forme un homodimère avec le domaine extracellulaire N-terminal de DARC [60]. La formation de la jonction serrée pourrait également être facilitée par la sécrétion du ligand *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1 (*PvAMA1*) à la surface du mérozoïte, l'injection de complexes de la protéine *PvRON* à la surface des réticulocytes et leur interaction. Il a notamment été démontré que *PvRON5* a une préférence marquée pour les réticulocytes et est donc soupçonné d'être impliqué dans le processus d'invasion [66]. Enfin, l'expression de divers membres de la famille de la protéine *vivax* 6-cystéine (*PvP*) à la surface du mérozoïte jouerait également un rôle dans cette étape [64].

Chez les individus Duffy-négatifs, les mécanismes et les facteurs impliqués dans la formation de la jonction serrée restent inconnus, mais plusieurs hypothèses sont actuellement discutées (Figure 3). À Madagascar, la mise en évidence d'infections à *P. vivax* chez des patients Duffy-négatifs a été corrélée à l'existence d'une duplication commune du gène *pvdhp*. Ceci a conforté l'hypothèse selon laquelle l'amplification du gène *pvdhp* pourrait favoriser la liaison de la protéine *PvDBP* à un autre récepteur de moindre affinité. Cependant, un tel récepteur alternatif n'a pas encore été identifié. De plus, les

souches de *P. vivax* présentant de multiples copies de *pvdbp* sont fréquemment trouvées dans les zones endémiques où la Duffy-négativité est rare [53]. Une deuxième hypothèse est que le ligand *PvEBP* pourrait fonctionner comme un ligand alternatif pour l'invasion des réticulocytes Duffy-négatifs. En effet, le ligand *PvEBP* semble partager des similitudes structurales avec le ligand *PvDBP*, comme un site d'attachement Duffy-binding like et un domaine C-terminal avec des positions de cystéine conservées, et probablement des fonctions similaires [55]. Sur la base de ces similarités structurales, un site de liaison au récepteur recombinant pour *PvEBP* (*rPvEBPII*) a été produit. Les résultats des essais de liaison ont montré que *PvEBPII* se lie préférentiellement aux réticulocytes immatures Duffy-positifs, mais une liaison minimale a été observée dans les réticulocytes immatures Duffy-négatifs. En revanche, aucune liaison n'a été observée pour les érythrocytes matures [57, 58]. Récemment, une étude fonctionnelle réalisée sur des isolats de *P. vivax* provenant d'Éthiopie a confirmé que *PvEBPII* peut se lier aux réticulocytes Duffy-positifs et Duffy-négatifs, mais à une fréquence plus faible que *PvDBP*. Cette découverte indique que le domaine *PvEBPII* n'a peut-être pas les mêmes capacités de liaison que le domaine *PvDBPII* malgré leurs similitudes structurales [51]. Le récepteur principal de *PvEBP* étant encore inconnu, on ne sait pas si ce ligand alternatif potentiel joue un rôle dans l'invasion des réticulocytes Duffy-négatifs. Enfin, il a été récemment évoqué que les réticulocytes Duffy-négatifs peuvent exprimer transitoirement des niveaux faibles de DARC à la surface de leurs réticulocytes. Des données préliminaires suggèrent que DARC pourrait être exprimé à la surface des cellules précurseurs érythroïdes des individus Duffy-négatifs, mais cela doit encore être confirmé [90].

#### 4.4. *Invagination*

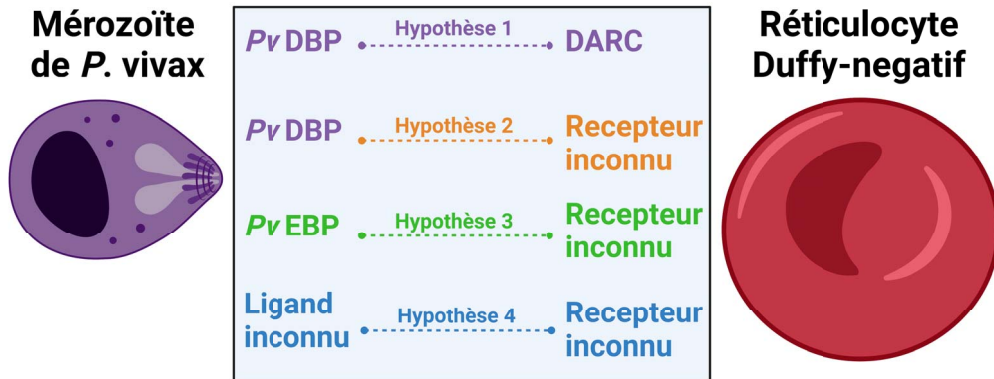
Une fois que les mérozoïtes de *P. vivax* sont engagés de manière irréversible dans le processus d'invasion, ils pourraient pénétrer dans les réticulocytes via l'activité du glidéosome et se sceller dans la vacuole parasitophore. Bien que ces mécanismes ne soient pas clairs, il semble que la protéine *PvTRAg36.6* et la protéine *P. vivax* Early Transcribed Membrane Protein (*PvETRAPM*) soient colocalisés dans la région apicale des mérozoïtes pour former et/ou maintenir la membrane de la vacuole parasitophore [52].

Bien que les technologies protéomiques ne soient pas encore pleinement exploitées, elles semblent essentielles pour répondre à des questions concernant les mécanismes d'invasion de *P. vivax*. L'amélioration constante des techniques (électrophorèse sur gel bidimensionnelle, spectrométrie de masse, criblage à deux hybrides de levure, etc.), l'approche à haut débit, les programmes de prédiction computationnelle et les capacités de traitement des données offrent d'énormes possibilités pour étudier l'expression, l'interaction et la modification des ligands de *P. vivax*. Cependant, les données protéomiques seules semblent être insuffisantes pour établir une analyse fine du processus d'invasion et proposer des modèles testables. Elles doivent être intégrées dans une connaissance plus globale et fondamentale de la biologie de *P. vivax* [91].

## 5. Conclusion

Pendant longtemps, le paludisme à *P. vivax* a été considéré comme une infection bénigne. Par conséquent, la recherche sur *P. vivax* a reçu une priorité moindre de la part des chercheurs, des décideurs politiques et des agences de financement. En outre, l'accès limité au matériel biologique et le manque de systèmes robustes pour la culture *in vitro* ont entravé le développement d'études fonctionnelles.

Pour résoudre ce problème, les scientifiques ont pris en compte les données provenant de familles de protéines homologues chez d'autres espèces de *Plasmodium* et ont produit des protéines recombinantes pour étudier les ligands de *P. vivax* potentiellement impliqués dans le processus d'invasion. Mais ces méthodes n'ont pas permis d'obtenir des informations complètes sur les fonctions réelles des ligands natifs. En fait, la question cruciale pour la recherche sur le paludisme à *P. vivax* recoupe plusieurs disciplines. En effet, les technologies génomiques apportent un certain éclairage sur la diversité génétique des souches *P. vivax*. Mais elles ne sont peut-être pas suffisantes pour comprendre les conséquences fonctionnelles de ces variations. Alors que les technologies transcriptomiques sont des outils puissants pour caractériser les transcriptions hautement régulées et spécifiques à chacun des stades de développement de *P. vivax*, l'analyse des données reste limitée par l'insuffisance d'échantillons et la difficulté d'étudier les gènes de ménage à expression constante.



**FIGURE 3.** Mécanismes hypothétiques d'invasion de *P. vivax* dans les réticulocytes Duffy-négatifs. Hypothèse 1 : Les mérozoïtes de *P. vivax* envahissent les réticulocytes Duffy-négatifs par l'interaction entre le ligand *Pv*DBP et le récepteur DARC, ce qui implique que les réticulocytes Duffy-négatifs peuvent exprimer DARC à un niveau faible et/ou transitoire. Hypothèse 2 : Les mérozoïtes de *P. vivax* envahissent les réticulocytes Duffy-négatifs par l'interaction entre le ligand *Pv*DBP et un récepteur inconnu exprimé à la surface des réticulocytes Duffy-négatifs. Hypothèse 3 : Les mérozoïtes de *P. vivax* envahissent les réticulocytes Duffy-négatifs par l'interaction entre le ligand *Pv*EBP et un récepteur inconnu exprimé à la surface des réticulocytes Duffy-négatifs. Hypothèse 4 : Les mérozoïtes de *P. vivax* envahissent les réticulocytes Duffy-négatifs par l'interaction entre un ligand inconnu exprimé à la surface des mérozoïtes de *P. vivax* et un récepteur inconnu exprimé à la surface des réticulocytes Duffy-négatifs. Figure créée avec BioRender.com.

Cependant, de récentes applications des technologies dites « single-cell » ont permis de produire des profils transcriptomiques à la fois de parasites au stade hépatique et des cellules hôtes pour explorer les interactions hôte-parasite [92]. Il est donc possible que cette technologie soit appliquée à l'étude des facteurs de l'hôte dans la voie d'invasion des réticulocytes humains. En plus des études omiques, divers modèles *in vivo* ont été utilisés pour étudier les voies d'invasion de *P. vivax*. Les modèles de primates non humains (PNH) ont été largement utilisés dans le passé, malgré leurs limites inhérentes telles que les problèmes éthiques et les variations de la sensibilité de l'hôte à l'infection par des isolats de terrain de *P. vivax* nécessitant une adaptation avant la réplique, ce qui modifie probablement les caractéristiques biologiques des souches adaptées [55]. Plus récemment, des efforts ont été entrepris pour développer des systèmes de souris humanisées comme modèles pour reproduire *in vivo* les infections à *P. vivax* [93]. Bien qu'encourageants, ces systèmes très fragiles et coûteux n'en sont qu'à leurs débuts et doivent être perfectionnés pour permettre le maintien continu d'une infection à *P. vivax* asexuée au

stade sanguin et le développement de parasites *P. vivax* génétiquement modifiés [94].

Dans ce contexte, les technologies protéomiques se concentrent sur le décryptage des diverses interactions entre les ligands impliqués dans le processus d'invasion de *P. vivax* et leurs récepteurs spécifiques. Néanmoins, elles ne parviennent pas à fournir une vision générale des mécanismes d'invasion de *P. vivax*, notamment en expliquant comment le parasite est capable d'envahir les réticulocytes Duffy-négatifs. Le développement d'études multi-omiques intégrées et complémentaires ainsi que les études d'invasion *in vitro* devraient nous permettre de mieux comprendre la biologie de ce parasite et soutenir le développement de stratégies de prévention, de contrôle et d'éradication dans le monde entier.

### Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

### Remerciements

Cette revue a été soutenue par une subvention de l'Agence Nationale de la Recherche (VipeRs,



ANR-18-CE15-0026), par l'Institut Pasteur, Paris, le Laboratoire d'Excellence (LabEx) « Alliance Française de Parasitologie pour la Santé » (ANR-11-15 LABX-0024-PARAFRAP) et l'Université de Strasbourg à travers le Programme IdEX 2022 (Attractivité — Dotation d'accueil des professeurs d'université recrutés en 2021).

## References

- [1] World Health Organization, *World Malaria Report 2021*, WHO, Geneva, Switzerland, 2021.
- [2] J. H. Adams, I. Mueller, "The biology of *Plasmodium vivax*", *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7** (2017), article no. a025585.
- [3] A. Roth, S. R. Adapa, M. Zhang, X. Liao, V. Saxena, R. Goffe, S. Li, R. Ubalee, G. S. Saggi, Z. R. Pala, S. Garg, S. Davidson, R. H. Y. Jiang, J. H. Adams, "Unraveling the *Plasmodium vivax* sporozoite transcriptional journey from mosquito vector to human host", *Sci. Rep.* **8** (2018), article no. 12183.
- [4] J. S. Armistead, J. H. Adams, "Advancing research models and technologies to overcome biological barriers to *Plasmodium vivax* control", *Trends Parasitol.* **34** (2018), p. 114-126.
- [5] J. M. Sa, M. V. Cannon, R. L. Caleon, T. E. Wellem, D. Serre, "Single-cell transcription analysis of *Plasmodium vivax* blood-stage parasites identifies stage- and species-specific profiles of expression", *PLoS Biol.* **18** (2020), article no. e3000711.
- [6] P. Ngoto, A. B. Soares, F. Hentzschel, F. Achcar, L. Bertuccini, M. Marti, "Revisiting gametocyte biology in malaria parasites", *FEMS Microbiol. Rev.* **43** (2019), p. 401-414.
- [7] J. K. Baird, "Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria", *Clin. Microbiol. Rev.* **26** (2013), p. 36-57.
- [8] R. E. Howes, A. P. Patil, F. B. Piel, O. A. Nyangiri, C. W. Kabaria, P. W. Gething, P. A. Zimmerman, C. Barnadas, C. M. Beall, A. Gebremedhin, D. Ménard, T. N. Williams, D. J. Weatherall, S. I. Hay, "The global distribution of the Duffy blood group", *Nat. Commun.* **2** (2011), article no. 266.
- [9] J. K. Baird, "African *Plasmodium vivax* malaria improbably rare or benign", *Trends Parasitol.* **38** (2022), p. 683-696.
- [10] U. Kanjee, G. W. Rangel, M. A. Clark, M. T. Duraisingh, "Molecular and cellular interactions defining the tropism of *Plasmodium vivax* for reticulocytes", *Curr. Opin. Microbiol.* **46** (2018), p. 109-115.
- [11] J. G. Beeson, D. R. Drew, M. J. Boyle, G. Feng, F. J. I. Fowkes, J. S. Richards, "Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria", *FEMS Microbiol. Rev.* **40** (2016), p. 343-372.
- [12] A. F. Cowman, C. J. Tonkin, W.-H. Tham, M. T. Duraisingh, "The molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites", *Cell Host Microbe* **22** (2017), p. 232-245.
- [13] M. F. Boyd, W. K. Stratman-Thomas, "Studies on benign tertian malaria", *Am. J. Epidemiol.* **18** (1933), p. 485-489.
- [14] R. S. Bray, "The susceptibility of liberians to the madagascar strain of *Plasmodium vivax*", *J. Parasitol.* **44** (1958), p. 371-373.
- [15] M. D. Young, J. M. Ellis, T. H. Stubbs, "Some characteristics of foreign vivax malaria induced in neurosyphilitic patients", *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **s1-27** (1947), p. 585-596.
- [16] M. D. Young, D. E. Eyles, R. W. Burgess, G. M. Jeffery, "Experimental testing of the immunity of negroes to *Plasmodium vivax*", *J. Parasitol.* **41** (1955), p. 315-318.
- [17] M. Cutbush, P. L. Mollison, "The Duffy blood group system", *Heredity* **4** (1950), p. 383-389.
- [18] M. Cutbush, P. L. Mollison, D. M. Parkin, "A new human blood group", *Nature* **165** (1950), p. 188-189.
- [19] L. H. Miller, S. J. Mason, D. F. Clyde, M. H. McGinniss, "The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks", *New Engl. J. Med.* **295** (1976), p. 302-304.
- [20] C. Tournamille, Y. Colin, J. P. Cartron, C. Le Van Kim, "Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals", *Nat. Genet.* **10** (1995), p. 224-228.
- [21] C. Tournamille, A. Filipe, C. Badaut, M.-M. Riottot, S. Longacre, J.-P. Cartron, C. Le Van Kim, Y. Colin, "Fine mapping of the Duffy antigen binding site for the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein", *Mol. Biochem. Parasitol.* **144** (2005), p. 100-103.
- [22] J. W. Barnwell, M. E. Nichols, P. Rubinstein, "In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*", *J. Exp. Med.* **169** (1989), p. 1795-1802.
- [23] C. E. Chitnis, L. H. Miller, "Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion", *J. Exp. Med.* **180** (1994), p. 497-506.
- [24] C. Mendes, F. Dias, J. Figueiredo, V. G. Mora, J. Cano, B. de Sousa, V. E. do Rosário, A. Benito, P. Berzosa, A. P. Arez, "Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax*-molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea)", *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5** (2011), article no. e1192.
- [25] P. Poirier, C. Doderer-Lang, P. S. Atchade, J.-P. Lemoine, M.-L. C. de l'Isle, A. Abou-Bacar, A. W. Pfaff, J. Brunet, L. Arnoux, E. Haar, D. Filisetti, S. Perrotey, N. W. Chabi, C. D. Akpovi, L. Anani, A. Bigot, A. Sanni, E. Candolfi, "The hide and seek of *Plasmodium vivax* in West Africa: report from a large-scale study in Beninese asymptomatic subjects", *Malar. J.* **15** (2016), article no. 570.
- [26] H. G. Ngassa Mbenda, A. Das, "Molecular evidence of *Plasmodium vivax* mono and mixed malaria parasite infections in Duffy-negative native Cameroonians", *PLoS One* **9** (2014), article no. e103262.
- [27] G. Russo, G. Faggioni, G. M. Paganotti, G. B. Djeunang Dongho, A. Pomponi, R. De Santis, G. Tebano, M. Mbida, M. Sanou Sobze, V. Vullo, G. Rezza, F. R. Lista, "Molecular evidence of *Plasmodium vivax* infection in Duffy negative symptomatic individuals from Dschang, West Cameroon", *Malar. J.* **16** (2017), article no. 74.
- [28] J. M. Rubio, A. Benito, J. Roche, P. J. Berzosa, M. L. Garcia, M. Micó, M. Edú, J. Alvar, "Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in equatorial guinea", *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60** (1999), p. 183-187.
- [29] T. G. Woldearegai, P. G. Kremsner, J. F. J. Kun, B. Mord-

- müller, “*Plasmodium vivax* malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia”, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **107** (2013), p. 328-331.
- [30] J. R. Ryan, J. A. Stoute, J. Amon, R. F. Dunton, R. Mtalib, J. Koros, B. Owour, S. Luckhart, R. A. Wirtz, J. W. Barnwell, R. Rosenberg, “Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya”, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75** (2006), p. 575-581.
- [31] D. Menard, C. Barnadas, C. Bouchier, C. Henry-Halldin, L. R. Gray, A. Ratsimbaoa, V. Thonier, J. F. Carod, O. Domarle, Y. Colin, O. Bertrand, J. Picot, C. L. King, B. T. Grimberg, O. Mercereau-Puijalon, P. A. Zimmerman, “*Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** (2010), p. 5967-5971.
- [32] A. Niangaly, K. Gunalan, A. Ouattara, D. Coulibaly, J. M. Sá, M. Adams, M. A. Travassos, J. Ferrero, M. B. Laurens, A. K. Kone, M. A. Thera, C. V. Plowe, L. H. Miller, O. K. Doumbo, “*Plasmodium vivax* infections over 3 years in duffy blood group negative Malians in Bandiagara, Mali”, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **97** (2017), p. 744-752.
- [33] N. Wurtz, K. Mint Lekweiry, H. Bogreau, B. Pradines, C. Rogier, A. Ould Mohamed Salem Boukhary, J. E. Hafid, M. S. Ould Ahmedou Salem, J.-F. Trape, L. K. Basco, S. Briolant, “*Vivax* malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual”, *Malar. J.* **10** (2011), article no. 336.
- [34] M. M. A. Albsheer, K. Pestana, S. Ahmed, M. Elfaki, E. Gamil, S. M. Ahmed, M. E. Ibrahim, A. M. Musa, E. Lo, M. M. A. Hamid, “Distribution of Duffy phenotypes among *Plasmodium vivax* infections in Sudan”, *Genes* **10** (2019), article no. 437.
- [35] K. E. Battle, J. K. Baird, “The global burden of *Plasmodium vivax* malaria is obscure and insidious”, *PLoS Med.* **18** (2021), article no. e1003799.
- [36] K. Gunalan, A. Niangaly, M. A. Thera, O. K. Doumbo, L. H. Miller, “*Plasmodium vivax* infections of duffy-negative erythrocytes: historically undetected or a recent adaptation?”, *Trends Parasitol.* **34** (2018), p. 420-429.
- [37] L. H. Miller, J. D. Haynes, F. M. McAuliffe, T. Shiroishi, J. R. Durocher, M. H. McGinniss, “Evidence for differences in erythrocyte surface receptors for the malarial parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*”, *J. Exp. Med.* **146** (1977), p. 277-281.
- [38] L. H. Miller, S. J. Mason, J. A. Dvorak, M. H. McGinniss, I. K. Rothman, “Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: duffy blood group determinants”, *Science* **189** (1975), p. 561-563.
- [39] D. E. Loy, L. J. Plenderleith, S. A. Sundararaman, W. Liu, J. Gruszczyk, Y.-J. Chen, S. Trimboli, G. H. Learn, O. A. MacLean, A. L. K. Morgan, Y. Li, A. N. Avitto, J. Giles, S. Calvignac-Spencer, A. Sachse, F. H. Leendertz, S. Speede, A. Ayoub, M. Peeters, J. C. Rayner, W.-H. Tham, P. M. Sharp, B. H. Hahn, “Evolutionary history of human *Plasmodium vivax* revealed by genome-wide analyses of related ape parasites”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115** (2018), p. E8450-E8459.
- [40] W. Roobsoong, C. S. Tharinjaroen, N. Rachaphaew, P. Chobson, L. Schofield, L. Cui, J. H. Adams, J. Sattabongkot, “Improvement of culture conditions for long-term in vitro culture of *Plasmodium vivax*”, *Malar. J.* **14** (2015), article no. 297.
- [41] J. Carlton, “The *Plasmodium vivax* genome sequencing project”, *Trends Parasitol.* **19** (2003), p. 227-231.
- [42] J. M. Carlton, J. H. Adams, J. C. Silva, S. L. Bidwell, H. Lorenzi, E. Caler, J. Crabtree, S. V. Angiuoli, E. F. Merino, P. Amedeo, Q. Cheng, R. M. R. Coulson, B. S. Crabb, H. A. del Portillo, K. Essien, T. V. Feldblyum, C. Fernandez-Becerra, P. R. Gilson, A. H. Gueye, X. Guo, S. Kang’a, T. W. A. Kooij, M. Korsinczyk, E. V.-S. Meyer, V. Nene, I. Paulsen, O. White, S. A. Ralph, Q. Ren, T. J. Sargeant, S. L. Salzberg, C. J. Stoeckert, S. A. Sullivan, M. M. Yamamoto, S. L. Hoffman, J. R. Wortman, M. J. Gardner, M. R. Galinski, J. W. Barnwell, C. M. Fraser-Liggett, “Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*”, *Nature* **455** (2008), p. 757-763.
- [43] Y. Cheng, Y. Wang, D. Ito, D.-H. Kong, K.-S. Ha, J.-H. Chen, F. Lu, J. Li, B. Wang, E. Takashima, J. Sattabongkot, T. Tsuboi, E.-T. Han, “The *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog is a novel erythrocyte-binding ligand of *P. vivax*”, *Infect. Immun.* **81** (2013), p. 1585-1595.
- [44] G. W. Rangel, M. A. Clark, U. Kanjee, J. M. Goldberg, B. MacInnis, M. J. Menezes, M. U. Ferreira, M. T. Duraisingh, “*Plasmodium vivax* transcriptional profiling of low input cryopreserved isolates through the intraerythrocytic development cycle”, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **14** (2020), article no. e0008104.
- [45] L. E. Rodríguez, M. Urquiza, M. Ocampo, H. Curtidor, J. Suárez, J. García, R. Vera, Á. Puentes, R. López, M. Pinto, Z. Rivera, M. E. Patarroyo, “*Plasmodium vivax* MSP-1 peptides have high specific binding activity to human reticulocytes”, *Vaccine* **20** (2002), p. 1331-1339.
- [46] C. W. Cheng, C. Putaporntip, S. Jongwutiwes, “Polymorphism in merozoite surface protein-7E of *Plasmodium vivax* in Thailand: Natural selection related to protein secondary structure”, *PLoS One* **13** (2018), article no. e0196765.
- [47] C. W. Cheng, S. Jongwutiwes, C. Putaporntip, A. P. Jackson, “Clinical expression and antigenic profiles of a *Plasmodium vivax* vaccine candidate: merozoite surface protein 7 (PvMSP-7)”, *Malar. J.* **18** (2019), article no. 197.
- [48] A. J. Perrin, S. J. Bartholdson, G. J. Wright, “P-selectin is a host receptor for plasmodium MSP7 ligands”, *Malar. J.* **14** (2015), article no. 238.
- [49] L. A. Baquero, D. A. Moreno-Pérez, D. Garzón-Ospina, J. Forero-Rodríguez, H. D. Ortiz-Suárez, M. A. Patarroyo, “PvGAMA reticulocyte binding activity: predicting conserved functional regions by natural selection analysis”, *Parasites Vectors* **10** (2017), article no. 251.
- [50] J. Lu, R. Chu, Y. Yin, H. Yu, Q. Xu, B. Yang, Y. Sun, J. Song, Q. Wang, J. Xu, F. Lu, Y. Cheng, “Glycosylphosphatidylinositol-anchored micronemal antigen (GAMA) interacts with the band 3 receptor to promote erythrocyte invasion by malaria parasites”, *J. Biol. Chem.* **298** (2022), article no. 101765.
- [51] A. Ford, D. Kepple, B. R. Abagero, J. Connors, R. Pearson, S. Auburn, S. Getachew, C. Ford, K. Gunalan, L. H. Miller, D. A. Janies, J. C. Rayner, G. Yan, D. Yewhalaw, E. Lo, “Whole genome sequencing of *Plasmodium vivax* isolates reveals frequent sequence and structural polymorphisms in erythrocyte binding genes”, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **14** (2020), article no. e0008234.
- [52] K. Tyagi, M. E. Hossain, V. Thakur, P. Aggarwal, P. Malhotra, A. Mohammed, Y. D. Sharma, “*Plasmodium vivax* tryptophan rich antigen PvTRAG36.6 interacts with PvETRAMP and

- PvTRAg56.6 interacts with PvMSP7 during erythrocytic stages of the parasite", *PLoS One* **11** (2016), article no. e0151065.
- [53] C. Roesch, J. Popovici, S. Bin, V. Run, S. Kim, S. Ramboarina, E. Rakotomalala, R. L. Rakotoarison, T. Rasoloharimanana, Z. Andriamanantena, A. Kumar, M. Guillotte-Blisnick, C. Huon, D. Serre, C. E. Chitnis, I. Vigan-Womas, D. Menard, "Genetic diversity in two *Plasmodium vivax* protein ligands for reticulocyte invasion", *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12** (2018), article no. e0006555.
- [54] J. Popovici, C. Roesch, L. L. Carias, N. Khim, S. Kim, A. Vantaux, I. Mueller, C. E. Chitnis, C. L. King, B. Witkowski, "Amplification of Duffy binding protein-encoding gene allows *Plasmodium vivax* to evade host anti-DBP humoral immunity", *Nat. Commun.* **11** (2020), article no. 953.
- [55] J. Hester, E. R. Chan, D. Menard, O. Mercereau-Puijalon, J. Barnwell, P. A. Zimmerman, D. Serre, "De novo assembly of a field isolate genome reveals novel *Plasmodium vivax* erythrocyte invasion genes", *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7** (2013), article no. e2569.
- [56] J.-H. Han, S.-K. Lee, B. Wang, F. Muh, M. H. Nyunt, S. Na, K.-S. Ha, S.-H. Hong, W. S. Park, J. Sattabongkot, T. Tsuboi, E.-T. Han, "Identification of a reticulocyte-specific binding domain of *Plasmodium vivax* reticulocyte-binding protein 1 that is homologous to the PfRh4 erythrocyte-binding domain", *Sci. Rep.* **6** (2016), article no. 26993.
- [57] K. Gunalan, E. Lo, J. B. Hostetler, D. Yewhalaw, J. Mu, D. E. Neafsey, G. Yan, L. H. Miller, "Role of *Plasmodium vivax* duffy-binding protein 1 in invasion of duffy-null Africans", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113** (2016), p. 6271-6276.
- [58] E. B. Ntumngia, R. Thomson-Luque, L. D. M. Torres, K. Gunalan, L. H. Carvalho, J. H. Adams, "A novel erythrocyte binding protein of *Plasmodium vivax* suggests an alternate invasion pathway into duffy-positive reticulocytes", *mBio* **7** (2016), article no. e01261-16.
- [59] V. Kosaisavee, U. Lek-Uthai, R. Suwanarusk, A. C. Grüner, B. Russell, F. Nosten, L. Rénia, G. Snounou, "Genetic diversity in new members of the reticulocyte binding protein family in thai *Plasmodium vivax* isolates", *PLoS One* **7** (2012), article no. e32105.
- [60] J. Gruszczyk, N. T. Y. Lim, A. Arnott, W.-Q. He, W. Nguitragool, W. Roobsoong, Y.-F. Mok, J. M. Murphy, K. R. Smith, S. Lee, M. Bahlo, I. Mueller, A. E. Barry, W.-H. Tham, "Structurally conserved erythrocyte-binding domain in *Plasmodium* provides a versatile scaffold for alternate receptor engagement", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113** (2016), p. E191-E200.
- [61] B. Malleret, A. Li, R. Zhang, K. S. W. Tan, R. Suwanarusk, C. Claser, J. S. Cho, E. G. L. Koh, C. S. Chu, S. Pukritayakamee, M. L. Ng, F. Ginhoux, L. G. Ng, C. T. Lim, F. Nosten, G. Snounou, L. Rénia, B. Russell, "*Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes", *Blood* **125** (2015), p. 1314-1324.
- [62] B. Malleret, A. El Sahili, M. Z. Tay, G. Carissimo, A. S. M. Ong, W. Novera, J. Lin, R. Suwanarusk, V. Kosaisavee, T. T. T. Chu, A. Sinha, S. W. Howland, Y. Fan, J. Gruszczyk, W.-H. Tham, Y. Colin, S. Maurer-Stroh, G. Snounou, L. F. P. Ng, J. K. Y. Chan, A.-M. Chacko, J. Lescar, R. Chandramohanadas, F. Nosten, B. Russell, L. Rénia, "*Plasmodium vivax* binds host CD98hc (SLC3A2) to enter immature red blood cells", *Nat. Microbiol.* **6** (2021), p. 991-999.
- [63] P. A. Camargo-Ayala, D. Garzón-Ospina, D. A. Moreno-Pérez, L. A. Ricaurte-Contreras, O. Noya, M. A. Patarroyo, "On the evolution and function of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding surface antigen (pvrbsa)", *Front. Genet.* **9** (2018), article no. 372.
- [64] J.-W. Hang, F. Tukijan, E.-Q.-H. Lee, S. R. Abdeen, Y. Aniweh, B. Malleret, "Zoonotic malaria: non-laverania plasmodium biology and invasion mechanisms", *Pathogens* **10** (2021), article no. 889.
- [65] D. R. Drew, P. R. Sanders, G. Weiss, P. R. Gilson, B. S. Crabb, J. G. Beeson, "Functional conservation of the AMA1 host-cell invasion ligand between *P. falciparum* and *P. vivax*: a novel platform to accelerate vaccine and drug development", *J. Infect. Dis.* **217** (2018), p. 498-507.
- [66] G. Arévalo-Pinzón, M. Bermúdez, H. Curtidor, M. A. Patarroyo, "The *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein 5 is expressed in the apical pole of *Plasmodium vivax* VCG-1 strain schizonts and binds to human reticulocytes", *Malar. J.* **14** (2015), article no. 106.
- [67] G. Arévalo-Pinzón, H. Curtidor, J. Abril, M. A. Patarroyo, "Annotation and characterization of the *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein 4 (PvRON4)", *Malar. J.* **12** (2013), article no. 356.
- [68] J. C. Rayner, T. M. Tran, V. Corredor, C. S. Huber, J. W. Barnwell, M. R. Galinski, "Dramatic difference in diversity between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* reticulocyte binding-like genes", *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72** (2005), p. 666-674.
- [69] M. R. Galinski, C. C. Medina, P. Ingravalló, J. W. Barnwell, "A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites", *Cell* **69** (1992), p. 1213-1226.
- [70] S.-B. Chen, Y. Wang, K. Kassegne, B. Xu, H.-M. Shen, J.-H. Chen, "Whole-genome sequencing of a *Plasmodium vivax* clinical isolate exhibits geographical characteristics and high genetic variation in China-Myanmar border area", *BMC Genom.* **18** (2017), article no. 131.
- [71] S. P. Wertheimer, J. W. Barnwell, "*Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: Identification of a parasite receptor-like protein", *Exp. Parasitol.* **69** (1989), p. 340-350.
- [72] C. E. Chitnis, "Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion", *Curr. Opin. Hematol.* **8** (2001), p. 85-91.
- [73] R. D. Pearson, R. Amato, S. Auburn, O. Miotto, J. Almagro-García, C. Amaratunga, S. Suon, S. Mao, R. Noviyanti, H. Trimarsanto, J. Marfurt, N. M. Anstey, T. William, M. F. Boni, C. Dolecek, T. T. Hien, N. J. White, P. Michon, P. Siba, L. Tavul, G. Harrison, A. Barry, I. Mueller, M. U. Ferreira, N. Karunaweera, M. Randrianarivelojosia, Q. Gao, C. Hubbard, L. Hart, B. Jeffery, E. Drury, D. Mead, M. Kekre, S. Campino, M. Manske, V. J. Cornelius, B. MacInnis, K. A. Rockett, A. Miles, J. C. Rayner, R. M. Fairhurst, F. Nosten, R. N. Price, D. P. Kwiatkowski, "Genomic analysis of local variation and recent evolution in *Plasmodium vivax*", *Nat. Genet.* **48** (2016), p. 959-964.
- [74] D. Menard, E. R. Chan, C. Benedet, A. Ratsimbaoa, S. Kim, P. Chim, C. Do, B. Witkowski, R. Durand, M. Thellier, C. Severini, E. Legrand, L. Musset, B. Y. M. Nour, O. Mercereau-Puijalon, D. Serre, P. A. Zimmerman, "Whole genome se-

- quencing of field isolates reveals a common duplication of the duffy binding protein gene in malagasy *Plasmodium vivax* strains", *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7** (2013), article no. e2489.
- [75] J. B. Hostetler, E. Lo, U. Kanjee, C. Amaratunga, S. Suon, S. Sreng, S. Mao, D. Yewhalaw, A. Mascarenhas, D. P. Kwiatkowski, M. U. Ferreira, P. K. Rathod, G. Yan, R. M. Fairhurst, M. T. Duraisingh, J. C. Rayner, "Independent origin and global distribution of distinct *Plasmodium vivax* duffy binding protein gene duplications", *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10** (2016), article no. e0005091.
- [76] S. Auburn, S. Getachew, R. D. Pearson, R. Amato, O. Miotto, H. Trimarsanto, S. J. Zhu, A. Rumaseb, J. Marfurt, R. Noviyanti, M. J. Grigg, B. Barber, T. William, S. M. Goncalves, E. Drury, K. Sriprawat, N. M. Anstey, F. Nosten, B. Petros, A. Aseffa, G. McVean, D. P. Kwiatkowski, R. N. Price, "Genomic analysis of *Plasmodium vivax* in southern ethiopia reveals selective pressures in multiple parasite mechanisms", *J. Infect. Dis.* **220** (2019), p. 1738-1749.
- [77] L. J. Chan, M. H. Dietrich, W. Nguitragool, W. H. Tham, "*Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes", *Cell. Microbiol.* **22** (2020), article no. e13110.
- [78] B. L. Rice, M. M. Acosta, M. A. Pacheco, J. M. Carlton, J. W. Barnwell, A. A. Escalante, "The origin and diversification of the merozoite surface protein 3 (msp3) multi-gene family in *Plasmodium vivax* and related parasites", *Mol. Phylogenet. Evol.* **78** (2014), p. 172-184.
- [79] B. Wang, F. Lu, Y. Cheng, J.-H. Chen, H.-Y. Jeon, K.-S. Ha, J. Cao, M. H. Nyunt, J.-H. Han, S.-K. Lee, M. P. Kyaw, J. Sattabongkot, E. Takashima, T. Tsuboi, E.-T. Han, "Immunoprofiling of the tryptophan-rich antigen family in *Plasmodium vivax*", *Infect. Immun.* **83** (2015), p. 3083-3095.
- [80] S. V. Siegel, L. Chappell, J. B. Hostetler, C. Amaratunga, S. Suon, U. Böhme, M. Berriman, R. M. Fairhurst, J. C. Rayner, "Analysis of *Plasmodium vivax* schizont transcriptomes from field isolates reveals heterogeneity of expression of genes involved in host-parasite interactions", *Sci. Rep.* **10** (2020), article no. 16667.
- [81] A. Kim, J. Popovici, A. Vantaux, R. Samreth, S. Bin, S. Kim, C. Roesch, L. Liang, H. Davies, P. Felgner, S. Herrera, M. Arévalo-Herrera, D. Ménard, D. Serre, "Characterization of *P. vivax* blood stage transcriptomes from field isolates reveals similarities among infections and complex gene isoforms", *Sci. Rep.* **7** (2017), p. 1-12.
- [82] C. Bourgard, L. Albrecht, A. C. A. V. Kayano, P. Sunnerhagen, F. T. M. Costa, "*Plasmodium vivax* biology: insights provided by genomics, transcriptomics and proteomics", *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8** (2018), article no. 34.
- [83] L. Zhu, S. Mok, M. Imwong, A. Jaidee, B. Russell, F. Nosten, N. P. Day, N. J. White, P. R. Preiser, Z. Bozdech, "New insights into the *Plasmodium vivax* transcriptome using RNA-Seq", *Sci. Rep.* **6** (2016), p. 1-13.
- [84] R. J. Longley, C. T. Franca, M. T. White, C. Kumpitak, P. Sa-Angchai, J. Gruszczyk, J. B. Hostetler, A. Yadava, C. L. King, R. M. Fairhurst, J. C. Rayner, W. H. Tham, W. Nguitragool, J. Sattabongkot, I. Mueller, "Asymptomatic *Plasmodium vivax* infections induce robust IgG responses to multiple blood-stage proteins in a low-transmission region of western Thailand", *Malar. J.* **16** (2017), article no. 178.
- [85] S. Changrob, J. H. Han, K. S. Ha, W. S. Park, S. H. Hong, P. Chootong, E. T. Han, "Immunogenicity of glycosylphosphatidylinositol-anchored micronemal antigen in natural *Plasmodium vivax* exposure", *Malar. J.* **16** (2017), article no. 348.
- [86] D. N. Ndegwa, P. Kundu, J. B. Hostetler, A. Marin-Menendez, T. Sanderson, K. Mwikali, L. H. Verzier, R. Coyle, S. Adjalley, J. C. Rayner, "Using *Plasmodium knowlesi* as a model for screening *Plasmodium vivax* blood-stage malaria vaccine targets reveals new candidates", *PLoS Pathog.* **17** (2021), article no. e1008864.
- [87] G. E. Weiss, P. R. Gilson, T. Taechalertrapaisarn, W.-H. Tham, N. W. M. de Jong, K. L. Harvey, F. J. I. Fowkes, P. N. Barlow, J. C. Rayner, G. J. Wright, A. E. Cowman, B. S. Crabb, "Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during plasmodium falciparum invasion of erythrocytes", *PLoS Pathog.* **11** (2015), article no. e1004670.
- [88] J. Gruszczyk, U. Kanjee, L.-J. Chan, S. Menant, B. Malleret, N. T. Y. Lim, C. Q. Schmidt, Y.-F. Mok, K.-M. Lin, R. D. Pearson, G. Rangel, B. J. Smith, M. J. Call, M. P. Weekes, M. D. W. Griffin, J. M. Murphy, J. Abraham, K. Sriprawat, M. J. Menezes, M. U. Ferreira, B. Russell, L. Renia, M. T. Duraisingh, W.-H. Tham, "Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for *Plasmodium vivax*", *Science* **359** (2018), p. 48-55.
- [89] J. Gruszczyk, R. K. Huang, L.-J. Chan, S. Menant, C. Hong, J. M. Murphy, Y.-F. Mok, M. D. W. Griffin, R. D. Pearson, W. Wong, A. E. Cowman, Z. Yu, W.-H. Tham, "Cryo-EM structure of an essential *Plasmodium vivax* invasion complex", *Nature* **559** (2018), p. 135-139.
- [90] C. Dechavanne, S. Dechavanne, S. Metral, B. Roeper, S. Krishnan, R. Fong, S. Bennett, L. Carias, E. Chen, N. D. Salinas, A. Ghosh, N. H. Tolia, P. G. Woost, J. W. Jacobberger, Y. Colin, B. Gamain, C. L. King, P. A. Zimmerman, "Duffy antigen expression in erythroid bone marrow precursor cells of genotypically duffy negative individuals", 2018, bioRxiv.
- [91] K. E. Swearingen, S. E. Lindner, "Plasmodium parasites viewed through proteomics", *Trends Parasitol.* **34** (2018), p. 945-960.
- [92] L. Mancio-Silva, N. Gural, E. Real, M. H. Wadsworth, 2nd, V. L. Butty, S. March, N. Nerurkar, T. K. Hughes, W. Roobsoong, H. E. Fleming, C. A. Whittaker, S. T. Levine, J. Sattabongkot, A. K. Shalek, S. N. Bhatia, "A single-cell liver atlas of *Plasmodium vivax* infection", *Cell Host Microbe* **30** (2022), p. 1048-1060, e5.
- [93] C. Schafer, W. Roobsoong, N. Kangwanrangsan, M. Bardelli, T. A. Rawlinson, N. Dambrasukas, O. Trakhimets, C. Parthiban, D. Goswami, L. M. Reynolds, S. Y. Kennedy, E. L. Flannery, S. C. Murphy, D. N. Sather, S. J. Draper, J. Sattabongkot, S. A. Mikolajczak, S. H. I. Kappe, "A Humanized mouse model for *Plasmodium vivax* to test interventions that block liver stage to blood stage transition and blood stage infection", *iScience* **23** (2020), article no. 101381.
- [94] C. Luiza-Batista, S. Thiberge, M. Serra-Hassoun, F. Nardella, A. Claës, V. C. Nicolette, P.-H. Commère, L. Mancio-Silva, M. U. Ferreira, A. Scherf, S. Garcia, "Humanized mice for investigating sustained *Plasmodium vivax* blood-stage infections and transmission", *Nat. Commun.* **13** (2022), article no. 4123.