



HAL
open science

Etude des Récepteurs Tyrosine Kinase du parasite helminthe *Schistosoma mansoni* - Découverte des Venus Kinase Récepteurs, une nouvelle famille de RTK

Arnaud Ahier

► **To cite this version:**

Arnaud Ahier. Etude des Récepteurs Tyrosine Kinase du parasite helminthe *Schistosoma mansoni* - Découverte des Venus Kinase Récepteurs, une nouvelle famille de RTK. Biochimie [q-bio.BM]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT : . tel-00348172v2

HAL Id: tel-00348172

<https://theses.hal.science/tel-00348172v2>

Submitted on 19 Dec 2008

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

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

Université du Droit et de la Santé de Lille

N° d'ordre :

THÈSE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II

Discipline Parasitologie - Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Arnaud AHIER

Le 12 Décembre 2008

**Etude des Récepteurs Tyrosine Kinase du parasite
helminthe *Schistosoma mansoni***

-

**Découverte des Récepteurs Venus Kinase, une nouvelle
famille de RTK**



Devant le jury composé de :

Président

Professeur El Moukhtar Aliouat

Rapporteurs

**Docteur Catherine Bourgouin
Docteur Pascale Crépieux**

Examineurs

**Professeur Hubert Hondermarck
Docteur Philippe Rondard
Docteur Jérôme Vicogne
Docteur Colette Dissous**

**INSERM U547 – Université de Lille 2
Institut Pasteur de Lille**

Arnaud AHIER

Biological Sciences Research Applicant

INSERM U547

① + 33 3 20 877 350

Institut Pasteur de Lille

Fax: + 33 3 20 877 888

1, rue du Pr. Calmette, 59019 Lille Cedex, FRANCE

Ahier.Arnaud@laposte.net

• *EDUCATION*

2005-present: Doctorat (PhD) of Biology and Health Sciences, Université Droit et Santé de Lille, France

Research work at INSERM U547 “*Schistosomiasis, Malaria and Inflammation*”

Graduation in December 2008

2004-2005: M2R (Master Degree) of Biology and Health Sciences, Université Droit et Santé de Lille

Research work at INSERM U547 “*Schistosomiasis, Malaria and Inflammation*”

Graduated with first class honors degree - Second place in the doctoral research fellowship competition

2003-2004: D.U (Academic Degree) in Parasite-associated Malacology, Université de Pharmacie de Limoges, France, Honors

Research work at Laboratory of Parasitology (EA3174) de l'Université de Pharmacie de Limoges

2002-2003: Master (MSc) of Cellular and Molecular Biology, Université des Sciences et Technologies de Nantes, France

2001-2002: Master (MSc) of Biology of Populations and Ecosystems, Environment option, Université des Sciences et Technologies de Nantes, France

2000-2001: Licence (BSc) of general Biology, Université des Sciences et Technologies de Nantes, France

1998-2000: DEUG (Bachelor's degree) of Biology, Université des Sciences et Technologies du Mans, France

June 1998: Baccalauréat of Science, biology option, Lycée Bellevue du Mans -France

- *HONORS*

Selected for a doctoral Research fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et Technologies

Selected for a teaching fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et Technologies and the Université Droit et Santé de Lille

- *PROFESSIONAL EXPERIENCES*

Research

2004-present: INSERM U547, director Pr. M. Capron. Research supervisor: Dr. C. Dissous

“Insulin receptors and glucose uptake in the human helminth parasite *Schistosoma mansoni*”

Determination of the expression patterns of both insulin receptors using Real time RT-PCR and by techniques of Western Blot and Immunohistochemistry

Demonstration of the importance of insulin in the regulation of glucose uptake using radiolabeled 2-deoxyglucose in the schistosomula and in the adult worms

Demonstration of the implication of SmIR-1 in the regulation of glucose uptake in schistosomula by RNA interference coupled with glucose uptake assays

3D modeling of Tyrosine Kinase domain of SmIR-1 and SmIR-2

“A new family of receptor tyrosine kinase with a Venus Flytrap binding domain in *Schistosoma mansoni* and other invertebrates”

RNA extraction, RACE PCR, DNA cloning and sequencing of VKR in various invertebrates

Genomes exploration, protein annotation and alignment using various bioinformatics softwares: NCBI BLAST, Prosite/Expasy, SMART, Lasergene pack, MEGA3.1, BioEdit and gene annotation

Phylogenetic studies using Neighbor Joining techniques

Production of a polyclonal serum against VKR in various invertebrates

Determination of the expression patterns of VKR using Real time RT-PCR in various tissues types and various organisms

Construction of catalytic mutants of VKR by site- directed mutagenesis

Expression of VKR in heterologous systems (HEK cells, MDCK cells) and determination of the expression patterns by techniques of Western Blot and Immunohistochemistry

In vitro kinase assays

3D modeling and analyses

2003-2004: Laboratory of Parasitology (EA3174) de l'Université de Pharmacie de Limoges, director Pr. G. Dreyfuss. Research supervisor: Dr. D. Rondelaud

“Influence of glucose on expérimental miracidial infestation of *Galba truncatula* (molluscan) with miracidia of *Fasciola hepatica* (Helminth-Trematoda)”

Mono-miracidial in vitro infestation

Purification of parasite eggs

Breeding of intermediaite molluscan host

Determination and counting of parasite stages

Teaching/Supervision

2005-present Teaching at the Faculté de Médecine de Lille, Teaching supervisor: Pr. E. Aliouat

Parasitology, 4th year of Pharmaceutical Studies: practical work in parasitology (96 H/year).

Introduction to parasitology Diseases of cestods Diseases of trematods Diseases of nematods Diseases of protozoa (Amoeba, trypanosoma, leishmania, plasmodia) Diseases of ectoparasites Mycologic diseases	Functional coprology Dejection analyses Digestifs troubles Parasitic Diseases Experimental infestations with <i>Trypanosoma brucei brucei</i>
--	---

Supervision of students and of their research project

2007-2008: Nadège Gougnard (co-supervision), Master Degree of Biology and Health Sciences

Summer 2006: Anthony Daccache and Jonathan Levebvre, Master (MSc), Université des Sciences de Lille

• *TECHNICAL SKILLS*

- Cloning strategies, plasmidic DNA extraction, RNA extraction using several techniques (Cesium chloride, Trizol and several types of kit), real time RT-PCR, RACE PCR, site directed mutagenesis, DNA sequencing
- Recombinant proteins in eukaryotic and prokaryotic cells, several methods of protein extraction, immunoprecipitation, Western Blot, immunohistochemistry, fluorescence and light microscopy
- Preparation of *S. mansoni* miracidia and cercariae, *in vitro* culture of schistosomula and adult worms
- cell culture and transfection (HEK cells, MDCK Cells)
- Production of double stranded RNA and of SiRNA, RNA interference, kinase assay, metabolic labeling
- Bioinformatic softwares for nucleotide and protein sequence analysis and for phylogenetic studies: NCBI BLAST, Lasergene pack (EditSeq,

MapDraw, MegAlign, Protean, Seqman), Chromas, ABI sequence detection system, Prosite/Expasy, SMART, Primer express, Clustal W, Mega 3.1, BioEdit

- 3D modeling : Accelrys DS Visualizer, RAMP server, consurf server

PUBLICATIONS AND COMMUNICATIONS

- Dissous C, Long T, **Ahier A.** “**A new promising drug against schistosomiasis**”, *Med. & Sci*, 2009, in press.
- **Ahier A.**, Rondard P, Gougnard N, Khayath N, Trolet J, Donogue DJ, Gauthier M, Pin JP, Dissous C “**A new family of receptor tyrosine kinases with a Venus Flytrap binding domain in insects and other invertebrates**”, *PLOS One*, 2009, submitted.
- **Ahier A.**, Khayath N, Vicogne J, Dissous C “**Insulin receptors and glucose uptake in the human parasite *Schistosoma mansoni***”, *Parasite*, 2008, 15, 573-579.
- Dissous C, **Ahier A.**, Khayath N “**Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis**”, *BioEssays*, 2007 Nov; 16;29 (12):1281-1288.
- Khayath N, Vicogne J, **Ahier A.**, BenYounes A, Konrad C, Trolet J, Viscogliosi E, Brehm K, Dissous C “**Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni***”, *Febs J.* 2007 Feb;274(3):659-76.

Ahier A et al. (Oral communications):

- **Ahier A.**, Khayath N, Rondard P, Vicogne J, Gauthier M, Pin JP et Dissous C “**The Venus Kinase Receptors : The discovery of a new Receptor Tyrosine Kinase family (RTK) in invertebrates**”, Oswaldo Cruz Fondation (Fiocruz),: Belo Horizonte, Bresil, 2007.
- **Ahier A.**, Khayath N, Rondard P, Vicogne J, Gauthier M, Pin JP et Dissous C “**The Venus Kinase Receptors : a new family of RTK in insects.**”, The XV Congres of insect Physiology, Agrocampus Rennes, France, 2007.

Ahier A et al. (Posters):

- **Ahier A.**, Khayath N., Rondard P., Trolet J., Vicogne J., Pin J. P. Dissous C. « **Discovery of a new family of Receptor Tyrosine Kinase : The VKR** » Journée André Verbert, Poster, Lille, France, October 2005.

- *COLLABORATIONS*

- **Dr. Philippe Rondard, Research associate**, Fonctionnal Génomic Institut - Dépt. of Molecular Pharmacology CNRS UMR 5203 - INSERM U 661- Universités de Montpellier I & II, France. « Dimerization processes of VKR and VFTM structural analyses ».
- **Dr. Monique Gauthier, Professor**, Centre of Research on Animal Cognition, CNRS - Université Paul Sabatier – Toulouse, France. « *Apis Mellifera* insect Model »
- **Dr. Catherine Bourgouin, Director of Laboratory**, Center of Anopheles Production and Infection –Pasteur Institut of Paris, France. « *Anopheles Gambiae* model »

- *LANGUAGES*

French (natural language), English

- *RESEARCH INTEREST*

I am interested in working in cell signaling in order to dissect biological mechanisms of development of invertebrates

- *REFERENCES*

- **Colette Dissous, PhD**
Research director, INSERM U547
Institut Pasteur de Lille
59019 Lille Cedex, France
☎ +33 3 20 87 73 50
colette.dissous@pasteur-lille.fr
- **Raymond Pierce, PhD**
Research director, INSERM U547
Institut Pasteur de Lille
59019 Lille Cedex, France
☎ +33 3 20 87 77 83
raymond.pierce@pasteur-lille.fr
- **Jerome Vicogne, PhD**
Research assistant, UMR8161 – CNRS,
Institut de Biologie de Lille
Institut Pasteur de Lille, France
59019 Lille Cedex, France
☎ +33 3 20 87 12 49
jerome.vicogne@ibl.fr

Remerciements

Tous mes remerciements vont au Professeur **Monique Capron** qui m'a accueilli dans les laboratoires de l'unité INSERM 547.

Je tiens aussi à remercier Mesdames et Messieurs les membres du jury qui me font l'honneur de juger mes travaux.

Des remerciements particuliers vont à toutes les personnes qui ont enrichi ce parcours doctoral tant au niveau humain, qu'au niveau scientifique et technique.

Je tiens tout particulièrement à remercier tous les membres du groupe « Signalisation, évolution et interaction hôte-parasite » avec qui j'ai vécu ces 4 années, du Master Recherche à la Thèse.

Mes remerciements les plus sincères vont à mes plus proches collaborateurs que sont **Colette Dissous, Naji Khayath, Jacques Trolet** et **Nadège Gougnard**.

A Madame le Docteur **Colette Dissous** – Vous m'avez vraiment fourni un environnement de travail exceptionnel sur le plan scientifique et humain où j'ai appris à aimer la recherche. J'ai toujours été encouragé à proposer et à développer de nouvelles approches. Assis à coté de vous, j'ai pu assister et participer à la démarche intellectuelle qui mène à l'élaboration d'un article scientifique du début à la fin et je dois avouer que cela m'a toujours beaucoup impressionné. Je suis sûrement l'étudiant le moins « biochimiste » que vous ayez eu, mais chaque jour je le deviens un peu plus. Vraiment merci de m'avoir aidé à mener à bien cette Thèse.

A Monsieur le Docteur **Naji Khayath** – Tu m'as vraiment donné beaucoup de ton temps (allant même jusqu'à infiltrer les jury de MNERT) pour me fournir tous « les outils » conceptuels et techniques qui allaient me servir pour développer mes travaux. Il est bien probable que sans ton aide je ne serais pas là aujourd'hui.

Je tiens à te remercier, **Jacques Trolet**, pour ton aide technique vraiment efficace mais surtout pour ta gentillesse.

Je tiens enfin à te remercier, **Nadège Gougnard**, qui est arrivée dans l'équipe à un moment clé et pour avoir bien voulu croire que l'on pouvait rendre un VKR actif à la manière d'un FGFR. Grâce à toi une partie très importante de l'étude a pu être envisagée.

Merci à l'ensemble des membres de l'unité 547 avec qui j'ai vécu cette aventure.

TABLE DES MATIERES

CADRE DU TRAVAIL, COLLABORATIONS ET FINANCEMENT	11
ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION.....	16
I- SCHISTOSOME ET SCHISTOSOMIASE.....	16
1. GENERALITES.....	16
2. BIOLOGIE, CYCLE DE VIE ET TRANSMISSION.....	17
3. CONTROLE DE LA TRANSMISSION.....	19
a) <i>Contrôle des populations de mollusques.....</i>	<i>19</i>
b) <i>Contrôle de la maladie.....</i>	<i>20</i>
• Le praziquantel (PZQ).....	20
• Les stratégies vaccinales.....	22
4. SCHISTOSOME ET RELATION HOTE-PARASITE : BASES DE L'ETUDE ET ENJEUX DU LABORATOIRE.....	22
II- PROTEINES KINASES ET SIGNALISATION.....	26
1. CLASSIFICATION DES PROTEINES KINASES.....	26
2. DIVERSITE ET CONSERVATION DES KINOMES D'ORGANISMES MODELES.....	27
3. LE GROUPE DES TK.....	29
a) <i>Les NRTK (Planche 8-Figure 1).....</i>	<i>29</i>
b) <i>Les RTK.....</i>	<i>30</i>
4. LE DOMAINE CATALYTIQUE DES KINASES : STRUCTURE ET MECANISMES D'ACTIVATION.....	32
a) <i>Structure.....</i>	<i>32</i>
b) <i>Mécanismes d'activation.....</i>	<i>33</i>
c) <i>Voies de signalisation transduites par les RTK.....</i>	<i>34</i>
III- LES KINASES DE SCHISTOSOME.....	36
1. LES S/T KINASES.....	36
a) <i>Le récepteur au TGF-β, ligand et voies de signalisations associées chez S. mansoni.....</i>	<i>36</i>
b) <i>SmSlk, une Ste20-like kinase de S. mansoni.....</i>	<i>37</i>
2. LES TK.....	37
a) <i>Les CTK ou TK cytoplasmiques.....</i>	<i>37</i>
3. LES RTK.....	38
a) <i>SER : Le récepteur de l'EGF de S. mansoni.....</i>	<i>38</i>
b) <i>SmIR-1 et SmIR-2 : les récepteurs de l'insuline de S. mansoni.....</i>	<i>39</i>
IV- DE LA DECOUVERTE DE SMRTK-1 CHEZ LE SCHISTOSOME A CELLE D'UNE NOUVELLE FAMILLE DE RTK.....	42
1. SMRTK-1 : UN RTK ATYPIQUE CHEZ S. MANSONI.....	42
2. INTRODUCTION A L'ANALYSE DES VKR.....	43
a) <i>Partie extracellulaire du récepteur et ligand potentiel du VKR.....</i>	<i>43</i>
b) <i>Le mode d'activation du VKR.....</i>	<i>44</i>
c) <i>Les voies de signalisation associées au VKR.....</i>	<i>44</i>
V- LES RTK COMME CIBLES THERAPEUTIQUES.....	46
1. RTK ET PROCESSUS PATHOLOGIQUES.....	46
2. STRATEGIES DE CIBLAGE DES RTK.....	47
VI- OBJECTIFS DE L'ETUDE	48
PLANCHES DES FIGURES LIEES AU CHAPITRE INTRODUCTIF.....	49
RESULTATS.....	60
I- LES RTK DE SCHISTOSOME COMME FUTURES CIBLES THERAPEUTIQUES.....	60

II- DE L'ETUDE D'UN RTK ATYPIQUE CHEZ LE SCHISTOSOME A LA DECOUVERTE D'UNE NOUVELLE FAMILLE DE RTK CHEZ LES INVERTEBRES.	63
III- APPROCHE FONCTIONNELLE DES VKR : STRATEGIES COMPLEMENTAIRES ET PERSPECTIVES.	65
1. ETUDE DE AMVKR DANS LE MODELE <i>APIS MELLIFERA</i>	65
a) <i>Elaboration d'un sérum polyclonal YSARVA dirigé contre les VKR d'Apis mellifera (AmVKR) et de Tribolium castaneum (TcVKR)</i>	65
b) <i>Expression du gène Amvkr</i>	68
c) <i>ARN Interférence</i>	69
2. EXPRESSION ET FONCTION DE AMVKR EN CELLULES DE MAMMIFERE.....	70
a) <i>Recherche de l'activation des voies Ras/MAPK</i>	70
b) <i>Recherche d'une séquence de rétention chez les VKR</i>	75
c) <i>Recherche d'autres voies de signalisation possibles</i>	77
d) <i>La réalisation d'une chimère GABABR1-AmVKR</i>	78
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES.....	82
I- INVERTEBRES D'INTERET MEDICAL, BIOLOGIE COMPARATIVE ET GENOMIQUE FONCTIONNELLE.	82
II- QUELLE PEUT ETRE L'IMPORTANCE DES VKR DANS LA BIOLOGIE DES INVERTEBRES ?	85
1. L'EVOLUTION DES VKR	85
2. L'EXPLORATION DE LA FONCTION BIOLOGIQUE DES VKR	89
III- PEUT-ON REELLEMENT ENVISAGER DE CIBLER LES RTK DE SCHISTOSOME ?.....	92
BILAN GLOBAL.....	94
ANNEXES	95
• Récapitulatif des séquences protéiques et numéros d'accèsion Genbank des différents VKR découverts ..	95
• Genbank accession numbers of receptors used in phylogenetic analyses	Erreur ! Signet non défini.
BIBLIOGRAPHIE.....	97

Cadre du travail, collaborations et financement

Laboratoire d'accueil :

Ce travail de doctorat a été réalisé à l'Institut Pasteur de Lille, au sein de l'unité INSERM 547 « Schistosomiase, Paludisme et Inflammation » dirigée par Madame le Pr. Monique Capron. Il a été effectué sous la direction du Dr. Colette Dissous dans le groupe de recherche « Signalisation, Evolution et Interaction Hôte-Parasite ».

L'étude des relations hôte-parasite chez le modèle platheminthe *Schistosoma mansoni*, a toujours été le fil conducteur de l'unité 547 INSERM. Une partie des travaux réalisés au laboratoire est centrée sur l'analyse des mécanismes effecteurs et régulateurs de l'immunité innée et adaptative dans le contexte de la schistosomiase, du paludisme et au cours de différentes pathologies inflammatoires et allergiques. Certains de ces travaux ont notamment conduit à l'élaboration d'une stratégie vaccinale contre la schistosomiase. Actuellement, la Sh28GST (Glutathion S-Transférase de 28 kDa de *S. haematobium*) constitue le candidat vaccin le plus encourageant et vient de franchir les essais cliniques de phase III.

Les travaux de notre groupe ont été orientés d'une manière plus générale vers l'étude de la relation hôte-parasite et les mécanismes impliqués dans le développement du schistosome. Depuis quelques années, nous avons entrepris la caractérisation moléculaire des récepteurs tyrosine kinase.

Le sujet, tel qu'il a été mené durant cette Thèse, nous a conduit à considérer d'autres organismes invertébrés, en plus du schistosome. L'établissement de collaborations avec des spécialistes du modèle insecte et des RCPG de classe 3 a été nécessaire pour mener à bien l'étude.

Collaborations :

- **Pr. Monique Gauthier, Professeur** des universités à la faculté de Paul Sabatier de Toulouse - Centre de Recherches sur la Cognition Animale - CNRS - Université Paul Sabatier.

Manipulations biologiques du modèle Apis mellifera (Matériel biologique, ARN interférence, Immunolocalisation, extraction d'ARN ...)

- **Dr. Jean-Philippe Pin, DR1 CNRS**, Institut de Génomique Fonctionnelle - Dépt. de Pharmacologie moléculaire CNRS UMR 5203 - INSERM U 661- Universités de Montpellier I & II.
- **Dr. Philippe Rondard, CR1 CNRS**, Institut de Génomique Fonctionnelle - Dépt. de Pharmacologie moléculaire CNRS UMR 5203 - INSERM U 661- Universités de Montpellier I & II,

Etude de la dimérisation des récepteurs et analyses structurales du domaine Venus Flytrap.

- **Dr. Catherine Bourgouin**, Directeur du Centre de Production et d'Infection des Anophèles (CEPIA) –Pasteur Institut of Paris, France.

Manipulations biologiques du modèle Anopheles gambiae (dissections, extractions ARN)

Financements :

Ces trois années de thèse ont été financées par le Ministère de la Recherche et de la Technologie, ainsi que par l'Université de Lille II dans le cadre du monitorat.

Ce projet a été soutenu en 2006, 2007 et 2008 par le programme de coopération INSERM-FIOCRUZ, ce qui m'a permis de rencontrer l'équipe du Dr Guilherme Oliveira au Centro de Pesquisas Rene *Rachou*, Belo Horizonte, Brésil et avoir accès aux dernières données génomiques de *Schistosoma mansoni*.

Abréviations

2-DOG ³H	2-désoxyglucose tritié
ANF	Atrial Natriuretic Factor
AP-1	Activating protein-1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri-phosphate
CaSR	Ca ⁺ Sensing Receptor
CMV	Cyto Megalo Virus
CTK	Cytosolic Tyrosine Kinase
dsRNA	double strand RNA
EGF	Epidermal Growth Factor
ePK	Eucaryotic Protein Kinase
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
EST	Expressed Sequence Tag
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GABA	Gamma Amino Butyric Acid
RCPG	Recepteur Couplé aux protéines G
GST	Gluthation S-Transférase
GTP	Guanosine tri-phosphate
HEK293	Human Embryonic Kidney 293
IGF	Insulin Growth Factor
IGF1-R	Insulin Growth Factor-1 Receptor (in vertebrates)
Ig-like	Immunoglobulin-like
iGluR	Ionotopic Glutamate Receptor
IR	Insulin Receptor (terme général pour tous les types d'IR)
LBD	Ligand Binding Domain (of IR)
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
mGluR	Metabotropic Glutamate Receptor
mTOR	mammalian Target of Rapamycin

NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NRTK	Non Receptor Tyrosine Kinase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBP	Periplasmic Binding Protein
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase
PKB/Akt	Protéine Kinase B
PKI	Protein Kinase Inhibitor
PZQ	Praziquantel
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SER	Schistosoma EGF Receptor
SGTP	Schistosoma Glucose Transporter
SH2	Src Homology-2
SHC	Src Homology Collagen
SiRNA	Small interfering RNA
SmIR	<i>S. mansoni</i> Insulin Receptor
SmRTK1	<i>S. mansoni</i> Receptor Tyrosine Kinase
SOS	Son of Sevenless
TDII	Thanatophoric dysplasia (Type II)
TGFb	Transforming Growth Factor β
TK	Tyrosine Kinase
TM	Trans Membrane
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VFTM	Venus Fly Trap Module

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I- SCHISTOSOME ET SCHISTOSOMIASE.

1. Généralités.

La schistosomiase ou bilharziose a été pour la première fois décrite en Egypte, en 1852, par le parasitologiste allemand, Theodor Bilharz lors de la construction du Canal de Suez. La schistosomiase est causée par un helminthe trématode sanguin du genre *Schistosoma*. Cinq espèces de schistosomes sont connues pour infecter l'homme : *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* et *S. haematobium*. Les quatre premières espèces sont associées à des atteintes hépatiques chroniques et fibroses intestinales en raison de la localisation des schistosomes adultes au niveau des veines mésentériques supérieures (*S. mansoni*), inférieures ou encore hémorroïdales (*S. japonicum*). *S. haematobium* provoque des fibroses pouvant aller jusqu'à la calcification du tractus urinaire en raison de sa localisation au niveau des veines drainant l'urètre et du plexus vésical.

Les schistosomiasés ou bilharziosés sont des maladies parasitaires concernant plus de 600 millions de personnes à travers 79 pays tropicaux et sub-tropicaux. On estime que 120 millions de personnes présentent tous les symptômes chroniques et que 20 millions développent les troubles sévères de la maladie (Chitsulo et al. 2000).

En plus d'être la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme, la schistosomiase est la plus importante helminthiase humaine en terme de morbidité et de mortalité et impose un impact socio-économique certain sur de nombreux pays émergents concernés (Fenwick et al. 2006).

S. mansoni est endémique de l'Afrique sub-saharienne, du Nord-Est du Brésil, du Surinam, du Venezuela, des îles Caraïbes, de l'Egypte ou encore de la péninsule Arabique. *S. haematobium* reste circonscrite au niveau du continent africain au niveau de l'Afrique sub-saharienne, de la vallée du Nil égyptienne, du Soudan, du Maghreb et aussi de la péninsule Arabique. *S. japonicum* est endémique de l'Asie du Sud-Est avec la Chine et quelques îles des Philippines et de l'Indonésie. *S. mekongi* est présent au niveau du Bassin du Mekong au Laos et Cambodge. Enfin *S. intercalatum* est rencontré très localement au niveau de l'Ouest et du Centre de l'Afrique (McManus and Loukas 2008) (**Planche 1 –Figure 2**).

2. Biologie, cycle de vie et transmission.

Le schistosome possède un cycle de développement complexe durant lequel il évolue selon plusieurs stades distincts à travers deux hôtes successifs: un mammifère et un mollusque. Le mammifère est défini comme étant l'hôte définitif puisqu'il héberge les formes adultes et sexuées du parasite. Cet hôte peut être un primate (singe, homme) ou également un rongeur dans le cas de *S. mansoni* ou encore un animal domestique (canidé, suidé ou bovidé) dans le cas de *S. japonicum* pour lequel le bétail constitue un réservoir important. Le mollusque, qui est l'hôte intermédiaire hébergeant les formes asexuées du parasite, est très spécifique de l'espèce de schistosome (*S. mansoni* infecte *Biomphalaria sp.*, *S. haematobium* et *S. intercalatum* infectent *Bulinus sp.*, *S. japonicum* infecte *Oncomelania sp.*, et *S. mekongi* infecte *Neotricula sp.*).

Ce cycle de vie du schistosome est ici décrit à partir du stade cercaire, qui est le stade infestant pour l'hôte définitif, en l'occurrence l'homme (**Planche 1 –Figure 1**).

La cercaire ou furcocercaire (**Planche 2-Figure 3**) est libérée à intervalles réguliers par le mollusque infesté et nage de manière active en eau douce. La cercaire est composée d'une tête qui donnera le futur jeune schistosome ou schistosomule et d'une queue bifide qui sera perdue lors de sa pénétration active au travers de la peau de l'hôte. La cercaire dispose d'un arsenal d'enzymes protéolytiques à son extrémité apicale lui permettant de perforer très rapidement (en quelques minutes) la peau de l'hôte.

Les cercaires ayant pénétré évoluent très vite en schistosomules (**Planche 2-Figure 4**) qui gagnent l'appareil circulatoire par l'intermédiaire des capillaires et du système lymphatique, et se dirigent, après quelques jours dans les poumons, vers le système porte hépatique puis les veines mésentériques (dans le cas de *S. mansoni*), dans lesquelles ils se développent en schistosomes adultes à sexes séparés (gonochorisme) et à très fort dimorphisme sexuel (**Planche 3-Figure 1**). Le caractère gonochorique du schistosome est unique au sein des plathelminthes. Les schistosomes adultes ont un corps pouvant varier de 7 à 20 mm avec deux ventouses terminales (buccale et ventrale), un tégument bordé par une membrane heptalaminée, un tractus digestif aveugle et des organes reproducteurs. Le dimorphisme sexuel des schistosomes s'illustre par la forme très caractéristique du ver adulte mâle qui dispose d'un canal gynécophore lui permettant de maintenir le ver femelle (plus long et plus fin) en permanence. Cette configuration particulière permet au couple de schistosomes d'être

en accouplement permanent et assure à la femelle la capacité de pondre continuellement un grand nombre d'œufs. La production des œufs commence environ 4 à 6 semaines après l'infestation et dure tout au long de la vie du parasite qui peut habituellement durer une dizaine d'année. Une femelle peut pondre plusieurs centaines (*S. mansoni*, *S. haematobium*, et *S. intercalatum*) voir plusieurs milliers d'œufs (*S. japonicum* et *S. mekongi*) par jour (Loker 1983). Les œufs sont pondus dans la lumière des veines où réside le couple de schistosomes et se retrouvent donc dans le circuit sanguin. Les œufs sont pourvus d'un éperon dont la position est spécifique de chaque espèce de schistosome) (**Planche 2-Figure 1**) qui va leur permettre de s'infiltrer et de traverser les tissus de l'hôte. Ainsi dans le cas de *S. mansoni*, la grande majorité des œufs pondus au niveau des capillaires mésentériques va « forcer » les tissus pour se retrouver dans le tube digestif pour ensuite être expulsée dans les selles. Dans le cas de *S. haematobium*, les œufs pondus au voisinage du tractus urinaire traversent les tissus de la vessie pour se retrouver dans les urines. Pour cette raison *S. haematobium* a été le premier schistosome suspecté, déjà depuis l'antiquité, en raison de la détection facile des œufs dans les urines et de l'hématurie provoquée par leur passage.

Les œufs éliminés dans les fèces éclosent au contact de l'eau douce pour donner naissance à des larves ciliées ou miracidiums (**Planche 2-Figure 2**) qui seront en mesure de détecter et de pénétrer le tégument d'un mollusque hôte intermédiaire. Dans le cas de *S. mansoni*, l'hôte intermédiaire est un mollusque d'eau douce, pulmoné, appelé *Biomphalaria glabrata*.

Chaque miracidium entame la phase de reproduction asexuée du parasite et se transforme en sporocyste primaire qui se différencie ensuite en centaines de sporocystes secondaires ou filles à l'origine de plusieurs milliers de cercaires évacuées dans l'environnement (Ross et al. 2001).

Les vers ne sont pas par eux-mêmes responsables de la maladie. La pathologie bilharzienne est liée à la présence des centaines d'œufs pondus chaque jour par la femelle adulte et qui se retrouvent piégés dans les tissus de l'hôte définitif et en particulier dans le foie (**Planche 4-Figure 2, 3**). En effet, les œufs pondus au niveau des veines mésentériques, particulièrement pour *S. mansoni* sont inévitablement entraînés par la circulation sanguine en direction du foie. Chaque œuf coincé dans le tissu hépatique entraîne une réaction inflammatoire intense qui ne parvient pas à éliminer ce corps étranger et aboutit à la formation d'un granulome qui séquestre l'œuf et coupe tout contact avec les tissus de l'hôte. Au cours de l'infestation continue par le schistosome, la multiplication des granulomes mène à la fibrose hépatique, déterminant ainsi une occlusion vasculaire qui est à l'origine de l'hépto-splénomégalie

rencontrée chez les patients atteints de cette maladie (**Planche 4-Figure 1**). Le tableau clinique, lié à l'intensité de l'infestation, regroupe généralement asthénie, prurit, urticaire, dysenterie et quelques fois lésions rénales, voire plus rarement manifestations neurologiques. La fibrose généralisée du foie provoque une hypertension artérielle responsable de varices oesophagiennes. La schistosomiase est avant tout une maladie chronique débilitante, mais il peut arriver que la mort survienne suite à la rupture de ces varices qui entraînent des hémorragies (King et al. 2006).

3. Contrôle de la transmission.

La schistosomiase est un problème grave de santé publique en particulier en Afrique subsaharienne où environ 85% des cas sont retrouvés. Comme toute maladie parasitaire, la schistosomiase est sous-jacente à des problèmes sans précédent d'hygiène, d'assainissement et d'éducation sanitaire qui sont le lot quotidien des pays les plus pauvres du globe. Les groupes à haut risque sont principalement les enfants d'âge scolaire et adolescents, mais également les membres de professions impliquant un contact avec les eaux infestées (pêcheurs, agriculteurs ...) ainsi que les femmes dans leurs tâches domestiques (Gryseels et al. 2006).

Il est évident que dans les zones d'endémie importante, le traitement anti-parasitaire utilisé seul, lorsqu'il est véritablement entrepris, n'a aucun effet durable sur les populations qui se réinfestent inlassablement au contact des eaux contaminées (Fenwick et al. 2006). Divers programmes de lutte intégrée prenant en compte l'amélioration de l'assainissement et de l'accès à l'eau salubre ainsi que l'éducation pour la santé n'ont jamais vraiment pu être pleinement appliqués dans les zones les plus nécessiteuses. Cela en raison de défaut de moyens de communication, de faibles moyens mis en œuvre ou encore des priorités politiques qui, on le comprend bien, s'occupent de problèmes encore plus graves. Seuls quelques pays endémiques plus aisés arrivent à tirer des bénéfices durables de ce genre de campagne comme par exemple l'Arabie Saoudite (al-Madani 1990).

a) Contrôle des populations de mollusques

Diverses stratégies environnementales ont été pensées et entreprises pour tenter d'influer sur la schistosomiase en agissant sur le mollusque hôte intermédiaire (Li et al. 2007). On sait en effet que les modifications environnementales liées au milieu de vie du mollusque (qui vit en

général au niveau de la végétation bordant les rives à l'interface eau-terre) peuvent avoir une influence sur les populations de mollusques. Ainsi la construction du barrage de Diama sur le fleuve du Sénégal a déplacé les populations de *B. glabrata* et par la même occasion introduit *S. mansoni* en Mauritanie et au Sénégal. De la même manière, le barrage d'Aswan en Egypte, semblerait avoir fortement diminué les infestations à *S. haematobium* au détriment de l'installation de *S. mansoni* au Nord du pays. Les divers moyens de lutte contre les mollusques employés, tels que l'utilisation massive de mollusquicides (Dai et al. 2008), l'assèchement des marécages, le bétonnage des canaux d'irrigation, l'élimination de la flore dont se nourrit l'hôte intermédiaire, le déploiement de prédateurs des mollusques ou de compétiteurs pour la même niche écologique (Coelho et al. 2008) *etc*, n'ont jamais vraiment donné de résultats satisfaisants (McManus and Loukas 2008). Ces échecs sont principalement dus à des coûts quelquefois démesurés, des impacts environnementaux désastreux et surtout aux capacités d'adaptation souvent sous-estimées des mollusques qui sont capables de recoloniser un écosystème récemment asséché ou encore dans une certaine mesure de s'adapter à la pollution humaine, voire même de tirer profit de la matière organique qu'elle génère (Teles 2005).

b) Contrôle de la maladie

- *Le praziquantel (PZQ)*

L'arsenal thérapeutique utilisé à ce jour pour lutter contre la schistosomiase se limite à une seule et unique molécule hautement efficace et très bien tolérée, à savoir le Praziquantel (Biltricide® (Bayer)) (Fenwick et al. 2006) (**Planche 4-Figure 4, 5**). Cette drogue connue à l'origine pour être un anxiolytique a commencé à être appliquée en parasitologie au milieu des années 70, un peu par hasard, pour être très rapidement reconnue indispensable par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) dans la lutte contre la schistosomiase. On peut citer d'autres drogues autrefois utilisées telles que l'antimoine, l'Oltipraz®, le Métrifonate® (Bayer), l'Oxamniquine® (Pfizer) présentant la plupart du temps trop d'effets secondaires non négligeables mais aussi des coûts de production trop importants associés à des spectres d'activité limités. Seul le PZQ est actif sur toutes les espèces de schistosomes et peut même être étendu à la lutte contre les distomatoses (douve hépatiques, intestinales et pulmonaires) et les cestodoses (*Taenia sp.* *Echinococcus sp.*). Le coût du traitement au PZQ a été ramené à moins de 25 centimes de dollar US pour l'adulte, et il est encore moindre pour l'enfant.

Le PZQ est une pyrazinoisoquinoline qui a un effet quasiment immédiat sur le ver en provoquant un violent influx calcique dans le tégument et les muscles sous-jacents, déclenchant de violentes contractions musculaires, la paralysie et la rupture du tégument. Les parasites se détachent finalement de la paroi des vaisseaux sanguins et sont progressivement dégradés par le système immunitaire.

Le PZQ présente néanmoins quelques failles qui pourraient bien un jour créer des résistances chez les schistosomes et donc le rendre inefficace.

En effet, Le PZQ ne prévient aucunement la réinfestation qui ressurgit généralement 6 à 8 mois après traitement pour les populations restant au contact des eaux contaminées (King et al. 2006).

Le PZQ n'est pas actif sur les formes larvaires de schistosome (Botros et al. 2005a) et peut donc éliminer des vers adultes déjà installés dans l'organisme tout en ignorant les schistosomules qui sont en train d'effectuer la migration vers les veines mésentériques.

Le mécanisme d'action précis du PZQ n'est pas vraiment connu (Jeziorski and Greenberg 2006) comme d'ailleurs c'est le cas d'un grand nombre de molécules tranquillisantes et anxiolytiques (ce qui dans l'absolu n'est pas un problème dès l'instant où la molécule est efficace) mais qui peut entraver l'optimisation de la molécule par l'industrie pharmaceutique.

Le PZQ est la plupart du temps utilisé de manière totalement inadaptée sans véritable stratégie. Ainsi en Afrique subsaharienne seuls 4 millions d'enfants, soit uniquement 3% de la population africaine à traiter, ont accès au PZQ.

Enfin le PZQ est utilisé en monothérapie. Or il est admis que les stratégies de lutte anti-parasitaire basées sur des approches monothérapeutiques sont rapidement dépassées. Cela a pu être observé dans le cadre de la lutte contre le paludisme, par exemple à Madagascar où la chloroquine, utilisée en monothérapie et en première ligne depuis soixante ans n'a plus aucun effet (Randrianarivelosia et al. 2000, Randrianarivelosia et al. 2006).

Même si actuellement aucune souche de schistosome résistante au PZQ n'a clairement été décrite, des baisses de susceptibilité à la drogue ont été rapportées aussi bien *in vitro* que sur le terrain (Doenhoff et al. 2002, Botros et al. 2005b). Face à la crainte de l'apparition d'une résistance au PZQ, la recherche et le développement de nouveaux composés actifs contre les schistosomes deviennent une nécessité encouragée par l'OMS.

Certaines nouvelles drogues pourraient être des alternatives séduisantes ou complémentaires au PZQ. C'est le cas de l'artemether (**Planche 4-Figure 6**), un dérivé semi-synthétique de l'artémisinine, qui est actif contre les formes immatures de schistosome dans l'hôte définitif (Keiser and Utzinger 2007). Le mécanisme d'action de l'artemether reste peu connu, si ce n'est que l'ouverture du pont endoperoxyde de la molécule entraîne la production de radicaux libres à l'origine de perturbations cellulaires pour le parasite. Cependant, l'artemether est déjà utilisé dans le cadre de la lutte contre le paludisme dans des conditions bien contrôlées et son utilisation contre le schistosome n'est pas encore d'actualité.

- *Les stratégies vaccinales*

La découverte d'un vaccin pourrait présenter une nouvelle alternative aux méthodes actuelles basées essentiellement sur la chimiothérapie. Divers candidats vaccinaux ont été testés au cours des dernières années, à savoir la glutathione S-transférase 28 (Sm28-GST) par notre laboratoire (Capron et al, 2005), la paramyosine, l'Ir-V5 (un homologue de la myosine), la triosephosphate isomerase, ou encore la Sm14-FABP (Fatty Acid- Binding. Protein), mais aucun n'est parvenu à prévenir l'infestation et l'installation du parasite (Mcmanus & Loukas, 2008). Néanmoins, le candidat vaccinal Sm28-GST produit sous le nom de BILHVAX et mis au point dans notre laboratoire, constitue un vaccin thérapeutique prometteur contre le schistosome. En effet, BILHVAX diminue de manière significative la fécondité du ver adulte femelle et la viabilité des œufs responsable des signes cliniques de la schistosomiase. Le BILHVAX est à ce jour le seul candidat vaccinal contre le schistosome en phase III d'essai clinique (Capron et al. 2005).

4. Schistosome et relation hôte-parasite : bases de l'étude et enjeux du laboratoire.

Le développement de nouvelles stratégies vaccinales et chimiothérapeutiques réside dans l'identification de nouveaux antigènes ou de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques du schistosome. La taille du génome de schistosome est estimée à environ 280 Mb pour environ 20 000 gènes. Les récentes avancées sur le séquençage (LoVerde et al. 2004) et l'annotation du génome couplé à la transcriptomique (Verjovski-Almeida et al. 2003) et protéomique (Liu et al. 2008) du schistosome permettent d'aborder la biologie moléculaire du parasite avec de

nouveaux horizons. Voici donc les enjeux actuels de la recherche biomoléculaire sur les schistosomes.

Dans ce cadre, notre équipe s'est progressivement intéressée aux phénomènes clés de la survie du parasite *S. mansoni* à savoir le développement, la croissance et surtout la reproduction. En effet la reproduction du schistosome est un point crucial pour le contrôle du parasite qui pond énormément et les processus moléculaires menant à la fertilité démesurée du ver adulte femelle sont très peu connus.

De nombreuses évidences scientifiques ont montré depuis très longtemps que l'hôte définitif et le parasite influent l'un sur l'autre réciproquement. Il est donc apparu évident que l'étude du dialogue moléculaire hôte-parasite pouvait aider à décrypter les modalités de développement du parasite. De nombreux travaux ont montré que diverses hormones et facteurs de croissance de l'hôte avaient un effet sur l'infestation parasitaire.

Les hormones sexuelles stéroïdes - Il est clairement établi que le statut hormonal du mammifère hôte définitif influe sur la schistosomiase. Ainsi aussi bien chez l'homme que chez la souris, les jeunes individus (avant la puberté) et les individus femelles développent des schistosomiasis plus sévères que les individus mâles (Nakazawa et al. 1997). Les modalités exactes d'action de ces hormones ne sont pas connues mais de nombreux faits intéressants ont pu être observés *in vivo*. Il semblerait que la testostérone joue un rôle crucial dans l'établissement de la schistosomiase puisque son ajout à des souris femelles diminue l'intensité de l'infection et sa privation par castration chez les mâles augmente l'intensité de l'infection. De plus, la DHEA (Déhydroépiandrostérone), une autre hormone stéroïdienne, pourrait avoir les mêmes effets que la testostérone (Fallon et al. 1998).

Cependant ces observations *in vivo* manquent d'évidences moléculaires. Les effets de ces hormones sexuelles testées *in vitro* montrent des résultats contradictoires et à ce jour un seul récepteur stéroïdien (à l'androstane) a été découvert chez le schistosome (Hu et al. 2006). Ces hormones agiraient-elles directement sur le parasite ou sur le parasite par l'intermédiaire de l'hôte mammifère, en modulant la réponse immune ?

Les hormones thyroïdiennes - Elles semblent également jouer un rôle dans le développement parasitaire puisque chez des souris hypothyroïdiennes les parasites se développent plus lentement, sont de taille diminuée et la fécondité du ver femelle est

également diminuée (Wahab et al. 1971). Le phénomène inverse se produit dans le cas d'une infection de souris hyperthyroïdiennes (Knopf and Linden 1985). Cependant comme pour les hormones sexuelles stéroïdes, ces évidences *in vivo* peinent à être complétées d'évidences moléculaires. A ce jour seulement deux molécules homologues aux récepteurs aux hormones thyroïdiennes ont été décrites *in silico* (Wu et al. 2006). Ces hormones agiraient-elles directement sur le parasite ou sur le parasite par l'intermédiaire de l'hôte mammifère, en modulant le métabolisme de l'hôte?

Les cytokines - Le rôle de certaines cytokines a clairement été montré *in vivo*. Le TNF α a un effet positif sur la fécondité des vers adultes femelles puisqu'il augmente la ponte de manière dose dépendante (Amiri et al. 1992). De plus, des souris SCID (dépourvues de lymphocytes) infestées par le schistosome, présentent une réduction nette du nombre d'œufs hépatiques alors que la charge parasitaire reste élevée. L'interleukine 7 (IL-7) semble aussi avoir un effet positif sur le parasite (Wolowczuk et al. 1999b, Wolowczuk et al. 1999a). L'administration intradermique d'IL-7 la veille de l'infestation, conduit à une augmentation significative de la charge parasitaire sans modification notable de la réponse humorale. Inversement, dans le cas d'infestation chez des souris déficientes pour l'expression de l'IL-7, la charge parasitaire est diminuée. De plus, on peut souligner que ces vers sont de taille réduite (phénotype « dwarf »). Cependant l'hypothèse d'une action directe de l'IL-7 sur le parasite n'a pas été démontrée.

Les facteurs de croissance - L'insuline est le facteur de croissance dont l'effet sur le parasite est le plus controversé. Les différentes expériences réalisées *in vitro* sur le schistosome sont relativement anciennes et considèrent de nombreux paramètres différents. Ceci est peut être à l'origine de la contradiction des résultats décrits. D'un côté il a été montré qu'en présence d'insuline le parasite résistait mieux aux anticorps et au complément (Levi-Schaffer and Smolarsky 1981), qu'il augmentait sa consommation d'oxygène (Cornford 1974) et qu'il tendait à vivre plus longtemps (Basch and Humbert 1981). Dans un second temps des expériences complémentaires ont conclu à une indépendance du parasite vis-à-vis du glucose avec une incapacité de l'insuline de vertébrés à se fixer sur des extraits parasitaires (Clemens and Basch 1989a). Quelques résultats *in vivo* obtenus chez des souris traitées par de l'insuline porcine indiquent que la charge parasitaire est plus élevée avec des vers de taille plus grande (Saule et al. 2005). Au laboratoire, des récepteurs de l'insuline (IR), SmIR-1 et SmIR-2, ont été découverts et caractérisés et leur interaction avec la pro-insuline humaine a été prouvée.

Les résultats exposés dans ce mémoire apportent des nouvelles données en faveur d'une implication de l'insuline humaine dans la régulation de la prise de glucose par le parasite.

D'autres facteurs de croissance ont aussi un impact sur le parasite. Des études montrent que chez le schistosomule, le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor), ont un effet net sur la croissance et l'incorporation de thymidine tritiée alors que le FGF (Fibroblast Growth Factor) ne stimulerait pas le développement du parasite (Clemens and Basch 1989b). Par la suite le récepteur de l'EGF de *S. mansoni* a été cloné (Shoemaker et al. 1992) et au laboratoire nous nous sommes intéressés à l'effet de l'EGF humain sur les sporocystes *in vitro* démontrant une stimulation de la synthèse d'ADN et de protéines (Vicogne *et al*, 2004).

De manière générale, les hormones et facteurs de croissance sont des molécules messagères qui agissent sur un type cellulaire donné pour réguler des mécanismes cellulaires variés (division, différenciation, et prolifération cellulaire ...). A l'échelle d'un organisme, ce sont des phénomènes clés pour la survie tels que le développement, la croissance ou encore la reproduction qui seront modulés.

Les différents exemples de « détournement » des hormones et facteurs de croissance de l'hôte par le parasite suggèrent fortement que le parasite possède un réseau de voies de signalisation fortement conservé, proche de celui de l'hôte, en mesure d'utiliser ses propres molécules (Dissous et al. 2006).

Or il est admis que la plupart de ces voies de signalisation s'articulent autour de protéines capables de phosphoryler des substrats pour réaliser des cascades de phosphorylation. Ces protéines sont appelées kinases.

Sur ces constatations, notre équipe a commencé à s'intéresser progressivement aux protéines kinases du parasite *S. mansoni*. L'attention du laboratoire se porte plus particulièrement sur les Récepteurs à activité Tyrosine Kinase (ou RTK) puisqu'ils sont à l'interface de la communication hôte-parasite. De plus leur étude dans notre laboratoire a permis d'apporter des évidences moléculaires quant à l'effet contesté ou non de certains facteurs de croissance.

II- PROTEINES KINASES ET SIGNALISATION

Notre équipe s'est particulièrement intéressée aux kinases de schistosome pour plusieurs raisons. Les kinases sont des acteurs-clés pour une multitude d'événements cellulaires de base et vont donc influencer sur les grandes fonctions essentielles à la survie d'un organisme à savoir le développement, la reproduction ou encore le métabolisme (Robinson et al. 2000). En plus de l'intérêt fondamental que peut susciter leur étude, leur rôle essentiel les rend attractives en tant que futures cibles potentielles pour le « design » de nouvelles drogues contre le schistosome (Knobloch et al. 2006).

Les kinases sont des enzymes du groupe des transférases catalysant les réactions de phosphorylation (ajout d'un groupement phosphate) sur un substrat pour en modifier son activité. En effet, la phosphorylation réversible constitue le type de régulation post-traductionnelle le plus répandu chez les eucaryotes. Ce substrat peut être de nature diverse : glucidique (glucokinases), lipidique (sphingosine kinase, PI3 kinase) ou protéique. Nous nous focaliserons sur les « protéines » kinases qui phosphorylent les protéines sur des résidus sérine, thréonine ou encore tyrosine et qui sont au cœur des principales voies de signalisation cellulaire connues et de réseaux sophistiqués de régulation. Les protéines kinases sont impliquées dans des processus cellulaires très variés, incluant métabolisme, transcription, régulation du cycle cellulaire, réarrangements du cytosquelette, mouvements cellulaires, apoptose et différenciation. Il ne faut pas oublier que les protéines kinases ont aussi un rôle à jouer dans la communication intercellulaire durant le développement, le maintien de l'homéostasie, ou encore dans le fonctionnement du système nerveux ou du système immunitaire.

1. Classification des protéines kinases

On estime que les protéines kinases constituent environ 2% du protéome des eucaryotes avec environ 30% du protéome directement concerné par leur phosphorylation. Ces protéines kinases sont définies sous le terme ePK (Eukaryotic Protein Kinase) (Hubbard and Till 2000, Manning 2005).

La classification actuelle des ePK a pour base la nomenclature de Manning basée sur les familles de kinases humaines (Manning et al. 2002b). Cette classification prend en compte des

similitudes de séquences et des données de structure pour les domaines catalytiques mais aussi pour les domaines adjacents et parfois les fonctions biologiques lorsqu'elles sont disponibles. Les kinomes connus de différents organismes modèles, à savoir principalement *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont été comparés à cette classification. De manière générale, la comparaison des kinomes montrent que de nombreuses familles de kinases sont conservées pour l'ensemble de ces organismes avec néanmoins des particularités que l'on peut expliquer par le fait que certains organismes aient des besoins particuliers (Manning et al. 2002a) ; (Manning 2005).

Les principaux groupes sont les suivants (Miranda-Saavedra and Barton 2007) (**Planche 5-Figure 1**) :

-**AGC**: kinases dépendantes des nucléotides cycliques, des phospholipides ou encore du calcium (telles que les Protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique (PKA), protéine kinase G (PKG), protéine kinase C (PKC) ...).

-**CAMK**: kinases dépendantes de la calmoduline (telle que la PDK pour kinase dépendante des Phosphoinositides).

-**CKI**: les casein kinases 1.

-**CMGC**: Ce groupe contient les CDK (kinases dépendantes de la cycline), les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), les GSK (Glycogen Synthase Kinase) et autres kinases apparentées aux CDK.

-**STE**: Ce groupe contient les kinases activatrices des MAPK.

-**TK** : Les Tyrosines Kinase (qui seront détaillées par la suite).

-**TKL** : Les Tyrosines Kinase Like qui sont en fait des sérine-thréonine kinases (S/T kinases).

2. Diversité et conservation des kinomes d'organismes modèles.

Les comparaisons phylogénétiques réalisées entre ces différents kinomes d'organismes montrent que les ePK sont globalement bien conservées au sein des eucaryotes (**Planche 6-Figure 1**).

Sur 212 sous-familles d'ePK caractérisées, 189 sont présentes chez l'homme. On pense en effet que la complexité d'organisation des mammifères nécessite un grand nombre de protéines kinases pour maintenir les fonctions évoluées telles que l'angiogénèse, l'hématopoïèse, ou encore la régulation du système immunitaire adaptatif. L'homme possède

des classes d'ePK qui lui sont propres comme les RTK de la famille des Tie exprimés au niveau des cellules endothéliales ou encore les RTK Axl qui ont une fonction au niveau des tissus neuraux et hématopoïétiques (Hafizi and Dahlback 2006).

Sur les 212 sous-familles d'ePK connues, 53 sont communes de la levure à l'homme laissant penser que la « fonction » protéine kinase a pu être établie dès l'origine des eucaryotes. On peut noter à ce sujet qu'il n'existe pas d'ePK chez les procaryotes, mais des histidines kinases et des ePK-like possédant bien un pouvoir phosphorylant mais une similitude de séquence très faible avec les ePK (de l'ordre de 10%) (Kannan et al. 2007).

Chez les protistes où les ePK sont bien présentes, des particularités sont observées. Ainsi chez les trypanosomatidés (trypanosomes et *Leishmania*), une grande abondance de familles de kinases STE et CMGC (en particulier les CDK), impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, est remarquée alors que les TK semblent absentes (Naula et al. 2005). *Plasmodium falciparum* présente des particularités encore plus surprenantes puisqu'il semblerait que beaucoup de STE kinases, soient cette fois-ci absentes. Ainsi aucun STE7/11 et 20 n'a été retrouvée à ce jour chez ce parasite (Dorin et al. 2005). De plus là encore les TK semblent absents chez *P. falciparum* (Ward et al. 2004) comme c'est le cas chez les levures (Shiu and Li 2004). A la place de cela une nouvelle famille d'ePK a été découverte chez les Apicomplexa, à savoir la famille FIKK. De récents travaux ont d'ailleurs montré l'activité de phosphorylation in vitro des FIKK malgré l'absence de la triade de glycine GxGxxG nécessaire à la fixation de l'ATP et évoquent une fonction de ces protéines dans le remodelage de la surface érythrocytaire lors de l'infection par *P. falciparum* (Nunes et al. 2007).

Chez les invertébrés, on peut aussi remarquer que chaque kinome possède ses particularités et que toutes les kinases d'invertébrés ne sont pas par défaut incluses dans celles que l'on peut trouver chez les vertébrés supérieurs. *C. elegans* possède 15 familles d'ePK originales non partagées avec l'homme, en particulier des ePK de la classe des CK1 (gène *spe-6*), des TK (la sous-classe Fer avec le gène *spe-8*) et autres ePK non classées. L'hypothèse selon laquelle ces ePK seraient nécessaires aux fonctions biologiques spécifiques du nématode a été avancée. En effet, il est admis que les fonctions reproductrices nécessitent une adaptation et donc une évolution rapide. Or les gènes *spe-6* et *spe-8* sont connus pour avoir des fonctions dans la spermatogenèse du nématode (Muhlrad and Ward 2002).

En terme de kinases, *D. melanogaster* semble plus proche de l'homme que ne l'est *C. elegans*. En effet quasiment toutes les familles de kinases retrouvées chez *D. melanogaster* se

retrouvent globalement chez l'homme, à l'exception de quelques curiosités, concernant particulièrement les RTK qui seront décrits dans le chapitre sur les RTK.

Pour de nombreux autres insectes comme *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis*, *Tribolium castaneum* et autres insectes modèles, les annotations prédictives des récents génomes laissent apparaître de nombreuses familles de kinases attendues bien que leur inventaire n'ait pas vraiment été fait jusqu'à présent. Des données récentes sur le kinome d'oursin (Bradham et al. 2006) indiquent que le panel d'ePK dont dispose l'oursin est très proche de ce qui est rencontré chez l'homme avec seulement 4 familles d'ePK manquantes ce qui souligne le haut degré d'évolution des organismes épithélienneuriens.

3. Le groupe des TK

Les familles qui nous intéressent plus particulièrement sont celles qui appartiennent au groupe des TK. Comme leur nom l'indique, les TK catalysent la phosphorylation ATP-dépendante de leur protéine cible sur des résidus Tyrosine spécifiques. Les différentes études portant sur les kinomes d'organismes unicellulaires laissent penser que les TK sont apparues chez les métazoaires bien que de récents travaux *in silico* mentionnent la présence d'une TK cytosolique chez le parasite unicellulaire *Entamoeba histolytica* (Miranda-Saavedra and Barton 2007) (Loftus et al. 2005). Très récemment des TK ont été décrites *in silico* chez les plantes, ce qui n'avait jamais été découvert auparavant bien que la phosphorylation sur les tyrosines soit connue chez ces organismes. Quatre TK avec tous les résidus nécessaires à l'activité catalytique ont été trouvées dans le génome de *Oriza sativa ssp. Japonica* (Miranda-Saavedra and Barton 2007).

Les TK sont classées en 2 super-familles: Les Non-Récepteurs Tyrosine Kinases (NRTK) qui sont des TK cytosoliques (CTK) et les Récepteurs Tyrosine Kinases (RTK) (**Planche 7-Figure 1**).

a) Les NRTK (**Planche 8-Figure 1**)

Les NRTK constituent une vaste famille de protéines de signalisation qui se répartissent chez l'homme dans 10 sous-familles (SRC (première famille découverte avec l'oncogène du virus du Sarcome de Rous), ABL, JAK, ACK, CSK, FAK, FES, FRK, TEC et SYK). Ces Tyrosine

Kinases cytosoliques sont composées d'un domaine catalytique de type TK et de différents domaines extra-catalytiques qui leur confèrent des propriétés particulières et permet leur classification (Blume-Jensen and Hunter 2001) ; (Robinson et al. 2000). Les NRTK sont impliquées dans les interactions protéine-protéine, protéine-lipide ou encore protéine-ADN. Parmi les domaines d'interactions les plus importants nous pouvons citer les domaines SH2 (SRC homology 2), SH3 (SRC homology 3) et PH (Pleckstrin homology) qui sont des adaptateurs moléculaires jouant un rôle très important dans la distribution des signaux au niveau des molécules effectrices (Koch et al. 1991) ; (Hirata et al. 1998) et donc dans les cascades signalétiques intracellulaires. En effet, une protéine de voie de signalisation doit être en mesure de détecter la phosphorylation d'un partenaire en amont ou encore son changement de conformation pour pouvoir y réagir.

Le domaine SH2 permet la reconnaissance spécifique de séquences peptidiques contenant une tyrosine phosphorylée. Ce domaine d'une centaine d'acides aminés contient deux poches de fixation constituées de feuillets β . La première poche contient une arginine conservée (l'arginine β B5) qui entre en interaction avec une tyrosine phosphorylée. Cette poche est trop profonde pour permettre l'interaction avec une phosphosérine ou une phosphothréonine. Une seconde poche en aval est spécifique du peptide ou de la protéine phosphorylée.

Le domaine SH3, constitué d'environ 60 acides aminés, présente une spécificité pour des peptides riches en proline de motif général PXXP. Le domaine SH3 est constitué de 3 sous-sites (S0, S1, S2). Il a été montré que le sous-site S2 doit fixer une arginine proche du domaine riche en proline pour que l'interaction soit possible.

Enfin le domaine PH (Pleckstrin homology) permet la fixation aux lipides phosphatidylinositol pour permettre le recrutement des protéines vers la membrane plasmique. Ces régions contiennent trois boucles variables chargées positivement qui vont pouvoir interagir avec des phospholipides spécifiques.

b) Les RTK

Les RTK forment une famille diversifiée (**Planche 8-Figure 2**) comprenant plus de 50 glycoprotéines de structure modulaire contenant : un domaine transmembranaire hydrophobe unique sous forme d'une hélice α (permettant l'ancrage du RTK à la membrane plasmique) ; un domaine extracellulaire capable de fixer un ligand (la plupart du temps un polypeptide soluble) ; un domaine intracellulaire contenant un domaine juxtamembranaire, le domaine catalytique TK et le domaine C terminal plus ou moins long pouvant contenir des sites de

recrutement pour des substrats ou encore des sites nécessaires à l'endocytose des récepteurs et donc leur renouvellement.

Les RTK semblent être spécifiques des eucaryotes métazoaires. L'émergence de ces récepteurs pourrait être liée à l'apparition de la communication intercellulaire devenue incontournable dès lors que des organismes unicellulaires ont commencé à s'associer (**Planche 6-Figure 2**). L'apparition des métazoaires est à l'origine de nouvelles fonctions cellulaires (différenciation, prolifération, apoptose ou quiescence) qu'il devient alors nécessaire de contrôler (Skorokhod et al. 1999). Aucun RTK n'a été décrit chez les plantes, les champignons et ni chez des unicellulaires si ce n'est un ancêtre de récepteur de l'EGF chez les choanoflagellés (King and Carroll 2001). On retrouve des RTK chez les premiers métazoaires comme les spongiaires (Muller et al. 1999a), les cnidaires (Miller and Steele 2000) ; (Reidling et al. 2000) ou encore les tuniciers (Kulman et al. 2006) ; (Leveugle et al. 2004) jusqu'à l'homme où une classification servant de référence a été établie. Les kinomes d'invertébrés peuvent présenter un répertoire de RTK particulier. Certaines fois, des RTK attendus ne sont pas retrouvés alors que de nouvelles familles (quelquefois difficiles à classer) font leur apparition.

Les RTK décrits chez des organismes primitifs à l'origine des métazoaires tels que les spongiaires ou encore les cnidaires présentent pour beaucoup des structures atypiques. On retrouve des récepteurs avec des domaines extracellulaires de type lectine chez l'hydre (Reidling et al. 2000) et des récepteurs hybrides entre les récepteurs de l'insuline et de l'IGF chez les spongiaires (Skorokhod et al. 1999).

Un inventaire des RTK a été réalisé chez l'oursin marin (*Strongylocentrotus purpuratus*) qui permet de retrouver la plupart des RTK humains, avec néanmoins la présence de RTK atypiques (dont un est inclus dans les résultats de ce mémoire) (Lapraz et al. 2006).

Un état des lieux des RTK, dressé chez *C. elegans*, montre que le ver partage avec l'homme beaucoup de familles de RTK, mais surtout possède des familles qui lui sont propres et qui d'ailleurs restent non classées (Plowman et al. 1999).

Pour de nombreux autres invertébrés, dont en particulier les insectes, où les séquençages et annotations de génomes ont grandement avancé, les inventaires précis sur les RTK tardent encore à paraître. Il est alors bien possible de passer à côté d'une nouvelle famille de RTK. Chez la drosophile, on retrouve la quasi-totalité des familles de RTK communes à l'homme, comme les FGF-R impliqués dans la morphogénèse, des récepteurs de l'insuline impliqués dans le développement et le métabolisme, des récepteurs de l'EGF, etc. On pourra néanmoins

souligner qu'il ne semble pas exister de véritables récepteurs du PDGF (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) ou encore du VEGF (Vascular Endothelial Cell Growth Factor Receptor). A la place de ceux-ci, on retrouve un récepteur hybride entre le PDGFR et le VEGFR nommé PVR qui pourrait bien être un ancêtre commun des PDGFR et VEGFR de mammifères (Duchek et al. 2001). On pourra aussi citer les RTK Torso proches des PDGFR et VEGFR, impliqués dans l'embryogenèse des insectes (Li 2005). Curieusement on ne retrouve pas non plus d'homologues de PDGFR et VEGFR chez *C. elegans*.

4. Le domaine catalytique des kinases : Structure et mécanismes d'activation

a) Structure

Les protéines kinases sont caractérisées par la présence d'un domaine catalytique d'environ 250 à 300 acides aminés, répartis en 12 domaines (I à XII), dont la structure primaire est très conservée pour certains (Hanks and Quinn 1991) (**Planche 9-Figure 1**). En terme de séquence tertiaire, les différents sous-domaines sont regroupés en 2 unités structurales que sont le petit lobe et le grand lobe de la kinase (**Planche 10-Figure 2A**).

Le petit lobe : Le domaine N-terminal, contenant les sous-domaines I à IV, est appelé petit lobe de la kinase. Il contient un site de liaison au substrat nucléotidique ATP formé par les sous-domaines I à III. Ce site est caractérisé par la présence d'un consensus de séquence **G-X-G-X-X-G** et **V-A-V-K** qui permet de former deux « doigts » qui vont entourer et maintenir le substrat ATP (Hubbard et al. 1994) (Hubbard 1997).

Le grand lobe : Le domaine C-terminal, contenant les domaines VI à XI, est appelé grand lobe. Ce domaine contient principalement le site de liaison à l'ion métal cofacteur Mg^{2+} par le sous-domaine VII avec la signature **D-G-F** et la boucle catalytique de la kinase avec les signatures **H-R-D-L-X-X-X-N** (pour le phosphotransfert) et **X-A-P-E-X** (pour la liaison aux protéines substrats).

Les deux lobes sont reliés par des domaines présentant de forts degrés d'hydrophobicité, comme le domaine V avec un rôle essentiellement structural.

On peut noter que le domaine VIb est caractérisé par la présence d'un résidu basique, arginine (R) ou lysine (K), universellement conservé. Cet acide aminé est un très puissant indicateur de la nature de la kinase : sérine/thréonine ou tyrosine kinase. Pour une sérine/thréonine kinase, on trouvera un résidu lysine (K) pour donner le site consensus HRDLKxxN, alors que le site d'une TK sera HRDLxxRN (Hanks and Hunter 1995).

b) Mécanismes d'activation

Le mécanisme d'activation d'une tyrosine kinase peut être étendu à l'ensemble des kinases (**Planche 10-Figure 1**). Les kinases subissent une succession d'événements bien définis menant à leur activation. Seule l'origine de déclenchement de ces événements varie selon la kinase concernée. L'origine de l'activation d'une kinase provient toujours d'un changement de conformation. Par exemple dans le cas des récepteurs de l'insuline, la fixation de l'insuline par le récepteur induit « une torsion » de ce dernier lui permettant de devenir actif. Une kinase soluble peut être activée suite à une interaction et/ou phosphorylation avec un partenaire protéique.

Les étapes de fonctionnement d'une kinase sont les suivantes :

Suite à l'activation de la kinase par un changement de conformation, une molécule d'ATP entre dans le petit lobe de la kinase. Cet ATP, maintenu dans la poche du petit lobe, est stabilisé par le cofacteur Mg^{2+} qui aide à la libération du γ -P qui va phosphoryler de manière spécifique certains résidus de la boucle catalytique. La boucle catalytique ainsi phosphorylée change de conformation et se désengage du « frein moléculaire » qui maintient toute kinase inactive (Chen et al. 2007) (**Planche 10-Figure 2**).

La kinase ainsi activée devient capable de phosphoryler (en *trans*) des substrats spécifiques et dans certains cas de s'autophosphoryler (en *cis*).

L'autophosphorylation en *cis* permet au récepteur de phosphoryler certains résidus du domaine kinase ou adjacents qui vont lui permettre de recruter des partenaires de voies de signalisation, tels que des protéines adaptatrices. Par exemple, le motif N-P-X-Y des IR est le principal site de recrutement des substrats de l'IR que sont les substrats IRS 1/4 (insulin receptor substrate) et SHC (Src Homology Collagen) (Kaburagi et al. 1995).

La phosphorylation *en trans* permet de phosphoryler une protéine partenaire. Dans le cas particulier des RTK qui se dimérisent, un monomère de RTK peut phosphoryler un autre monomère afin d'amplifier l'activité kinase (Blume-Jensen and Hunter 2001).

c) Voies de signalisation transduites par les RTK

L'ensemble des voies médiées par les RTK constitue un réseau de signalisation très dense dont la description ne cesse d'évoluer en particulier à cause des nouvelles modélisations dynamiques prenant désormais en compte la notion spatio-temporelle (Oda et al. 2005, Amit et al. 2007).

Pour simplifier la signalisation des RTK, nous pouvons considérer les voies de signalisation Ras/MAPK et PI3K/PKB (AKT) (**Planche 11-Figure 1**). La voie Ras/MAPK semble purement orientée vers le développement et/ou la croissance cellulaire alors que la voie PI3K/PKB (AKT) prend en compte des phénomènes liés au métabolisme avec des synthèses d'acide gras, des synthèses de glycogène, ou encore la translocation des transporteurs de glucose dans le cas particulier des IR. Dans les faits, ces deux voies qui ont des effets pléiotropes sur la cellule, sont plus imbriquées qu'on ne le pense (Doepfner et al. 2007).

Voie RAS/MAPK- Le RTK activé recrute Grb2, soit directement, soit par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice Src. Grb2, à son tour interagit avec la protéine SOS, qui va elle-même interagir avec la petite protéine G Ras ancrée sous la membrane plasmique. SOS qui est un échangeur de guanine nucléotide, va apporter un GTP à Ras lui permettant de s'activer et d'enclencher la cascade des MAPK avec RAF comme initiateur.

A l'issue de la cascade des MAPK, ERK1 et 2 activées vont stimuler divers facteurs de transcription comme le complexe AP1 constitué des facteurs de transcription c-fos et c-jun (Neuberg et al. 1989). Les expressions de gènes sont diverses et variées mais vont généralement dans le sens de la prolifération cellulaire, ce qui fait que la voie Ras/MAPK est à l'origine d'un grand nombre de processus cancéreux quand son activation est incontrôlée (Sebolt-Leopold 2000) .

Il est important de noter que les partenaires de voies MAPK ne sont pas libres dans le cytoplasme mais spécifiquement rattachés à certains compartiments cellulaires par des protéines de conformation (McKay and Morrison 2007). De plus la protéine Ras a l'origine des voies MAPK a été détectée par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), dans

différents compartiments cellulaires comme l'appareil de golgi ou encore les compartiments endosomaux (Kolch 2005).

Voie PI3K/PKB (AKT)- Les RTK recrutent généralement des protéines adaptatrices menant vers ce type de voie. Par exemple les IR ou les IGF-R recrutent des adaptateurs particuliers de type IRS (Insulin Receptor Substrate). La phosphorylation de ces adaptateurs permet l'activation de la PI3K, qui va à son tour, phosphoryler le phosphatidylinositol (PI) pour produire des seconds messagers tels que le PIP3. Le PIP3 active diverses protéines telle que la PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) à l'origine de l'activation de PKB/AKT. Ensuite, la FKHR (Forkhead homolog of rhabdomyosarcoma), la GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) ou encore mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) sont activées. Dans la plupart des cas des phénomènes liés au métabolisme comme la synthèse de protéines, d'acides gras ou la translocation des transporteurs de glucose Glut4 sont observés (Matsui et al. 2006).

III- LES KINASES DE SCHISTOSOME

L'inventaire étendu de l'ensemble des kinases ou kinome de schistosome n'a pour le moment pas été réalisé, même si les avancées génomiques, transcriptomiques et protéomiques ont permis d'en dévoiler un certain nombre. Les kinases connues à ce jour chez le schistosome l'ont été grâce à des techniques classiques de biochimie et/ou sur la base de la recherche de leur domaine catalytique conservé.

Les kinases de schistosome découvertes appartiennent principalement aux groupes des Sérine/Thréonine kinase (S/T kinase) et des Tyrosine kinases (TK).

1. Les S/T kinases

a) Le récepteur au TGF- β , ligand et voies de signalisations associées chez *S. mansoni*.

Parmi les S/T kinases découvertes, il est important de mentionner le récepteur au TGF- β associé à la voie des protéines Smad, dont l'étude est la plus avancée chez le schistosome (**Planche 12-Figure 1**) (Knobloch et al. 2007, Loverde et al. 2007). Globalement il semble que cette voie soit très conservée et semblable à celle trouvée chez les mammifères. Le récepteur au TGF- β de *S. mansoni* se compose de deux unités différentes comportant une S/T kinase transmembranaire de type I (TbRI) et de type II (TbRII). TbRII capte le ligand et active par phosphorylation TbRI. Le récepteur, qui fonctionne donc sous l'état d'un hétérodimère, active des partenaires Smad par phosphorylation. Plusieurs protéines Smad ont été caractérisées (SmSmad1, SmSmad2, SmSmad4, SmSmad8). Le récepteur au TGF- β est au voisinage de la surface du parasite mais dans les couches inférieures du tégument, ce qui le rend peu accessible à un éventuel ligand qui serait alors contraint de traverser le tégument heptalaminé parasitaire pour venir l'activer. Le ligand serait donc endogène au parasite. Deux ligands TGF- β potentiels que sont SmInACT (une molécule inhibin/activin-like) et SmBMP (Bone Morphogenetic Protein) ont été découverts chez *S. mansoni*. Les nombreuses études fonctionnelles menées sur la voie TGF- β du schistosome indiquent que celle-ci pourrait jouer un rôle crucial dans les stades précoces d'embryogénèse au niveau de l'oeuf. En effet on remarque en qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), hybridation *in situ* et Western

Blot, une forte expression du ligand SmInACT au niveau des cellules vitellines de la femelle mature. Rappelons que les cellules vitellines fournissent des substances nutritives qui se retrouvent enfermées dans l'œuf avec l'embryon lui permettant de survivre durant environ 5 jours avant émergence du stade miracidium. L'interférence ARN dirigée contre le ligand entraîne une mortalité accrue et prématurée des embryons (**Planche 12-Figure 2**) à l'intérieur même de l'œuf sans influencer sur le nombre d'œufs pondus (Freitas et al. 2007). On peut aussi souligner l'absence de SmInACT au niveau des vers femelles immatures lors d'infections monosexuées chez la souris. La voie du TGF- β serait donc importante pour la fécondité des parasites.

b) SmSlk, une Ste20-like kinase de *S. mansoni*.

De récents travaux menés au laboratoire ont permis de découvrir et de caractériser une S/T kinase appelée SmSLK pour *S. mansoni* Ste20-like kinase. Cette kinase est une MAP4K (Mitogen-activated protein 4 kinase) du sous-groupe des GCK (Germinal Center Kinases) constituant les premiers partenaires des voies MAPK. Les Ste20-like kinases sont habituellement impliquées dans des phénomènes d'apoptose, de croissance et de morphogénèse. SmSLK pourrait être un orthologue de la kinase LOK (pour Lymphocyte Oriented Kinase) de mammifère. Chez le parasite, l'expression de SmSLK en cellules de mammifère a permis de démontrer son activité et sa capacité à induire une activation des Jun Kinases (JNK/MAPK) (Yan et al. 2007).

2. Les TK

a) Les CTK ou TK cytoplasmiques.

Plusieurs représentants de différentes familles de CTK ont été décrits chez *S. mansoni*. Il s'agit de SmTK3, SmTK4, SmTK5 et SmFes.

SmTK3 est une kinase appartenant à la sous-famille des Src kinases, son activité kinase a pu être démontrée en cellules de mammifères et elle a été localisée de manière spécifique au niveau des cellules vitellines et des ovocytes de vers femelles ainsi qu'au niveau des spermatozoïdes des vers mâles, suggérant que la kinase joue un rôle au niveau de la reproduction du parasite. Des travaux en système de double hybride en levure ont montré que le domaine SH3 de SmTK3 était capable d'entrer en interaction avec la β -tubulin et participer

aux réarrangements cytosquelettiques (Kapp et al. 2004). SmTK4 a été définie comme étant une Syk kinase, son expression semble ubiquitaire mais absente des cellules vitellines (Knobloch et al. 2002). SmTK5 est une Fyn kinase dont l'expression est décrite au niveau des cellules vitellines du ver adulte femelle (Knobloch et al, 2007). SmFes est exprimée au niveau du térébratorium miracidien et des glandes acétabulaires de schistosomule (Ludolf et al. 2007). Un rôle dans la pénétration des hôtes intermédiaires et définitif a été suggéré (Bahia et al. 2007).

3. Les RTK

Les RTK de *S. mansoni* constituent le domaine d'étude principal de notre équipe de recherche.

a) SER : Le récepteur de l'EGF de *S. mansoni*.

SER (pour *Schistosoma mansoni* EGF Receptor) a été cloné pour la première fois par une équipe américaine (Shoemaker et al. 1992) et étudié ensuite au laboratoire. L'ensemble des études menées sur ce récepteur a permis de confirmer qu'il s'agissait d'un récepteur homologue au récepteur de l'EGF humain possédant tous les motifs structuraux caractéristiques des récepteurs de l'EGF. En effet, le domaine de liaison au ligand est composé de 2 domaines L1 et L2 entourés de domaines structuraux riches en cystéine (furin-like) créant une petite structure bilobée capable d'accueillir le ligand. Le domaine TK, séparé du domaine de liaison au ligand par une région transmembranaire unique possède lui aussi toutes les signatures nécessaires au fonctionnement d'un domaine TK (décrits planche 9). Les études phylogénétiques réalisées à partir du domaine TK classent SER au sein de la famille des récepteurs de l'EGF.

La voie d'activation principale qui a été recherchée pour SER a été la voie des Ras/MAPK, qui est pour un RTK en général et plus encore pour le récepteur de l'EGF la voie de prédilection. Pour cela deux systèmes ont été utilisés : l'expression en cellules géantes de xénope que sont les ovocytes et l'expression en cellule HEK avec transfection simultanée d'un vecteur rapporteur de voie MAPK.

L'expression en ovocyte de xénope a été réalisée en injectant l'ARN de SER synthétisé *in vitro* directement dans le cytoplasme de la cellule. L'addition d'EGF humain a montré une augmentation du taux de maturation des ovocytes, appelée GVBD pour Germinal Vesicle

BreakDown. Ce phénomène, naturellement dépendant de l'activation des voies Ras/MAPK, est facilement observable par l'apparition d'une tache blanche au pôle animal de l'ovocyte due à l'expulsion du globule polaire.

L'activation des voies Ras/MAPK a été confirmée en cellules HEK293 dans lesquelles SER a été transfecté en même temps qu'un vecteur codant la luciférase dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur sensible à la voie MAPK. Pour compléter cette étude, des analyses de "Scatchard" ont démontré que SER avait une forte affinité pour l'EGF humain, comparable à celle du récepteur humain. Des évidences *in vivo* d'incorporation de résidus radioactifs ont enfin été rapportées montrant que l'EGF humain stimule la synthèse d'ADN et de protéine chez les schistosomules et induit la phosphorylation de SER directement dans les membranes du parasite (Vicogne et al, 2004).

b) SmIR-1 et SmIR-2 : les récepteurs de l'insuline de *S. mansoni*.

Comme évoqué précédemment, l'effet de l'insuline sur le schistosome a toujours été un sujet de controverse et c'est la raison pour laquelle notre laboratoire a recherché la présence de IR chez *S. mansoni*.

Un premier récepteur homologue d'IR a été cloné au laboratoire à partir d'une stratégie d'amorces dégénérées spécifiques de domaines TK d'IR et a été nommé SmIR-1 pour *S. mansoni* Insulin Receptor 1. De manière surprenante (car il est établi qu'il existe habituellement un seul IR chez les invertébrés), un second homologue d'IR a pu être ensuite identifié à partir d'analyses génomiques et d'EST (Expressed Sequence Tag) du schistosome et nommé SmIR-2. L'étude comparative de ces deux récepteurs a été menée au laboratoire par N. Khayath (**planche 13-Figure 1**) (Khayath et al. 2007).

Les deux récepteurs présentent toutes les caractéristiques structurales des IR, à savoir des domaines de liaison L1 et L2 reliés par une région furin-like riche en cystéines, des domaines fibronectine responsables de la torsion du récepteur, un site de clivage à l'origine des sous unités α et β du récepteur. Bien qu'appartenant tous deux à la famille des IR, SmIR-1 et SmIR-2 possèdent plusieurs différences importantes dans des motifs structuraux essentiels à la transduction du signal. SmIR-2 possède une extrémité C terminale beaucoup plus longue que celle de SmIR-1 suggérant le recrutement de partenaires différents. SmIR-2 possède aussi un domaine NPDY habituellement responsable du recrutement de l'adaptateur IRS (Insulin Receptor Substrate) alors que SmIR-1 n'en possède pas. Ils sont tous deux exprimés à tous les stades parasitaires mais leur localisation et leur taux d'expression sont distincts. SmIR-1

est exprimé au niveau du tégument du ver adulte mâle et du schistosomule tandis que SmIR-2 est exprimé de manière plus étendue au niveau du parenchyme. Des études de qPCR ont montré que SmIR-1 était en moyenne dix fois moins exprimé que SmIR-2 (**Planche 13-Figure 2**). Tout cela suggère un rôle biologique propre pour chacun des deux récepteurs. Des expériences de double hybride en levure ont montré que SmIR-1 et SmIR-2 sont capables de lier la pro-insuline humaine mais pas le pro-IGF-1. Il est important de souligner le fait que chez les invertébrés un seul IR est présent et que la diversification des IR intervient uniquement à partir des vertébrés avec l'IR (impliqué dans la régulation de phénomènes métaboliques) et l'IGF-R (préférentiellement impliqué dans le développement). Le schistosome, avec ses 2 IR différents, constitue donc un fait atypique qui peut être une résultante de la pression parasitaire auquel il est confronté. L'étude des récepteurs SmIR-1 et SmIR-2 en système hétérologue s'est toujours montré problématique. En effet, jamais aucune expression n'a pu être détectée en cellule de mammifère. Les IR sont des protéines de haut poids moléculaire qui subissent un processus de maturation assez complexe avant d'être exportées à la membrane. Les difficultés d'expression de SmIR-1 et SmIR-2 peuvent être liées à des problèmes d'usage de codons augmentant avec la longueur des séquences nucléotidiques (Kane 1995). De plus les mécanismes post-traductionnels nécessaires à la maturation et au trafic du récepteur peuvent être affectés par les différences dans la structure du peptide signal et dans le site de clivage habituellement reconnu par les protéases de type furine. Les tentatives d'expression en cellules de mammifères (HEK293) ont toujours échoué malgré la mutation du site putatif de clivage délimitant les chaînes α et β de SmIR-1. Dans les ovocytes de xénope, une très faible expression de SmIR-1 a pu être détectée à l'aide d'un marquage des protéines avec de la méthionine ^{35}S , mais la protéine exprimée présentait un poids moléculaire élevé suggérant l'absence de clivage du récepteur.

SmIR-1 apparaît localisé aux mêmes endroits que les transporteurs de glucose caractérisés (SGTP4) chez *S. mansoni* (Skelly and Shoemaker 1996) (**Planche 13-Figure 3**). SmIR-1 pourrait très bien réguler la prise de glucose par l'intermédiaire de ce transporteur. Une partie de mes travaux réalisés ont tenté d'apporter des éléments quand à la fonction de SmIR-1 et SmIR-2 en ayant recours à la technique d'interférence ARN. De plus dans le but de montrer l'implication d'une voie insuline dans la prise de glucose par le schistosome adulte et larvaire, diverses drogues spécifiques d'IR ont été testées. A ce jour, la spécificité des IR de schistosome suggère toujours qu'ils pourraient servir de cible spécifique structurale contre le schistosome.

L'amplification par PCR d'un IR hypothétique à l'aide d'oligonucléotides dégénérés complémentaires du domaine TK très conservé des IR, a permis d'identifier SmIR-2 mais est aussi à l'origine de la découverte d'un nouvel RTK totalement atypique. Le domaine catalytique de cet RTK atypique est similaire à ceux des IR mais sa partie extracellulaire est constituée d'un Module Venus FlyTrap (ou VFTM) caractéristique des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) de classe III tels que le récepteur métabotropique au GABA (acide γ -amino butyrique) ou encore au glutamate. Ce récepteur qui ne pouvait de toute évidence pas être considéré comme un IR, a fait l'objet d'une caractérisation approfondie au laboratoire qui constitue la base des résultats présentés dans ce mémoire.

IV- De la découverte de SmRTK-1 chez le schistosome à celle d'une nouvelle famille de RTK.

1. SmRTK-1 : un RTK atypique chez *S. mansoni*.

SmRTK-1 pour *S. mansoni* Recepteur Tyrosine Kinase 1 est le premier RTK à avoir été isolé au laboratoire (Vicogne et al. 2003). Sa structure est atypique puisqu'il est composé d'un VFTM (Venus FlyTrap Module) (structure bilobale extracellulaire capable de lier un ligand de petite taille), d'un domaine transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire à activité TK semblable à celui retrouvé dans les IR (**Planche 14-Figure 1**). Ce récepteur n'était répertorié dans aucune des familles de RTK connues, s'ajoutant ainsi à la liste des autres récepteurs tout aussi atypiques découverts dans d'autres espèces (en particulier chez l'hydre, (Reidling et al. 2000) (Miller and Steele 2000)).

Des études structurales du VFTM réalisées en collaboration avec l'équipe Dr J. P. Pin (CNRS, Montpellier) ont confirmé l'intégrité du VFTM et la conservation de résidus qui pourraient être impliqués dans la liaison potentielle d'un ligand GABA ou dérivé d'un aminoacide.

SmRTK-1 s'est révélé être exprimé à tous les stades parasitaires (**Planche 15-Figure 1**). Les différentes études de localisation de SmRTK-1 par les techniques d'hybridation *in situ* ou d'immunolocalisation ont montré la présence de SmRTK-1 au niveau des ovocytes des vers femelles et au niveau des sporocystes (stades de reproduction asexuée du parasite chez le mollusque). SmRTK-1 est aussi retrouvé dans le parenchyme du ver mâle (**Planche 15-Figure 2,3**).

Les difficultés rencontrées pour exprimer SmRTK-1 en cellules et démontrer son activité kinase, ont retardé considérablement la poursuite de ses études à la fois d'un point de vue structural et fonctionnel. Cependant, en 2005, un récepteur homologue à SmRTK-1 a été découvert chez l'abeille à miel *Apis Mellifera* (AmRTK-1), à partir de l'annotation du génome qui commençait à devenir très conséquente. Dès lors nous disposons d'un nouveau modèle d'étude performant pour étudier la fonction des RTK-1, le modèle insecte *A. mellifera*, un organisme très étudié en biologie fondamentale et dans le domaine des sciences cognitives et environnementales. L'interférence ARN est une technique développée chez cet organisme (Amdam et al. 2003), et les expressions protéiques en cellules de mammifères et évidemment d'insectes sont possibles. Ces raisons ont motivé le choix de réaliser ma thèse sur l'étude des molécules RTK-1 d'abeille et de schistosome. Plus récemment, les grandes

avancées concernant l'annotation de différents génomes d'invertébrés (ex : l'oursin marin, *S. purpuratus* (Sodergren et al. 2006)) et en particulier d'insectes nous ont permis de dévoiler d'autres récepteurs homologues à SmRTK-1 et AmRTK-1 qui pourraient constituer une nouvelle famille de RTK dont la fonction est inconnue, que nous avons appelée VKR pour Venus Kinase Receptor.

2. Introduction à l'analyse des VKR

Les processus évolutifs à l'origine des VKR, la nature des ligands potentiels, les modalités d'activation et les voies de signalisation médiées par les récepteurs VKR doivent être explorés.

Une des hypothèses possibles d'évolution repose sur les études de Yarden and Ullrich 1988) et de King et Carroll (2001) qui proposent un schéma simple de formation de nouvelles classes de RTK par recombinaison de modules fonctionnels (motifs EGF ou Ig-like, domaine tyrosine kinase...). Cette hypothèse est d'ailleurs largement étayée par divers exemples tels que les observations faites chez les éponges (Muller et al. 1999b, Muller et al. 1999a) ou encore les cas de recombinaison oncogénique comme BCR-Abl dans la leucémie myéloïde chronique (Shtivelman et al. 1987). Les études phylogéniques réalisées au cours de mes travaux, bien que peu orientées vers la recherche même de l'origine du récepteur apportent des indices quand à l'apparition des VKR.

a) Partie extracellulaire du récepteur et ligand potentiel du VKR

Pour tenter d'aborder au mieux la nature du ligand il est nécessaire de prendre en compte la biologie et la structure du VFTM des RCPG de classe 3 puisque les VFTM de SmRTK-1 et AmRTK-1 en sont très proches. Les RCPG de classe 3 jouent un rôle majeur aussi bien dans la communication intercellulaire que dans la perception de signaux environnementaux. Leur ligand peut être de nature extrêmement diverse mais généralement de petite taille pour pouvoir entrer au cœur de la poche ligand (**Planche 16-Figure 1**). Ainsi ils peuvent être des récepteurs aux phéromones, aux neurotransmetteurs (acides aminés et dérivés d'acides aminés, comme le Glutamate ou encore le GABA), mais aussi des molécules odorantes ou encore des composés du goût (par ex : fructose, galactose ou aspartame qui activent des RCPG de classe 3 au niveau de la langue chez l'homme). Le ligand peut être tout simplement un ion comme dans le cas des récepteurs sensibles au calcium (Pin et al. 2003). De plus nous pouvons

mentionner qu'un autre récepteur, le récepteur de l'ANF pour « Atrial Natriuretic factor » possède un VFTM qui capte un ligand protéique de grande taille, non pas dans la poche du VFTM mais à l'extérieur de ce dernier, à l'interface de dimérisation du récepteur (van den Akker 2001).

b) Le mode d'activation du VKR

Les VKR comportent un domaine extracellulaire proche de celui des RCPG de classe 3 et un domaine intracellulaire semblable à celui d'un IR. Or aussi bien les RCPG de classe 3 que les RTK ont besoin de se dimériser pour s'activer (**Planche 16-Figure 2**). Les RTK se dimérisent pour augmenter leur potentiel kinase car chaque monomère sert de substrat à l'autre. Les processus qui mènent à la dimérisation des RTK sont divers. Les IR sont toujours maintenus sous forme dimérique, étant constitués de deux chaînes α et deux chaînes β reliées entre elles de façon covalente par des ponts disulfure. La fixation de l'agoniste se traduit par une torsion du récepteur menant au rapprochement des domaines catalytiques intracellulaires permettant une phosphorylation croisée. D'autres RTK, comme les récepteurs de l'EGF dévoilent des boucles de dimérisation après fixation du ligand EGF qui permettent l'interaction de deux monomères de récepteur (Schlessinger 2002). Enfin de nombreux RTK se dimérisent par affinité pour un ligand commun (Li and Hristova 2006).

Les RCPG de classe III existent sous forme de dimères constitutifs (Pin et al. 2005, Pidasheva et al. 2006) qui d'ailleurs leur permettent d'être exprimés à la surface et de ne pas être retenus dans le réticulum endoplasmique (Brock et al. 2005). Ces dimères peuvent être des homo- ou des hétérodimères. Les récepteurs mGlu et CaS sont des homodimères (Bai et al. 1998, Kunishima et al. 2000), alors que les récepteurs au GABAB sont des hétérodimères (Kammerer et al. 1999). Le récepteur de l'ANF, qui est composé d'un VFTM extracellulaire, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine homologue aux domaines TK suivi d'un domaine guanylate cyclase (van der Akker et al, 2001) fonctionne lui aussi sous forme d'un dimère. De récentes études montrent par ailleurs que le récepteur doit être sous forme de dimère inactif pour pouvoir recevoir un ligand et devenir actif (Parat et al. 2008).

Le VFTM possède donc de sérieuses aptitudes à se dimériser, ce qui doit être pris en compte dans l'étude des VKR.

c) Les voies de signalisation associées au VKR

En raison de la partie intracellulaire proche de celle d'un IR, les VKR pourraient médier des voies insuline classiques à savoir les voies Ras/MAPK et PI3K/PKB décrites précédemment, pour être impliqués, tout comme les IR et les IGF-R, dans des phénomènes de croissance et de différenciation. Cependant des réserves sont à émettre à cause de la faible conservation de la queue C terminale des VKR, qui pourrait offrir des sites de recrutement de partenaires et adaptateurs de voies de signalisation différents de ceux des IR.

Nous sommes donc face à un nouveau type de récepteur dont l'évolution, les modalités de fonctionnement et les voies de signalisations associées sont totalement inconnues. Quel pourrait être le rôle d'un tel récepteur ? Cette association surprenante des modules VFT et des domaines TK peut elle avoir une signification biologique ? A ce propos il est intéressant de souligner que de nombreux cas d'associations entre RCPG et RTK pour la modulation de voies de signalisation existent au sein de la cellule. Certains types de processus cancéreux ont permis de révéler ces types d'associations. Les phénomènes de transactivation entre RTK et RCPG semblent pouvoir aller dans les deux sens (**Planche 16-Figure 3**). En effet il a été remarqué que dans certains cas de carcinome du sein le récepteur de l'IGF-1 activé était à l'origine de la production de grandes quantités de ligand pour le RCPG CCR5 alors responsable de la migration cellulaire métastatique. Dans d'autres cas encore l'IGF-1R activé semble pouvoir se dimériser avec le RCPG CXCR4, produisant alors le même phénotype de migration (Akekawatchai et al. 2005, Delcourt et al. 2007). Dans le sens contraire il a été montré que l'activation de RCPG pouvait induire un phénotype de croissance et différenciation cellulaire par transactivation d'un RTK. Ainsi des RCPG, ayant comme ligand la prostaglandine E2 (PGE2) et la bradykinine (BK), sont capables d'induire une activation de l'EGFR, par augmentation de la sécrétion de ligands de l'EGFR, dans certains cas de tumeurs épithéliales (Thomas et al. 2006). On pense d'ailleurs que les thérapies cancéreuses devraient prendre en compte ces phénomènes de transactivation et cibler les RTK avec les RCPG associés. Ces exemples montrent bien que la coopération entre RCPG et RTK existe bel et bien même si dans le cas du VKR cette coopération serait directe. Ce récepteur pourrait ouvrir de nouvelles perspectives en terme de voies de signalisation en activant une voie de croissance cellulaire par l'intermédiaire d'un nouveau signal extérieur à la cellule.

V- Les RTK comme cibles thérapeutiques

1. RTK et processus pathologiques

Le rôle pivot des RTK en tant que régulateur primaire de processus cellulaires implique qu'ils peuvent initier des phénomènes de dérégulation (**Planche 17-Figure 1**).

L'activité des RTK est habituellement finement régulée, soit par des protéines phosphatases qui contrôlent leur phosphorylation (Ostman and Bohmer 2001), soit par des systèmes de rétrocontrôles négatifs dues à la structure même du domaine TK. En effet, le concept de frein moléculaire maintenant le domaine TK inactif jusqu'à ce qu'un signal ordonne son activation est maintenant bien établi (Chen et al. 2007). Ce frein moléculaire est constitué de nombreuses liaisons ioniques entre le cœur du domaine TK et certains résidus de la boucle catalytique. Les changements de conformation dus à la fixation d'un ligand par le récepteur, suivis de phosphorylations spécifiques de certains résidus de la boucle catalytique, désengagent certains résidus du « frein » et lèvent l'inhibition du récepteur. De récentes études sur l'IGFR ont montré la finesse du système car la mutation de certains résidus de la boucle catalytique parviennent à moduler la vitesse de phosphorylation du récepteur (Li and Miller 2006). De plus il a été montré que la région juxta membranaire jouait un rôle inhibiteur sur l'activité TK pour l'EGFR (Thiel and Carpenter 2007) et l'IGFR (Craddock et al. 2007), ou encore que l'extrémité C terminale pouvait jouer le même rôle dans le cas de certains RTK de la famille des MET (Yokoyama et al. 2005). Enfin il existe des systèmes bien connus d'endocytose et de dégradation du récepteur une fois son ligand lié.

Dans certains cas les RTK peuvent être dérégulés, soit intrinsèquement, soit surexprimés en présence de leur ligand, pour être à l'origine de processus pathologiques. Il faut savoir qu'environ 30% des RTK connus à ce jour ont été retrouvés associés à des cas de cancers, ce qui paradoxalement a permis de mieux comprendre le fonctionnement de ces récepteurs (Amit et al. 2007) (**Planche 17-Figure 2**). Le cas le plus connu est sans doute la translocation de Philadelphie, qui est une anomalie chromosomique spécifique (échange de matériel génétique, entre les chromosomes 9 et 22) associée à la leucémie myéloïde chronique (LMC). Il y a alors association d'une partie du récepteur BCR (B Cell Receptor) à la tyrosine kinase ABL soluble. Il s'agit d'une mutation « gain de fonction » où le récepteur BCR-ABL ainsi obtenu conduit à une activation constitutive et exacerbée du domaine TK. D'autres RTK comme le FGFR3 peuvent aussi être activés de façon constitutive pour créer des désordres

métaboliques, comme la dysplasie thanatophorique de type II. Dans ce cas pathologique, le FGFR3 suractivé conduit à une signalisation aberrante qui entraîne des désordres squelettiques congénitaux menant à une mort néonatale dans la plupart des cas (Webster et al. 1996).

2. Stratégies de ciblage des RTK

Deux grandes stratégies sont déployées à l'heure actuelle pour cibler les RTK qui sont l'utilisation de petites molécules organiques inhibitrices regroupées sous le terme de PKI (Protéine Kinase Inhibiteur) et les anticorps monoclonaux. Le Cetuximab est un exemple d'anticorps monoclonal qui se lie spécifiquement au domaine extra-cellulaire de l'EGFR, qui en prenant la place du ligand, précipite l'internalisation du récepteur (El-Rayes and LoRusso 2004). Les PKI semblent présenter les solutions les plus prometteuses pour cibler les RTK, en raison de leur efficacité et de leur spécificité. Les PKI sont des petites molécules de moins de 600 Da constituées d'hétérocycles hydrophobes. La plupart du temps les PKI sont des inhibiteurs compétitifs du substrat ATP (Shchemelinin et al. 2006) (**Planche 18-Figure 1**), et vont donc aller se loger dans la poche à ATP des domaines TK pour empêcher toute activation de la kinase par encombrement stérique (Vlahovic and Crawford 2003) (**Planche 18-Figure 2**). Un des meilleurs exemples à ce jour est l'imatinib (dont est dérivé le Gleevec) qui est à la fois active sur Bcr-Abl, c-kit et le récepteur au PDGF (Platelet-derived growth factor) (Noble et al. 2004) (**Planche 18-Figure 3,4**). A ce jour, pas moins de 30 inhibiteurs compétitifs de l'ATP sont en essais cliniques mais doivent faire face à divers problèmes de cytotoxicité et de vectorisation. De plus il arrive que ces composés ne soient pas efficaces sur certaines versions mutées de RTK.

Les tendances actuelles tentent de trouver de nouvelles applications aux PKI autre que le cancer. Il pourrait être possible de les utiliser dans le cas de maladies inflammatoires chroniques si la spécificité de certains composés devenait encore plus précise (Rokosz et al. 2008) ou encore dans le cas de certaines maladies infectieuses. Ce dernier point nous intéresse particulièrement. De récents travaux décrivent l'efficacité d'inhibiteurs de CDK (Cyclin Dependent Kinase) contre la réplication du VIH (Schang 2005). Plus proche de nos travaux encore, le ciblage des PKI semble de plus en plus envisagé dans le cadre de maladies parasitaires à *Plasmodium falciparum* (Doerig and Meijer 2007) ou Trypanosoma et Leishmania (Naula et al. 2005) contre leur kinases solubles.

VI- Objectifs de l'étude

Dans le contexte actuel où la monothérapie au PZQ contre le schistosome montre ses limites en terme de prévalence de réinfection et tend à créer des résistances, il est nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques anti-schistosome. Dans ce cadre nous pensons que l'utilisation des RTK, protéines essentielles aux processus de survie de tout organisme, peut constituer une cible thérapeutique pertinente.

Les objectifs de mes travaux de recherches ont consisté à :

Evaluer la possibilité des RTK de schistosome à être utilisés comme cibles thérapeutiques.

Ce concept s'inscrit dans celui de l'utilisation des PKI dans des applications autres que le cancer, comme la lutte contre les maladies infectieuses. Cette étude a pris appui sur les connaissances que nous avons sur les RTK de schistosome et sur l'analyse structurale approfondie des domaines catalytiques de RTK caractérisés au laboratoire. En effet, il était important d'évaluer la spécificité des domaines catalytiques des RTK de schistosome vis-à-vis des RTK humains (hôte).

Confirmer l'existence d'une prise de glucose dépendante d'une voie insuline chez *S. mansoni* et tenter de définir l'implication de SmIR-1 ou SmIR-2 dans ce phénomène.

Cette étude s'inscrit dans la ligne directe de la caractérisation des IR de schistosome réalisée au laboratoire, apportant de nouvelles données concernant l'effet de l'insuline humaine sur le parasite.

Etendre l'étude de SmRTK-1 : le récepteur atypique de *S. mansoni*, à celle d'une nouvelle famille de RTK, les VKR.

Ce volet a constitué la part la plus importante de mon travail de recherche. Les travaux qui vont être exposés dans ce mémoire montrent que SmRTK-1 et AmRTK-1 sont les premiers représentants d'une toute nouvelle famille de RTK nommée VKR. Différentes approches fonctionnelles ont été menées pour tenter de comprendre le mode de fonctionnement et le rôle de ces récepteurs originaux.

Planches des figures liées au chapitre introductif

Schistosome et schistosomiase

Planche 1 : Cycle et aires de répartition

Planche 2 : Stades parasitaires

Planche 3 : Le couple de vers adultes

Planche 4 : Pathologie et thérapie

Protéines kinases et signalisation

Planche 5 : Les kinases humaines

Planche 6 : Les kinomes

Planche 7 : Les Protéines Tyrosine Kinases (TK) humaines

Planche 8 : Protéines kinases et signalisation - Classification des Tyrosine Kinases cytosoliques (CTK) et Récepteurs Tyrosine kinase (RTK) humains

Planche 9 : Motifs caractéristiques des domaines catalytiques de kinases humaines

Planche 10 : Fonctionnement du domaine Tyrosine Kinase

Planche 11 : Voies de signalisations classiques transduites par les RTK

Les kinases de schistosome

Planche 12 : Le récepteur et la voie TGF- β

Planche 13 : Les récepteurs de l'insuline

Découverte de SmRTK-1 chez *S. mansoni*

Planche 14 : Structure du Récepteur

Planche 15 : Bases de l'étude

Planche 16 : Comment envisager son étude ?

Les RTK comme cibles thérapeutiques

Planche 17 : RTK impliqués dans les cancers

Planche 18 : Ciblage par inhibiteurs de protéine kinase (PKI)

Planche 1 - Schistosome et schistosomiase - Cycle et aires de répartition

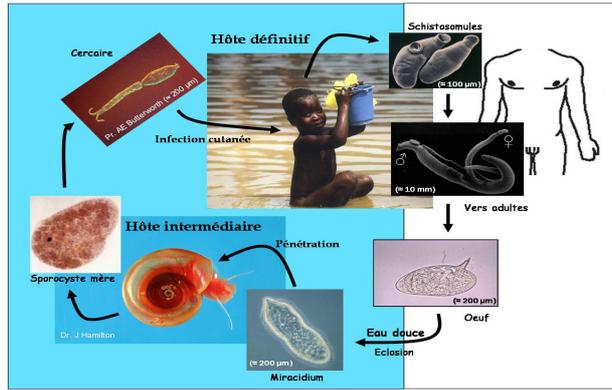


Figure 1 : Cycle de vie de *S. mansoni* (d'après Wellcome Trust 1998, modifié)

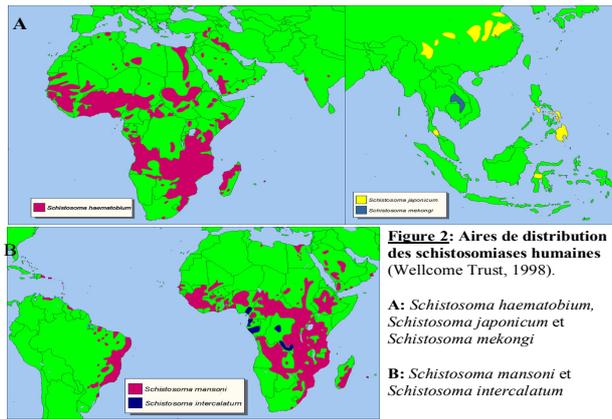


Figure 2: Aires de distribution des schistosomoses humaines (Wellcome Trust, 1998).
A: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* et *Schistosoma mekongi*
B: *Schistosoma mansoni* et *Schistosoma intercalatum*

Planche 2 - Schistosome et schistosomiase - Stades parasitaires



Figure 1 : Œuf de *S. mansoni* à éperon latéral contenant la larve miracidiale (≈ 200µm). (Cambridge University Schistosomiasis Research Group)

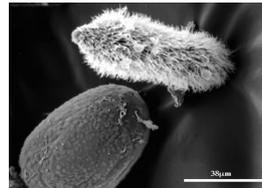


Figure 2 : Miracidium (petite larve avec des plaques ciliées) vu en microscopie électronique à balayage. (Wellcome Trust, 1998)



Figure 3 : Furcocercaire, vu en microscopie électronique à balayage, constitué d'une tête (qui va pénétrer la peau de l'homme) et d'une queue bifide qui sera perdue (Wellcome Trust, 1998).

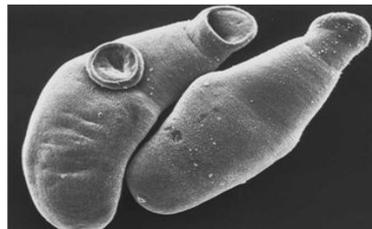


Figure 4 : Schistosomules vus en microscopie électronique à balayage. (Wellcome Trust, 1998)

Planche 3 - Schistosome et schistosomiase - Le couple de vers adultes

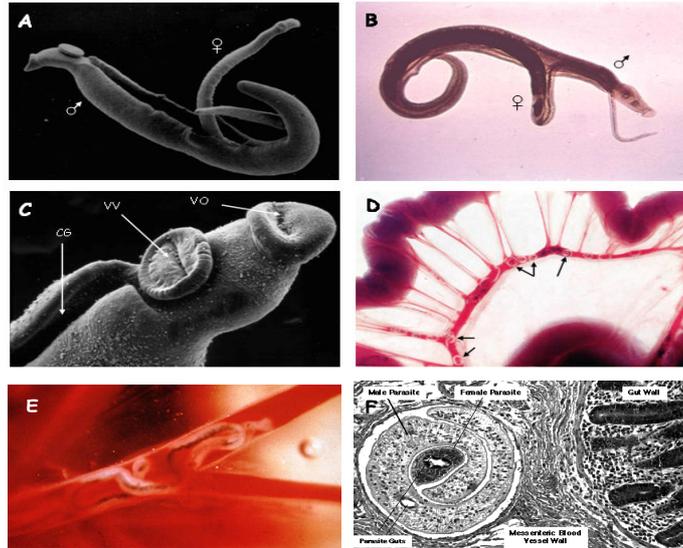


Figure 1 : Schistosomes adultes. (A) Couple de vers observé au MEB ; la femelle est dressée hors du canal gynécophore du mâle. (B) Couple observé par transparence au microscope optique. (C) Ver mâle observé au MEB ; détail de la partie antérieure. VO, Ventouse Orale ; VV, Ventouse Ventrale ; CG, Canal Gynécophore. (D) Veines mésentériques, lieu de ponte de *S. mansoni*. Les flèches indiquent les couples de vers. (E) Couples de schistosomes vus par transparence dans une veine mésentérique. (F) Coupe de vaisseau sanguin, Dr. D. Owen .

Planche 4 - Schistosome et schistosomiase - Pathologie et thérapie



Figure 1 : Jeune patient africain atteint de bilharziose avancée (hépatosplénomégalie).

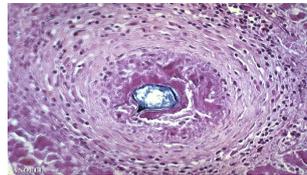


Figure 2 : Granulome bilharzien à *S. mansoni*. L'œuf, de part son éperon se retrouve prisonnier dans le tissu hépatique et provoque une forte réaction immunitaire qui finit par calcifier la région (ouvrage Anophele, 7eme Edition).

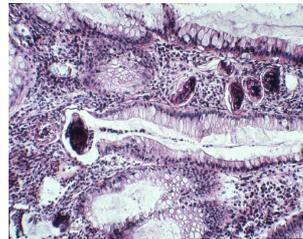


Figure 3 : Œufs de *S. mansoni* emprisonnés dans les tissus intestinaux (ouvrage Anophele, 7eme Edition).

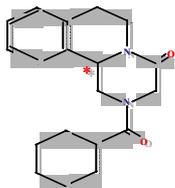


Figure 4 : Molécule de praziquantel, seule drogue anti-schistosome efficace à ce jour



Figure 5 : Praziquantel (BILTRICIDE – Bayer)

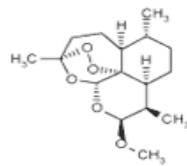


Figure 6 : Molécule d'arthémeter, autre drogue alternative au PZQ.

Planche 5 - Protéines kinases et signalisation - Les kinases humaines

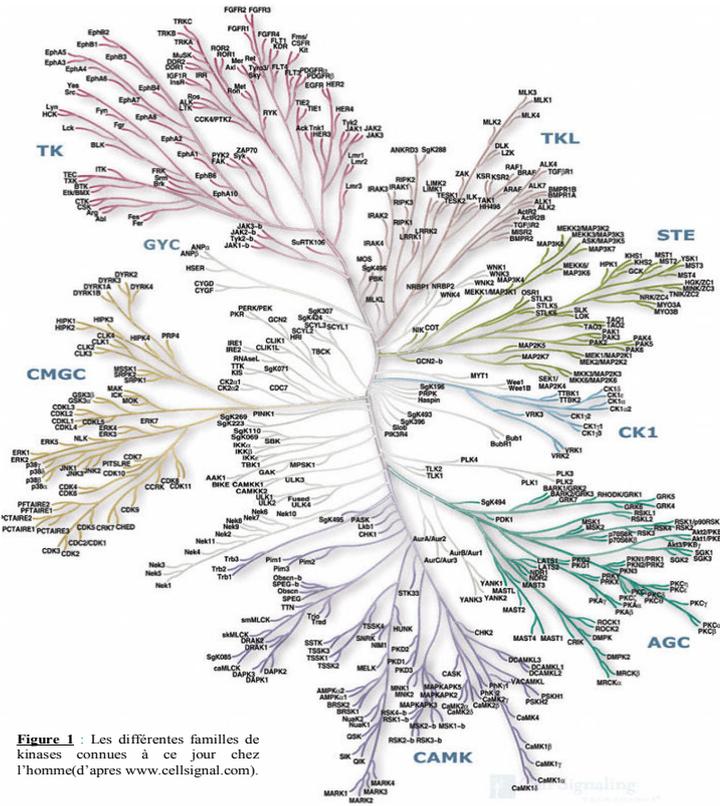


Figure 1 : Les différentes familles de kinases connues à ce jour chez l'homme (d'après www.cellsignal.com).

Planche 6 - Protéines kinases et signalisation – Les kinômes

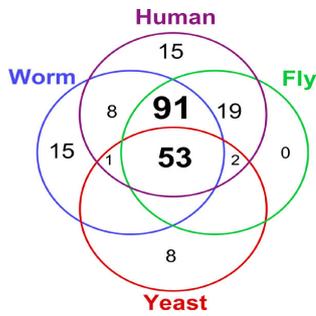


Figure 1 : Distribution des 212 familles de kinase des kinomes de levure *Saccharomyces cerevisiae*, de nématode *Caenorhabditis elegans*, de drosophile *Drosophila melanogaster* et d'humain. (Manning et al, 2005)

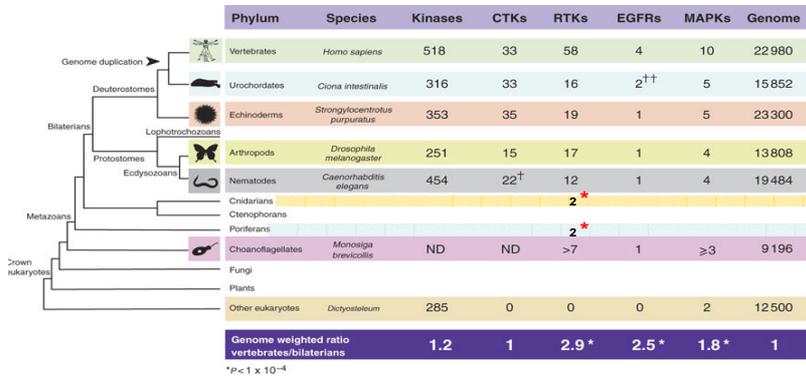


Figure 2 : Evolution et expansion de la signalisation RTK. Les RTK semblent être spécifiques des métazoaires. Parmi les métazoaires, des RTK ont été retrouvés chez les cnidaires (Muller et al, 1999) et les spongiaires (Miller et al, 2000; Reidling et al, 2000). Aucun RTK n'est retrouvé chez les unicellulaires mis à part les Choanoflagellés où il pourrait exister un ancêtre des RTK (King et Caroll, 2001). Il ne semble pas exister de RTK chez les champignons et les plantes. (Schéma de Amit et al, 2007, complété)

Planche 7 - Protéines kinases et signalisation - Les Protéines Tyrosine Kinases (TK) humaines

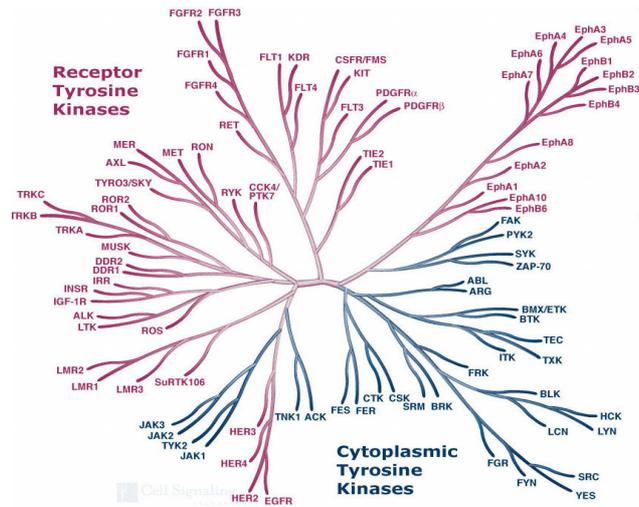


Figure 1 : Les différentes familles de Tyrosine Kinases (TK) connues à ce jour chez l'homme. (d'après www.cellsignal.com).

Planche 8 - Protéines kinases et signalisation - Classification des Tyrosine Kinases cytosoliques (CTK) et Récepteurs Tyrosine kinase (RTK) humains

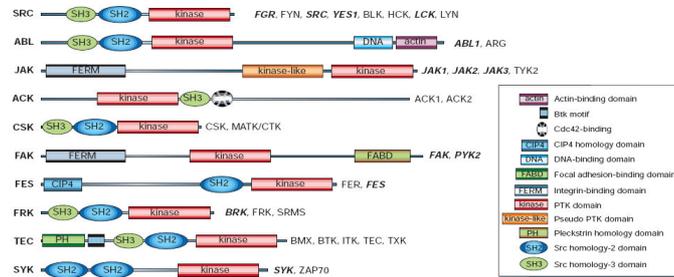


Figure 1 : Structure des Les différentes sous-familles de CTK ou NRTK connues chez l'homme. Le domaine le plus fréquemment retrouvé associé au domaine catalytique TK est le domaine SH2 (reconnaissance des tyrosines phosphorylées) ou SH3 (reconnaissance des domaines riches en proline) (Blume-Jensen et Hunter, 2001).

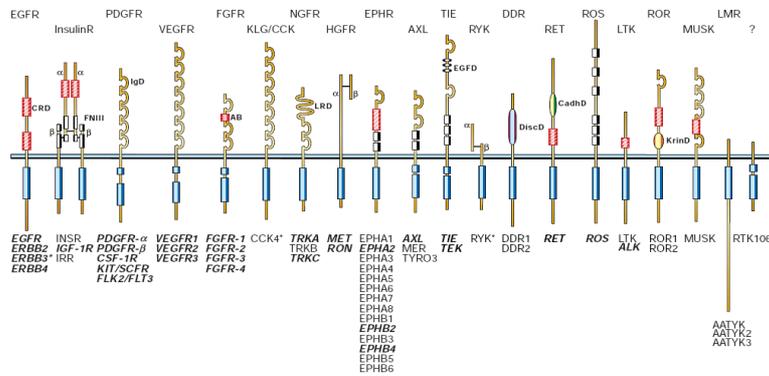


Figure 2 : Structure des différentes sous-familles de RTK connues chez l'homme (Blume-Jensen et Hunter, 2001).

Planche 9 - Protéines kinases et signalisation – Motifs caractéristiques des domaines catalytiques de kinases humaines

S. Dom	I	II	III
cons.	G G G V	A K	E
Erk2	YTNLSYIGGGAYGRVCSAYDN-----VNKVRVAIKKISP--FEHQTYCQRTLREIKILLRFHEN-II		
SLK	WEIIGELGGGAFGRVYKQNK-----ETSVLAARVIDT--KSEEEEDVMREIDILASCDHFM-IV		
Ab1	ITMKHKIGGGYGVYGVVWIK-----K-YSLVAVKTKLED--T-MEVEEFLFAVAMKEIKHFM-IV		
EGFR	FKKIKVLGGGAFGTVYKGLWIP--EGEK--VKIPEVAIKELREA--TSPKANKEILDEAYVMASVDMHP-VC		
INSR	ITLLRELGGGSGFGRVYEGNAR--DIKGEAETRVAVKTVNES--ASLRERIEFLNEASVMKMGFTCHH-VV		
FGFR1	LVLGKPLGGGCGVVLAEAIGLDDKDKPNRVTKVAVKMLKSD--ATEKDLSDLISEMEMMMIGKHGHNII		
	IV	V	VIa
Erk2	GINDIIRAPITIEQMKRDVYVYQDLMETD-LYKLLRTO--HLSN-----LSN-DHICFYFLYQLLRG		
SLK	KLLDAFAYE-----NINLWILIEPCAGGAVDVMLELERLTFE-----LFE-SQIQVVCQQLDIA		
Ab1	QLLGVCTREF-----PFYIIIEFMTYGNLLDYLRECNQREVN-----EVNAVLLYMATQISSA		
EGFR	RLLGICILTS-----TVQLITQLMPFGCLLDVYVREHKD-NIGS-----IGS-QVLLNWCYQIAGK		
INSR	RLLGIVVSKGQ-----PTLVVMEMLMAHGDLKSYLSRLP--EAENNPGRPPP--TLQEMIQMAEADG		
FGFR1	NLLGACTQDG-----PLVVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLECYNPSHNPEEQSSKDLVSCAYQVARG		
	VIb	VII	VIII
Erk2	y hEDLK RN K DFG AFE		
SLK	LNVLHD-NKIIHRDLKAGNIIIFLDG---DIKLDVFGVSAKN---TRTIQRDRSFIG---TFWYRABEIM		
Ab1	MEYLEK-KNFIHRDLAARNLVGNGH---LVKVDVFLGRSR---IMTGDYTAHAGAKFFIKWIAPESEL		
EGFR	MNYLED-RRLVHRDLAARNLVKTPQ---HVKITDFGLAKL---LGAEKEYHAEGGKVPFKWMALESIL		
INSR	MAYLNA-KKFIHRDLAARNMVAHDF---TVKIGDFGMTRD---IYETDYRKGKGLLFPVWMAPESEL		
FGFR1	MEYLAS-KKCIHRDLAARNVLVTEDN---VMKIDVFGFLARD---IHHIDYKKTITNGRLPVKQWMAPEAL		
	IX	X	
Erk2	LNS---KGYT-KSIDIWSVCCILAEMLS-NRPIFGKHLYDQLNHLGILGSPSQEDLNINCIINLKARNY		
SLK	MCETSKDRPYD-YKADVWSLGTILIEMAE-IEPPHHE-----LNFMRVLLKIAKSEPP		
Ab1	AY---NKFS-IKSDVWSAFGVLLWEIATYGMSPYFG-----IDLQVYVELLEKDY		
EGFR	LH---RIYT-HQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDG-----IPASEISSILEKGE		
INSR	KD---GVFT-TSSDWSFQVLLWEITSLAEQPYQG-----LNSQVILKFMVMDGG		
FGFR1	FD---RIYT-HQSDVWSFQVLLWEITLGGSPYFG-----VPVEELFKLLKEGH		
	XI		
Erk2	LLSLPHKNKVPVNRNLPFNADSKALDLDLKLMTFNPHKRIE-----VEQALAHPYL		
SLK	TLAQP-----SRWSNFKDFLLKCKLEKNVDARWT-----TSQLLQHPFV		
Ab1	RMERP-----EGCPEKVEYELMRACQWNPNSDRFS-----FAEIQHAF		
EGFR	RLPQP-----PICTIDVYIMVVKCWMIDADSREP-----FRELIIIEFS		
INSR	YLDQP-----DNCPERVTDLMRMCQWQFNPNMPT-----FLEIVNLL		
FGFR1	RMDFP-----SNCTNELYMMRDCWHAVFSGRPT-----FKQLVEDL		

Figure 1 : Alignement multiple de 9 domaines catalytiques de kinase humaines représentatifs des différents membres de la superfamille des kinase eucaryotiques.
- Sérine/Thréonine Kinases (signature: **K**): Erk2 (CMGC), SLK (STE) et Akt1 (AGC)
- Tyrosine Kinases (signature: **R**): Abl (cytoplasmique), EGFR, INSR et FGFR1.
Les différents sous-domaines sont indiqués en chiffres romains. Le consensus universel est indiqué en rouge (d'après Khayath et al, 2007, modifié).

Planche 10 - Protéines kinases et signalisation – Fonctionnement du domaine Tyrosine Kinase.

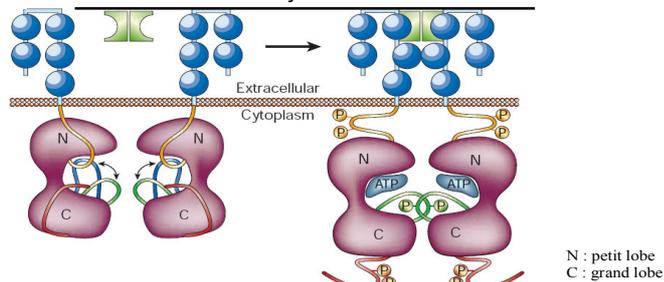


Figure 1 : Mécanisme d'action d'un RTK (et même d'une kinase en général) (Blume-Jensen et Hunter, 2001).
Sous l'effet d'un signal activateur (un ligand capté dans le cas d'un RTK), la protéine change de conformation pour faire entrer une molécule d'ATP dans la poche à ATP du domaine TK. Cet ATP est utilisé pour phosphoryler des résidus tyrosine bien spécifiques de la boucle d'activation, ce qui a pour effet de désengager la boucle d'activation du « frein moléculaire » tenant inactive chaque kinase. La kinase devient alors une « machine » à phosphoryler son substrat (dans le cas d'un RTK, un partenaire de dimérisation). La phosphorylation de certaines tyrosines d domaine juxtamembranaire ou C terminal va permettre le recrutement de partenaires de voies de signalisation.

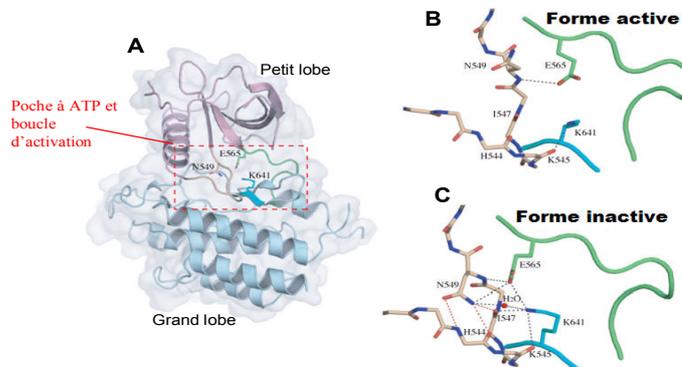


Figure 2 : La boucle d'activation d'un domaine kinase (d'après Chen et al, 2007).
A : Position de la boucle d'activation (en vert) et de la poche à ATP au niveau de la kinase en modélisation.
B : Boucle d'activation désengagée du frein moléculaire – La kinase est active
C : Boucle d'activation engagée dans le frein moléculaire (tensions ioniques) – La kinase est inactive

Planche 11 - Protéines kinases et signalisation – Voies de signalisations transduites par les RTK.

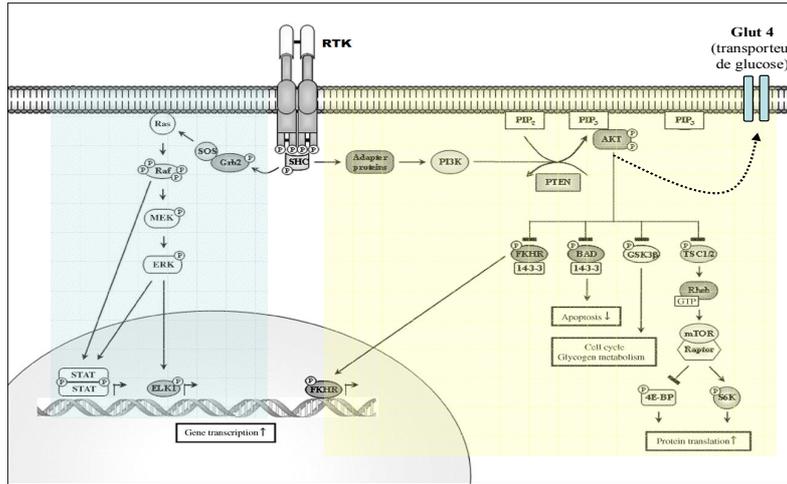


Figure 1 : Représentation schématique des principales voies transduites par les RTK (d'après Doepfner et al, 2007, modifié).

La voie Ras/MapK (en Bleu) : Par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice SHC, le complexe Grb2/SOS est activé. Celui-ci va activer la petite protéine G Ras, qui va ensuite activer la voie des MAPK avec Raf comme initiateur. Divers facteurs de transcriptions sont ensuite activés tel que ELK1 ou AP1.

La voie PI3K/AKT (ou PKB) (en jaune) : Par l'intermédiaire de SHC ou autre protéine adaptatrice (ex : IRS –Insulin Receptor Substrate – pour les IR) la p13K est activée et va à son tour activer AKT (ou PKB) qui est un véritable carrefour de signalisation. AKT peut activer la translocation des transporteurs de glucose (Glut4) dans le cas des IR, mais aussi médier des voies variées menant par exemple à la synthèse protéique avec mTOR ou encore au métabolisme du glycogène par GSK3.

Donc de manière générale, la tendance générale est que la voie Ras/MAPK est impliquée dans les phénomènes de développement alors que la voie PI3K/AKT est impliquée dans les voies liées au métabolisme. Il faut bien prendre en compte que les 2 voies ne sont pas strictement cloisonnées.

Planche 12 - Les kinases de schistosome – Le récepteur et la voie TGF-b.

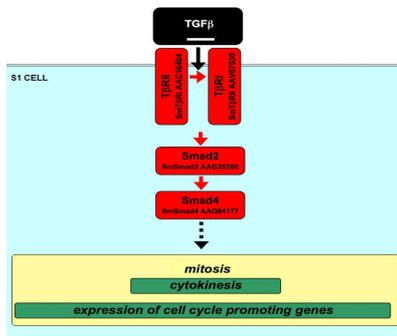


Figure 1 : Schéma synthétique de la voie TGF-β chez *S. mansoni*.

Un ligand TGF-like endogène au parasite (*l'activine* de *S. mansoni*) active un récepteur au TGF-β (constitué de TβRI et TβRII), qui recrute des partenaires Smad menant au développement parasitaire (mitoses...)(Grevelding et al, 2007).

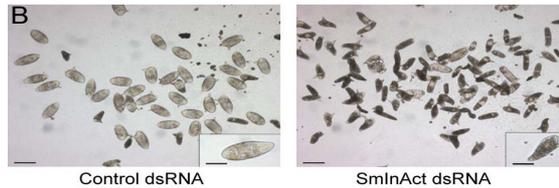
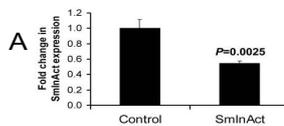


Figure 2 : Expérience d'interférence ARN menée contre SmAct (*Activine* de *S. mansoni*). Des ARN double-brin (ARNdb) dirigés contre SmAct sont administrés *in vitro* par trempage sur des schistosomes adultes en couple. Les ARNdb enclenchent la machinerie naturelle d'interférence ARN qui va détruire les transcrits de SmAct (par l'intermédiaire des complexes DICER et RISC), créant ainsi un « Knock Down » de SmAct. La déplétion de SmAct au niveau des vers adultes entraîne la ponte d'œufs non fertiles. (A : vérification de la baisse d'expression de SmAct par PCR quantitative, B : Observation des œufs après interférence ARN) (Freitas et al, 2007)

Planche 13 - Les kinases de schistosome – Les récepteurs de l'insuline.

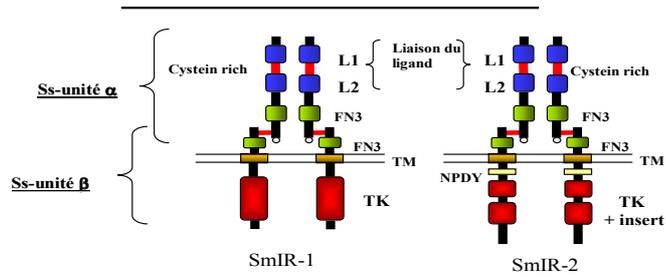


Figure 1 : Schéma des 2 récepteurs de l'insuline (SmIR-1 et SmIR-2) découverts chez *S. mansoni*. Les 2 récepteurs présentent beaucoup de similarités avec néanmoins une partie C-terminale plus importante pour SmIR-2 ainsi qu'un insert dans le domaine TK. De manière surprenante, SmIR-1 ne possède pas de motif NPDY pour le recrutement d'une protéine IRS. Ces différences suggèrent des fonctions différentes pour les 2 récepteurs (Khayath et al, 2007).

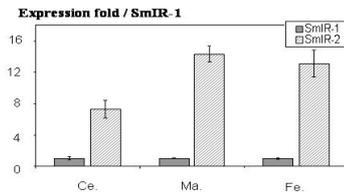


Figure 2 : Taux d'expression de SmIR-1 et SmIR-2 en PCR quantitative. SmIR-2 est beaucoup plus exprimé que SmIR-1 à tous les stades parasitaires (Ce : cercaires; Ma : ver adulte mâle, Fe : Ver adulte femelle) ce qui suggère la encore des fonctions différentes (Khayath et al, 2007).

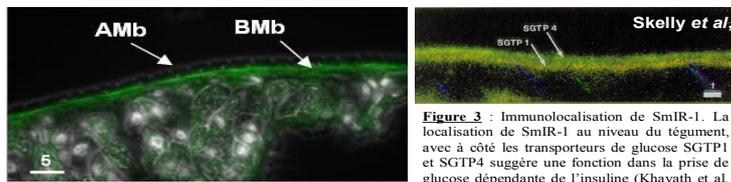


Figure 3 : Immunolocalisation de SmIR-1. La localisation de SmIR-1 au niveau du tégument, avec à côté les transporteurs de glucose SGTP1 et SGTP4 suggère une fonction dans la prise de glucose dépendante de l'insuline (Khayath et al, 2007, Skelly et al, 1996).

Planche 14 - Découverte de SmRTK-1 chez *S. mansoni* – Structure du Récepteur

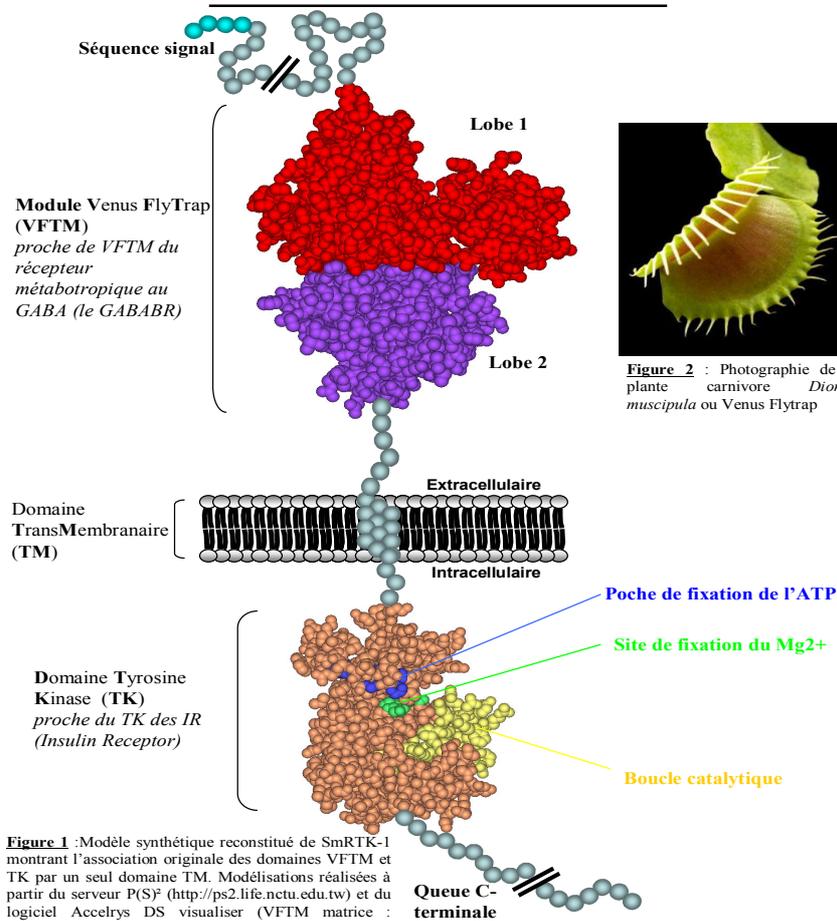


Figure 2 : Photographie de la plante carnivore *Dionaea muscipula* ou Venus Flytrap

Figure 1 : Modèle synthétique reconstitué de SmRTK-1 montrant l'association originale des domaines VFTM et TK par un seul domaine TM. Modélisations réalisées à partir du serveur P(S)² (<http://ps2.life.nctu.edu.tw>) et du logiciel Accelrys DS visualiser (VFTM matrice : IEWK_A; matrice TK : 1m14_A)

Planche 15 - Découverte de SmRTK-1 chez *S. mansoni* – Bases de l'étude

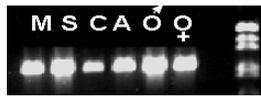


Figure 1 : RT-PCR indiquant que SmRTK-1 est présent à tous les stades parasitaires (M : miracidium; S : sporocyste; C : cercaire, A : adulte (Mâle et Femelle)). (Vicogne et al, 2003)

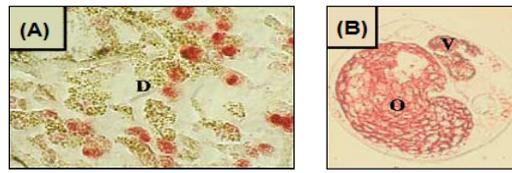


Figure 2 : Expériences d'hybridation *in situ* montrant une localisation de SmRTK-1 au niveau des ovocytes (A) et ovaires (B) de ver adulte femelle de *S. mansoni*. (Vicogne et al, 2003)

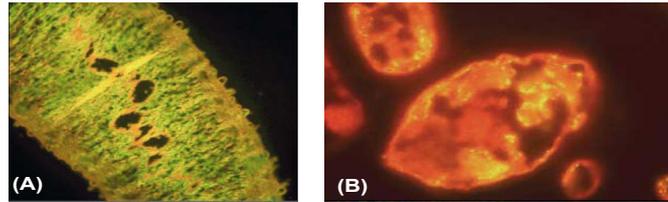


Figure 3 : Expériences d'immunolocalisation montrant une localisation de SmRTK-1 au niveau du parenchyme chez le ver adulte mâle (A) et les sporocystes (B). (Vicogne et al, 2003)

Planche 16 - Découverte de SmRTK-1 chez *S. mansoni* – Comment envisager son étude ?

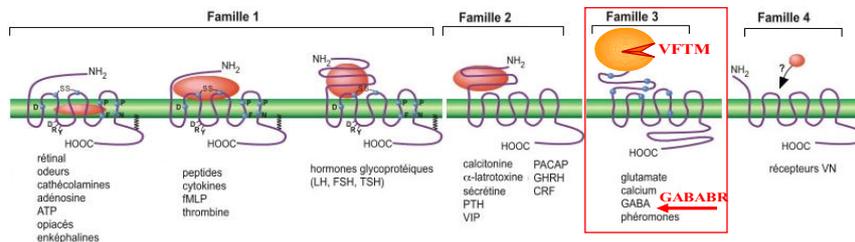


Figure 1 : Schéma montrant les différentes familles de Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG). SmRTK-1 contient un VFTM proche de ceux des RCPG de classe 3 (GABABR). Le ligand de SmRTK-1 est à rechercher parmi ceux connus de la famille 3 des RCPG (d'après Martin S., site 123bionet, modifié).

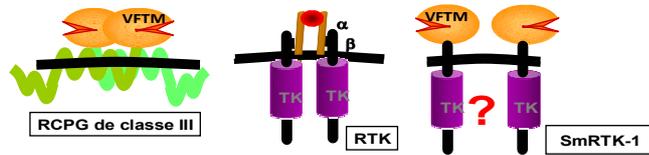


Figure 2 : Schéma montrant que les RCPG de classe 3, et les RTK se dimérisent. Les RCPG de classe 3 se dimérisent même avant d'arriver en surface sous peine d'être retenus dans le réticulum endoplasmique (Brock et al, 2005). Les RTK se dimérisent par affinité par un ligand (où le sont constitutivement, comme les IR). Il est donc fort probable que SmRTK-1 se dimérise (hétéro- ou homodimérisation) pour s'activer.

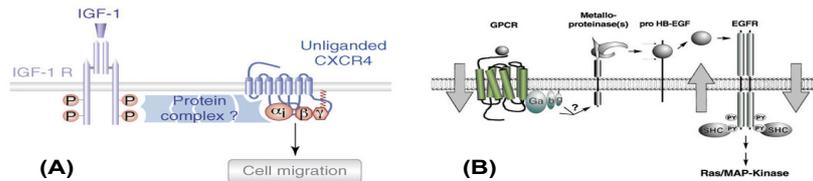


Figure 3 : Schéma montrant des cas de transactivation entre GPCR et RTK. Les phénomènes de transactivation sont connus dans les 2 sens. (A) Médiation d'une voie GPCR après activation par des facteurs de croissance retrouvés dans certains cas de cancers. (B) Médiation d'une voie de croissance après activation d'un GPCR, aussi dans certains cas pathologiques. Ce dernier point nous intéresse particulièrement car nous pourrions avoir ce type de cas de figure ou un ligand de type GPCR mène à une voie de croissance et différenciation. (d'après Delcourt et al, 2007; Thomas et al, 2006)

Planche 17 - Les RTK comme cibles thérapeutiques – RTK impliqués dans les cancers

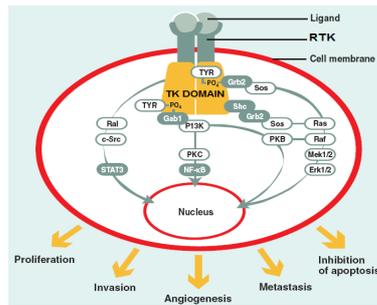


Figure 1 : Schéma montrant les effets possibles d'une signalisation aberrante et exacerbée médiée par des RTK pathogéniques (surexprimés ou mutés). Ces effets entrent majoritairement dans différents processus cancéreux (Vlahovic et al, 2003)

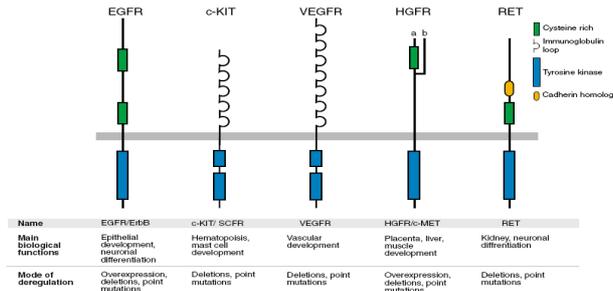


Figure 2 : Exemples de RTK directement impliqués dans des cancers (Amit et al, 2007).

Planche 18 - Les RTK comme cibles thérapeutiques – Ciblage par inhibiteurs de protéine kinase (PKI)

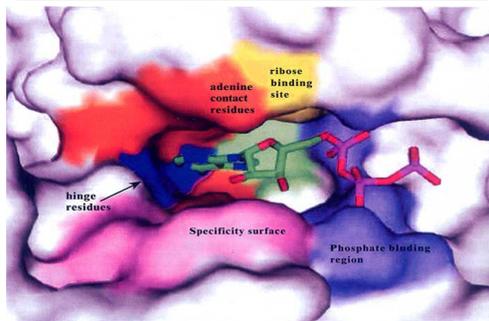


Figure 1 : modélisation de la poche à ATP d'une kinase. Dans cet exemple la poche contient une molécule d'ATP. (McInnes et al, 2005)

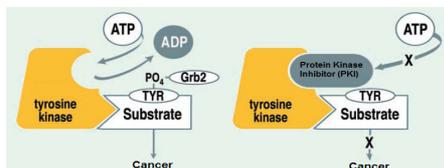


Figure 2 : Mode d'action des PKI (Protein Kinase Inhibitor) qui vont se loger dans la poche à ATP pour empêcher la kinase de fonctionner (Vlahovic et al, 2003)

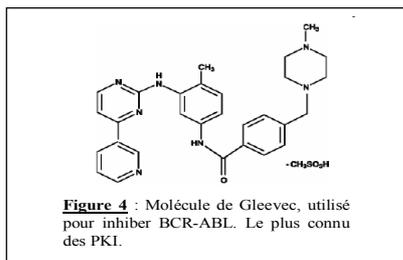


Figure 4 : Molécule de Gleevec, utilisé pour inhiber BCR-ABL. Le plus connu des PKI.

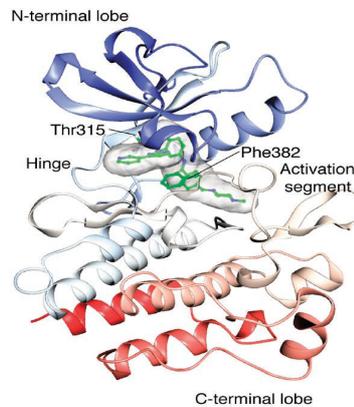


Figure 3 : Modélisation montrant un PKI inséré dans la poche à ATP d'une kinase (Martin et al, 2004).

RESULTATS

RESULTATS

I- Les RTK de schistosome comme futures cibles thérapeutiques

La première partie de ce travail s'organise entre 2 grands axes décrits à travers 2 articles. Le premier axe consiste à évaluer le concept d'utilisation des TK et plus particulièrement des RTK pour lutter contre le schistosome. Le second axe, quant à lui, s'intéresse à définir la fonction des RTK que nous étudions au laboratoire, à savoir les récepteurs de l'insuline SmIR-1 et SmIR2, et à définir leur importance biologique pour le parasite et par conséquent leur intérêt comme cible potentielle. Cette première partie de résultats cherche donc à solidement établir le concept de « RTK de schistosome comme future cible thérapeutique » de manière intégrée, en apportant des données bibliographiques, prédictives et expérimentales.

Le premier article présenté (*Dissous C., Ahier A. et Khayath N. Bioessays – 2007. Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis Dec ; 29(12) : 1281-8*) pose les bases conceptuelles du sujet. Dans ce travail, un point est fait sur l'état actuel de la schistosomiase dans le monde et des moyens existants pour limiter les infections. En effet il faut rappeler que la schistosomiase concerne près de 200 millions de personnes dans le monde, avec environ 280 000 morts par an, principalement dans les pays d'Afrique subsaharienne. Malgré toutes les tentatives entreprises pour éradiquer le parasite (actions sur le milieu de vie du mollusque vecteur, éducation des populations, utilisations de diverses drogues anti-schistosome et tentatives de mise au point de vaccin anti-schistosome) force est de constater que la schistosomiase est toujours bien présente. A ce jour, une seule et unique drogue est utilisée à grande échelle contre le schistosome : le praziquantel ou PZQ. Il apparaît donc nécessaire de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques pour disposer d'une alternative au PZQ qui pourrait devenir obsolète, comme toute monothérapie appliquée sans aucun contrôle. Dans cet article nous proposons les TK et plus particulièrement les RTK comme cibles thérapeutiques. Nous avons rassemblé les connaissances acquises à ce jour sur les TK de schistosome montrant qu'il existe de nombreuses TK conservées par rapport à celles de l'homme et qui pourraient être impliquées dans des étapes clé du développement parasitaire. Différents travaux menés sur les TK de schistosome ont pu démontrer que l'inhibition des kinases de la famille Src par de l'herbimycine A diminuait l'activité mitotique et la ponte des œufs des vers schistosomes femelles ou encore que SER, le récepteur de l'EGF du schistosome, était en mesure d'influer sur la voie des Ras/MAPK du parasite. Le rôle fondamental des TK pour la survie parasitaire est une des raisons principales pour les considérer comme cibles thérapeutiques potentielles.

Dans ce cadre nous avons voulu étudier la fonction des deux récepteurs de l'insuline (IR) de schistosomes, SmIR-1 et SmIR-2, récemment découverts et caractérisés au laboratoire (*Ahier A., Khayath N., Vicogne J. & Dissous C. Parasite – 2008. Insulin Receptors and glucose uptake in the human parasite Schistosoma mansoni ; 15, 573-579*).

Deux IR, SmIR-1 et SmIR-2 ont pu être caractérisés au laboratoire, ce qui semble être un phénomène nouveau chez les invertébrés où un IR unique est habituellement retrouvé. SmIR-1 et SmIR-2 possèdent tous deux des particularités de structure, des différences d'expression et de localisation, qui sous-entendent des fonctions différentes (Khayath et al, 2007). Nous avons voulu considérer la fonction métabolique des IR dans la prise de glucose. En effet, le schistosome consomme des quantités considérables de glucose sanguin. Bueding en 1950 (Bueding 1950) a montré que le ver était capable d'ingérer toutes les 5 heures son poids sec en glucose. De plus il vit dans les veines mésentériques en amont du système porte, dans une zone où le taux de glucose peut rapidement varier selon la prise alimentaire.

Jusqu'alors, l'existence d'une voie insuline chez le schistosome était controversée. Dans cet article nous montrons que la prise de glucose peut être modulée par l'insuline humaine et ce grâce à la mise au point d'un protocole de mesure de l'entrée de glucose non métabolisable radioactif dans les stades larvaires et adultes du parasite, prouvant l'existence d'une voie insuline possible chez le parasite.

Dans un second temps nous avons démontré que des inhibiteurs sélectifs d'IR humain (tyrphostines AG1024 et AG538) modulent la prise de glucose par le parasite. Ces résultats suggèrent que les IR interviennent dans ce processus et ils ont été confortés ensuite par des expériences d'interférence ARN démontrant que le ciblage de SmIR-1 chez les parasites provoque de la même manière une diminution de la prise de glucose.

Dans un dernier volet qui réunit les deux articles, nous décrivons un type de stratégie dans lequel on pourrait cibler les RTK parasitaires par des inhibiteurs spécifiques de la poche à ATP, à l'image de ce qui a déjà été entrepris pour les RTK dérégulés responsables de processus cancéreux. Nous avons pour cela construit et analysé précisément les structures tridimensionnelles des domaines TK, et plus particulièrement celles des poches à ATP, des RTK SER, SmIR-1 et SmIR-2 dans le but de démontrer le caractère conservé des domaines TK, mais surtout de souligner au voisinage de la poche à ATP les motifs divergents par rapport aux espèces mammifères. En effet, c'est sur la base de telles observations que le ciblage spécifique des RTK parasitaires pourra être envisagé chez l'hôte.

Nous avons entrepris une approche par modélisation à partir des matrices de RTK homologues connues chez l'homme. Pour cela nous avons utilisé le serveur (Maurel *et al.*)² de modélisation par homologie (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>) qui détermine la matrice la plus proche à considérer. Ensuite cette matrice est soumise au serveur RAMP (<http://www.ram.org/computing/ramp/>) qui détermine la structure tridimensionnelle finale. Le logiciel Accelrys DS Visualizer V1.7 (Accelrys Software Inc[©]) est utilisé pour étudier les modèles générés.

Les différents modèles obtenus montrent une grande conservation structurale des motifs cruciaux pour la liaison de l'ATP, à savoir le motif GxGxxG et VAVK, mais aussi tout un ensemble de motifs spécifiques, comme des inserts kinases (qui nécessiterait l'établissement d'un cristal pour être véritablement observé), susceptibles de permettre un ciblage très sélectif des RTK du schistosome.

Articles disponibles Online :

Ahier A, Khayath N, Vicogne J, Dissous C “**Insulin receptors and glucose uptake in the human parasite *Schistosoma mansoni***”, *Parasite*, 2008, 15, 573-579.

Dissous C, **Ahier A**, Khayath N “**Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis**”, *BioEssays*, 2007 Nov; 16;29 (12):1281-1288.

II- De l'étude d'un RTK atypique chez le schistosome à la découverte d'une nouvelle famille de RTK chez les invertébrés.

Cette partie regroupe la plus grande partie du travail accompli lors de cette Thèse. SmRTK-1 est un récepteur atypique constitué d'un domaine extracellulaire de type Venus Flytrap, d'un domaine transmembranaire unique et d'un domaine TK intracellulaire. SmRTK-1, caractérisé au laboratoire en 2003, a d'abord été considéré comme un représentant unique de ce type de RTK. Au cours de l'année 2005, les avancées concernant les séquençages et annotations de génomes divers, en particulier d'insectes, ont progressivement fait apparaître des séquences partielles de protéines très proches de SmRTK-1. Les analyses des régions génomiques au voisinage des séquences isolées, réalisées grâce à différentes banques de données (FlyBase, VectorBase, GenBank Blast) et outils de bioinformatique (Augustus gene, Genscan, Lasergene DNASTAR) ont rapidement permis de reconstituer d'autres récepteurs homologues à SmRTK-1. A ce jour, 15 séquences ont ainsi été décrites *in silico* chez différents organismes (*Drosophila ananasse*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. willistoni*, *D. mojavensis*, *D. virilis*, *D. grimshawi*, *Culex pipiens*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Tribolium castaneum*, *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis* (guêpe parasitoïde), *Pediculus humanus corporis* et *Strongylocentrotus purpuratus* (oursin)). Des études de structure génomique (structure intron-exon, conservations des jonctions intron-exon) et de phylogénie des domaines VFTM et TK nous ont permis de placer SmRTK-1 et les autres séquences trouvées au sein **d'une nouvelle famille de RTK** nommée **VKR** pour **V**enus **K**inase **R**eceptor. Nous avons cloné et séquencé quatre de ces récepteurs répartis dans différents ordres de la classe des insectes : DpseuVKR, AgVKR, TcVKR, AmVKR. SpVKR était déjà recensé dans une banque de RTK d'oursin sous le terme IR-like (<http://urchin.nidcr.nih.gov/blast/index.html>). Les différents profils d'expression obtenus pour les VKR indiquent une expression préférentielle dans les gonades d'oursin et ovaires d'anophèle (des résultats qui sont à corréliser avec la présence de SmVKR dans les gonades du schistosome femelle) ainsi que dans les stades larvaires de *T. castaneum* et du faux-bourdon d'*A. mellifera*.

Un travail important a été mené pour tenter de montrer que les VKR qui contiennent tous les motifs nécessaires à l'activité kinase du domaine TK sont des récepteurs capables d'exercer une activité kinase. En effet il existe chez certains organismes des RTK avec des fonctions importantes mais qui sont dépourvus d'activité kinase (Kroihner et al. 2001). Pour ces études, l'expression des VKR d'*A. mellifera* (organismes fournis par le Pr. Monique Gauthier –

Université P. Sabatier – Toulouse) et de *T. castaneum* (fournis par le Pr. Eric Haubruge – FUSAGX – Gembloux) a été mise au point et grâce à la construction de différents mutants nous avons démontré que ces deux récepteurs possédaient une activité kinase *in vitro*.

La mise au point de ce test kinase a aussi permis de démontrer que l'arginine (100µM) active la phosphorylation *in vitro* de AmVKR, suggérant que cet amino-acide ou au moins un analogue ou dérivé, puisse représenter le ligand des VKR.

Un second volet a concerné l'étude de la dimérisation d'AmVKR par la technique de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Les signaux obtenus prouvent que le récepteur est en mesure de s'homodimériser, même si une hétérodimérisation avec un autre récepteur est toujours possible dans les conditions naturelles d'expression chez l'abeille. Ces résultats sont en accord avec les analyses de bioinformatique du domaine VFTM qui montrent l'existence d'une face de dimérisation conservée chez les VKR.

Référence de l'article (En cours de publication) :

Ahier A, Rondard P, Gouignard N, Khayath N, Trolet J, Donogue DJ, Gauthier M, Pin JP, Dissous C “**A new family of receptor tyrosine kinases with a Venus Flytrap binding domain in insects and other invertebrates**”, PLOS One, 2009, submitted.

III- Approche fonctionnelle des VKR : Stratégies complémentaires et perspectives.

1. Etude de AmVKR dans le modèle *Apis mellifera*

a) Elaboration d'un sérum polyclonal YSARVA dirigé contre les VKR d'*Apis mellifera* (AmVKR) et de *Tribolium castaneum* (TcVKR)

Deux peptides présents dans le VFTM de AmVKR et TcVKR ont été sélectionnés sur la base de leurs fortes hydrophilie et antigénicité (figure 1) et de leur exposition en surface prédite par la modélisation (figure 2). Le peptide 1, AmYSA (YSAEGSSFNDRTKYYP), 100% identique à la séquence de *A. mellifera* et le peptide 2, TcRVA (RVAALTEDGQKYTEY), 100% identique à la séquence de *T. castaneum* (figure 3), ont été synthétisés et couplés à l'ovalbumine par l'entreprise Eurogentec.

TcVKR	----	TLVVSYSAEGETSFSDRNKYPYFFFRITIGENKDYQYVYL	----	VYLLLFKRLGW	RVAALTEDGQKYTEY	ISHMQETLG	----
AaVKR	----	MAVISYSAEGAFLSDRETYPYFFFRITIGENRQYGHVYV	----	VYVRLQLQLNWNRVAALTEDGQKSTEYISHMESMLK	----	----	----
AgVKR	----	MAVISYSAEGAFLSDREKYPFFFRITIGENRQYEHVYA	----	VYAQLLQRMNRRVAALTEDGQKATEYISYMETLLK	----	----	----
AmVKR	----	TVVISYSAEGSSFNDRTKYYP	----	VYLLLFKRLGW	RVAALTEDGQKYTEY	ISHMQDLFR	----
CpVKR	----	MAVISYSAEGAFLSDRETYPYFFFRITIGENRQYEHVYA	----	VYARLLQLNWNRRVAALTEDGQKSTEYISHMESLLK	----	----	----
DaVKR	----	LIVMSYSAEVNLVNSKSYPYFFFRITIGSDLIFIGAYL	----	AYLEIMKIFDWSRVSYLYEN	--EAVEYITNLKRNK	----	----
DgVKR	----	MMAISYSAEGSSFVDRKAYPYFFFRITIGSNVYVDVYM	----	VYMRIMQQLGWSRVSTLTEDSQCYTEYMSRMEKLR	----	----	----
DpVKR	----	MMIMSYSAEGATFSNREAYPNFFFRITIGSNRLFVDAYL	----	AYLDIMEKFKWSRVASLTEN	--ESNDNTSHMEKLR	----	----
DmojVKR	----	MMVISYSAEGDSFVDREAYPYFFFRITIGSNSEYVDAYI	----	AYIKIMQRLGWIRVSTLTEDTQCYTGYLSRMENKLR	----	----	----
DperVKR	----	MMIMSYSAEGATFSNREAYPNFFFRITIGSNRLFVDAYL	----	AYLDIMEKFKWSRVASLTEN	--ESNDNTSHMEKLR	----	----
DvVKR	----	MMVMSYSAEGASFVDRSAYPYFFFRITIGSNSEYVDAYI	----	AYIEIMQFQGWIRVSTLTEDSQCYTEYMSRMEKLR	----	----	----
NvVKR	----	TVIMSYGAEGSSFSDRSRYPYFFFRITIGENRQYKHVYL	----	VYLQLLKKFNWNRVAAFSEDLKYTEYISYMQEMLR	----	----	----
DwilVKR	----	MMVISYSAEAAIFDREAYPYFFFRITIGTDWLFIDAYL	----	AYLEIMKVFGNRRVAALTEDHTTMEYTFYMESKMK	----	----	----
PhcVKR	----	TVAISYSAEGTIFSDRSKYPYFFFRITIGENQYKLVYL	----	VYLNLLRRLGWKR	RISSITEDGQKYTEYLPHLVNLIS	----	----

Figure 1 : Position du peptide YSA (de AmVKR) et RVA (de TcVKR) (Alignement CW des VFTM de VKR d'insectes)

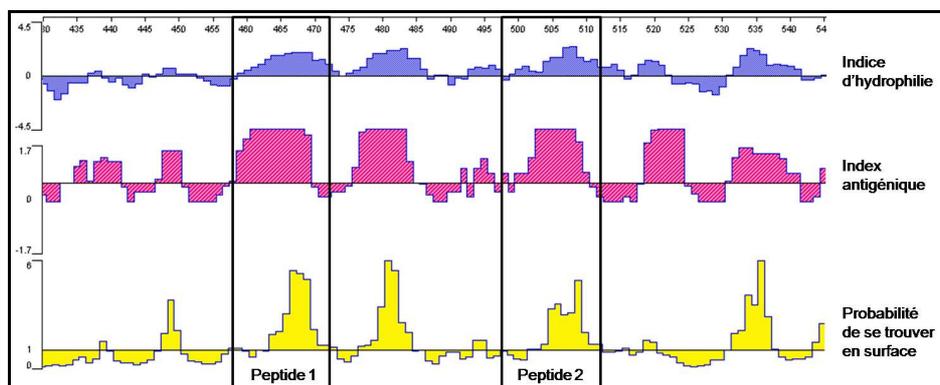


Figure 2 : Propriétés prédictives des peptides YSA et RVA (logiciel Proten – Suite DNASTAR Lasergene[®])

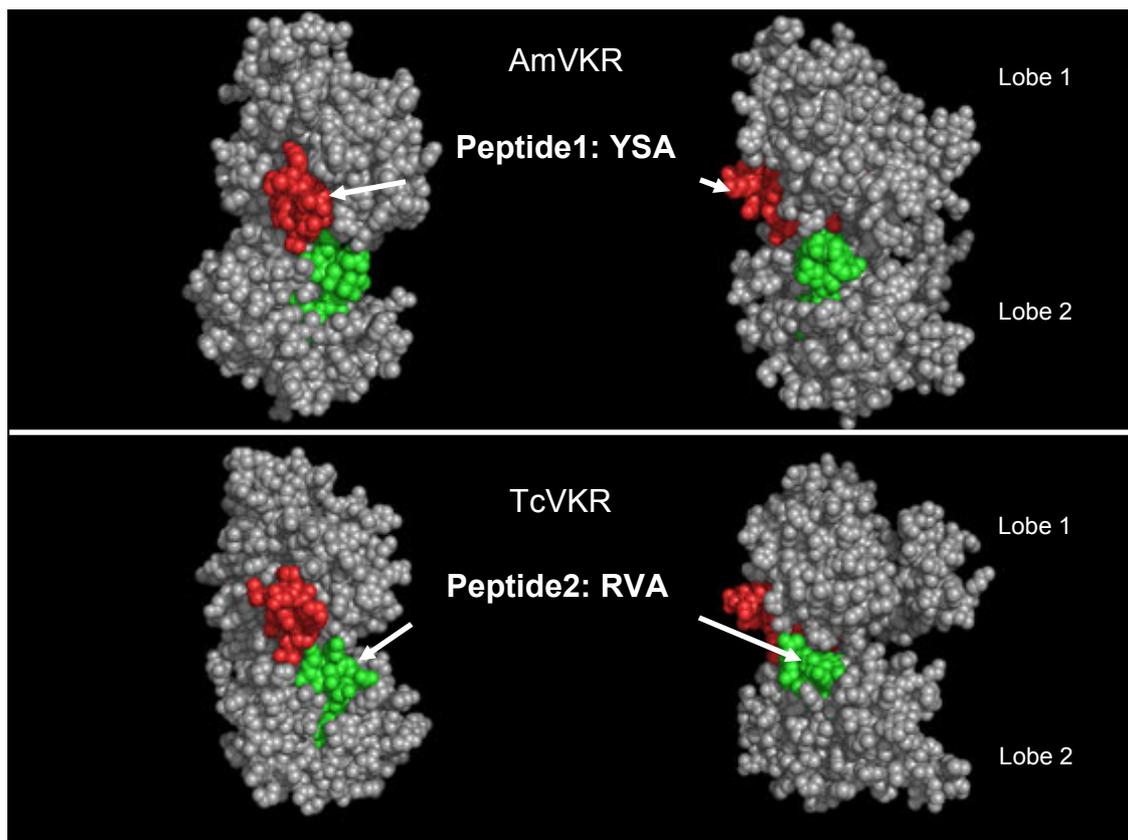


Figure 3 : Positions des peptides YSA et RVA observés sur les modélisations des VFTM de AmVKR et TcVKR. Modélisations réalisées par le serveur automatique de modélisation des homologies (Maurel *et al.*)² (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>) et RAMP (<http://www.ram.org/computing/ramp/>) en utilisant la matrice [matrice : 1EWK_A ,qui correspond au domaine VFT du récepteur au glutamate]

Des souris ont été immunisées (3 souris + 1 souris contrôle) simultanément avec 34 µg d'AmYSA et 36µg de TcRVA en présence de 100 µl d'adjuvant complet de Freund. Après 20 jours, un rappel a été effectué en présence d'adjuvant de Freund incomplet avec la même quantité de peptides. Les souris contrôles ont reçu une solution saline à la place des peptides. Les saignées ont eu lieu à J35, J45 et J60.

Des tests Elisa réalisés sur les peptides non couplés à l'ovalbumine ont montré la spécificité du sérum obtenu pour les peptides YSA et RVA. La souris présentant le plus fort taux de réponse contre les peptides a été retenue pour la suite des tests. De plus, des expériences de Western Blot ont aussi démontré la reconnaissance des protéines recombinantes AmVKR et TcVKR exprimées en cellule HEK293 (figure 4). La détection en Western Blot des protéines natives dans les tissus d'abeille ou de tribolium n'a pas donné de résultats satisfaisants en raison de la difficulté générale à réaliser des extractions protéiques de tissus d'insectes.

Des différences majeures de reconnaissance en immunofluorescence (IF) ont été observées pour AmVKR et TcVKR. En effet seule AmVKR est détectée *in situ* dans les cellules HEK293 par le sérum YSARVA (figure 5), laissant présager que celui-ci ne pourra pas être utilisé pour détecter la protéine TcVKR dans les tissus de *Tribolium*.

Cette différence de reconnaissance pour AmVKR et TcVKR pourrait être imputable à la position même du peptide YSA qui serait mieux exposé en surface (figure 3) que le peptide RVA situé dans un « renforcement » entre les 2 lobes du VFTM. Cette accessibilité limitée du peptide RVA n'aurait pas d'incidence pour la reconnaissance de la protéine en WB (après électrophorèse en conditions dénaturantes AmVKR et TcVKR sont détectés), mais pourrait empêcher celle-ci en IF dans des conditions où la protéine reste relativement conformée.

Les résultats obtenus montrent que le sérum YSARVA peut être utilisé pour l'étude de AmVKR en WB et pour des localisations *in situ* chez *A.mellifera*. Cependant son utilisation n'a pas été validée pour une localisation de TcVKR dans des tissus du coléoptère.

Nous avons envisagé qu'en raison du fort taux de conservation entre les différents VKR d'insectes (entre 40% et 60%), nous pourrions fabriquer un sérum « universel » capable de reconnaître les différents VKR d'insectes. Le fait que le sérum YSARVA ne soit pas capable de reconnaître TcVKR en IF, même par l'intermédiaire du peptide YSA (spécifique d'*A. mellifera*) rend peu envisageable une telle stratégie.

Le sérum YSARVA pourrait être utilisé par la suite pour détecter AmVKR dans des tissus d'*A. mellifera*.

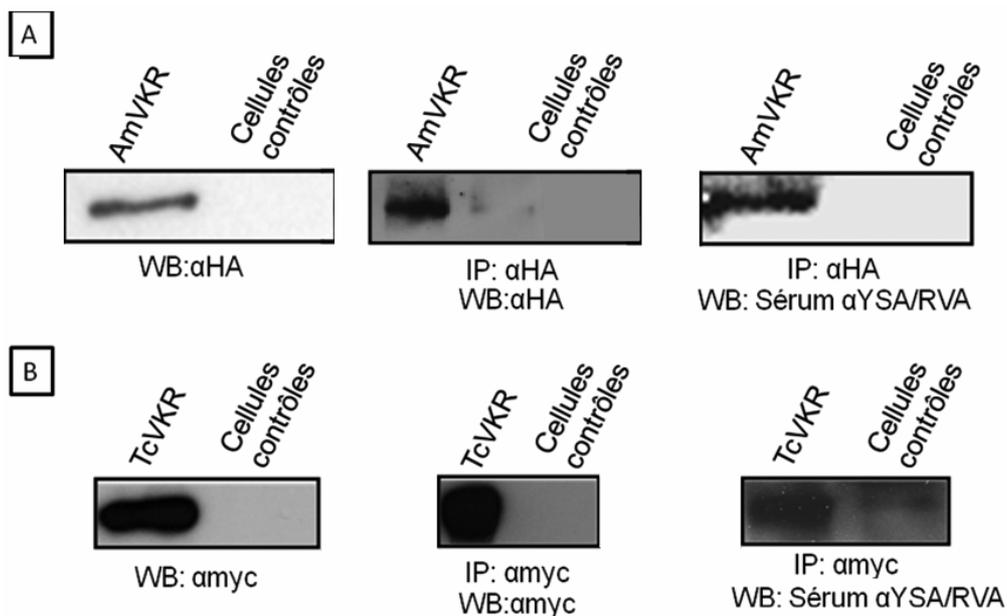
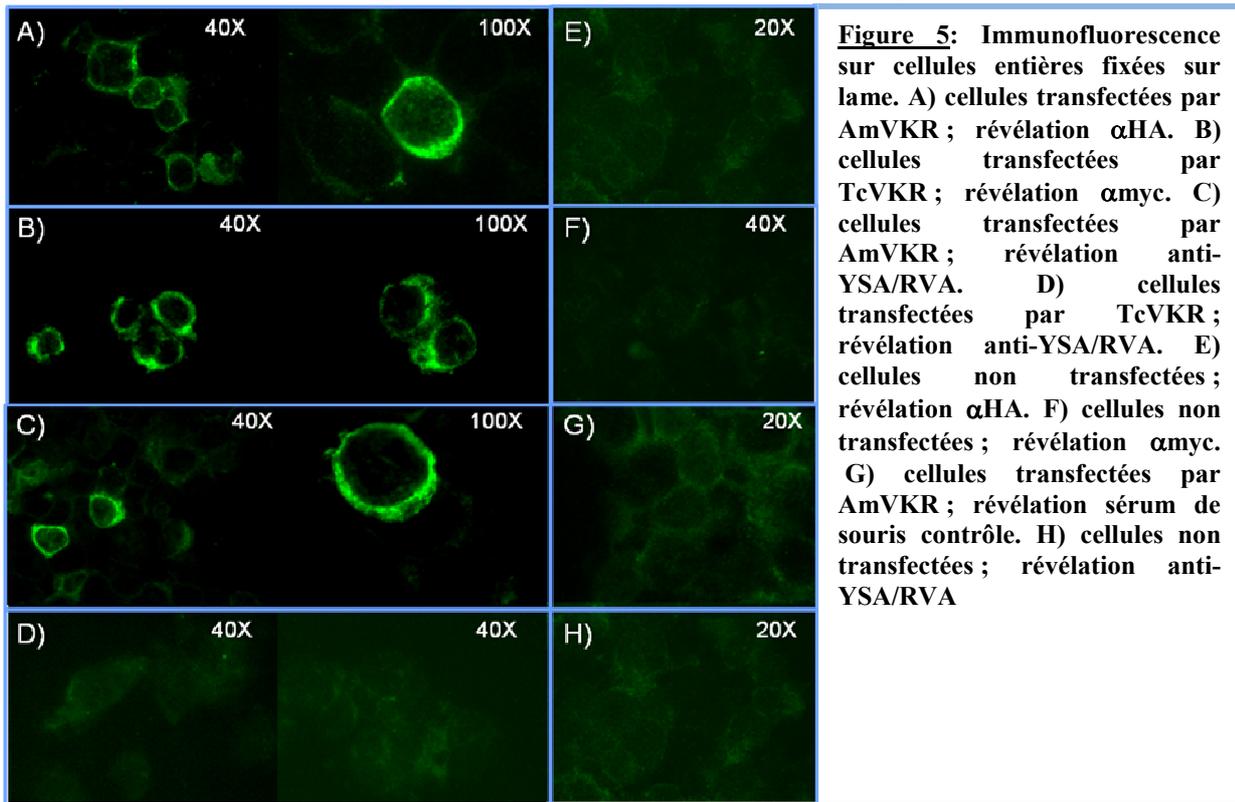


Figure 4 : Détection en WB après immunoprécipitation (Loftus *et al.*) des lysats de cellules transfectées



b) Expression du gène *Amvkr*

Nous avons étudié par Q-PCR les taux d'expression d'*Amvkr* chez les abeilles ouvrières et chez les faux-bourdons mis à disposition par le Pr. M. Gauthier (Université Paul Sabatier, Toulouse). Les transcrits *Amvkr* sont détectés à tous les stades de développement des organismes des deux castes (larves, nymphes et imago) mais l'expression au niveau des stades larvaires est beaucoup plus faible dans les ouvrières que dans les faux-bourdons (Fig 6). Les taux d'expression ont également été mesurés dans différents segments d'abeille ouvrière, à savoir la tête, le thorax et l'abdomen. Les transcrits *Amvkr* sont retrouvés dans toutes les parties analysées avec un taux comparativement plus faible dans l'abdomen (Fig 7). Nous avons vu précédemment que SmVKR était surtout associé aux organes génitaux femelles du schistosome. Dans le cas de l'abeille ouvrière, le faible taux d'*Amvkr* observé dans l'abdomen est compatible avec l'absence d'organes sexuels chez cette caste.

L'étude d'AmVKR chez la caste ouvrière d'*A. mellifera* est donc discutable. Bien que les ouvrières soient les organismes les plus abondants et les plus faciles à obtenir, les études futures devront être réalisées parallèlement chez la reine surtout si l'on veut approfondir les

observations réalisées chez le schistosome et analyser le rôle possible de AmVKR dans la fécondité des organismes.

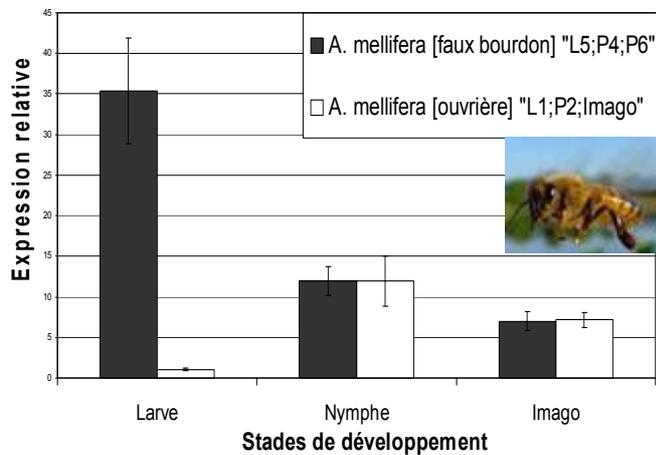


Figure 6 : Expression relative de AmVKR selon les différents stades de développement (Larve, Nympe, Imago). Gène de référence (AmACTIN XM 623378.1)

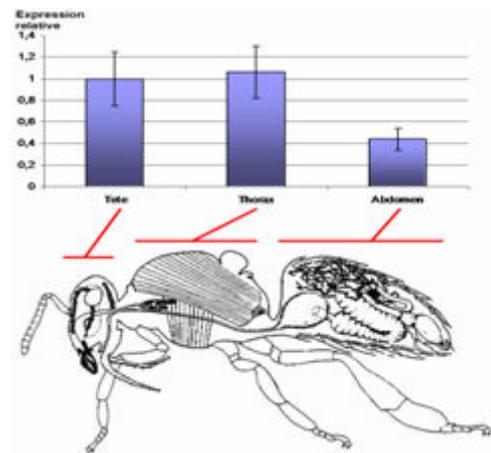


Figure 7 : Expression relative de AmVKR selon les différents segments d'abeille ouvrière (Tête, Thorax, Abdomen). (AmACTIN XM 623378.1)

c) ARN Interférence

Des manipulations d'interférence ARN ciblant *Amvkr* ont aussi été entreprises chez l'ouvrière d'*A. mellifera*. Nous avons choisi d'utiliser des siARN (petit ARN double brin ou small interfering ARN), bien que des dsARN (long ARN double brin ou double-stranded RNA) auraient aussi pu être utilisés. En effet, chez les insectes, il semblerait que les deux stratégies soient aussi efficaces (15^e Colloque de Physiologie des insectes, Rennes, 2007, Workshop RNA interference insectes). Un couple de siRNA a été désigné selon les recommandations de Tuschl et al, 2004 (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>) et commandés auprès de l'entreprise Ambion.

Caractéristiques des siRNA choisis :

position	Séquence	Type design
296	Cible : 5'- AAGATGTGAATCCAAAGAGGG -3' siRNA brin sens: 5'- GAUGUGAAUCCAAAGAGGGtt -3' siRNA brin antisens: 3'- ttCUACACUUAGGUUUCUCCC -5' %CG 42,9	Ambion

	Blast OK (pas de croisement intra- <i>A. mellifera</i>)	
	Pas de polymorphisme (test sur 3 séquençages de AmVKR)	

Des injections de 1µg de siARN ont été réalisées de manière systémique dans les abdomens d'abeilles légèrement anesthésiées sur glace, d'après le protocole (Amdam et al. 2003). Les ARN d'abdomen ont ensuite été extraits et purifiés par ultracentrifugation sur coussin de chlorure de césium (densité 1,73) et les mesures de taux d'expression ont été réalisées sur trois abdomens « poolés » d'abeilles sacrifiées à 24 et 48 h après l'injection des siARN. Des baisses significatives de transcrits *Amvkr* sont observables dès 48 h (Fig 8).

Ces expériences préliminaires ont permis de mettre au point l'ARN interférence dans le modèle *A. mellifera* et de valider un couple de siARN. Dans le cas présent, le témoin négatif a été réalisé par injection de la solution saline dans laquelle les siARN ont été dilués. Ces expériences mériteraient d'être répétées en incluant un témoin négatif de type « scramble » ou irrelevant de type « GFP ».

Ces manipulations ouvrent des perspectives intéressantes pour la recherche de la fonction de AmVKR. Il serait nécessaire de rechercher un phénotype, en particulier sur les stades de faux-bourdon et de reine. L'observation des tissus gonadiques à divers stades de développement pourrait constituer un phénotype de choix pour l'étude de AmVKR. Il serait aussi intéressant de suivre l'extension du phénomène d'interférence ARN dans le temps et les différents segments de l'insecte.

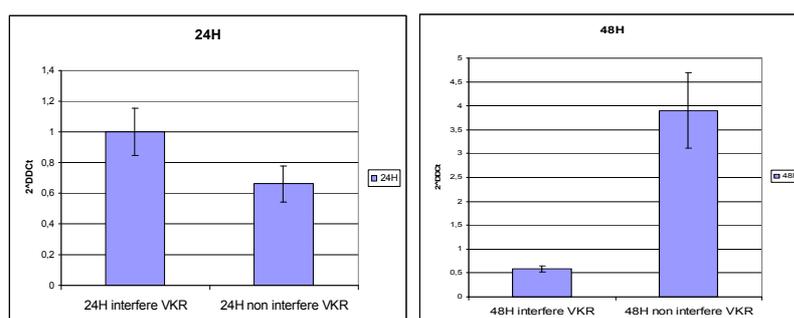


Figure 8 : Expressions relatives des transcrits de AmVKR dans les abdomens d'*Apis mellifera*. Sacrifices à 24h, 48h après interférence ARN. Gène de référence (AmACTIN XM_623378.1)

2. Expression et fonction de AmVKR en cellules de mammifère

a) Recherche de l'activation des voies Ras/MAPK

L'étude fonctionnelle de AmVKR et en particulier la recherche des voies de signalisation a été abordée en cellules de mammifères (HEK293, MDCK et HuH7). Le choix de produire la

protéine d'insecte en système hétérologue mammifère a été motivé par l'existence d'outils fonctionnels disponibles pour ce type de cellules (FRET, tests d'activité kinase, vecteurs de clonage adaptés) et aussi par le fait que de nombreuses études fonctionnelles de récepteurs d'invertébrés ont été réalisées en cellules de mammifères (Mitri et al. 2004).

La voie de signalisation principale qui a été recherchée est la voie Ras/MAPK, une voie ubiquitaire qui implique la plupart des RTK activés (McKay and Morrison 2007). Nous avons pour cela utilisé une stratégie de transactivation d'un vecteur rapporteur Py-Luc contenant le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur sensible au facteur de transcription ETS/AP1 constitué de c-fos et c-jun (Wasylyk et al. 1990). Ce système de transactivation a été conçu pour être très sensible à la détection de l'activation des voies Ras/MAPK et utilisé préalablement avec succès dans l'étude du RTK de *S. mansoni* SER (Vicogne et al. 2004).

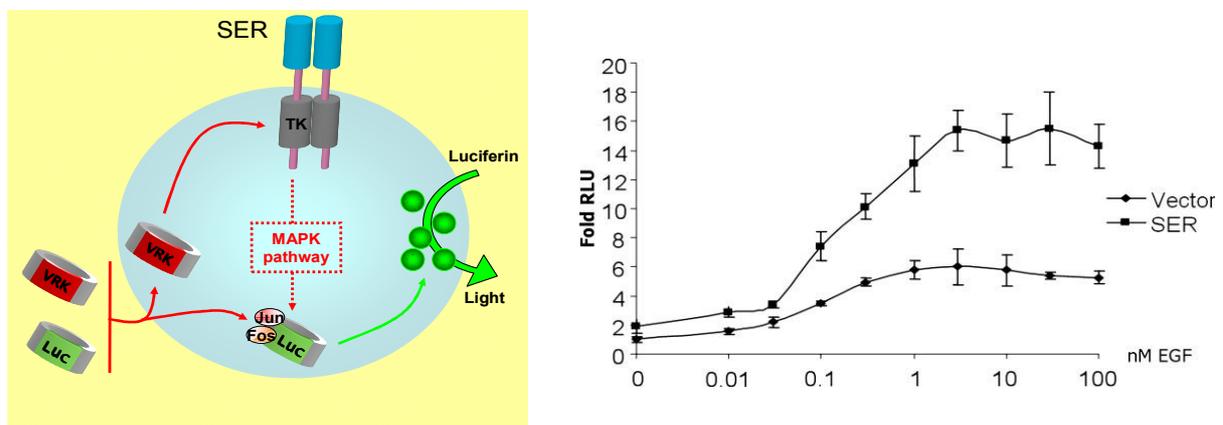


Figure 9 : Schéma montrant le principe de transactivation du vecteur Py-Luc et graphique montrant son utilisation pour l'étude de SER (activé par de l'EGF Humain) (Vicogne et al, 2004).

Les RTK utilisés comme contrôles positifs dans les expériences étaient :

- Le récepteur Trk-MET, qui est un récepteur chimère constitué de la partie extracellulaire de TrkA qui est le récepteur du NGF (Nerve Growth Factor) et de la partie intracellulaire de MET, le récepteur du HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Weidner et al. 1995). Trk-MET est ainsi capable de médier une voie MET après activation par le NGF. Néanmoins, il possède naturellement une forte activité basale et active en absence de ligand la voie Ras/MAPK (Tulasne et al. 2004).
- Le récepteur SER de *S. mansoni* caractérisé au laboratoire. SER qui en présence d'EGF humain induit une forte activation des voies Ras/MAPK en cellules de mammifère (Fig 9).
- Les FGFR 3 (Récepteur au Fibroblast Growth Factor) WT et muté (FGFR 3 K650E, constitutivement actif) fournis par le Dr. D. Donoghue de San Diego (CA).

Les résultats de la Fig 10 montrent que Trk-MET et SER en présence d'EGF activent fortement l'expression de luciférase mais curieusement, FGFR3 WT activé par le FGF1, ou encore la version mutée FGFR3 W650E, n'induisent pas d'activation d'une voie des Ras/MAPK dépendante du facteur de transcription AP-1. Dans la littérature le FGFR1 est décrit pour activer spécifiquement les voies ERK dépendantes de Ras et de Raf et faisant intervenir AP-1 (Yang et al. 2008), alors que la voie de signalisation du FGFR3 reste floue, avec une activation des ERK, mais qui semble indépendante des partenaires Ras et Raf (Choi et al. 2001). Enfin l'activation du facteur de transcription AP-1 par le FGFR3 n'a pas été décrite à ma connaissance. Il semblerait plutôt que les ERK activées, activent à leur tour des S/T kinases de type RSK (Kang et al. 2007). Cela pourrait expliquer le fait que FGFR3 WT (activé par du FGF1) et FGFR3 K650E induisent une phosphorylation des ERK détectée en WB (Fig 11, A & B) alors qu'aucune transactivation n'est observée (Fig 10).

Différents construits de AmVKR ont été testés (à différentes concentrations : 10ng à 1µg) :

-AmVKR WT

-AmVKR KO (inactif en essai kinase),

-AmVKR mutés EE, XE et EX (suractifs en essai kinase) (cf article 3)

ainsi que d'autres construits renfermant les séquences TcVKR et SmVKR, permettant tous potentiellement l'expression des protéines en cellules de mammifère.

Les résultats des Fig 10 et 11 (A & B) indiquent une absence totale de phosphorylation de ERK et d'expression de luciférase et ce indépendamment des plasmides transfectés (prk5, pcDNA3.1 ou PsecHygro (Invitrogen[®])) et du codon usage du VKR concerné (*A. mellifera*, *T. castaneum* ou encore *S. mansoni*). Plus important encore, l'absence de transactivation semble être indépendante de l'activité catalytique des mutants utilisés dans le cas de AmVKR. Dans certains cas, nous avons observé que la transfection des construits de VKR entraînait en plus une chute du signal basal de transactivation (par rapport au témoin plasmide vide). Plus surprenant, lors d'une cotransfection des plasmides VKR avec le plasmide SER on observe une inhibition du signal induit par SER en présence d'EGF (Fig 10 D).

Cette inhibition du signal pourrait être due à un effet toxique de la protéine recombinante exprimée dans la cellule bien qu'aucun aspect anormal par rapport aux cellules contrôles n'ait

été observé pour les cellules transfectées par VKR. Pour préciser ce point, nous avons donc transfecté en même temps que les construits VKR un vecteur constitutif CMV-Luc qui permet de juger de l'état physiologique de la cellule. Les résultats (Fig 10 D) montrent que la luciférase est effectivement moins exprimée dans les cellules lorsqu'elles sont transfectées par les VKR, indiquant un effet de stress sur la cellule.

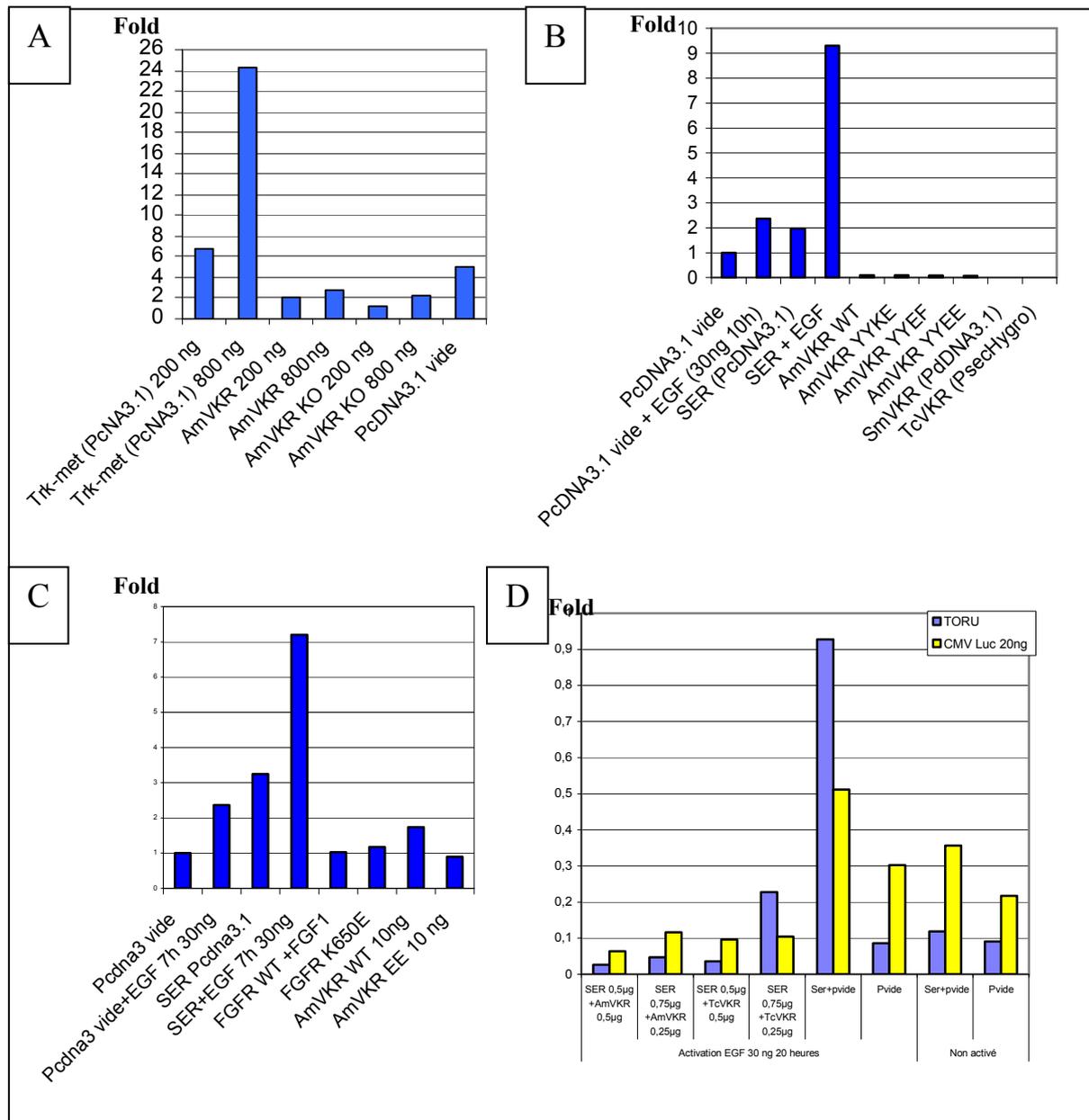


Figure 10 (A, B, C & D) : Tests de transactivation du vecteur rapporteur Py-luc. 400 000 cellules sont transfectées par 1µg total de plasmide additionné de 25ng de plasmide TORU (lipotransfectant Exgen500 (Euromedex[®]) 3,3µl/µg ADN). Les cellules sont récoltées au bout de 24H et la luciférase est dosée par un kit luciférase assay system de Promega[®] contenant le substrat luciférine qui va être clivé pour libérer de la lumière mesurée par luminomètre Victor (Perkin Elmer).
 Note : la quantité de plasmide transfectée est toujours de 1µg. Dans les conditions 200ng, 800ng et 10ng, le plasmide vide correspondant complète à 1µg.

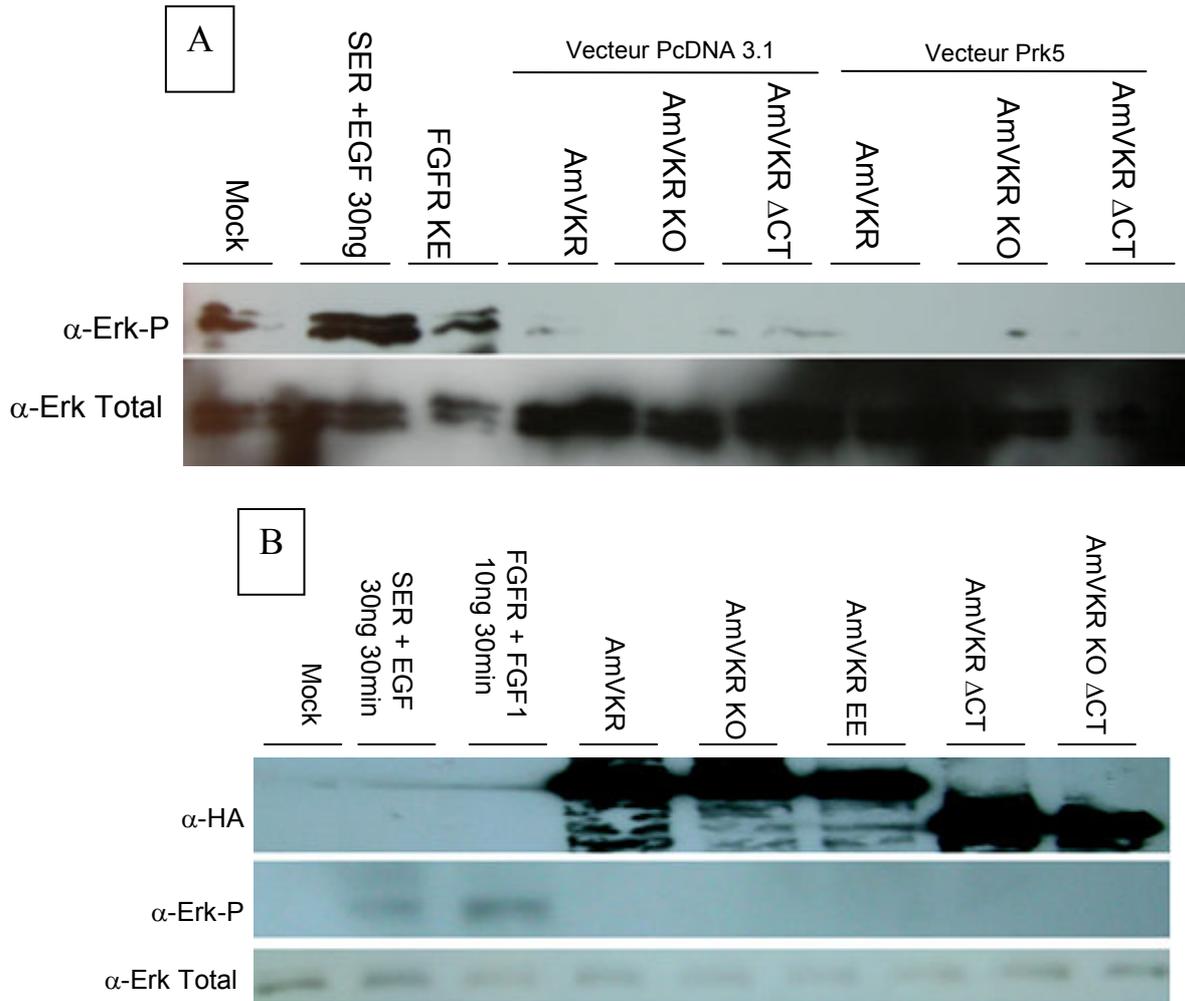


Figure 11 (A & B) : WB montrant la phosphorylation des ERK1 et 2 suite à la transfection de différents construits de AmVKR.

Plusieurs hypothèses ont été émises et testées pour tenter d'expliquer la nature des résultats.

- Le récepteur VKR pourrait contenir une séquence de rétention, l'empêchant d'être exprimé correctement à la surface (voir test elisa chapitre suivant). Cette hypothèse semble peu probable pour un RTK mais ce phénomène existe pour les RCPG de classe 3, dont le récepteur du GABA.
- A l'instar du récepteur MET, les VKR pourraient se cliver pour libérer une partie C-terminale à fonction pro-apoptotique.
- Les VKR pourraient médier des voies autres que celle des Ras/MAPK (voies p38, AKT ...)

b) Recherche d'une séquence de rétention chez les VKR

Malgré l'observation que des quantités significatives de protéines VKR puissent être produites en cellules de mammifère (cf Fig 11, B), il semblerait que les VKR soient peu exprimés à leur surface. En effet, si les marquages en immunofluorescence démontrent bien la localisation en surface de la protéine, les différents tests Elisa menés sur cellules entières (révélation de l'étiquette HA en position N-term - collaboration Philippe Rondard, Montpellier) ont montré une exposition très partielle de AmVKR en surface (Fig 12-13). Différentes tentatives ont été utilisées pour tenter d'améliorer l'adressage en surface du récepteur, comme l'utilisation de la séquence signal de mGluR5 dans le vecteur prk5 ou l'utilisation de séquences de sécrétion de la région V-J2-C des chaînes kappa des Ig de souris dans le vecteur pSecTag2/Hygro. Un module SNAP (module enzymatique permettant le clivage d'un substrat et la fixation d'un fluorophore HA (Maurel et al. 2008)) a aussi été incorporé au construit d'AmVKR en aval de l'étiquette HA. Ce dernier a permis l'augmentation du taux d'expression de la protéine AmVKR (Fig 13- 14) sans pour autant augmenter son taux d'adressage en surface (Fig 13). C'est cette dernière version d'AmVKR qui a été utilisée pour l'étude fonctionnelle de AmKR (SNAP-FRET, essai-kinase et recherche voies de sigbalisations).

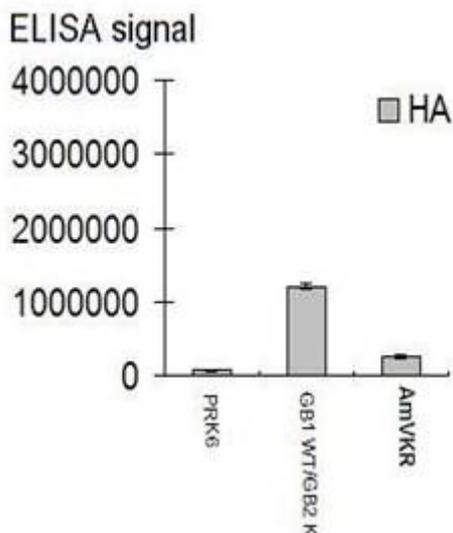


Figure 12 : Elisa sur cellule entière montrant l'expression des récepteurs en surface. Prk6 (vecteur vide), GB1 WT/GB2 K (témoin positif).

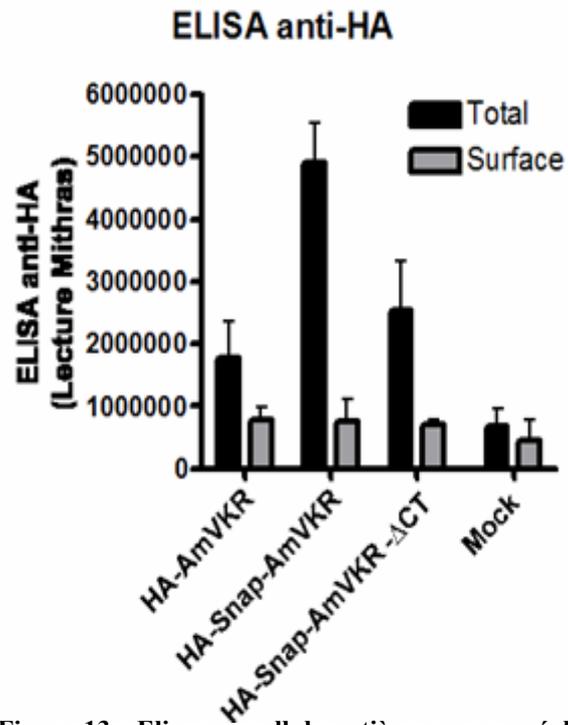


Figure 13 : Elisa sur cellule entière non perméabilisée (Surface) et perméabilisée (Total) après transfection de différentes versions de AmVKR. (ΔCT : Cterm supprimé)

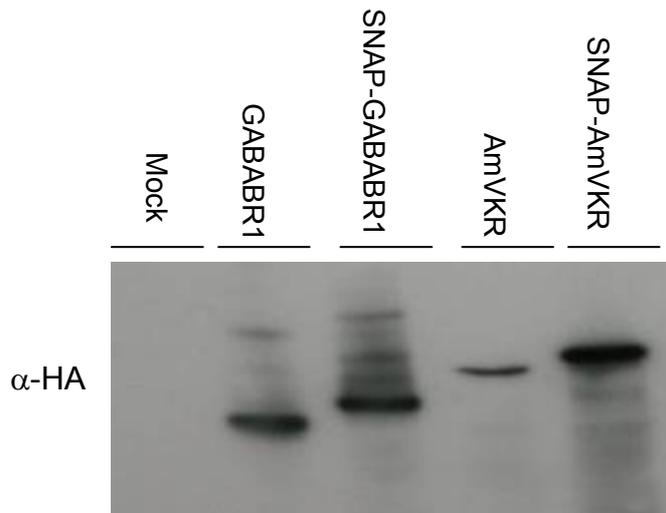


Figure 14 : WB montrant l'augmentation d'expression après greffage du module SNAP. L'équivalent de 50 000 cellules est déposé par puits.

M.W GABABR1 : 110 Kd

M.W SNAP-GABABR1 : 130 Kd

M.W AmVKR : 153 Kd

M.W SNAP-AmVKR : 172 Kd

La faible expression en surface de AmVKR peut être la cause de son incapacité à induire une signalisation. Nous avons voulu rechercher l'existence d'un motif de rétention dans la structure du récepteur qui pourrait être responsable de son expression insuffisante en surface. Chez les RTK, ce phénomène n'est pas connu, mais pour de nombreux récepteurs, comme les récepteurs au NMDA ou au kainate ou encore les RCPG de classe 3 comme le GABABR, il existe un motif di-basique de type di-lysine (KKRR) ou di-arginine (RXR) dans la queue C-term retenant le récepteur dans le réticulum endoplasmique (RE). En effet, ces motifs di-basiques sont reconnus par le complexe protéique COPI (Coat Protein I Complex), qui retiennent la protéine dans le RE (Brock et al. 2005). Plusieurs séquences di-basiques ont été remarquées dans la queue C-term de AmVKR et la stratégie de couper cette dernière (juste derrière le domaine TK) a été choisie. Les construits AmVKR dépourvus de la partie C-term (AmVKR δ CT) ont été testés pour leur capacité à activer ERK. Malheureusement, les résultats de WB n'indiquent à nouveau aucune phosphorylation de ERK dans les cellules qui expriment la protéine AmVKR δ CT (Fig 11 A, B).

Séquence de l'extrémité C-term de AmVKR (domaine post-TK) et motifs di-basiques repérés :

ATNPRILSPCLDVPLASVQIEHTGQLDIELPENL**RK**FSLSWSPQNSTTRPASTSSSPFGVP
 YPPLLDINDHDDKPIQNSIMGNGIADAESSRPLLLNANEPLSGLPMILQSF**KQK**EESPH
 KYVNIQPGISNNCDYSSDQNGGGSIQMEE**RR**AILPEN**RK**SEDVSIL-STOP

Il aurait sûrement été plus judicieux de muter seulement les sites di-basiques de la queue C-term pour garder toute la potentialité du RTK à recruter des éventuels partenaires de signalisation. Cependant la stratégie de sectionner l'extrémité C-term a été motivée par le fait de vouloir vérifier, à l'instar du RTK MET (Deheuninck et al. 2008, Tulasne and Foveau 2008), qu'un fragment pro-apoptique ne risquait pas de se détacher du RTK pour aller médier une voie apoptotique.

En plus du fait que les versions coupées de AmVKR ne semblent pas restaurer l'activité ERK de base, la détection en WB par des anticorps anti-HA (étiquette N-term) et anti-V5 (étiquette C-term) du récepteur AmVKR à la taille attendue (175kDa) suggère fortement que AmVKR ne subit pas de clivage (résultats non montrés).

c) Recherche d'autres voies de signalisation possibles

La cellule semble subir un stress suite à la transfection par AmVKR. Nous avons voulu vérifier si la P38 kinase pouvait être activée dans les cellules HEK293 suite à la transfection du VKR. En effet il est connu que la voie P38, avec ou sans l'aide de JNK (c-Jun N-terminal Kinases), est activée en réponse à un stress subi par la cellule (Raingeaud et al. 1995). La P38 activée intervient dans une voie de signalisation permettant de réguler des phénomènes d'inflammation, d'apoptose ou encore de différenciation cellulaire (Cuenda and Rousseau 2007).

Les résultats de la Fig 15 montrent que contrairement à des cellules exposées au TNF α (10ng/ml pendant 15 mn) et qui servent de contrôle positif, aucune molécule P38 phosphorylée n'est détectable dans les lysats des cellules transfectées par les construits AmVKR, et ce même dans le cas où AmVKR est constitutivement actif, indiquant que les VKR ne semblent pas induire la voie P38.

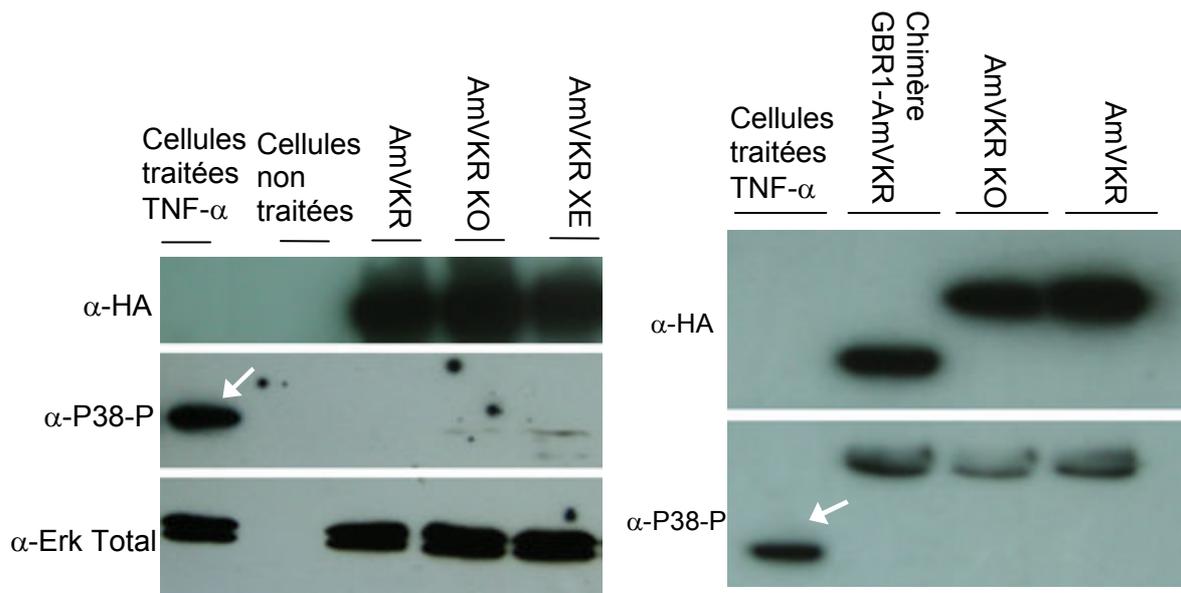


Figure 15 : WB montrant l'état de phosphorylation de P38 suite à la transfection de différents construits de AmVKR.

Les voies de signalisation qui pourraient être médiée par AmVKR (dans ce modèle d'expression hétérologue) restent toujours inconnues. Dans nos approches nous n'avons pu montrer ni une voie de croissance (ERK/AP-1), ni une voie de stress cellulaire lié à P38. Il serait sûrement nécessaire de changer de système cellulaire et d'évoluer vers un système homologue de cellule d'insecte

d) La réalisation d'une chimère GABABR1-AmVKR

Dans le but de créer un récepteur dont le domaine extracellulaire serait connu et donc facilement activable par un ligand connu, nous avons tenté de réaliser un récepteur chimère constitué du domaine extracellulaire du GABABR1 (récepteur au GABA B métabotropique de type 1) couplé au domaine intracellulaire du VKR d'*A. mellifera*.

Pour cela nous avons créé, par mutagenèse dirigée, un site Not1 dans la séquence du GABABR1, juste avant le premier domaine transmembranaire. Le site Xba1 était déjà présent en position C-term dans le construit. Le domaine intracellulaire de AmVKR (incluant le domaine transmembranaire (TM)) a été amplifié avec des amorces contenant les sites de restriction Not1 et Xba1 puis ligué dans le construit GABABR1 libéré de son domaine intracellulaire (Fig 16).

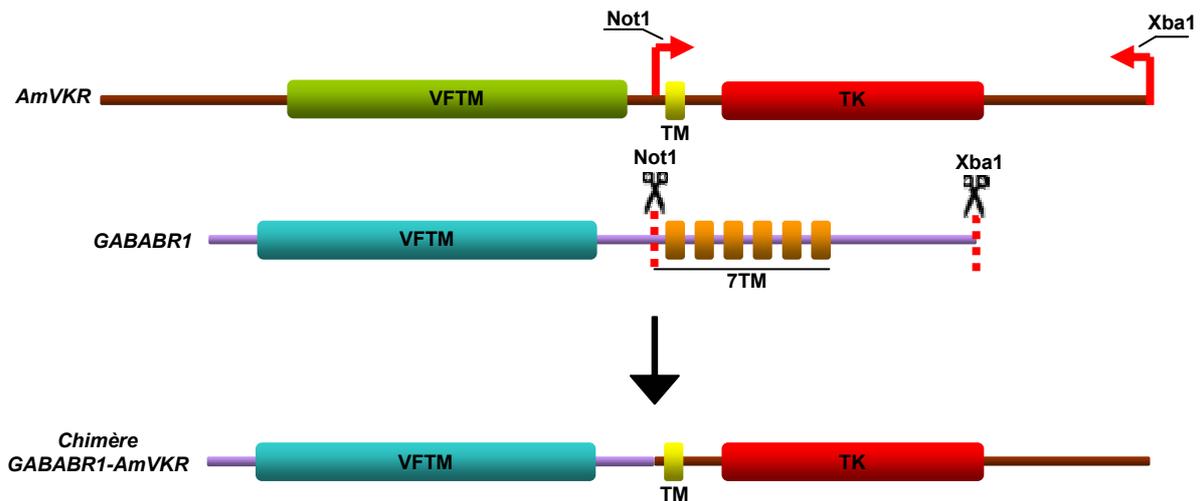


Figure 16 : Schéma montrant la stratégie utilisée pour constituer la chimère GABABR1-AmVKR. (Construit Prk5-HA-ST-GABABR1 fourni par P. Rondard & J.P. Pin – Montpellier)

La chimère ainsi obtenue contient bien le domaine extracellulaire GABABR1 et la partie intracellulaire du récepteur AmVKR, le domaine TM étant celui de AmVKR. Les domaines TM des RTKs sont très spécifiques d'un récepteur donné. Ainsi il est possible de modifier l'activité d'un RTK en rajoutant ou en enlevant un résidu de l'hélice α constituant le TM (Li and Hristova 2006). Ces données ont motivé le choix de garder le TM de AmVKR dans la chimère. Cependant le fait d'avoir conservé le domaine riche en cystéine présent juste derrière le VFTM du GABABR1 est discutable puisque AmVKR n'en possède pas. De plus, la longue partie N-term de AmVKR (environ 400 aa) en amont du VFTM a été supprimée. Bien qu'elle ne corresponde à aucun motif connu à ce jour et qu'elle n'existe pas dans le GABABR1, elle pourrait très bien avoir une fonction sur l'activité de AmVKR.

Un autre point concerne l'éventuelle dimérisation de cette chimère. GABABR1 est censé se dimériser avec GABABR2, une autre sous-unité du GABABR. Dans notre cas, où le récepteur a été transfecté seul, nous ne savons pas comment il pourrait se comporter et cela n'a pas été abordé dans notre étude.

Nous avons pu montrer que le construit chimérique s'exprime bien à la taille attendue de 140 Kd en cellules de mammifère (Duchek *et al.*) (Fig 15, 17). Nous avons testé son activation par les ligands connus de GABABR1 (GABA et Baclofen) dans un test kinase *in vitro* mais aucune autophosphorylation de la chimère n'a pu être détectée (Fig 17). De même, dans le test d'activation des voies Ras/MAPK en présence du vecteur Py-Luc, le construit GABABR1-

AmVKR se comporte comme les autres construits VKR (pas d'activation mais plutôt tendance à l'inhibition de l'expression du gène rapporteur) (Fig 18).

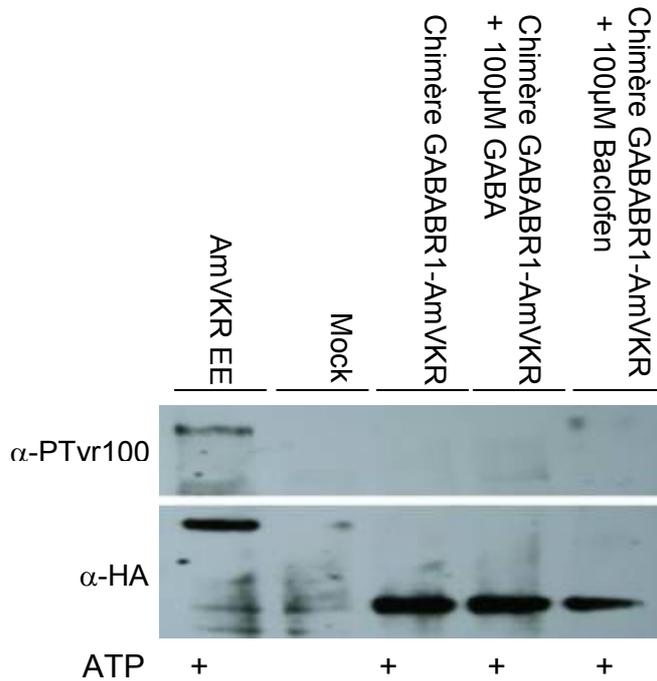


Figure 17: WB montrant l'expression de la chimère GABABR1-AmVKR en cellule HEK 293. Divers ligands ont été testés en essai kinase (GABA 100µm et Baclofen 100µm).

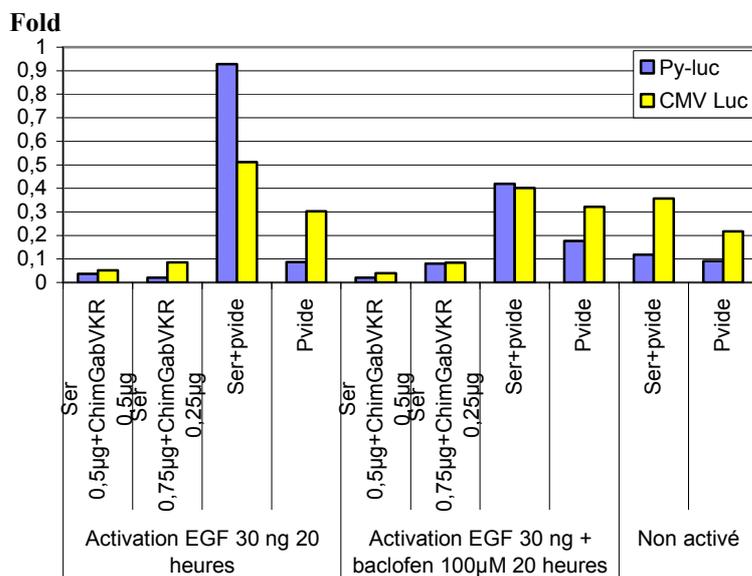


Figure 18: Test de transactivation Py-Luc par la chimère GABABR1-AmVKR (en bleu). Un vecteur CMV luc constitutivement actif été transfecté pour voir l'état physiologique des cellules MDCK.

La réalisation d'une chimère est peut être plus compliqué qu'il n'y parait. Même si de nombreux exemples dans la littérature ont permis une telle approche (cas de la chimère Trk-Met), il est sûrement nécessaire de connaître davantage le mode de fonctionnement du récepteur pour connaître l'importance de chaque domaine que l'on veut moduler/remplacer.

DISCUSSION,
PERSPECTIVES &
CONCLUSION

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

I- Invertébrés d'intérêt médical, biologie comparative et génomique fonctionnelle.

La biologie comparative tend à faire le lien entre les systèmes biologiques existant chez des organismes différents. Cette approche par comparaison peut permettre d'étudier une protéine d'intérêt médical chez un organisme modèle dont le fonctionnement biologique semble simplifié ou au contraire d'envisager la fonction de certaines protéines d'invertébrés, en raison de la grande conservation des systèmes biologiques au sein du règne animal, hypothèses qu'il convient ensuite de confirmer. De nombreuses approches de ce genre sont réalisées chez les invertébrés en comparaison avec les modèles vertébrés et humains en particulier. Une telle démarche nous a permis au laboratoire d'aborder l'étude de SER, de SmIR-1 et SmIR-2, mais aussi d'autres kinases très conservées au niveau de la régulation du cycle cellulaire. Il est néanmoins nécessaire de souligner que ces études ont montré de nombreuses particularités, qui peuvent être exploitées pour les recherches de nouveaux moyens de contrôle des organismes (parasites, vecteurs) d'intérêt médical.

L'essor récent du séquençage et de l'annotation des génomes d'invertébrés (banques de données VectorBase, FlyBase, Sanger ...) apporte un nouvel outil pour une approche complémentaire dans la façon d'aborder la biologie moléculaire de ces organismes. SmVKR en est un exemple, puisqu'à partir d'un RTK découvert par une stratégie de reconnaissance d'un domaine Tyrosine Kinase par des amorces dégénérées (screening par PCR), nous avons rapidement pu délimiter une nouvelle famille de RTK en exploitant les données génomiques mises à jour régulièrement depuis ces 3 dernières années.

Ces données génomiques arrivent dans un contexte où il est plus que nécessaire de développer des outils de contrôle d'invertébrés d'intérêt médical, souvent impliqués comme agent ou vecteur de maladies qualifiées de « Neglected Diseases ». En effet, les maladies transmises par des vecteurs invertébrés (en particulier arthropodes) entraînent un taux de décès humains supérieur à toutes les autres causes combinées (Hill et al. 2005, Kalluri et al. 2007) (voir table suivante).

Pour illustration, nous citerons bien sûr le paludisme (ou malaria), qui est la première endémie parasitaire mondiale, avec près de 500 millions de cas d'accès palustre par an dont environ 3 millions de morts imputés annuellement à *Plasmodium falciparum* à travers les zones tropicales et subtropicales du globe. Environ 6 000 cas d'importations sont recensés par an en France (Stahl JP 2008), et les modifications climatiques à venir pourraient bien entendu modifier les aires de répartition du parasite. Le paludisme est transmis par le moustique femelle *Anopheles gambiae*, qui doit nécessairement prélever du sang de vertébrés, pour produire ses oeufs et achever son cycle de développement. De nombreux efforts sont mis en œuvre pour contrôler le vecteur moustique et la protection contre les piqûres du vecteur (repulsifs et moustiquaires en particulier) constituent un axe de prévention très important montrant bien qu'une action menée au niveau du vecteur peut être porteuse. Les drogues antiparasitaires existantes n'ont permis de contrôler que relativement le parasite puisque ce dernier s'est toujours montré très adroit pour développer des résistances aux molécules utilisées (Ringwald 2007). L'étude d'une protéine nouvelle et originale comme le VKR d'*A.gambiae* (menée par N. Gougnard au laboratoire) pourrait apporter de nouveaux éléments pour la compréhension de la biologie de l'anophèle ainsi qu'un nouveau moyen de la contrôler.

Vector	Disease	Pathogen Type
Mosquitoes	Filariasis	Helminth
	Malaria	Protozoa
	Dengue fever	Virus
	Yellow fever	Virus
	St. Louis encephalitis	Virus
	Eastern equine encephalitis	Virus
	Western equine encephalitis	Virus
	West Nile	Virus
	Rift Valley fever	Virus
Ticks	Lyme disease	Bacteria
	Rocky Mountain spotted fever	Bacteria
	Q fever	Bacteria
	Tularemia	Bacteria
	Relapsing fever	Bacteria
	Ehrlichiosis	Bacteria
	Colorado tick fever	Virus
	Crimean hemorrhagic fever	Virus
Mites	Babesiosis	Protozoa
	Q fever	Bacteria
Deerflies (Chrysops)	Rickettsioses/rickettsialpox	Bacteria
	Tularemia	Bacteria
Tsetse flies	Sleeping sickness (African trypanosomiasis)	Protozoa
Blackflies (simulies)	Onchocerciasis	Helminth
Muscoid flies	Yaws	Bacteria
Sandflies (Phlébotomes)	Leishmaniasis	Protozoa
	Sandfly fever	Virus
	Vesicular stomatitis	Virus
Lice (poux)	Epidemic typhus	Bacteria
	Trench fever	Bacteria
Fleas (puces)	Endemic typhus	Bacteria
	Bubonic plague	Bacteria
Reduviids (also known as bed bugs, kissing bugs, cone-nose bugs)(punaises)	Chagas disease (American trypanosomiasis)	Protozoa

Principaux Arthropodes vecteurs de maladies (Kalluri et al, 2007, modifié).

Dans le même ordre d'idée, il ne faut pas omettre *Aedes aegypti* et *Culex pipiens* (pouvant être vecteur d'helminthes responsables de filarioses (*Wuchereria bancrofti* pour *C. pipiens*) et de maladies virales (Dengue, Fièvre du Nil ...)) dont les génomes, en général, ont également grandement avancé (Cf. Flybase). De nombreux autres arthropodes, tels que la mouche tsé-tsé (vecteurs de la Trypanosomose Humaine Africaine), les réduvidés (punaises), (vecteurs de maladies de Chagas), le phlébotome (vecteur de leishmanioses) ou encore la simulie (vecteur de pathogènes responsables

d'onchocercose ou « cécité des rivières ») ont quant à eux des génomes encore très méconnus, malgré leur impact non négligeable sur la santé dans le monde (voir tableau des arthropodes vecteurs communs).

Quant au schistosome, son intérêt médical est considérable puisqu'il constitue la seconde maladie parasitaire mondiale juste après le paludisme mais reste pourtant négligé avec trop peu de moyens mis en œuvre pour contrôler l'endémie. A ce jour, une seule et unique drogue, le PZQ, permet de contrôler l'infection par les schistosomes. Il apparaît donc nécessaire de développer l'étude de la biologie du parasite pour trouver de nouvelles armes efficaces contre lui. Le schistosome est entré progressivement dans l'aire de la génomique fonctionnelle, avec à ce jour environ 30% de séquences annotées concernant un génome d'environ 280 Mb renfermant 20 000 gènes estimés.

Le schistosome, en tant que parasite de l'homme, a souvent été abordé par une approche immunologique à travers l'étude des mécanismes de défense et d'échappement de ce dernier. Ce type d'approche mené au laboratoire, depuis sa mise en place par le Pr. André Capron et poursuivi par le Pr Monique Capron, a permis aujourd'hui de porter en phase III d'essai clinique le candidat vaccinal prometteur Bilhvax (Capron et al. 1987, Capron and Capron 1994, Capron et al. 2005). Alternativement, dans l'équipe du Dr. Colette Dissous, nous abordons l'étude du parasite sous l'angle du développement de l'organisme et principalement dans l'axe de la biologie de sa reproduction. Les arguments qui motivent ce type d'approche sont simples : le parasite vit jusqu'à 30 ans dans le corps humain, consomme énormément d'énergie, pond énormément et reste en accouplement permanent. Ces considérations imposent obligatoirement une stimulation intense et finement régulée du cycle cellulaire. Nous pensons que les RTK sont des protéines-clé dans ces systèmes. Outre l'implication de SER, SmIR-1 et SmIR-2 dans des phénomènes clés de la survie du schistosome, les spécificités structurales des RTK parasites font d'eux des cibles potentielles, dont SmVKR constitue actuellement le candidat le plus prometteur. En effet son originalité garantit de pouvoir le cibler spécifiquement le domaine TK et/ou le domaine VFT et la conservation de l'activité catalytique des VKR laisse penser qu'il intervient dans les processus importants du développement parasitaire.

II- Quelle peut être l'importance des VKR dans la biologie des invertébrés ?

Les données biologiques obtenues jusqu'à présent sont insuffisantes pour affirmer que les VKR ont un rôle crucial chez les organismes concernés, néanmoins divers points peuvent être discutés.

1. L'évolution des VKR

Dans un premier temps, il est important de souligner que notre étude a permis de confirmer que les différents VKR ne sont pas des « artéfacts » isolés mais qu'ils appartiennent bien à une nouvelle famille de RTK. Comme la plupart des protéines, les VKR ont vraisemblablement évolué sous l'influence de la pression de sélection liée à l'évolution. Si aujourd'hui nous retrouvons des VKR ayant conservé tout leur potentiel kinase (Figure 7, article 3), il est fort probable qu'ils aient un rôle biologique essentiel.

Les véritables modalités d'évolution des VKR restent encore inconnues. Le fait de les retrouver dans différents groupes (insectes, échinodermes et plathelminthes) indique juste que les VKR doivent avoir un ancêtre commun au niveau des bilatériens (Halanych 2004). Les VKR seraient donc apparus peu de temps après l'émergence des premiers RTK chez les métazoaires (porifères et cnidaires) selon le principe d'évolution connu des RTK impliquant la recombinaison de modules fonctionnels (Yarden and Ullrich 1988). Néanmoins, la découverte des VKR chez les insectes reste d'une grande importance, car en terme de biodiversité, les insectes restent la classe la plus importante du règne animal. On estime à 1 750 000 le nombre d'espèces vivantes actuellement décrites (avec une estimation de 2 à 40 fois plus d'espèces restant à découvrir) et les arthropodes constituent vraisemblablement l'embranchement le plus abondant dans l'histoire de la Terre et le plus diversifié avec près de 1 200 000 espèces à lui seul.

Tableau présentant la biodiversité des grands groupes du règne animal (Chansigaud V., 2008).

Groupe concerné	Nombres d'espèces connues
Arthropoda	1 200 000
Mollusca	100 000 à 110 000
Nematoda	90 000 à 12 000
Chordata	47 200
Platyhelminthes	15 000 à 20 000
Annelida	15 000
Cnidaria	9 000 à 10 000
Echinodermata	6 000
Porifera	4 300

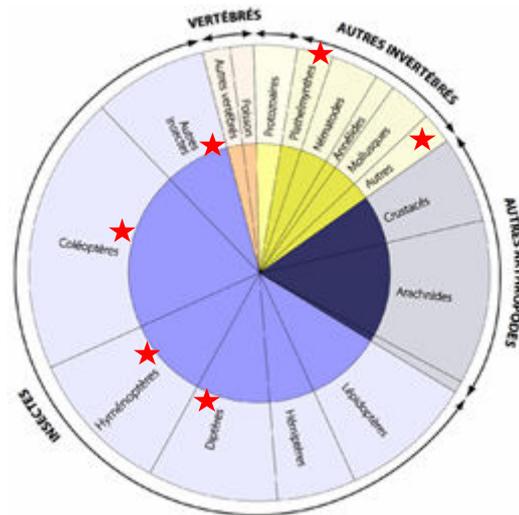
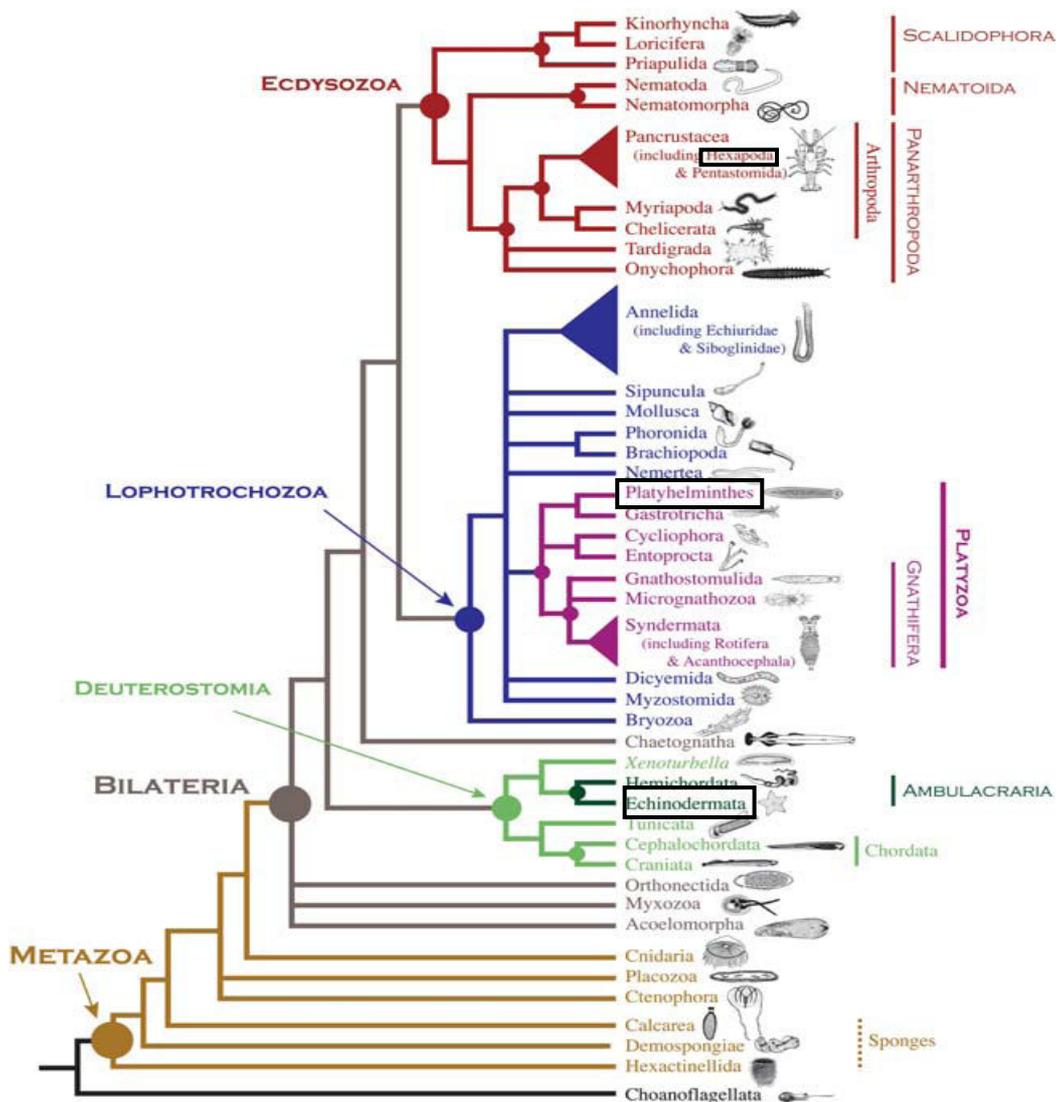


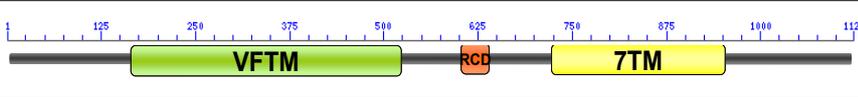
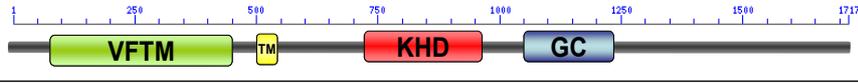
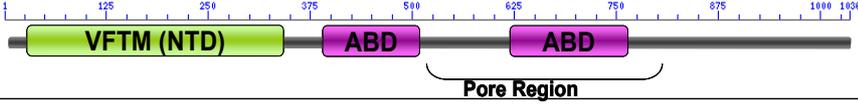
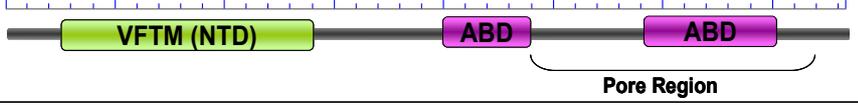
Diagramme présentant l'importance de chaque groupe animal en terme de biodiversité. Les étoiles rouges représentent les groupes où sont décrits les VKR (Chansigaud V., 2008).



Arbre phylogénétique moderne de la classification animale faisant intervenir données morphologiques, anatomiques et moléculaires. Les groupes où sont retrouvés des VKR sont encadrés en noir. (Halanych M. K., 2004)

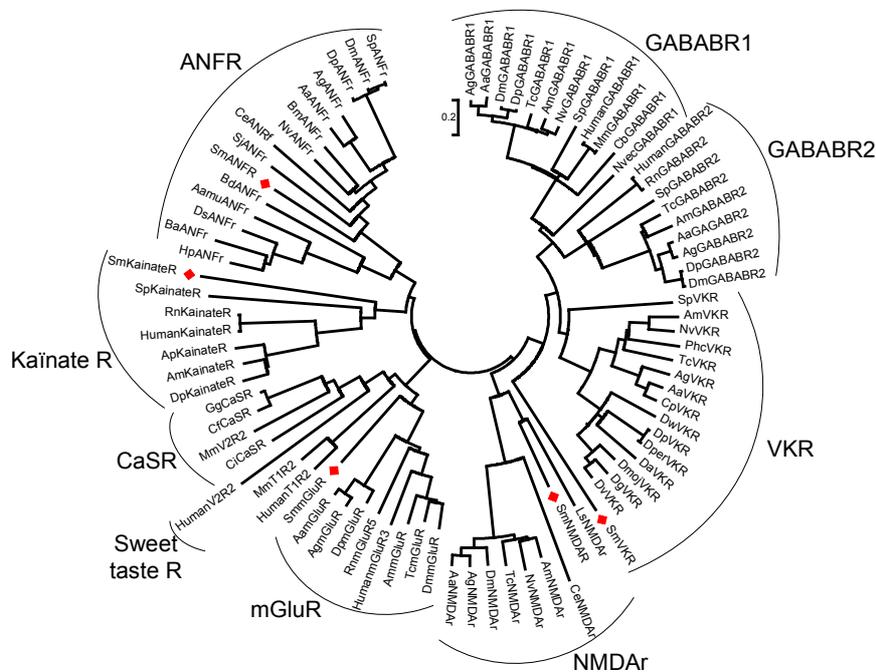
Aucun VKR n'a été retrouvé chez les vertébrés, où les systèmes biologiques sont complexes. Les VKR, exclusivement décrits chez les invertébrés, ont pu être conservés pour répondre à des besoins biologiques primitifs particuliers qui ne sont plus d'actualité chez les vertébrés ou bien qui pourraient être traités de façon différente. Chez les invertébrés, le VKR permettrait de combiner les voies de signalisation de deux récepteurs (un RCPG de classe 3 et un RTK) qui sont distincts chez les vertébrés. Cette réflexion rejoint celle des IR et IGF-1R qui sont séparés chez les vertébrés, à partir des céphalochordés, pour se spécialiser dans des fonctions différentes, à savoir des fonctions métaboliques (prise de glucose) pour l'IR et des fonctions purement de croissance pour l'IGF-1R, alors que chez les invertébrés il n'existerait qu'un seul IR pour la gestion des deux fonctions (Pashmforoush et al. 1996). Cette hypothèse pourrait être appuyée par l'évidence qu'il existe chez les vertébrés, une communication entre les RCPG et les RTK, où dans certains cas, une voie de signalisation RTK de croissance est médiée suite à la liaison d'un ligand par un RCPG voisin.

Les différentes phylogénies établies des domaines TK et VFTM confirment aussi le caractère ancestral du VKR (Figure 4 et 5, article 3). En effet, les arbres synthétisés montrent que ces domaines sont bien monophylétiques et que s'ils sont très proches respectivement du TK de l'IR et du VFTM du GABA_BR, ils n'en sont pas moins distincts. D'ailleurs les VKR coexistent avec GABA_BR1 et GABA_BR2 et IR chez les différents organismes où il a été découvert, montrant bien qu'ils ne se substituent pas à ces derniers. Une incertitude concerne peut être le schistosome chez qui, à l'heure actuelle, aucun sous type de GABABR n'a pu être détecté dans le génome, même après des recherches avancées dans les récentes annotations du génome de *S. mansoni* (Collaboration INSERM FIOCRUZ – Oliveira G. & Ruiz J. –Belo Horizonte, Brésil). Il n'est cependant pas exclu que l'état actuel d'annotation du génome ne nous permette pas de le détecter, d'autant plus que les GABABR métabotropiques sont très répandus chez les invertébrés et semble exercer un rôle beaucoup plus global dans le développement, alors qu'ils sont spécialisés dans l'influx nerveux des vertébrés (Dzitoyeva et al. 2005). Néanmoins chez *S. mansoni*, différents récepteurs contenant un domaine VFTM ont pu être repérés dans les données génomiques, à savoir un mGluR, un ANFR, des iGluR (un récepteur du kaïnate et du NMDA) et classés dans un arbre phylogénétique cohérent (Ahier et al, en préparation).

mGluR		Twinscan2 Smp_scaff000021 374561-342101
GABABR	Not Found	
ANFR		Augustus3 Smp_scaff000090 531367-649230
KaïnateR (KA1 or KA2)		Augustus3 Smp_scaff000159 1587069-1550851
NMDAR (NR1 or NR2)		Augustus3 Smp_scaff000012 672326-641780
VKR		GenBank AAL67949

- VFTM Venus Flytrap Module
- RCD Rich Cystein Domain
- 7TM 7-TransMembrane Domain
- TM Single TransMembrane Domain
- TK Tyrosine Kinase Domain
- KHD Kinase Homology Domain
- GC Guanylate Cyclase Domain
- ABD Agonist Binding Domain

Schéma montrant les différents récepteurs contenant un VFTM trouvés dans les données génomiques de *S. mansoni*. (NTD : N Term Domain) (Ahier et al, en préparation)



Phylogénie N.J. des différents récepteurs contenant un VFTM retrouvés dans le génome de *S. mansoni*. (Ahier et al, en préparation)

Curieusement chez certains invertébrés « modèles », le VKR est absent. Ainsi on ne retrouve pas de VKR chez *C. elegans* ou encore chez *D. melanogaster*, où leur étude aurait pu ouvrir d'avantage de perspectives en raison de la puissance de ces modèles en biologie moléculaire. Justifier l'absence de VKR chez *C. elegans* n'est pas tâche facile, d'autant plus que la grande connaissance du modèle ne laisse quasiment aucun doute sur son absence. Concernant *D. melanogaster*, on remarque que les VKR sont absents dans l'ensemble du groupe *menalogaster*, avec un seul VKR décrit chez *D. ananassae*. L'analyse de la structure du gène *Davkr* montre « une rupture » de la conservation de structure jusqu'alors très linéaire chez les différents VKR de drosophile (présence de 4 introns et jonctions intron-exon conservées). *Davkr* présente deux exons supplémentaires au sein du domaine TK. Il serait d'ailleurs nécessaire de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un pseudogène de VKR d'autant plus que la domaine catalytique de DaVKR pourrait être non fonctionnel en raison du manque de certains résidus (E_xG_{xx}G) constituant la poche à ATP du domaine TK. Une hypothèse serait qu'à la base du groupe *melanogaster*, le VKR commence à dégénérer, pour se perdre totalement à partir de *D. erecta* (Figure 2, article 3).

2. L'exploration de la fonction biologique des VKR

VKR serait un récepteur capable de transduire une voie de croissance après stimulation par un petit ligand (de type acide aminé, purine, odorant, ion ou encore phéromones, ceci par analogie avec les récepteurs à VFTM).

A partir des données de PCR quantitative qui indiquent de forts taux de transcrits de VKR au niveau des tissus gonadiques femelles et des stades embryonnaires d'insectes (Figure 6, article 3), de nombreuses hypothèses peuvent être émises quant à la fonction des VKR. Dans le contexte où le schistosome adulte femelle doit nécessairement se trouver dans la gouttière gynécophore du mâle pour développer ses caractères sexuels (Kunz 2001), se pourrait-il qu'une molécule de type phéromone soit émise par le mâle à l'intérieur de la gouttière, et captée par le VKR présent au niveau des organes sexuels de la femelle ? Ou bien se pourrait-il que le VKR soit le lien entre les acides aminés (en particulier l'arginine) et le développement des organes sexuels chez les insectes ? Il est connu chez les moustiques qu'après un repas sanguin le taux d'acides aminés augmente dans la matrice extracellulaire et permet (par une voie que l'on ignore) l'activation de la voie TOR nécessaire au développement des cellules vitellogènes (Hansen et al. 2004).

La seule réponse à cette question réside dans le recours à l'ARN interférence chez les différents organismes concernés. Dans ce cadre nous avons entrepris de réaliser de l'ARN interférence chez le modèle *A. mellifera*, en réalisant des injections systémiques abdominales de siARN. Les résultats obtenus sont encourageants, avec des baisses spécifiques de transcrits, mais il serait nécessaire de chercher un phénotype à observer sur ces représentants de castes différentes.

Les différentes études fonctionnelles que nous avons pu développer, pour déterminer les voies de signalisation et le mode de fonctionnement de AmVKR nous ont apporté de nombreux résultats de grande importance, comme la capacité du récepteur à se dimériser (Figure 8, article 3) et surtout à exercer une activité kinase et à être activable par de l'arginine (Figure 9, article 3).

Cependant, de nombreuses questions sont restées sans réponse, comme la détermination des voies de signalisation induites par VKR. Les résultats obtenus au cours de ce travail de Thèse ont montré que le système d'expression en cellules de mammifère n'était probablement pas le plus adapté pour l'étude fonctionnelle des VKR. En effet, même si nous avons pu produire des quantités suffisantes de VKR dans ce type cellulaire pour pouvoir faire les essais kinases, il semblerait que les VKR exercent une activité toxique sur les cellules de mammifères, en plus d'être relativement peu exprimées en surface, peut-être par simple présence d'une protéine exogène jugée aberrante par la cellule, où bien par médiation d'une voie que nous n'avons pas réussi à déterminer. Il se pourrait aussi très bien que le récepteur agisse comme compétiteur négatif pour les autres RTK de la cellule. Le système de transactivation Py-luc s'est montré performant pour étudier la voie Ras/MAPK du récepteur SER, mais ne s'est pas du tout montré convaincant dans l'étude des VKR. Cependant, ce système de transactivation n'est peut être pas à remettre en cause, puisque la phosphorylation des ERK n'est de toute façon pas détectée dans les cellules transfectées par des construits d'AmVKR.

Il serait nécessaire de passer en système d'expression d'insecte, en utilisant si possible le type cellulaire le plus adapté au VKR étudié (tel que les cellules d'anophèles pour l'étude de AgVKR). Ce type d'approche permettrait peut être d'obtenir l'état de glycosylation native du VKR et donc une conformation optimale. Il est aussi possible que le récepteur nécessite des protéines partenaires endogènes pour son activation et la transduction de son signal. A ce jour, nous n'avons pas recherché si un VKR endogène était exprimé dans les lignées cellulaires existantes de moustiques. Pour ce qui est de l'étude de SmVKR, il faudra nécessairement trouver un système cellulaire hétérologue. La seule lignée cellulaire phylogénétiquement apparentée au schistosome est celle du mollusque *B. glabrata*, qui fait partie des

lophotrochozoaires au même titre que le schistosome. Cette lignée cellulaire est disponible au laboratoire mais sa transfection est très difficile et nécessite des mises au point importantes (Lardans et al. 1996). En cellules de mammifère, il n'est jamais certain de parvenir à exprimer la protéine parasitaire en raison de la grande différence de codon usage, conséquence du fort taux en A/T (33%CG/66%AT) des gènes de schistosome.

L'analyse de la fonction de SmVKR par ARN interférence pourrait être développée chez le schistosome. La difficulté à réaliser l'ARN interférence chez le parasite vient du fait qu'il est très difficile d'y faire pénétrer l'ARN double-brin. Le trempage « ou soaking » nécessite l'utilisation de quantités énormes d'ARNdb (350µg/ml) ce qui augmente considérablement le coût des manipulations, imposant de travailler sur de petites quantités de parasites, ce qui pose des problèmes pour quantifier les extinctions d'ARN. Nous avons rencontré ce type de problème lors des manipulations d'interférence menées sur SmIR-1 et SmIR-2, où nous avons pu observer un phénotype mais pas d'extinction de transcrits. Des nouveaux protocoles d'électroporation d'ARNdb nouvellement mis au point au laboratoire pourraient sensiblement améliorer les résultats.

L'interférence ARN peut aussi être envisagée chez l'ensemble des autres insectes qui de manière générale ne sont pas réfractaires à l'interférence ARN. De nombreux protocoles existent par exemple chez le tribolium (Tomoyasu et al. 2008), la guêpe parasitoïde nasonia (Abdel-Latif et al. 2008), et potentiellement chez les drosophiles si les protocoles de *D. melanogaster* sont transposables aux autres espèces (Dzitoyeva et al. 2005). L'interférence ARN sur le modèle d'anophèle a été entreprise récemment au laboratoire en collaboration avec le CEPIA, le Centre de Production et d'Infection des Anophèles de l'Institut Pasteur de Paris, par injection systémique d'ARNdb chez l'insecte à l'aide de microinjecteurs.

Définir la fonction biologique des VKR est une étape essentielle pour envisager de les utiliser dans le contrôle des organismes.

III- Peut-on réellement envisager de cibler les RTK de schistosome ?

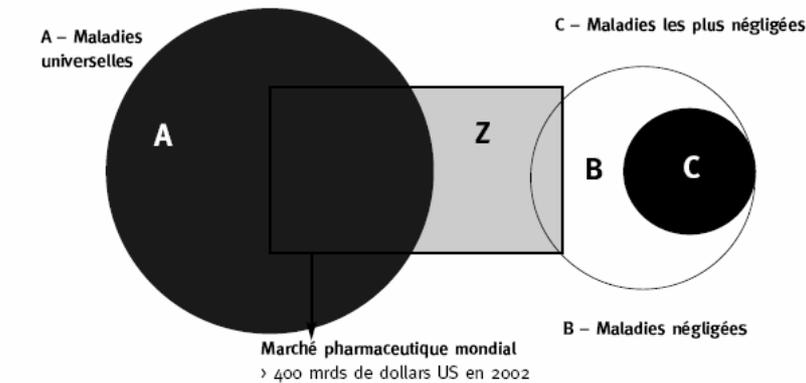
D'un point de vue purement conceptuel, tous les éléments sont rassemblés pour faire des RTK des cibles privilégiées contre le schistosome. Premièrement, en raison de la grande conservation des systèmes biologiques au sein du règne animal, il peut être admis que l'orthologie de séquence reflète l'homologie de fonction (Doerig and Meijer 2007) et que donc les RTK jouent nécessairement un rôle crucial chez le parasite. Ensuite, les différents travaux menés sur les RTK tendent à confirmer qu'ils sont effectivement impliqués dans des processus cellulaires cruciaux tout en présentant des particularités structurales pouvant permettre la mise au point d'inhibiteurs spécifiques.

A ce sujet, les IR de schistosome, SmIR-1 et SmIR-2, viennent s'ajouter à la liste de RTK à cibler. Même si la fonction de ces IR nécessiterait d'être explorée plus en profondeur, nos travaux apportent les évidences d'une prise de glucose dépendante d'une voie insuline chez le schistosome. L'utilisation d'inhibiteurs d'IR (les tyrphostines AG538 et AG1024) parvient à moduler cette prise de glucose. Ces drogues peuvent, dans une moindre mesure, avoir des effets sur d'autres cibles que les IR. Par exemple l'AG538 est connue pour inhiber la phosphorylation de substrats d'IR et la PKB, qui sont de toute façon des partenaires de voie insuline PI3K/PKB impliquée dans la régulation de la prise de glucose dépendante de Glut4. Pour limiter ces effets transversaux, nous avons utilisé des doses généralement utilisées en culture cellulaire (AG358 à 50 μ M et AG1024 à 0,2 μ M), sachant que dans notre cas, la drogue doit traverser la membrane heptalaminée du tégument d'un parasite métazoaire.

Les poches à ATP de SmIR-1 et SmIR-2 sont très conservées par rapport aux IR retrouvées chez l'homme, ce qui est en accord avec les effets relevés des tyrphostines utilisées, avec quelques résidus variants et des insert-kinases laissant penser que des inhibiteurs spécifiques sont réalisables.

En terme d'application les considérations sont autres. Comment pourrait-on intéresser les industries pharmaceutiques à synthétiser des inhibiteurs spécifiques de RTK de schistosomes sachant que les perspectives commerciales pour un médicament destiné aux pays émergents sont très faibles ? Sur les 1.393 nouveaux médicaments lancés dans le monde entre 1975 et 1999, seuls 13, soit 1 %, ont concerné des maladies dites « tropicales », qui se répandent dans les pays en voie de développement. Globalement, ces maladies sont négligées par l'industrie pharmaceutique car elles sont jugées peu rentables, frappant une population, qui représente certes 80 % de la population mondiale, mais dont le pouvoir d'achat est faible. (Smith D. et al,

2001). Sachant que le coût du traitement au PZQ a été ramené à moins de 25 centimes de dollar US pour l'adulte, et qu'il est encore moindre pour l'enfant, il est peu probable qu'un nouveau médicament issu d'une démarche non empirique, puisse être compétitive en terme de prix.



Légende

A – Les maladies universelles telles que le cancer et les affections cardiovasculaires, métaboliques, osseuses et articulaires touchent toute la population mondiale et mobilisent la majeure partie des efforts de R&D de l'industrie pharmaceutique.

B – Les maladies négligées telles que le paludisme ou la tuberculose affectent principalement les populations des pays pauvres, même si un marché restreint existe dans les pays riches ; de ce fait, les efforts de R&D entrepris pour traiter ces maladies sont faibles.

C – Les maladies les plus négligées touchent presque exclusivement les populations des pays en développement, qui sont trop pauvres pour avoir accès à un quelconque traitement. Comme elles ne représentent pas un marché viable, elles ne sont pas prises en considération dans les efforts de R&D de l'industrie pharmaceutique. Exemples de maladies les plus négligées : la trypanosomiase humaine africaine (communément appelée maladie du sommeil), la trypanosomiase américaine (aussi appelée maladie de Chagas), l'ulcère du Buruli, la dengue, la leishmaniose, la lèpre, la filariose lymphatique et la schistosomiase.

Z (la zone grise) – Elle représente la part du marché pharmaceutique consacrée à des produits destinés à traiter des affections non strictement médicales (notamment la calvitie masculine, les achats compulsifs, le stress et la fatigue due au décalage horaire), mais qui constituent néanmoins un segment très lucratif du marché dans les pays riches.

(Smith D. et al. 2001)

Bien qu'étant une maladie négligée, la schistosomiase continue de concerner environ 280 millions de personnes dans les régions les plus pauvres du globe. La mise au point de nouveaux moyens de lutte contre le parasite reste encore lointaine mais de nombreuses équipes de la communauté « schistosome » continue à innover dans ce sens, tout en sachant que les études qui sont menées sur le parasite ne peuvent que contribuer à la prise de conscience de la gravité du fléau. Sur le plan fondamental, le schistosome reste un modèle d'étude original et de nombreux processus biologiques restent à découvrir chez cet organisme, doué de capacités de défense, de développement et de reproduction très surprenantes. L'étude approfondie de ce modèle devra nécessairement s'accompagner de la mise au point de nouveaux outils moléculaires et cellulaires qui pour le moment font cruellement défaut (lignées cellulaires, ARN interférence efficace ...), même si les avancées en génomique et transcriptomique du schistosome se développent actuellement.

BILAN GLOBAL

Dans un contexte où la schistosomiase reste la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme, avec près de 300 millions de personnes concernées principalement dans les régions pauvres du globe, et une seule drogue efficace le PZQ, il apparaît évident de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques anti-schistosome.

Les travaux réalisés au cours de cette Thèse ont permis de poser les bases conceptuelles d'une utilisation des RTK de schistosome en tant que cible thérapeutique pour lutter contre le parasite. Les bases de cette affirmation sont les suivantes : Les RTK sont impliqués dans des phénomènes cruciaux pour le développement parasitaire et l'analyse de leur domaine catalytique démontre des spécificités de structure rendant le ciblage spécifique.

Nous avons entrepris de démontrer le rôle important de SmIR-1 et SmIR-2 pour la biologie du parasite. Les tendances obtenues en ARN interférence impliquent SmIR-1 dans la prise de glucose, mais ces résultats mériteraient d'être approfondis. L'étude a néanmoins permis de démontrer qu'il existait une prise de glucose dépendante d'une voie insuline chez le parasite. De plus l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'IR a montré que SmIR-1 et SmIR-2 pouvaient être affectés par des inhibiteurs de poche à ATP.

La partie la plus importante du travail a concerné l'étude des VKR, une nouvelle famille de RTK mise à jour chez les invertébrés (en particulier les insectes) à partir de l'orthologue découvert chez le schistosome. L'activité kinase des VKR a pu être démontrée, ce qui indique qu'ils ont probablement été conservés au cours de l'évolution pour avoir un rôle biologique. Nous avons aussi prouvé que le VKR était capable de se dimériser et d'être activable par l'arginine.

Le rôle biologique des VKR n'a pas encore été démontré, même si on sait que les transcrits de VKR sont exprimés au niveau des organes sexuels et des stades larvaires des organismes étudiés. Néanmoins la structure totalement atypique du VKR pourrait en faire une cible de choix pour le contrôle des invertébrés considérés comme nuisibles.

ANNEXES

- *Récapitulatif des séquences protéiques et numéros d'accèsion Genbank des différents VKR découverts*

Les VKR séquencés ont été déposés dans Genbank avec les numéros d'accèsion suivants :

DpseuVKR	EU598264
TcVKR	EU878395
AmVKR	EU878396
AgVKR	EU878397

Les séquences découvertes *in silico* sur les différents génomes d'invertébrés ont été déposées dans la section « Annotations », aussi appelée « Third Party Annotation » de Genbank avec les numéros d'accèsion suivants :

Nvvkr	BK006718
Spvkr	BK006716
Phcvkr	BK006717
Dvvkr	BK006719
Dmvkr	BK006720
Dgvkr	BK006721
Dwvkr	BK006722
Dpvkr	BK006723
Davkr	BK006724
Aavkr	BK006725
Cpvkr	BK006726

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Latif, M., L. A. Garbe, M. Koch, and J. Ruther. 2008.** An epoxide hydrolase involved in the biosynthesis of an insect sex attractant and its use to localize the production site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8914-9.
- Acher, F. C., and H. O. Bertrand. 2005.** Amino acid recognition by Venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. *Biopolymers* 80: 357-66.
- Akekawatchai, C., J. D. Holland, M. Kochetkova, J. C. Wallace, and S. R. McColl. 2005.** Transactivation of CXCR4 by the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in human MDA-MB-231 breast cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 280: 39701-8.
- al-Madani, A. A. 1990.** Schistosomiasis control in Saudi Arabia with special reference to the period 1983-1988. *Public Health* 104: 261-6.
- Alioto, T. S., and J. Ngai. 2005.** The odorant receptor repertoire of teleost fish. *BMC Genomics* 6: 173.
- Amdam, G. V., Z. L. Simoes, K. R. Guidugli, K. Norberg, and S. W. Omholt. 2003.** Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol* 3: 1.
- Amiri, P., R. M. Locksley, T. G. Parslow, M. Sadick, E. Rector, D. Ritter, and J. H. McKerrow. 1992.** Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* 356: 604-7.
- Amit, I., R. Wides, and Y. Yarden. 2007.** Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Mol Syst Biol* 3: 151.
- Bahia, D., R. A. Mortara, J. R. Kusel, L. F. Andrade, F. Ludolf, P. R. Kuser, L. Avelar, J. Trolet, C. Dissous, R. J. Pierce, and G. Oliveira. 2007.** *Schistosoma mansoni*: expression of Fes-like tyrosine kinase SmFes in the tegument and terebratorium suggests its involvement in host penetration. *Exp Parasitol* 116: 225-32.
- Bai, M., S. Trivedi, and E. M. Brown. 1998.** Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* 273: 23605-10.
- Basch, P. F., and R. Humbert. 1981.** Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. III. implantation of cultured worms into mouse mesenteric veins. *J Parasitol* 67: 191-5.
- Bjarnadottir, T. K., R. Fredriksson, and H. B. Schioth. 2005.** The gene repertoire and the common evolutionary history of glutamate, pheromone (V2R), taste(1) and other related G protein-coupled receptors. *Gene* 362: 70-84.

- Blume-Jensen, P., and T. Hunter. 2001.** Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411: 355-65.
- Botros, S., L. Pica-Mattoccia, S. William, N. El-Lakkani, and D. Cioli. 2005a.** Effect of praziquantel on the immature stages of *Schistosoma haematobium*. *Int J Parasitol* 35: 1453-7.
- Botros, S., H. Sayed, N. Amer, M. El-Ghannam, J. L. Bennett, and T. A. Day. 2005b.** Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. *Int J Parasitol* 35: 787-91.
- Bradham, C. A., K. R. Foltz, W. S. Beane, M. I. Arnone, F. Rizzo, J. A. Coffman, A. Mushegian, M. Goel, J. Morales, A. M. Genevieve, F. Lapraz, A. J. Robertson, H. Kelkar, M. Loza-Coll, I. K. Townley, M. Raisch, M. M. Roux, T. Lepage, C. Gache, D. R. McClay, and G. Manning. 2006.** The sea urchin kinome: a first look. *Dev Biol* 300: 180-93.
- Brock, C., L. Boudier, D. Maurel, J. Blahos, and J. P. Pin. 2005.** Assembly-dependent surface targeting of the heterodimeric GABAB Receptor is controlled by COPI but not 14-3-3. *Mol Biol Cell* 16: 5572-8.
- Bueding, E. 1950.** Carbohydrate metabolism of *Schistosoma mansoni*. *J Gen Physiol* 33: 475-95.
- Capron, A., G. Riveau, M. Capron, and F. Trottein. 2005.** Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. *Trends Parasitol* 21: 143-9.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, J. H. Ouma, and A. E. Butterworth. 1987.** Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science* 238: 1065-72.
- Capron, M., and A. Capron. 1994.** Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science* 264: 1876-7.
- Chen, H., J. Ma, W. Li, A. V. Eliseenkova, C. Xu, T. A. Neubert, W. T. Miller, and M. Mohammadi. 2007.** A molecular brake in the kinase hinge region regulates the activity of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell* 27: 717-30.
- Chitsulo, L., D. Engels, A. Montresor, and L. Savioli. 2000.** The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 77: 41-51.
- Choi, D. Y., J. J. Toledo-Aral, H. Y. Lin, I. Ischenko, L. Medina, P. Safo, G. Mandel, S. R. Levinson, S. Haleboua, and M. J. Hayman. 2001.** Fibroblast growth factor receptor 3 induces gene expression primarily through Ras-independent signal transduction pathways. *J Biol Chem* 276: 5116-22.
- Clemens, L. E., and P. F. Basch. 1989a.** *Schistosoma mansoni*: insulin independence. *Exp Parasitol* 68: 223-9.
- Clemens, L. E., and P. F. Basch. 1989b.** *Schistosoma mansoni*: effect of transferrin and growth factors on development of schistosomula in vitro. *J Parasitol* 75: 417-21.
- Coelho, P. M., F. M. Rosa, E. Maciel, D. A. Negrao-Correa, O. S. Carvalho, R. L. Caldeira, L. K. Jannotti-Passos, L. A. Moreira, G. C. Oliveira, and H. M. Teles.**

- 2008.** Transmission control of schistosomiasis mansoni by introduction of a resistant strain of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by this species. *Acta Trop.*
- Cornford, E. M. 1974.** Effects of insulin on *Schistosomatium douthitti*. *Gen Comp Endocrinol* 23: 286-93.
- Craddock, B. P., C. Cotter, and W. T. Miller. 2007.** Autoinhibition of the insulin-like growth factor I receptor by the juxtamembrane region. *FEBS Lett* 581: 3235-40.
- Crosby, M. A., J. L. Goodman, V. B. Strelets, P. Zhang, and W. M. Gelbart. 2007.** FlyBase: genomes by the dozen. *Nucleic Acids Res* 35: D486-91.
- Cuenda, A., and S. Rousseau. 2007.** p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1358-75.
- Dai, J. R., W. Wang, Y. S. Liang, H. J. Li, X. H. Guan, and Y. C. Zhu. 2008.** A novel molluscicidal formulation of niclosamide. *Parasitol Res* 103: 405-12.
- Deheuninck, J., B. Foveau, G. Goormachtigh, C. Leroy, Z. Ji, D. Tulasne, and V. Fafeur. 2008.** Caspase cleavage of the MET receptor generates an HGF interfering fragment. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 573-7.
- Delcourt, N., J. Bockaert, and P. Marin. 2007.** GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci* 28: 602-7.
- Dissous, C., N. Khayath, J. Vicogne, and M. Capron. 2006.** Growth factor receptors in helminth parasites: signalling and host-parasite relationships. *FEBS Lett* 580: 2968-75.
- Doenhoff, M. J., J. R. Kusel, G. C. Coles, and D. Cioli. 2002.** Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 465-9.
- Doepfner, K. T., D. Boller, and A. Arcaro. 2007.** Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 63: 215-30.
- Doerig, C., and L. Meijer. 2007.** Antimalarial drug discovery: targeting protein kinases. *Expert Opin Ther Targets* 11: 279-90.
- Dorin, D., J. P. Semblat, P. Poulet, P. Alano, J. P. Goldring, C. Whittle, S. Patterson, D. Chakrabarti, and C. Doerig. 2005.** PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 55: 184-96.
- Duchek, P., K. Somogyi, G. Jekely, S. Beccari, and P. Rorth. 2001.** Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* 107: 17-26.
- Dzitoyeva, S., A. Gutnov, M. Imbesi, N. Dimitrijevic, and H. Manev. 2005.** Developmental role of GABAB(1) receptors in *Drosophila*. *Brain Res Dev Brain Res* 158: 111-4.

- Efron, B., E. Halloran, and S. Holmes. 1996.** Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13429-34.
- El-Rayes, B. F., and P. M. LoRusso. 2004.** Targeting the epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 91: 418-24.
- Fallon, P. G., E. J. Richardson, F. M. Jones, and D. W. Dunne. 1998.** Dehydroepiandrosterone sulfate treatment of mice modulates infection with *Schistosoma mansoni*. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 251-3.
- Fenwick, A., D. Rollinson, and V. Southgate. 2006.** Implementation of human schistosomiasis control: Challenges and prospects. *Adv Parasitol* 61: 567-622.
- Freitas, T. C., E. Jung, and E. J. Pearce. 2007.** TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog* 3: e52.
- Gryseels, B., K. Polman, J. Clerinx, and L. Kestens. 2006.** Human schistosomiasis. *Lancet* 368: 1106-18.
- Hafizi, S., and B. Dahlback. 2006.** Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 295-304.
- Halanych, K. M. 2004.** THE NEW VIEW OF ANIMAL PHYLOGENY. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35: 229-56.
- Hanks, S. K., and A. M. Quinn. 1991.** Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* 200: 38-62.
- Hanks, S. K., and T. Hunter. 1995.** Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* 9: 576-96.
- Hanks, S. K., A. M. Quinn, and T. Hunter. 1988.** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52.
- Hansen, I. A., G. M. Attardo, S. G. Roy, and A. S. Raikhel. 2005.** Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito. *J Biol Chem* 280: 20565-72.
- Hansen, I. A., G. M. Attardo, J. H. Park, Q. Peng, and A. S. Raikhel. 2004.** Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10626-31.
- He, X., D. Chow, M. M. Martick, and K. C. Garcia. 2001.** Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone. *Science* 293: 1657-62.
- Hill, C. A., F. C. Kafatos, S. K. Stansfield, and F. H. Collins. 2005.** Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era. *Nat Rev Microbiol* 3: 262-8.
- Hirata, M., T. Kanematsu, H. Takeuchi, and H. Yagisawa. 1998.** Pleckstrin homology domain as an inositol compound binding module. *Jpn J Pharmacol* 76: 255-63.

- Hu, R., W. Wu, E. G. Niles, and P. T. Loverde. 2006.** Isolation and characterization of *Schistosoma mansoni* constitutive androstane receptor. *Mol Biochem Parasitol* 148: 31-43.
- Hubbard, S. R. 1997.** Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *Embo J* 16: 5572-81.
- Hubbard, S. R., and J. H. Till. 2000.** Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 69: 373-98.
- Hubbard, S. R., L. Wei, L. Ellis, and W. A. Hendrickson. 1994.** Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372: 746-54.
- Jeziorski, M. C., and R. M. Greenberg. 2006.** Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: potential role in praziquantel action. *Int J Parasitol* 36: 625-32.
- Kaburagi, Y., R. Yamamoto-Honda, K. Tobe, K. Ueki, M. Yachi, Y. Akanuma, R. M. Stephens, D. Kaplan, Y. Yazaki, and T. Kadowaki. 1995.** The role of the NPXY motif in the insulin receptor in tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and Shc. *Endocrinology* 136: 3437-43.
- Kalluri, S., P. Gilruth, D. Rogers, and M. Szczur. 2007.** Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: a review. *PLoS Pathog* 3: 1361-71.
- Kammerer, R. A., S. Frank, T. Schulthess, R. Landwehr, A. Lustig, and J. Engel. 1999.** Heterodimerization of a functional GABAB receptor is mediated by parallel coiled-coil alpha-helices. *Biochemistry* 38: 13263-9.
- Kane, J. F. 1995.** Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 6: 494-500.
- Kang, S., S. Dong, T. L. Gu, A. Guo, M. S. Cohen, S. Lonial, H. J. Khoury, D. Fabbro, D. G. Gilliland, P. L. Bergsagel, J. Taunton, R. D. Polakiewicz, and J. Chen. 2007.** FGFR3 activates RSK2 to mediate hematopoietic transformation through tyrosine phosphorylation of RSK2 and activation of the MEK/ERK pathway. *Cancer Cell* 12: 201-14.
- Kannan, N., S. S. Taylor, Y. Zhai, J. C. Venter, and G. Manning. 2007.** Structural and functional diversity of the microbial kinome. *PLoS Biol* 5: e17.
- Kapp, K., J. Knobloch, P. Schussler, S. Sroka, R. Lammers, W. Kunz, and C. G. Grevelding. 2004.** The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol Biochem Parasitol* 138: 171-82.
- Keiser, J., and J. Utzinger. 2007.** Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections. *Curr Opin Infect Dis* 20: 605-12.
- Khayath, N., J. Vicogne, A. Ahier, A. BenYounes, C. Konrad, J. Trolet, E. Viscogliosi, K. Brehm, and C. Dissous. 2007.** Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Febs J* 274: 659-76.

- King, C. H., R. F. Sturrock, H. C. Kariuki, and J. Hamburger. 2006.** Transmission control for schistosomiasis - why it matters now. *Trends Parasitol* 22: 575-82.
- King, N., and S. B. Carroll. 2001.** A receptor tyrosine kinase from choanoflagellates: molecular insights into early animal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15032-7.
- Knobloch, J., W. Kunz, and C. G. Grevelding. 2006.** Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 36: 1261-72.
- Knobloch, J., R. Winnen, M. Quack, W. Kunz, and C. G. Grevelding. 2002.** A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene* 294: 87-97.
- Knobloch, J., S. Beckmann, C. Burmeister, T. Quack, and C. G. Grevelding. 2007.** Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 117: 318-36.
- Knopf, P. M., and T. Linden. 1985.** Completion of *Schistosoma mansoni* life cycle in thyroidectomized rats and effects of thyroid hormone replacement therapy. *J Parasitol* 71: 422-6.
- Koch, C. A., D. Anderson, M. F. Moran, C. Ellis, and T. Pawson. 1991.** SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252: 668-74.
- Kolch, W. 2005.** Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 827-37.
- Kroiher, M., M. A. Miller, and R. E. Steele. 2001.** Deceiving appearances: signaling by "dead" and "fractured" receptor protein-tyrosine kinases. *Bioessays* 23: 69-76.
- Kucharski, R., C. Mitri, Y. Grau, and R. Maleszka. 2007.** Characterization of a metabotropic glutamate receptor in the honeybee (*Apis mellifera*): implications for memory formation. *Invert Neurosci* 7: 99-108.
- Kulman, J. D., J. E. Harris, N. Nakazawa, M. Ogasawara, M. Satake, and E. W. Davie. 2006.** Vitamin K-dependent proteins in *Ciona intestinalis*, a basal chordate lacking a blood coagulation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15794-9.
- Kunishima, N., Y. Shimada, Y. Tsuji, T. Sato, M. Yamamoto, T. Kumasaka, S. Nakanishi, H. Jingami, and K. Morikawa. 2000.** Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407: 971-7.
- Kunz, W. 2001.** Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. *Trends Parasitol* 17: 227-31.
- Kurtis, J. D., J. F. Friedman, T. Leenstra, G. C. Langdon, H. W. Wu, D. L. Manalo, L. Su, M. Jiz, B. Jarilla, A. O. Pablo, S. T. McGarvey, R. M. Olveda, and L. P. Acosta. 2006.** Pubertal development predicts resistance to infection and reinfection with *Schistosoma japonicum*. *Clin Infect Dis* 42: 1692-8.

- Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-32.
- Landau, M., I. Mayrose, Y. Rosenberg, F. Glaser, E. Martz, T. Pupko, and N. Ben-Tal. 2005.** ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Res* 33: W299-302.
- Lapraz, F., E. Rottinger, V. Duboc, R. Range, L. Duloquin, K. Walton, S. Y. Wu, C. Bradham, M. A. Loza, T. Hibino, K. Wilson, A. Poustka, D. McClay, L. Angerer, C. Gache, and T. Lepage. 2006.** RTK and TGF-beta signaling pathways genes in the sea urchin genome. *Dev Biol* 300: 132-52.
- Lardans, V., V. Boulo, P. Duclermortier, E. Serra, E. Mialhe, A. Capron, and C. Dissous. 1996.** DNA transfer in a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line by DOTAP lipofection. *Parasitol Res* 82: 574-6.
- Lawson, D., P. Arensburger, P. Atkinson, N. J. Besansky, R. V. Bruggner, R. Butler, K. S. Campbell, G. K. Christophides, S. Christley, E. Dialynas, D. Emmert, M. Hammond, C. A. Hill, R. C. Kennedy, N. F. Lobo, M. R. MacCallum, G. Madey, K. Megy, S. Redmond, S. Russo, D. W. Severson, E. O. Stinson, P. Topalis, E. M. Zdobnov, E. Birney, W. M. Gelbart, F. C. Kafatos, C. Louis, and F. H. Collins. 2007.** VectorBase: a home for invertebrate vectors of human pathogens. *Nucleic Acids Res* 35: D503-5.
- Leveugle, M., K. Prat, C. Popovici, D. Birnbaum, and F. Coulier. 2004.** Phylogenetic analysis of *Ciona intestinalis* gene superfamilies supports the hypothesis of successive gene expansions. *J Mol Evol* 58: 168-81.
- Levi-Schaffer, F., and M. Smolarsky. 1981.** *Schistosoma mansoni*: effect of insulin and a low-molecular-weight fraction of serum on schistosomula in chemically defined media. *Exp Parasitol* 52: 378-85.
- Li, E., and K. Hristova. 2006.** Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies. *Biochemistry* 45: 6241-51.
- Li, W., and W. T. Miller. 2006.** Role of the activation loop tyrosines in regulation of the insulin-like growth factor I receptor-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 281: 23785-91.
- Li, W. X. 2005.** Functions and mechanisms of receptor tyrosine kinase Torso signaling: lessons from *Drosophila* embryonic terminal development. *Dev Dyn* 232: 656-72.
- Li, Y. S., G. Raso, Z. Y. Zhao, Y. K. He, M. K. Ellis, and D. P. McManus. 2007.** Large water management projects and schistosomiasis control, Dongting Lake region, China. *Emerg Infect Dis* 13: 973-9.
- Liu, F., P. Chen, S. J. Cui, Z. Q. Wang, and Z. G. Han. 2008.** SjTPdb: integrated transcriptome and proteome database and analysis platform for *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics* 9: 304.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-8.

- Loftus, B., I. Anderson, R. Davies, U. C. Alsmark, J. Samuelson, P. Amedeo, P. Roncaglia, M. Berriman, R. P. Hirt, B. J. Mann, T. Nozaki, B. Suh, M. Pop, M. Duchene, J. Ackers, E. Tannich, M. Leippe, M. Hofer, I. Bruchhaus, U. Willhoeft, A. Bhattacharya, T. Chillingworth, C. Churcher, Z. Hance, B. Harris, D. Harris, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, R. Squares, S. Whitehead, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, H. Norbertczak, C. Price, Z. Wang, N. Guillen, C. Gilchrist, S. E. Stroup, S. Bhattacharya, A. Lohia, P. G. Foster, T. Sicheritz-Ponten, C. Weber, U. Singh, C. Mukherjee, N. M. El-Sayed, W. A. Petri, Jr., C. G. Clark, T. M. Embley, B. Barrell, C. M. Fraser, and N. Hall. 2005.** The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433: 865-8.
- Loker, E. S. 1983.** A comparative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitology* 87 (Pt 2): 343-69.
- Loverde, P. T., A. Osman, and A. Hinck. 2007.** *Schistosoma mansoni*: TGF-beta signaling pathways. *Exp Parasitol* 117: 304-17.
- LoVerde, P. T., H. Hirai, J. M. Merrick, N. H. Lee, and N. El-Sayed. 2004.** *Schistosoma mansoni* genome project: an update. *Parasitol Int* 53: 183-92.
- Ludolf, F., D. Bahia, L. F. Andrade, A. Cousin, M. Capron, C. Dissous, R. J. Pierce, and G. Oliveira. 2007.** Molecular analysis of SmFes, a tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* orthologous to the members of the Fes/Fps/Fer family. *Biochem Biophys Res Commun* 360: 163-72.
- Madden, D. R. 2002.** The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3: 91-101.
- Manning, G. 2005.** Genomic overview of protein kinases. *WormBook*: 1-19.
- Manning, G., G. D. Plowman, T. Hunter, and S. Sudarsanam. 2002a.** Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 27: 514-20.
- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam. 2002b.** The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-34.
- Marshall, F. H., K. A. Jones, K. Kaupmann, and B. Bettler. 1999.** GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci* 20: 396-9.
- Matsui, T., T. Nagoshi, E. G. Hong, I. Luptak, K. Hartil, L. Li, N. Gorovits, M. J. Charron, J. K. Kim, R. Tian, and A. Rosenzweig. 2006.** Effects of chronic Akt activation on glucose uptake in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E789-97.
- Maurel, D., L. Comps-Agrar, C. Brock, M. L. Rives, E. Bourrier, M. A. Ayoub, H. Bazin, N. Tinel, T. Durroux, L. Prezeau, E. Trinquet, and J. P. Pin. 2008.** Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods* 5: 561-7.
- McKay, M. M., and D. K. Morrison. 2007.** Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26: 3113-21.

- McManus, D. P., and A. Loukas. 2008.** Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 21: 225-42.
- Miller, M. A., and R. E. Steele. 2000.** Lemon encodes an unusual receptor protein-tyrosine kinase expressed during gametogenesis in Hydra. *Dev Biol* 224: 286-98.
- Miranda-Saavedra, D., and G. J. Barton. 2007.** Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins* 68: 893-914.
- Mitri, C., M. L. Parmentier, J. P. Pin, J. Bockaert, and Y. Grau. 2004.** Divergent evolution in metabotropic glutamate receptors. A new receptor activated by an endogenous ligand different from glutamate in insects. *J Biol Chem* 279: 9313-20.
- Moller, S., M. D. Croning, and R. Apweiler. 2001.** Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17: 646-53.
- Muhlrad, P. J., and S. Ward. 2002.** Spermiogenesis initiation in *Caenorhabditis elegans* involves a casein kinase 1 encoded by the *spe-6* gene. *Genetics* 161: 143-55.
- Muller, W. E., A. Skorokhod, and I. M. Muller. 1999a.** Receptor tyrosine kinase, an autapomorphic character of metazoa: identification in marine sponges. *Acta Biol Hung* 50: 395-411.
- Muller, W. E., M. Kruse, B. Blumbach, A. Skorokhod, and I. M. Muller. 1999b.** Gene structure and function of tyrosine kinases in the marine sponge *Geodia cydonium*: autapomorphic characters in Metazoa. *Gene* 238: 179-93.
- Nakazawa, M., M. R. Fantappie, G. L. Freeman, Jr., S. Eloi-Santos, N. J. Olsen, W. J. Kovacs, W. E. Secor, and D. G. Colley. 1997.** *Schistosoma mansoni*: susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. *Exp Parasitol* 85: 233-40.
- Naula, C., M. Parsons, and J. C. Mottram. 2005.** Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* 1754: 151-9.
- Neuberg, M., J. Adamkiewicz, J. B. Hunter, and R. Muller. 1989.** A Fos protein containing the Jun leucine zipper forms a homodimer which binds to the AP1 binding site. *Nature* 341: 243-5.
- Noble, M. E., J. A. Endicott, and L. N. Johnson. 2004.** Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 303: 1800-5.
- Nunes, M. C., J. P. Goldring, C. Doerig, and A. Scherf. 2007.** A novel protein kinase family in *Plasmodium falciparum* is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell. *Mol Microbiol* 63: 391-403.
- O'Hara, P. J., P. O. Sheppard, H. Thogersen, D. Venezia, B. A. Haldeman, V. McGrane, K. M. Houamed, C. Thomsen, T. L. Gilbert, and E. R. Mulvihill. 1993.** The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11: 41-52.

- Oda, K., Y. Matsuoka, A. Funahashi, and H. Kitano. 2005.** A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 1: 2005 0010.
- Ostman, A., and F. D. Bohmer. 2001.** Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol* 11: 258-66.
- Paoletti, P., and J. Neyton. 2007.** NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7: 39-47.
- Parat, M., N. McNicoll, B. Wilkes, A. Fournier, and A. De Lean. 2008.** Role of extracellular domain dimerization in agonist-induced activation of natriuretic peptide receptor A. *Mol Pharmacol* 73: 431-40.
- Pashmforoush, M., S. J. Chan, and D. F. Steiner. 1996.** Structure and expression of the insulin-like peptide receptor from amphioxus. *Mol Endocrinol* 10: 857-66.
- Pidasheva, S., M. Grant, L. Canaff, O. Ercan, U. Kumar, and G. N. Hendy. 2006.** Calcium-sensing receptor dimerizes in the endoplasmic reticulum: biochemical and biophysical characterization of CASR mutants retained intracellularly. *Hum Mol Genet* 15: 2200-9.
- Pin, J. P., T. Galvez, and L. Prezeau. 2003.** Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98: 325-54.
- Pin, J. P., J. Kniazeff, J. Liu, V. Binet, C. Goudet, P. Rondard, and L. Prezeau. 2005.** Allosteric functioning of dimeric class C G-protein-coupled receptors. *Febs J* 272: 2947-55.
- Plowman, G. D., S. Sudarsanam, J. Bingham, D. Whyte, and T. Hunter. 1999.** The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13603-10.
- Raingaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch, and R. J. Davis. 1995.** Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270: 7420-6.
- Randrianariveლოსia, M., L. Raharimalala, A. Randriamanantena, and R. Jambou. 2000.** [Drug resistance of *Plasmodium falciparum* in coastal regions of Madagascar]. *Med Trop (Mars)* 60: 243-9.
- Randrianariveლოსia, M., D. A. Fidock, O. Belmonte, S. G. Valderramos, O. Mercereau-Puijalon, and F. Ariey. 2006.** First evidence of pfcr1 mutant *Plasmodium falciparum* in Madagascar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 826-30.
- Ray, K., B. C. Hauschild, P. J. Steinbach, P. K. Goldsmith, O. Hauache, and A. M. Spiegel. 1999.** Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca(2+) receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric Ca(2+) receptor. *J Biol Chem* 274: 27642-50.

- Reidling, J. C., M. A. Miller, and R. E. Steele. 2000.** Sweet Tooth, a novel receptor protein-tyrosine kinase with C-type lectin-like extracellular domains. *J Biol Chem* 275: 10323-30.
- Ringwald, P. 2007.** [Current antimalarial drugs: resistance and new strategies]. *Bull Acad Natl Med* 191: 1273-84; discussion 1284.
- Robbins, M. J., F. Ciruela, A. Rhodes, and R. A. McIlhinney. 1999.** Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha. *J Neurochem* 72: 2539-47.
- Robinson, D. R., Y. M. Wu, and S. F. Lin. 2000.** The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19: 5548-57.
- Rokosz, L. L., J. R. Beasley, C. D. Carroll, T. Lin, J. Zhao, K. C. Appell, and M. L. Webb. 2008.** Kinase inhibitors as drugs for chronic inflammatory and immunological diseases: progress and challenges. *Expert Opin Ther Targets* 12: 883-903.
- Romano, C., W. L. Yang, and K. L. O'Malley. 1996.** Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* 271: 28612-6.
- Rondard, P., J. Liu, S. Huang, F. Malhaire, C. Vol, A. Pinault, G. Labesse, and J. P. Pin. 2006.** Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors. *J Biol Chem* 281: 24653-61.
- Rondard, P., S. Huang, C. Monnier, H. Tu, B. Blanchard, N. Oueslati, F. Malhaire, Y. Li, E. Trinquet, G. Labesse, J. P. Pin, and J. Liu. 2008.** Functioning of the dimeric GABA(B) receptor extracellular domain revealed by glycan wedge scanning. *Embo J* 27: 1321-32.
- Ross, A. G., A. C. Sleight, Y. Li, G. M. Davis, G. M. Williams, Z. Jiang, Z. Feng, and D. P. McManus. 2001.** Schistosomiasis in the People's Republic of China: prospects and challenges for the 21st century. *Clin Microbiol Rev* 14: 270-95.
- Saule, P., J. Vicogne, M. Delacre, L. Macia, A. Tailleux, C. Dissous, C. Auriault, and I. Wolowczuk. 2005.** Host glucose metabolism mediates T4 and IL-7 action on *Schistosoma mansoni* development. *J Parasitol* 91: 737-44.
- Schang, L. M. 2005.** Advances on cyclin-dependent kinases (CDKs) as novel targets for antiviral drugs. *Curr Drug Targets Infect Disord* 5: 29-37.
- Schlessinger, J. 2000.** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211-25.
- Schlessinger, J. 2002.** Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110: 669-72.
- Sebolt-Leopold, J. S. 2000.** Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* 19: 6594-9.
- Shchemelinin, I., L. Sefc, and E. Necas. 2006.** Protein kinase inhibitors. *Folia Biol (Praha)* 52: 137-48.

- Shiu, S. H., and W. H. Li. 2004.** Origins, lineage-specific expansions, and multiple losses of tyrosine kinases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 21: 828-40.
- Shoemaker, C. B., H. Ramachandran, A. Landa, M. G. dos Reis, and L. D. Stein. 1992.** Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. *Mol Biochem Parasitol* 53: 17-32.
- Shtivelman, E., R. P. Gale, O. Drezzen, A. Berrebi, R. Zaizov, I. Kubonishi, I. Miyoshi, and E. Canaani. 1987.** bcr-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 69: 971-3.
- Skelly, P. J., and C. B. Shoemaker. 1996.** Rapid appearance and asymmetric distribution of glucose transporter SGTP4 at the apical surface of intramammalian-stage *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3642-6.
- Skorokhod, A., V. Gamulin, D. Gundacker, V. Kavsan, I. M. Muller, and W. E. Muller. 1999.** Origin of insulin receptor-like tyrosine kinases in marine sponges. *Biol Bull* 197: 198-206.
- Sodergren, E., G. M. Weinstock, E. H. Davidson, R. A. Cameron, R. A. Gibbs, R. C. Angerer, L. M. Angerer, M. I. Arnone, D. R. Burgess, R. D. Burke, J. A. Coffman, M. Dean, M. R. Elphick, C. A. Ettensohn, K. R. Foltz, A. Hamdoun, R. O. Hynes, W. H. Klein, W. Marzluff, D. R. McClay, R. L. Morris, A. Mushegian, J. P. Rast, L. C. Smith, M. C. Thorndyke, V. D. Vacquier, G. M. Wessel, G. Wray, L. Zhang, C. G. Elsik, O. Ermolaeva, W. Hlavina, G. Hofmann, P. Kitts, M. J. Landrum, A. J. Mackey, D. Maglott, G. Panopoulou, A. J. Poustka, K. Pruitt, V. Sapozhnikov, X. Song, A. Souvorov, V. Solovyev, Z. Wei, C. A. Whittaker, K. Worley, K. J. Durbin, Y. Shen, O. Fedrigo, D. Garfield, R. Haygood, A. Primus, R. Satija, T. Severson, M. L. Gonzalez-Garay, A. R. Jackson, A. Milosavljevic, M. Tong, C. E. Killian, B. T. Livingston, F. H. Wilt, N. Adams, R. Belle, S. Carbonneau, R. Cheung, P. Cormier, B. Cosson, J. Croce, A. Fernandez-Guerra, A. M. Genevriere, M. Goel, H. Kelkar, J. Morales, O. Mulner-Lorillon, A. J. Robertson, J. V. Goldstone, B. Cole, D. Epel, B. Gold, M. E. Hahn, M. Howard-Ashby, M. Scally, J. J. Stegeman, E. L. Allgood, J. Cool, K. M. Judkins, S. S. McCafferty, A. M. Musante, R. A. Obar, A. P. Rawson, B. J. Rossetti, I. R. Gibbons, M. P. Hoffman, A. Leone, S. Istrail, S. C. Materna, M. P. Samanta, V. Stolc, W. Tongprasit, et al. 2006.** The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314: 941-52.
- Stahl JP, C. C., Bru JP, Choutet P, Decazes JM., 2008.** [Management and prevention of imported *Plasmodium falciparum* malaria (Revision 2007 of the 1999 Consensus Conference). Long text in French]. *Med Mal Infect* 38: 68-117.
- Stanke, M., O. Schoffmann, B. Morgenstern, and S. Waack. 2006.** Gene prediction in eukaryotes with a generalized hidden Markov model that uses hints from external sources. *BMC Bioinformatics* 7: 62.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-9.

- Teles, H. M. 2005.** [Geographic distribution of *Schistosoma mansoni* transmitter snail species in State of Sao Paulo]. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 426-32.
- Thiel, K. W., and G. Carpenter. 2007.** Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19238-43.
- Thomas, S. M., N. E. Bholra, Q. Zhang, S. C. Contrucci, A. L. Wentzel, M. L. Freilino, W. E. Gooding, J. M. Siegfried, D. C. Chan, and J. R. Grandis. 2006.** Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 66: 11831-9.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-80.
- Tomoyasu, Y., S. C. Miller, S. Tomita, M. Schoppmeier, D. Grossmann, and G. Bucher. 2008.** Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol* 9: R10.
- Tsuji, Y., Y. Shimada, T. Takeshita, N. Kajimura, S. Nomura, N. Sekiyama, J. Otomo, J. Usukura, S. Nakanishi, and H. Jingami. 2000.** Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J Biol Chem* 275: 28144-51.
- Tulasne, D., and B. Foveau. 2008.** The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* 15: 427-34.
- Tulasne, D., J. Deheuninck, F. C. Lourenco, F. Lamballe, Z. Ji, C. Leroy, E. Puchois, A. Moumen, F. Maina, P. Mehlen, and V. Fafeur. 2004.** Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 24: 10328-39.
- van den Akker, F. 2001.** Detailed analysis of the atrial natriuretic factor receptor hormone-binding domain crystal structure. *Can J Physiol Pharmacol* 79: 692-704.
- van der Werf, M. J., S. J. de Vlas, S. Brooker, C. W. Looman, N. J. Nagelkerke, J. D. Habbema, and D. Engels. 2003.** Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 86: 125-39.
- Verjovski-Almeida, S., R. DeMarco, E. A. Martins, P. E. Guimaraes, E. P. Ojopi, A. C. Paquola, J. P. Piazza, M. Y. Nishiyama, Jr., J. P. Kitajima, R. E. Adamson, P. D. Ashton, M. F. Bonaldo, P. S. Coulson, G. P. Dillon, L. P. Farias, S. P. Gregorio, P. L. Ho, R. A. Leite, L. C. Malaquias, R. C. Marques, P. A. Miyasato, A. L. Nascimento, F. P. Ohlweiler, E. M. Reis, M. A. Ribeiro, R. G. Sa, G. C. Stukart, M. B. Soares, C. Gargioni, T. Kawano, V. Rodrigues, A. M. Madeira, R. A. Wilson, C. F. Menck, J. C. Setubal, L. C. Leite, and E. Dias-Neto. 2003.** Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet* 35: 148-57.

- Vicogne, J., J. P. Pin, V. Lardans, M. Capron, C. Noel, and C. Dissous. 2003.** An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus Flytrap module. *Mol Biochem Parasitol* 126: 51-62.
- Vicogne, J., K. Cailliau, D. Tulasne, E. Browaeys, Y. T. Yan, V. Fafeur, J. P. Vilain, D. Legrand, J. Trolet, and C. Dissous. 2004.** Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 279: 37407-14.
- Vlahovic, G., and J. Crawford. 2003.** Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist* 8: 531-8.
- Wahab, M. F., K. S. Warren, and R. P. Levy. 1971.** Function of the thyroid and the host-parasite relation in murine schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis* 124: 161-71.
- Ward, P., L. Equinet, J. Packer, and C. Doerig. 2004.** Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 5: 79.
- Wasylyk, B., C. Wasylyk, P. Flores, A. Begue, D. Leprince, and D. Stehelin. 1990.** The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346: 191-3.
- Webster, M. K., P. Y. D'Avis, S. C. Robertson, and D. J. Donoghue. 1996.** Profound ligand-independent kinase activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the activation loop mutation responsible for a lethal skeletal dysplasia, thanatophoric dysplasia type II. *Mol Cell Biol* 16: 4081-7.
- Weidner, K. M., M. Sachs, D. Riethmacher, and W. Birchmeier. 1995.** Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2597-601.
- Wellendorph, P., K. B. Hansen, A. Balsgaard, J. R. Greenwood, J. Egebjerg, and H. Brauner-Osborne. 2005.** Deorphanization of GPRC6A: a promiscuous L-alpha-amino acid receptor with preference for basic amino acids. *Mol Pharmacol* 67: 589-97.
- Wolowczuk, I., O. Roye, S. Nutten, M. Delacre, F. Trottein, and C. Auriault. 1999a.** Role of interleukin-7 in the relation between *Schistosoma mansoni* and its definitive vertebrate host. *Microbes Infect* 1: 545-51.
- Wolowczuk, I., S. Nutten, O. Roye, M. Delacre, M. Capron, R. M. Murray, F. Trottein, and C. Auriault. 1999b.** Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun* 67: 4183-90.
- Wu, W., E. G. Niles, N. El-Sayed, M. Berriman, and P. T. LoVerde. 2006.** *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes, Trematoda) nuclear receptors: sixteen new members and a novel subfamily. *Gene* 366: 303-15.
- Yan, Y., D. Tulasne, E. Browaeys, K. Cailliau, N. Khayath, R. J. Pierce, J. Trolet, V. Fafeur, A. Ben Younes, and C. Dissous. 2007.** Molecular cloning and

characterisation of SmSLK, a novel Ste20-like kinase in *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 37: 1539-50.

Yang, H., Y. Xia, S. Q. Lu, T. W. Soong, and Z. W. Feng. 2008. Basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation of mouse bone marrow stromal cells requires FGFR-1, MAPK/ERK, and transcription factor AP-1. *J Biol Chem* 283: 5287-95.

Yao, K., Y. L. Yin, W. Chu, Z. Liu, D. Deng, T. Li, R. Huang, J. Zhang, B. Tan, W. Wang, and G. Wu. 2008. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J Nutr* 138: 867-72.

Yarden, Y., and A. Ullrich. 1988. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57: 443-78.

Yokoyama, N., I. Ischenko, M. J. Hayman, and W. T. Miller. 2005. The C terminus of RON tyrosine kinase plays an autoinhibitory role. *J Biol Chem* 280: 8893-900.