HAL
open science

Caractérisation moléculaire des Récepteurs Venus Kinase : étude fonctionnelle chez le parasite Schistosoma mansoni

Nadège Gouignard

To cite this version:

Nadège Gouignard. Caractérisation moléculaire des Récepteurs Venus Kinase : étude fonctionnelle chez le parasite Schistosoma mansoni. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S034 . tel-00769951

HAL Id: tel-00769951

https://theses.hal.science/tel-00769951

Submitted on 4 Jan 2013

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.

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE
Ecole Doctorale Biologie – Santé
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

N° d'ordre :

THESE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Nadège GOUIGNARD

Le 30 novembre 2011

Caractérisation moléculaire des Récepteurs Venus Kinase - Etude fonctionnelle chez le parasite *Schistosoma mansoni*.

Devant le jury composé de :

Président :	**Professeur El moukhtar ALIOUAT**
Rapporteurs :	**Docteur Héctor ESCRIVÀ**
	Docteur Philippe RONDARD
Examinateurs :	**Docteur Christian MITRI**
	Docteur Jérôme VICOGNE
	Professeur Christoph GREVELDING
	Docteur Colette DISSOUS

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Université Lille Nord de France - Inserm U1019 - CNRS UMR 8204- Institut Pasteur de Lille
1 Rue du Professeur Calmette 59019 Lille Cedex France

RESUME

La famille des Venus Kinase Receptors (VKR) est une nouvelle famille de Récepteurs Tyrosine Kinase découverte au laboratoire chez le ver parasite *Schistosoma mansoni* (SmVKR1), puis chez de nombreux autres organismes invertébrés, principalement des insectes. Les études réalisées au laboratoire ont montré la présence des transcrits *vkr* dans les organes reproducteurs des organismes adultes mais aussi dans les stades larvaires suggérant un rôle dans le développement et/ou la reproduction de ces organismes.

Ma thèse concerne la caractérisation structurale, biochimique et fonctionnelle des VKRs de deux organismes d'intérêt sanitaire majeur : le schistosome, parasite responsable de la bilharziose qui représente la seconde endémie parasitaire mondiale et l'anophèle, vecteur principal du paludisme en Afrique.

Dans une première partie nous avons mis en évidence la présence d'un second VKR chez le schistosome, nommé SmVKR2. Nous avons montré que ses transcrits sont exprimés à tous les stades du cycle parasitaire et principalement dans les organes génitaux de la femelle au niveau des ovocytes immatures et de l'ootype. Nous avons exprimé SmVKR1 et SmVKR2 et montré qu'ils sont tous deux des récepteurs à activité tyrosine kinase, activables respectivement par la L-arginine et par le calcium. Des expériences complémentaires semblent indiquer qu'un ligand naturel de SmVKR1 pourrait se trouver dans le canal gynécophore des vers appariés.

Parallèlement, nous avons entrepris l'identification des partenaires cytosoliques de SmVKR1 et SmVKR2 grâce au criblage d'une banque d'ADNc de vers adultes par la technique de double hybride en levure en utilisant les domaines intracellulaires (DIC) des récepteurs comme appâts. L'analyse partielle des résultats obtenus montre que les DIC de SmVKR1 et SmVKR2 interagissent en autres avec des protéines du cytosquelette et avec des protéines cytoplasmiques pourvues de domaines d'interaction protéine-protéine SH2, acteurs de voies de signalisation classique des RTKs.

Nous avons montré par ARNi que la diminution des transcrits SmVKR1 et SmVKR2 a un impact majeur sur la morphologie des organes génitaux de la femelle. Les sporocystes interférés pour les deux récepteurs présentent une diminution significative de leur taille comparée aux témoins.

La deuxième partie de mes travaux de thèse a été centrée sur l'étude d'AgVKR, le récepteur d'*Anopheles gambiae*. En utilisant deux systèmes d'expression hétérologue, nous avons pu établir que ce récepteur était lui aussi catalytiquement actif et activable par la L-arg comme SmVKR1.

L'étude de la fonction d'AgVKR a été abordée grâce à la découverte récente de son expression constitutive dans la lignée de cellules d'*A. gambiae* nommées Sua5B qui est de type hémocytaire. Des expériences d'ARNi ont été mises au point dans le but de visualiser l'impact d'une diminution de transcrits sur la physiologie des cellules.

Dans leur ensemble, les résultats de ces travaux participent à la compréhension des mécanismes de régulation et de la fonction des VKRs, des récepteurs qui semblent d'une grande importance pour le développement et la reproduction des organismes.

ABSTRACT

Venus Kinase Receptors (VKRs) form a novel family of Receptor Tyrosine Kinases discovered for the first time in the parasite *Schistosoma mansoni* (SmVKR1)*,* then many other invertebrate organisms and mainly in insects. In our laboratory, previous studies have shown that vkr transcripts are present in reproductive organs of adult organisms but also in larval stages, suggesting a role of VKRs in reproduction and development mechanisms.
My thesis was concerned with the structural, biochemical, and functional characterization of the VKRs of two invertebrate organisms causing serious public health concerns: the worm *S. mansoni* responsible for the second human parasitic disease, and the insect *Anopheles gambiae,* tle main malaria vector in Africa.

At first, we have shown the existence of SmVKR2, a second VKR in the worm. Its transcripts are expressed in all the parasitic stages and localized in the immature oocytes and the ootype of the female worm. Recombinant SmVKR1 and SmVKR2 proteins showed a tyrosine kinase activity *in vitro*. Their catalytic activity could be induced by small molecules such as L-arginine for SmVKR1 and calcium ions for SmVKR2. Preliminary experiments showed the presence of a potential natural ligand inside of the gynaecophoral duct of paired worms, able to activate SmVKR1 but not SmVKR2.
To identify cytoplasmic partners of SmVKR1 and SmVKR2, we used as baits intracellular domains (ICD) of each receptor to screen an adult worm cDNA yeast library. We could show that SmVKR1 and SmVKR2 ICDs interact with various proteins, including cytoskeleton components and proteins containing SH2 protein-protein interaction domains, known to participate in classical signalling pathways of RTKs.

We have also shown by RNAi that the diminution of smvkr1 and smvkr2 transcripts results in major changes in the morphology of genital organs of female worms. In the sporocyst larvae, RNAi of both SmVKR1 and SmVKR2 led to a significant decrease of the size of the parasites, as compared to the controls.

The second part of my thesis work concerned the study of AgVKR from *A. gambiae*. Using two different expression systems, we have established that AgVKR was also catalytically active and activable by L-Arg as was SmVKR1. Functional studies of AgVKR could be facilitated by the recent discovery that the hemocyte-like Sua5B cell line of *A. gambiae* are constitutively expressing AgVKR. RNAi procedures have been designed to analyse the impact of a diminution of agvkr transcripts on the physiology of Sua5B cells.

Taken together, these results already participate in a better knowledge of the mechanisms of VKR regulation and of their function, confirming their potential importance in growth and reproduction of invertebrate organisms.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Monique Capron pour m'avoir permis d'intégrer le laboratoire de l'Unité 547, et le Dr Camille Locht qui dirige le Centre d'Infection et d'Immunité de Lille.

Je remercie le Pr El moukthar Aliouat de me faire le plaisir de présider mon jury de thèse ainsi que les Drs Héctor Escrivà et Philippe Rondard pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie aussi le Dr Christian Mitri pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je remercie le Dr Raymond Pierce, pour son accueil, sa gentillesse et ses conseils tout au long de ces quatre années passées au laboratoire.

Des remerciements particuliers vont au Dr Colette Dissous, qui m'a accueillie au sein de son groupe lors de mon Master Recherche et qui m'a soutenue pendant ces quatre ans. Grâce à toi ces années ont été très enrichissantes et très instructives. J'ai eu le plaisir et l'honneur de participer à des congrès internationaux et de rencontrer des scientifiques de renom. Tu m'as appris la précision et le regard critique que tout scientifique doit posséder pour fournir un travail de qualité. Grâce à nos discussions animées et nos débats d'opinion, nous avons, je pense, fait des pas de géant sur le sujet VKR. Les prochaines années seront sans doute plus calmes sans mon caractère un peu emporté et je te remercie de ta patience. Pour ma part quitter ton groupe sera synonyme de tristesse, et je te souhaite une très bonne continuation.

Je remercie Jérôme, le « découvreur » des VKRs, qui continue à garder un œil sur les recherches du laboratoire, n'hésitant pas à prodiguer aide et conseils. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examinateur.

I also thank Professor Christoph Grevelding and his team for welcoming me in their laboratory during my stay in Giessen, where I learned a lot. Despite the -10 °C, I couldn't have expected a warmer welcome! I will always remember this visit and your kindness. Thank you to be present at my defence.

Ces travaux de thèse et ces quatre années passées au laboratoire n'auraient pas pu être ce qu'ils sont sans l'ensemble de mes collègues du Cibp. Personne ne pourrait souhaiter meilleur cadre de travail : bonne humeur, convivialité, entre-aide, conseils. Merci à tous ceux qui ont été là pour moi et qui ont depuis quitté le laboratoire (Arnaud, Thavy, Naji). Merci à ceux qui m'ont soutenue tout au long de ma thèse : Stéph pour ta patience, tous tes conseils et ton soutien presque maternel !, Flo pour ta bonne humeur, et Manu, que j'ai harcelé de questions. Merci à Julien, Audrey et Nico, j'aurais aimé passer plus de temps avec vous, ça passe trop vite!

Enfin, merci à Mathieu, que j'ai eu le plaisir d'encadrer durant son Master Recherche. Après quelques débuts difficiles, nous avons réussi à nous comprendre et à former un duo des plus efficaces ! Les VKRs nous tiennent à cœur à tous les deux, et sans ta participation, ton enthousiasme et ta « force tranquille », cette thèse n'en serait pas arrivée là. Le sujet s'est particulièrement développé durant ma dernière année, et je sais que je peux compter sur toi pour continuer sur cette lancée et montrer au monde qu'on a raison d'y croire. Travailler avec toi va me manquer, merci !

Je remercie également ma famille et mes amis qui, même de loin pour certains, m'ont soutenue durant ma thèse.

Nadège GOUIGNARD

31/01/1984 in Montreuil sous bois (93)
France

Biological Sciences Research Applicant
Centre of Infection and Immunity of Lille, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille 2, Pasteur Institute of Lille
1 rue du Pr. Calmette
59019 Lille Cedex
France

EDUCATION

2008-present : Doctorat PhD of Biology and Health Science, Université Droit et Santé de Lille, France. Research work at CIIL; Fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et Technologies
Thesis title: Molecular characterization of the Venus Kinase Receptors, Functional studies in the *Schistosoma mansoni* parasite.

Nov-Dec 2010 : Intership at the Institut für Parasitologie, Giessen University, Germany, supported by CDE Lille-Nord-Pas de Calais

2008-2010 : Teaching of microbiology practices at the Université Catholique de Lille

2007-2008 : Master Degree of Biology and Health Sciences, Université Droit et Santé de Lille
Research work at INSERM U547 « Schisosomiasis, Malaria and inflammation »

2006-2007 : Master (MSc) of Biology and Biotechnology, genetics and microbiology option, Université Lille 1.
Research work at UMR8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle

2005-2006 : Licence (BSc) of Cellular Biology, Microbiology option,
Research work at UPRES EA 3892, Laboratoire de pharmacie galénique, biopharmacie et pharmacie clinique

2003-2005 : DUT Génie Biologie, option Analyses Biologiques et Biochimiques, IUT La Rochelle (17), Rang 15/48
Research work at UP des Interactions Moléculaires Flavivirus-Hôtes, Institut Pasteur Paris

2002: Baccalauréat Sciences, biology option, Lycée René Josué Valin, La Rochelle France

TECHNICAL SKILLS

- Cloning strategies, plasmid DNA extraction, RNA extraction using several techniques (Caesium chloride, Trizol and kits), Real time RT-PCR, RACE PCR, site directed mutagenesis
- Recombinant protein expression in eukaryotic cells, several methods of protein extraction, immunoprecipitation, Western Blot, immunohistochemistry, fluorescence, confocal and light microscopy, Yeast two hybrid system, kinase assay
- Preparation of *S.mansoni* miracidia and cercariae, in vitro culture of schistosomula, sporocysts and adult worms
- Cell culture and transfection (HEK cells, insect S2 and Sua5B cells)
- Production of double stranded RNA, RNA interference, production of mRNA, *in situ* hybridization
- Bioinformatic softwares for nucleotide and protein sequence analyses and for phylogenetic studies: NCBI BLAST, Lasergene pack (EditSeq, MapDraw, MegAlign, Protean, Seqman), ABI sequence detection system, Prosite/Expasy, SMART, Primer express, Clustal W, Mega 3.1, BioEdit
- 3D modeling: Accelrys DS Visualizer, Pymol, RAMP server

PUBLICATIONS:

Gouignard N, Vanderstraete M, Cailliau K, Ahier A, Browaeys E, Dissous C. Characterization of the Venus Kinase Receptor of *Anopheles gambiae.* Insect Biochem Mol Biol, Submitted

Dissous C, Vanderstraete M, Beckmann S, **Gouignard** N, Leutner S and Grevelding CG. Tyrosine kinase signaling and drug targeting in schistosomes, in Protein phosphorylation in eukaryotic parasites: potential for chemotherapy. Editors: Doerig, C., Wiese, M. and Spaeth G, Wiley-Blackwell 2012

Beckmann S, Leutner S, **Gouignard** N, Dissous C, Grevelding CG. Protein Kinases as potential Targets for Novel Anti-Schistosomal Strategies. Special issue: Current strategies for drug development against major human parasites: malaria and schistosomiasis, **Curr Pharm Des**, 2012

Gouignard N, Vanderstraete M, Cailliau K, Lescuyer A, Browaeys E, Dissous C. Schistosoma mansoni: Structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors. Exp Parasitol. 2011 May 15.

Ahier, A., Rondard, P., **Gouignard**,N., Khayath, N., Huang, S. Trolet, J., Donoghue, D.J., Gauthier, M., Pin, J.P., Dissous, C. A New Family of Receptor Tyrosine Kinases with a Venus Flytrap Binding Domain in Insects and Other Invertebrates Activated by Aminoacids. PLoS One. 2009 May 21;4(5):e5651.

INTERNATIONAL COMMUNICATIONS:

Venus Kinase Receptors of *Schistosoma mansoni.* **Nadège Gouignard**, Arnaud Ahier, Mathieu Vanderstraete, Svenja Beckmann, Thavy Long, Christoph G. Grevelding, Colette Dissous. Schistosome Molecular Toolbox Workshop Sept 2009. San Francisco, USA, Poster.

Polo-like kinases and control of cell division in schistosomes. Colette Dissous, Thavy Long, **Nadège Gouignard**, Svenja Beckmann, Katia Cailliau, Edith Browaeys, Christoph G. Grevelding. Schistosome Molecular Toolbox Workshop Sept 2009. San Francisco, USA.

Two Venus Kinase Receptors in *Schistosoma mansoni.* **Nadège Gouignard**, Mathieu Vanderstraete, Edith Browaeys, Svenja Beckmann, Christoph G. Grevelding, Katia Cailliau and Colette Dissous. Hydra meeting, Sept 2010, Greece, Poster

Schistosoma mansoni: kinase signaling in mitosis and differentiation processes. Colette Dissous, Edith Browaeys, Katia cailliau, Svenja Beckmann, Christoph G. Grevelding, **Nadège Gouignard**, Thavy Long. Hydra meeting, Sept 2010, Greece.

The Venus Kinase Receptors of *Schistosoma mansoni*, **N. Gouignard**, M. Vanderstraete, E. Browaeys, S. Beckmann, C.G. Grevelding, K. Cailliau and C. Dissous. The British Society for Parasitology, Spring and Malaria Meeting, April 2011, Nottingham England, Oral communication.

LANGUAGES

French (Natural language), English

REFERENCES

Colette Dissous, PhD
Research Director, INSERM U1019/ UMR 8204
Institut Pasteur de Lille
59019 Lille cedex, France
+33 3 20 87 73 50
colette.dissous@pasteur-lille.fr

Christoph Grevelding, Pr
Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Parasitologie
35392 Giessen
+49 (0)641-99 38 466
Christoph.Grevelding@vetmed.uni-giessen.de

TABLES DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS 5

CADRE DU TRAVAIL 7

INTRODUCTION 9

I. Schistosome et schistosomiase 11

1. Taxonomie des schistosomes 12
2. Biologie et cycle de vie du parasite 14
   a) Les œufs 15
   b) Les miracidiums 17
   c) Les sporocystes 19
   d) Les cercaires 19
   e) Les schistosomules 21
   f) Les adultes 22
3. La schistosomiase humaine 26
   a) Pathologie 26
   b) Prévention et traitement : 27
      - Education 27
      - Contrôle vectoriel 28
      - Chimiothérapie 28
      - Vaccination 30

II. Les Protéine Kinases 31

1. Présentation : 31
2. Classification 31
3. Evolution des « eukaryotic PKs » 35
4. Les PTK 36
   a) Généralités 36
   b) Le domaine kinase 37
   c) Les CTK 41
      - Présentation 41
      - Structure 42
         - PH : 43
         - FERM : 43
         - Les domaines SH2 : 44
         - Les domaines SH3 : 45

• Activation 46
d) Les RTK.....47
• Présentation.....47
• Mécanisme d'activation.....48
- Fixation du ligand :.....49
- Phases d'activation du domaine catalytique :.....51
- Activation de la famille EGFR/ErbB :.....53
• Voies de signalisation associées aux RTKs 53
• Dégradation recyclage, déphosphorylation.....56
III. Protéine Kinases du schistosome – Importance dans le développement et la reproduction.....58
1. Exemples d'implication de protéine kinases dans les mécanismes de développement/reproduction des invertébrés 58
a) Prolifération des cellules germinales :.....58
b) Ovogénèse :.....59
c) Différenciation : exemple de l'abeille mellifère 61
2. Protéine kinases et développement/reproduction du schistosome.....62
a) Les sérine-thréonine kinases.....62
b) Les PTKs.....63
IV. Les VKRs (Venus Kinase Receptors).....72
1. SmVKR : découverte d'un récepteur atypique chez *S. mansoni* 72
2. Evolution des VKRs 74
3. Données acquises sur les VKRs.....76
RESULTATS 79
I. Caractérisation structurale et biochimique de deux Récepteurs Venus Kinases chez *Schistosoma mansoni*.....82
II. Caractérisation fonctionnelle des récepteurs SmVKR1 et SmVKR2.....85
1. Expression des VKRs chez *S. mansoni*.....86
a) Expression et localisation des transcrits des VKRs dans les organes reproducteurs des schistosomes.....86
b) L'expression des VKRs pourrait être associée à la maturation sexuelle.....87
c) Etude de l'expression des protéines SmVKR1 et SmVKR2 chez le parasite.....89
2. Recherche de ligands et mécanismes d'activation des récepteurs SmVKR.....90
a) Activation de SmVKR1 par des acides aminés 91
b) Activation de SmVKR2 par le calcium 93
c) Recherche du ligand naturel des VKRs.....95

3. Recherche de partenaires cytoplasmiques des VKRs 96
a) Stratégie de criblage 96
b) Identification préliminaire des protéines cibles 97
c) Caractérisation d'une nouvelle protéine à domaine SH2 (SmSH2) 100
4. Recherche de la fonction des VKRS 101
5. Sensibilité des VKRs aux inhibiteurs kinases 105
6. Discussion : 107
7. Matériel et méthodes : 117
a) Matériel biologique et culture de parasites 117
b) Mutagénèse dirigée 118
c) Hybridation *in situ* 118
d) Expression en ovocytes de xénope 119
e) Criblage d'une banque d'ADNc de schistosome adulte en levure par la technique de double hybride 119
f) Race PCR des construits sélectionnés 120
g) ARN interférence 120
h) RT-PCR en temps réel 121
i) Analyse en microscopie confocale laser 122
j) Composés chimiques utilisés 122
k) Analyses *in silico* : 122
III. Caractérisation structurale et fonctionnelle de AgVKR 124
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION 145
I. Place des VKRs dans l'évolution 147
II. Fonctions biologiques des VKRs 148
III. Les VKRs comme cibles thérapeutiques 151
ANNEXES 153
BIBLIOGRAPHIE 165

LISTE DES ABREVIATIONS

ANF: Atrial Natriuretic Factor
ARNm: Acide Ribonucleique Messager
ATP: Adenosine Tri-Phosphate
BMP: Bone Morphogenetic Protein
CaSR: Ca^{2+} Sensing Receptor
Cdk(s): Cyclin-dependent kinase(s)
Chk: Checkpoint Kinase
CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy
CTK(s): Cytosolic Tyrosine Kinase(s)
dk: dead kinase
dsRNA: double strand RNA
EGF: Epidermal Growth Factor
ePK: EuKaryotic Protein Kinase
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
EST: Expressed Sequence Tag
FGF: Fibroblast Growth Factor
FRET: Fluorescense Resonance Energy Transfer
GABA: Gamma Amino Butyric Acid
GPCR: G Protein Coupled Receptor
GTP: Guanosine Tri-Phosphate
GVBD: Germinal Vesicle BreakDown
HEK293: Human Embryonic Kidney 293
IGF: Insulin Growth Factor
IGF1-R: Insulin Growth Factor-1 Receptor
Ig-like: Immunoglobin-like
iGluR: Ionotropic Glutamate Receptor
IR: Insulin Receptor
LBD: Ligand Binding Domain
MAPK(s): Mitogen-Activated Protein Kinase(s)
mGluR: Metabotropic Glutamate Receptor
MPF: Maturation Promoting Factor
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
NMDA: N-Methyl-D-Aspartate
NRTK: Non Receptor Tyrosine Kinase
NTD: Neglected Tropical Disease
OMS: Organisation Mondiale de la Sante
PBP: Periplasmic Binding Protein
PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor
PG: Progesterone
PH: Pleckstrin Homology
PI3K: Phosphatidyl Inositol-3-phosphate Kinase
PKA: Proteine kinase A
Plk(s): Polo-like kinase(s)
Plkk(s): Polo-like kinase kinase(s)
PP: Proteine Phosphatase
PTK(s): Proteine(s) Tyrosine Kinase(s)
PZQ: praziquantel
R-Smad: Receptor-regulated Smad
RTK(s): Recepteur(s) Tyrosine Kinase(s)
RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
Sak: Snk/Plk-akin kinase
SDS-PAGE: Sodium Dodécyl Sulfate-PolyAcrylamide Electrophoresis
SER: *Schistosoma* EGF Receptor
SH2: Src Homology-2
SH3: Src Homology-3
SHB: Src Homology Containing adaptor B
SHC: Src Homology Collagen
SLK(s): Ste-20 like kinase(s)
Smad: Sma and mad related proteins
SmIR: S. mansoni Insulin Receptor
STK(s): Serine/Thréonine Kinase(s)
SOS: Son Of Sevenless
TGFβ: Transforming Growth Factor-beta
TK(s): Tyrosine Kinase(s)
TM: Trans Membrane
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VFTM: Venus FlyTrap Module
VKR: Venus Kinase Receptor

CADRE DU TRAVAIL

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, jusqu'en janvier 2010, puis au sein de l'unité INSERM 1019/ CNRS 8204 du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), dirigé par le Dr Camille Locht. Il a été effectué sous la direction du Dr. Colette Dissous dans l'équipe « Biologie Moléculaire du Développement et de la Reproduction du Schistosome » dirigée par le Dr Raymond Pierce.

Le CIIL, est une nouvelle structure centrée sur la compréhension des mécanismes liés aux infections microbiennes et parasitaires ainsi que sur les réponses immunes qui en découlent. Ce centre regroupe onze équipes de recherche et une plateforme technique de transcriptomique et de génomique. Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse aux mécanismes biologiques liés au développement et à la reproduction du schistosome, un parasite plathelminthe responsable de la schistosomiase. Notre groupe s'intéresse particulièrement aux Protéines Kinases du parasite et aux voies de signalisation initiées par les Récepteurs Tyrosine Kinase qui sont souvent liées au développement et à la reproduction des organismes.

Collaborations :

Dr Edith Browaeys-Poly et **Dr Katia Cailliau-Maggio**, Maîtres de conférences dans le groupe « Régulation des signaux de Division » à l'Université de Lille 1, EA 4479, IFR 147, Villeneuve d'Ascq, France.

Manipulations biologiques du modèle Ovocyte de Xenopus Laevis (Matériel biologique, injection, extraction protéique, Western Blot)

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

Manipulations biologiques du modèle Anopheles gambiae (Matériel biologique, ARN interférence)

Dr. Jean-Philippe Pin, DR1 CNRS et **Dr. Philippe Rondard**, CR1 CNRS, Institut de Génomique Fonctionnelle- Dépt. de Pharmacologie moléculaire CNRS UMR 5203 – INSERM U 661 – Universités de Montpellier I & II.
Analyses structurales du domaine Venus FlyTrap.

Pr C.G. Grevelding, Professeur à l'Université Justus-Liebig, Institut for Parasitology, Giessen, Allemagne.

Dr J. Vicogne, CR2 Equipe 1 CBC – COSMIC, UMR8161 – CNRS, Institut de Biologie de Lille,

Financement :

Ces trois années de thèse ont été financées par le Ministère de la Recherche et de la Technologie. Un stage de six semaines dans le groupe du Pr C. G. Grevelding a été financé par le Collège Doctoral Européen (CDR, Lille-Nord-Pas de Calais).

INTRODUCTION

I. Schistosome et schistosomiase

Avec 700 millions de personnes exposées à travers le monde dans 74 pays et 207 millions de personnes infectées, la schistosomiase ou bilharziose est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), comme la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme. Elle fait partie des 17 maladies tropicales négligées répertoriées par l'OMS qui font l'objet de campagnes d'action visant à promouvoir des stratégies de prévention chimio thérapeutiques et de contrôle de la transmission. L'OMS cherche à coordonner les actions des gouvernements, des institutions académiques et de recherche pour une meilleure efficacité d'action. La lutte contre la schistosomiase fait aussi partie des objectifs du millénaire pour le développement des Nations Unies (The eight Millennium Development Goals) qui visent à diminuer la pauvreté dans le monde d'ici 2015.

La zone de prévalence de la schistosomiase se situe dans les zones tropicales et subtropicales notamment dans les pays en voie de développement, aux systèmes sanitaires peu développés, qui regroupent les conditions idéales pour la transmission de la maladie. Si les continents Sud-américain et Asiatique sont touchés, 85 % de la population à risque se concentre sur le continent Africain et particulièrement dans la zone sub-saharienne touchant ainsi des populations extrêmement pauvres (Figure 1).

Connue depuis l'ancienne Egypte, Theodor Bilharz, parasitologue allemand, fut le premier à identifier dans la vallée du Nil en 1851, l'un des agents responsables de cette maladie, un parasite plathelminthe *Schistosoma haematobium*. Quelques années plus tard Sambon puis Fuji identifient d'autres espèces du même genre infectant l'Homme. Les parasites du genre *Schistosoma* sont particulièrement étudiés du fait de leur importance en termes de santé publique mais également dans les domaines vétérinaire et économique.

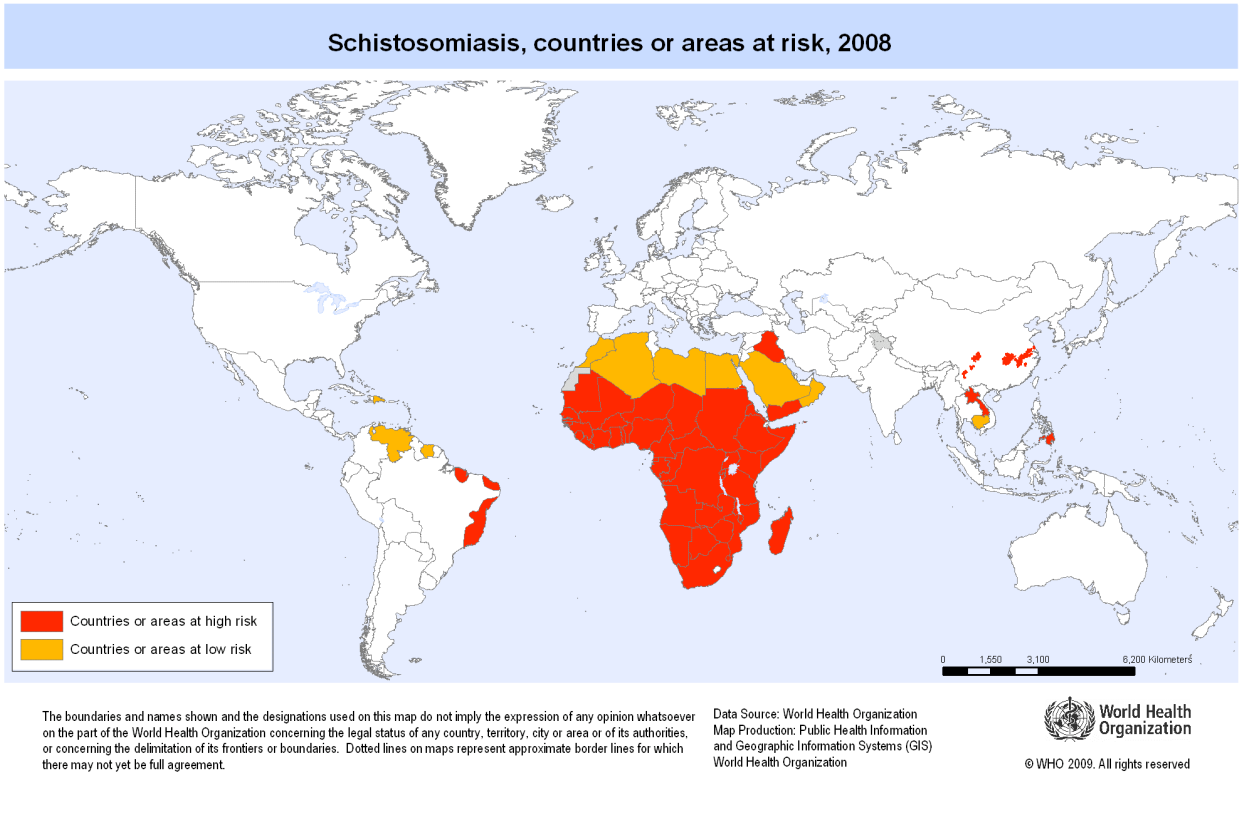


Figure 1 : Aires de distribution des schistosomiases humaines (OMS, 2009). Pays à haut risque infectieux (rouge), pays à faible risque infectieux (orange)

1. Taxonomie des schistosomes

Les schistosomes appartiennent à la classe des **trématodes**, ils possèdent un tégument syncitial, une ventouse orale et une ventrale. Ils entrent dans la sous-classe des **digènes**, c'est-à-dire qu'ils possèdent un cycle de vie complexe mettant en jeu deux hôtes, un hôte intermédiaire où se déroule une reproduction asexuée et un hôte définitif au sein duquel se déroule une reproduction sexuée. Les adultes mâles et femelles sont morphologiquement distincts, caractéristique du sous ordre des ***Schistosomoidea*,** contrairement aux autres membres de la classe des trématodes qui sont hermaphrodites. Le genre ***Schistosoma*** comprend à l'heure actuelle 21 espèces réparties en quatre groupes en fonction du genre de leur hôte intermédiaire, de leur localisation géographique ainsi que dans une moindre mesure de la morphologie des œufs. De nombreuses études phylogénétiques sont venues compléter et/ou corriger cette classification. (Figure 2, Webster *et al* 2006)

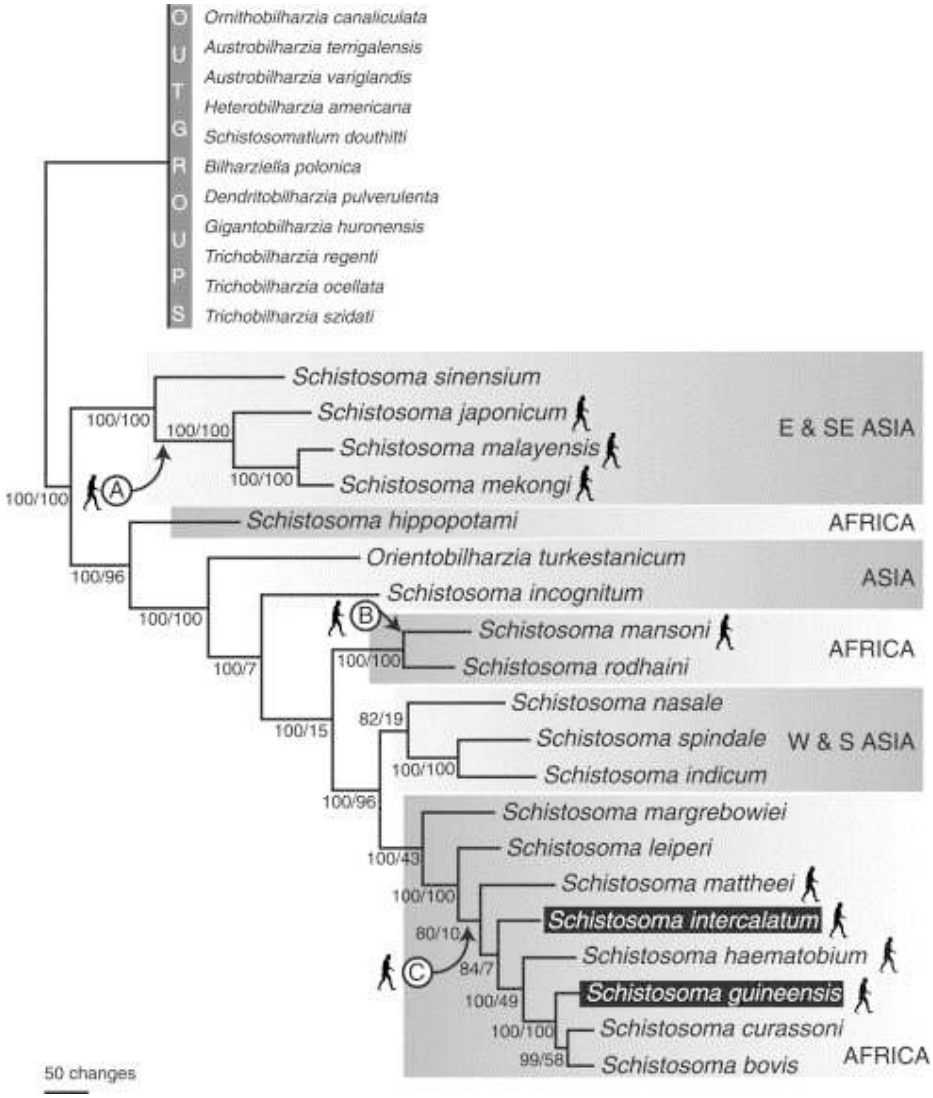


Figure 2: Arbre phylogénétique du genre *Schistosoma* basée sur une analyse bayésienne combinant les séquences de lsrDNA, ssrDNA et Cox1. Les continents concernés sont indiqués à droite. L'évolution vers une schistosomiase humaine est notée par les points A, B et C. (Webster *et al*, 2006)

Le groupe *S. japonicum* (découvert par Katsurada en 1904), regroupe les espèces *S. japonicum*, *S. mekongi, S. sinensium* et *S. malayensis* qui infectent des mollusques du genre *Oncomelania, Tricula* et *Robertsiella* respectivement. Ce groupe est capable d'infecter une grande diversité d'hôtes définitifs comme les primates, les carnivores, les rongeurs, et des herbivores à sabot (*Artiodactyla et Perissodactyla)*. Il est exclusivement rencontré en Asie et le stade œuf est caractérisé par un éperon terminal. Les études phylogénétiques réalisées ces dernières années placent ce groupe à la base du genre *Schistosoma*, suggérant une origine asiatique des schistosomes qui auraient migré par la suite en Afrique et en Amérique du Sud (Webster *et al,* 2006).

Le groupe *S. mansoni* (Sambon, 1907) comprend les espèces *S. mansoni* et *S. rodhaini*. Leur hôte intermédiaire est exclusivement du genre *Biomphalaria*, tandis que les hôtes définitifs sont de genres très variés (Primates*, Artiodactyla,* rongeurs et carnivores). *S.*

mansoni, contrairement à *S. rodhaini* n'est pas restreint au continent africain, il touche également l'Amérique du Sud et Madagascar. Les membres de ce groupe possèdent un éperon latéral au stade œuf.
Le groupe *S. indicum* (Montgomery, 1906) comprend les espèces *S. indicum*, *S. nasale*, *S. spindale* qui infectent des mollusques du genre *Indoplanorbis*. Ce groupe ne se rencontre qu'en Asie du Sud-est, Inde et Sri Lanka, où il touche les A*rtiodactyla*, les carnivores et les rongeurs.
Finalement, le dernier groupe et le plus récent d'un point de vue évolutif, *S. haematobium* (découvert par Bilharz) comprend les espèces *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. guineensis*, *S. mattheei*, *S. bovis*, *S. curassoni*, *S. margrebowiei* et *S. leiperi*. Ils infectent des mollusques d'eau douce du genre *Bulinus* comme hôtes intermédiaires et des mammifères (primates ou *Artiodactyla*) comme hôtes définitifs, exclusivement en Afrique. La majorité des œufs de ce groupe possède un éperon terminal.

A l'heure actuelle, des doutes persistent sur la place de quatre espèces, *S. incognitum*, *S. ovuncatum*, *S. hippopotami* et *S. edwardiense*.
S. hippopotami et de *S. edwardiense* sont retrouvés en Afrique où ils infectent de gros mammifères comme les hippopotames et les éléphants. Ils ont été longtemps inclus dans le groupe *S. mansoni* mais des études phylogénétiques récentes basées sur l'analyse des différents ARN ribosomiques contredisent ce rapprochement. Ces deux espèces semblent proches du groupe *S. japonicum,* précédant l'apparition de *S. incognitum* et *S. ovuncatum* ainsi que du « bloc » comprenant les groupes *S. indicum*, *S. mansoni* et *S. haematobium* (Morgan *et al,* 2003, Webster *et al,* 2006).

Parmi les espèces citées, seules six sont capables de parasiter l'homme : *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. mekongi*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. guineensis*. En 1915, Leiper et Aktinson ont décrit le cycle de vie complet du schistosome qui met en jeu six stades morphologiquement différents.

2. Biologie et cycle de vie du parasite

Comme nous l'avons vu, le cycle de vie du schistosome nécessite la présence de deux hôtes : un hôte invertébré dans lequel se déroule une reproduction asexuée et un hôte définitif vertébré dans lequel se déroule une reproduction sexuée (Figure 3). Chez l'homme, la pathologie résulte de cette reproduction plus que de la présence des vers eux-mêmes dans l'organisme. En effet, les œufs pondus par la femelle sont la source des symptômes graves de la maladie.

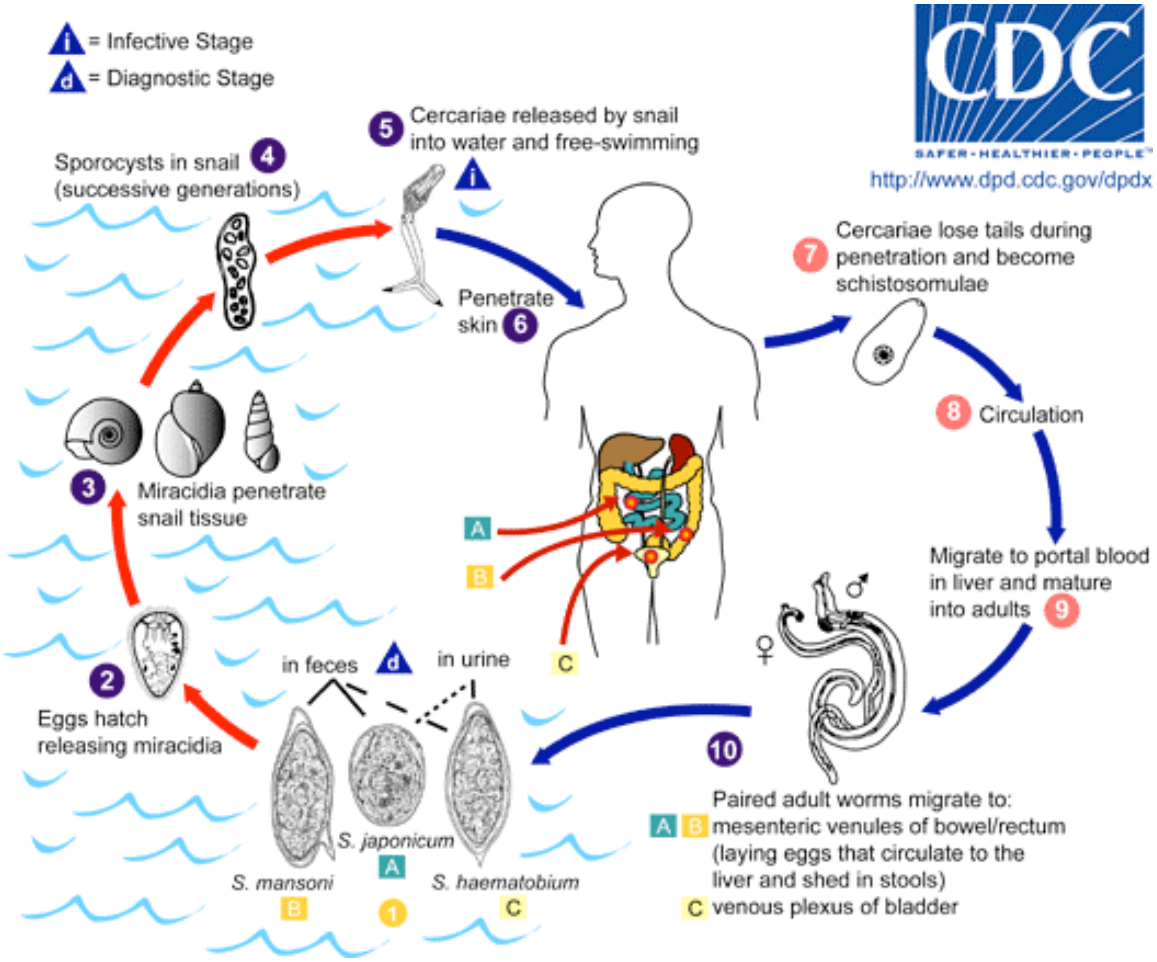


Figure 3 : Cycle de vie du schistosome (US centers for Disease Control and Prevention (CDC))

a) <u>Les œufs</u>

(Figure 3 : 1)

La forme des œufs est caractéristique de chaque espèce de schistosome. *S. mansoni* possède un éperon latéral (Figure 4 A), *S. intercalatum* et *S. guineensis* sont caractérisés par une forme allongée et la présence d'un éperon terminal (Figure 4 B). *S. haematobium* possède lui aussi un éperon terminal mais plus court (Figure 4 C), tandis que *S. japonicum* produit des œufs ronds sans éperon apparent (Figure 4 D).

Une étude par spectrométrie de masse (deWalick *et al*, 2011) montre que la coquille de l'œuf est composée à 70 % de la protéine p14 (protéine riche en glycine et tyrosine (Edersberger *et al*, 2005)) et à 30% de diverses protéines non structurales comme des protéines du métabolisme, de réponse au stress, des protéines membranaires etc. Cette composition inattendue est expliquée par les auteurs comme une résultante du processus de formation de la coquille. En effet des tyrosinases convertissent les résidus tyrosines des protéines en O-quinones qui réagissent et forment des liaisons covalentes avec les lysines et les histidines environnantes. Ainsi, toutes les protéines des cellules vitellines qui entourent

l'embryon lors de la formation de l'œuf, font partie intégrante de la coquille sans aucune implication de leur activité catalytique.

Jones *et al*, ont étudié la structure précise des œufs de *S. japonicum* préparés selon la méthode de congélation sous haute pression, ce qui permet de fixer les œufs sans dommage relatif à la congélation. Ils ont ainsi pu observer par microscopie la composition d'un œuf. La coquille est d'apparence uniforme, interrompue par ce qui ressemble à des pores et elle possède de nombreux spicules à sa surface qui pourrait servir à l'adhésion à l'endothélium vasculaire de l'hôte.

Sous la coquille se trouve l'enveloppe extra-embryonnaire divisée en enveloppe externe (matrice fibreuse) et enveloppe interne. L'enveloppe interne est une couche syncytiale dont le cytoplasme est riche en réticulum endoplasmique, en mitochondries et lysosomes, on y retrouve aussi des corps lipidiques et des corps de rosettes riches en sucres et autres carbo-hydrates. Des études ont suggéré le rôle de l'enveloppe interne comme source des antigènes secrétés par les œufs de *S. mansoni* (Ashton *et al,* 2001) qui entraînent les réactions inflammatoires chez l'hôte. Juste sous l'enveloppe interne se trouve la lacuna qui entoure l'embryon riche en corps lipidiques.

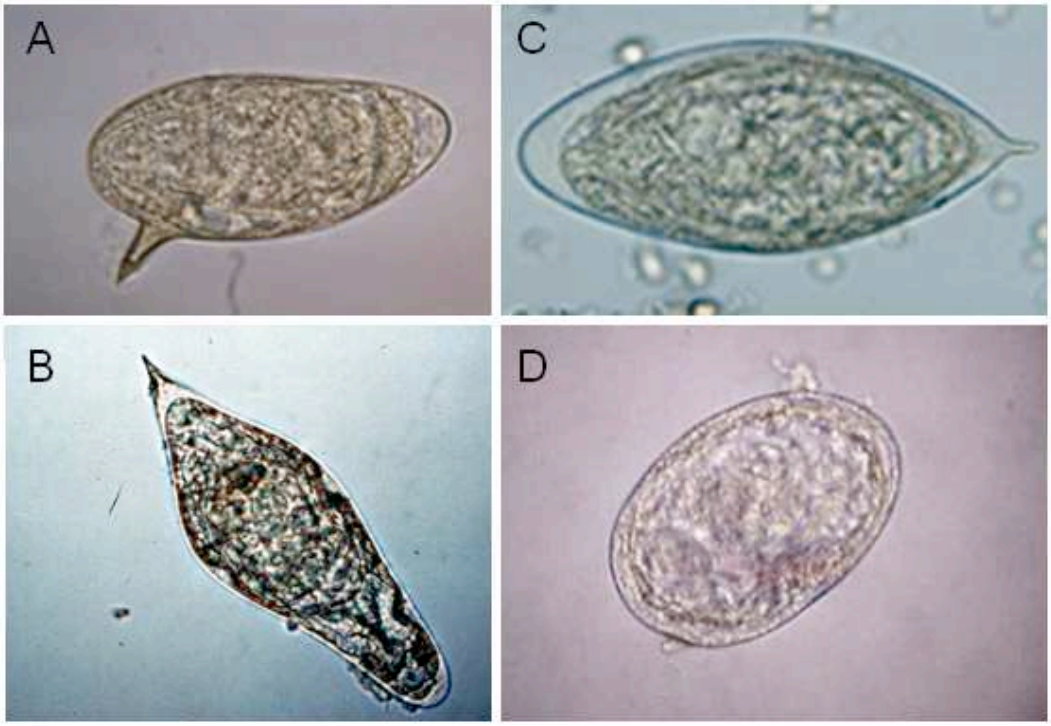


Figure 4 : Œufs de schistosome
A : *Schistosoma mansoni* ; B : *Schistosoma intercalatum* ; C : *Schistosoma haematobium* ; D : *Schistosoma japonicum*.

Les femelles schistosomes sont capables de produire un grand nombre d'œufs par jour, 300 pour *S. mansoni* et plus de 3000 pour *S. japonicum* soit un œuf toutes les cinq minutes et toutes les 30 secondes respectivement.
Les œufs une fois pondus à proximité de la lumière intestinale ou uro-génitale, vont pour une grande partie traverser la paroi et accéder au milieu extérieur. Ils seront viables une dizaine de jours, leur permettant d'atteindre un point d'eau douce pour l'éclosion. Six jours après la ponte, les œufs sont matures et contiennent une larve ciliée prête à éclore.
Les mécanismes qui régissent l'éclosion sont encore mal connus, cependant un modèle peut être proposé. Les œufs en contact avec l'eau douce vont subir un choc osmotique et une entrée massive d'eau par les pores (Kusel *et al*, 1970, Jones *et al*, 2008). La participation d'un flux de calcium dans l'œuf semble primordiale pour cette activation. Celui-ci entraîne la production de Leucine AminoPeptidase (LAP) qui servirait à une autolyse de l'enveloppe extra-embryonnaire. L'utilisation d'inhibiteurs de LAP ou l'utilisation de l'ARN interférence bloquent l'éclosion (Rinaldi *et al*, 2009). La rupture de la coquille serait ensuite provoquée par les mouvements de l'embryon lui-même, le miracidium.
Les œufs qui ne passent pas la barrière épithéliale restent piégés à l'intérieur de l'hôte. C'est leur présence dans l'organisme qui provoque la formation de granulomes bilharziens à l'origine de la pathologie comme nous le verrons ultérieurement.

b) Les miracidiums

(Figure 3 : 2)
Le miracidium est une larve nageuse en forme de poire de 150 à 180 µm de long et 70 à 80 µm de large (Figure 5A et B). Son corps est recouvert de plaques ciliées qui lui permettent de nager à 2 mm/s sur une distance maximale de 5 mètres afin d'atteindre son hôte intermédiaire, un mollusque d'eau douce. Le miracidium est composé d'une masse neurale entourée de ganglions périphériques, d'un sac digestif rudimentaire et d'un système d'excrétion utilisant des cellules flammes. Il possède un système de sécrétion composé de glandes situées dans sa tête, associées au terebratorium, outils indispensables à la pénétration de la larve dans le mollusque. Enfin, le miracidium possède une réserve d'une vingtaine de cellules germinales qui seront à l'origine de la lignée de sporocystes primaires lors de la division asexuée dans le mollusque (Collins III *et al*, 2011) (Figure 5C).

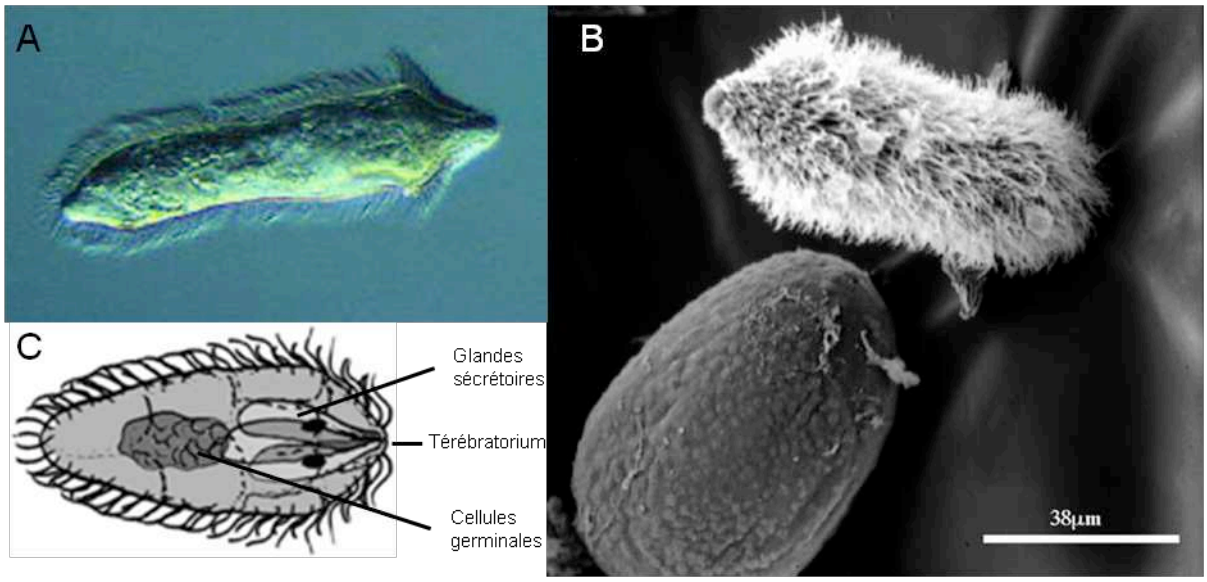


Figure 5 : Miracidium. A : Photographie d'un miracidium en train de nager, B : Observation au microscope Electronique à balayage, C : Représentation schématique d'un miracidium en coupe.

Le miracidium possède une espérance de vie courte comprise entre 8 et 12h. Il est donc vital pour la poursuite du cycle qu'il trouve son hôte le plus rapidement possible. Plusieurs études ont mis à jour une possible corrélation entre le comportement du miracidium et l'écologie de l'hôte invertébré. Chernin et Dunavan ont montré en 1962, que le miracidium de *S. mansoni* et de *S. japonicum* possède un phototactisme positif et un géotactisme négatif, en d'autres termes il est attiré par la lumière et la surface de l'eau. A l'inverse, les miracidiums de *S. haematobium* sont attirés par le fond de l'eau, loin de la lumière. Les mollusques *Biomphalaria* et *Oncomelania* (hôtes de *S. mansoni* et *S. japonicum* respectivement) restent près de la surface de l'eau, flottant sur des débris végétaux ou supports proches de l'air. Le mollusque *Bulinus*, hôte de *S. haematobium,* se retrouve lui dans les fonds vaseux des cours d'eau ou les rives ombragées. Ainsi, les miracidiums sont stimulés par des conditions environnementales correspondant au biotope de leur hôte.

Etant donné qu'un miracidium ne peut se transformer en sporocyste que dans son hôte spécifique, il semble important qu'il ait développé un système de reconnaissance de son mollusque cible. Ainsi, l'approche finale sur le mollusque est induite par un phénomène de chimiotactisme qui semble être hôte-spécifique. Dans le cas de *S. mansoni* cette spécificité serait due à une glycoprotéine de 80kDa sécrétée par *B. glabrata* capable de stimuler le métabolisme du miracidium (Dissous *et al*, 1986).

Une fois en contact avec le mollusque, le miracidium se fixe à son pied (site préférentiel de pénétration) par son térébratorium, et entame une pénétration active mécanique mais aussi enzymatique mettant en jeu ses glandes céphaliques. Contrairement à *S. japonicum* qui pénètre profondément dans le mollusque, la transformation de la larve de *S. mansoni* et *S. haematobium* se déroule près du point d'entrée.

c) Les sporocystes

(Figure 3 : 4)

Plusieurs études ont démontré que le nombre de miracidiums capables d'effectuer leur transformation en sporocystes était limité suivant l'espèce impliquée. Seuls 8 miracidiums de *S. mansoni* subissent une transformation complète chez *B. glabrata*, ce nombre s'élève à 32 pour *S. japonicum*. Les miracidiums supplémentaires sont encapsulés par le mollusque.

Une fois parvenus à destination, les miracidiums subissent une série de transformations morphologiques aboutissant à la production de sporocystes primaires et secondaires. Durant les 24 premières heures, les plaques ciliées, les muscles et les papilles sensorielles se détachent du futur sporocyste, et un nouveau tégument est produit à partir des cellules du sous-épithélium. Le sporocyste primaire va graduellement prendre la forme d'un long sac, étroitement lié au tissu du mollusque. Les cellules germinales qui composaient le miracidium vont grossir et se diviser de nombreuses fois, puis des clusters de cellules germinales et de cellules somatiques vont se créer. Ces clusters correspondent aux futurs sporocystes secondaires. Chaque cluster va être entouré d'un épithélium primitif généré par le tégument du sporocyste primaire avant d'être remplacé par un tégument définitif formé des cellules somatiques du nouveau sporocyste. Le nombre exact de sporocystes secondaires produits par sporocyste primaire est très difficile à évaluer, et les chiffres avancés vont de 34 à 625 suivant les études réalisées.

Les sporocystes secondaires de *S. mansoni* et *S. haematobium* sortent du sporocyste primaire en perforant sa barrière tégumentaire, tandis que *S. japonicum* semble utiliser ce qui ressemble à un pore de sortie. Ils entament alors leur migration vers les glandes digestives de l'hôte (hépatopancréas), où ils vont grossir et commencer à se différencier. Chaque sporocyste secondaire contient entre 50 et 100 cellules germinales destinées à la production du stade cercaire.

d) Les cercaires

(Figure 3 : 5)

Des divisions successives des cellules germinales du sporocyste secondaire aboutissent à la formation de morula (Cheng and Bier, 1972, Schutte, 1974). Ces morula forment un épithélium primitif à l'aide de cellules somatiques de l'embryon ou d'extensions des cellules tégumentaires du sporocyste secondaire. L'embryon va se scinder en deux parties inégales, la plus grosse va devenir le corps de la cercaire renfermant ses organes, et la plus petite partie deviendra la queue fourchue nécessaire à la nage (Figure 6A).

La cercaire est une larve nageuse dont la taille totale varie suivant l'espèce de schistosome. Pour *S. mansoni,* elle mesure environ 540 µm de long, 450 µm pour *S. haematobium*, 430 pour *S. bovis* et 300 pour *S. japonicum.*

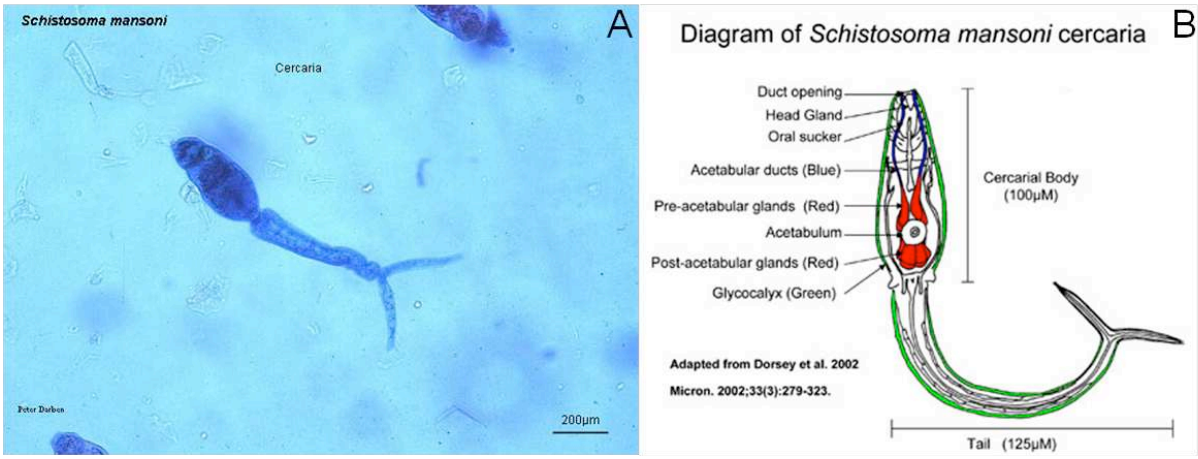


Figure 6 : Cercaire : A : Photographie d'une cercaire en train de nager, B : Schéma annoté d'une cercaire

Le corps de la cercaire est composé de 2 paires de glandes de pénétration pré-acétabulaires, de 3 glandes de pénétration post-acétabulaires et d'un système d'excrétion composé de cellules flammes dans le corps et la queue. La cercaire possède également un système de senseurs composé d'un bulbe nerveux, de papilles non ciliées et de « fosses multi-ciliées » (Collins III *et al*, 2011) (Figure 6B).

La productivité en cercaires dépend de nombreux paramètres, comme l'espèce concernée, la compatibilité hôte/parasite, les conditions physiologiques (eau, température, pH) et la période du jour. Ainsi pour un mollusque *B. glabrata* infecté par *S. mansoni*, 1500 cercaires environ seront produites par jour. Les cercaires quittent le mollusque selon un rythme journalier propre à chaque espèce correspondant au moment où la probabilité de rencontrer l'hôte définitif est la plus importante. Ainsi *S. rhodaini* qui infecte des rongeurs, émerge des mollusques la nuit tandis que *S. mansoni* émerge tôt le matin pour trouver son hôte définitif humain. Comme pour le miracidium, cette stratégie vise à augmenter les chances de la larve de rencontrer son hôte définitif, et ce le plus rapidement possible. La cercaire ne se nourrit pas, elle subsiste donc sur ses réserves énergétiques limitées, constituées principalement de glycogène dans son corps et sa queue. La nage de la larve semble stimulée par des facteurs chimiques produits par la peau de l'hôte, comme des acides gras dégradés par les bactéries présentes sur la peau (Haas et Schmidt, 1982) Une fois le contact établi, la pénétration de la cercaire se déroule en trois grandes étapes : l'attachement, l'exploration de la surface de la peau à la recherche d'un point d'entrée et enfin la pénétration dans

l'épiderme. Cette dernière étape résulte d'une action coordonnée des muscles et du système sécrétoire, c'est-à-dire les glandes acétabulaires qui déversent leur contenu (sérine protéases, chymotrypsines et mucines) lors de la pénétration. Celle-ci s'effectue en moins d'une heure *in vivo*. La traversée de la peau induit des changements morphologiques majeurs chez la cercaire, qui perd son glycocalyx pour simultanément produire un tégument multilaminé. La queue se détache du corps, et le tube digestif immature de la cercaire commence à se modifier pour prendre en charge les besoins nutritifs de la larve après épuisement des réserves en glycogène.

e) Les schistosomules

(Figure 3 : 7)

Le temps d'adaptation à l'entrée dans l'hôte définitif varie en fonction de l'espèce de schistosome concernée. *S. mansoni* et *S. haematobium* restent plus de 24h dans le derme de l'hôte tandis que *S. japonicum* commence sa migration plus tôt. Au bout de trois heures de transformation, la larve est devenue un schistosomule (Figure 7A) mais les principales différences morphologiques apparaissent après 48h (Figure 7B). Le déclenchement de la différenciation semble lié à une augmentation de la salinité ambiante passant de 18 milliosmoles (eau de ponte) à 300 mOsm, caractéristique du sang mammifère (Samuelson and Stein, 1989). Parmi les grands changements morphologiques, on retrouve une perte des glandes acétabulaires et un renouvellement complet de l'épiderme. La respiration aérobie passe en anaérobie et la larve acquiert des antigènes de l'hôte pour mettre en place ses mécanismes de défense contre le système immunitaire. Le schistosomule commence alors sa migration. Au bout de 10h, il repère les capillaires puis y pénètre en 8h en endommageant les parois. Une fois dans la lumière du vaisseau, la larve est rapidement emportée par le flux sanguin vers les poumons.

Durant la phase pulmonaire, la taille du schistosomule double mais son volume reste constant (Figure 7C à E). Il s'étire et adopte des mouvements rapides de contraction/extension nécessaires à son déplacement vers le système systémique. Là, les schistosomules sont répartis par la circulation sanguine dans l'ensemble de l'organisme. Les larves qui atteignent leur organe cible, le foie, y restent, les autres continuent leur migration, repassant par les poumons. Ainsi, il est possible qu'elles subissent plusieurs « tours » avant d'atteindre le foie. La phase hépatique est très importante pour la maturation de la larve et sa transformation en adulte (Figure 7F). Elle se déroule environ au 20éme jour post-infection et peut durer 8 à 10 jours.

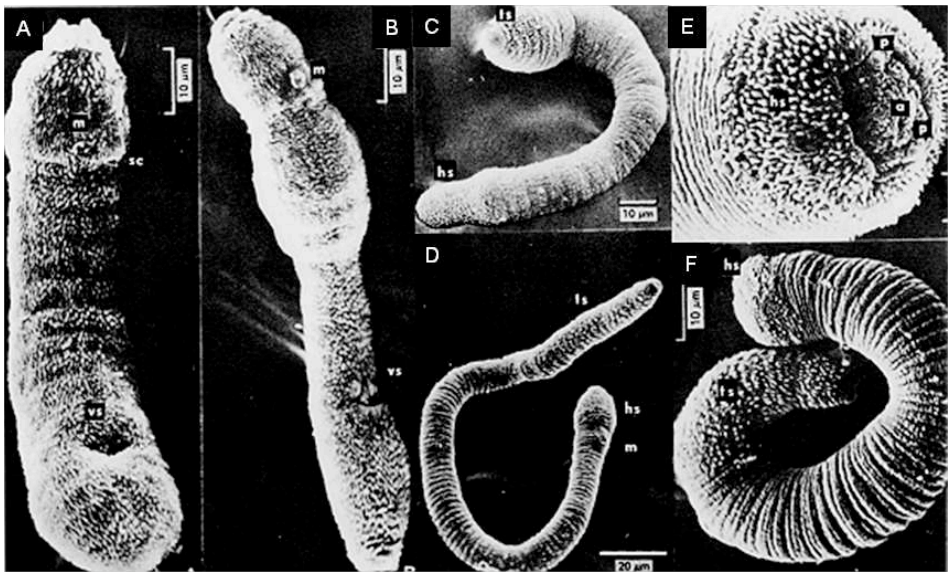


Figure 7 : Images de microscopie électronique de schistosomule (de la peau) à J-1 (A), à J-2 (B), de schistosomule pulmonaire à J-4 (C), et à J-7 (D, E) et de schistosomule hépatique à J-8 (F).

Dans le foie, le schistosomule grossit, produit un nouveau tégument plus rigide, met en place un système métabolique anaérobie et la ventouse orale se développe. Cette phase de croissance est plus ou moins longue suivant les espèces de schistosome, *S. haematobium* étant plus lent que *S. mansoni* à titre d'exemple. Entre 28 et 35 jours post-infection, les larves se différencient et s'accouplent dans le foie avant de migrer vers les veines mésentériques pour atteindre leur lieu de ponte. *S. mansoni* est connu pour se diriger préférentiellement dans les branches postérieures des veines mésentériques supérieures et inférieures, tandis que *S. japonicum* se retrouve dans les branches antérieures des veines mésentériques supérieures et *S. haematobium* dans le plexus vésical, indiquant que les schistosomes sont capables de s'orienter dans l'organisme hôte.

f) <u>Les adultes</u>

(Figure 3 : 10)

Comme nous l'avons vu plus tôt, les schistosomes sont des organismes gonochoriques. Ils possèdent huit paires de chromosomes dont une paire de chromosomes sexuels. La femelle est hétérozygote pour cette paire (Z/W) tandis que le mâle est homozygote (Z/Z). Si le caractère sexuel du schistosome est porté tout au long du cycle, seul le stade adulte présente des différences morphologiques en fonction du sexe.

Le gonochorisme et le dimorphisme sexuel sont des caractéristiques rarement retrouvées chez les parasites. De nombreuses études ont cherché à comprendre les raisons de l'évolution des schistosomes vers ce mode de reproduction. Il a notamment été avancé que l'apparition de deux sexes séparés résulterait de la nécessité de s'adapter aux organismes vertébrés à sang chaud. Ainsi, la variation phénotypique induite par l'accouplement sexué de

deux individus phylogénétiquement différents assurerait une meilleure adaptation et protection vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte (Loker et Brant, 2006, Beltran *et al*, 2008). Une autre hypothèse complémentaire suggère un besoin de spécialisation des individus. Par exemple, chez les organismes endothermes, comme l'homme, la pression sanguine à l'intérieur des veines hépatiques est importante. Les vers, qui se déplacent constamment dans l'ensemble du système veineux mésentérique (Bloch, 1980), doivent être suffisamment gros pour résister au flux sanguin et se déplacer à contre courant. D'un autre côté, le lieu de ponte des schistosomes doit se trouver le plus proche possible de la lumière intestinale ou urinaire pour assurer une dissémination optimale des œufs dans le milieu extérieur. Les capillaires sanguins étant de plus en plus fins, cela implique que les vers soient suffisamment fins et longilignes pour y pénétrer au plus loin. Ces deux critères semblent incompatibles à l'échelle d'un individu et expliquerait la nécessité de l'apparition de deux individus morphologiquement différents, aux capacités complémentaires.

Ainsi, le ver mâle est plat, trapu et large. Suivant les espèces, il mesure de 3 à 15 mm de long et environ 1mm de large. Il possède deux ventouses, une orale et une ventrale associées à un système musculaire puissant qui lui permettent de s'accrocher aux parois des vaisseaux de son hôte et de résister au flux sanguin pour maintenir sa position sur le lieu de ponte.

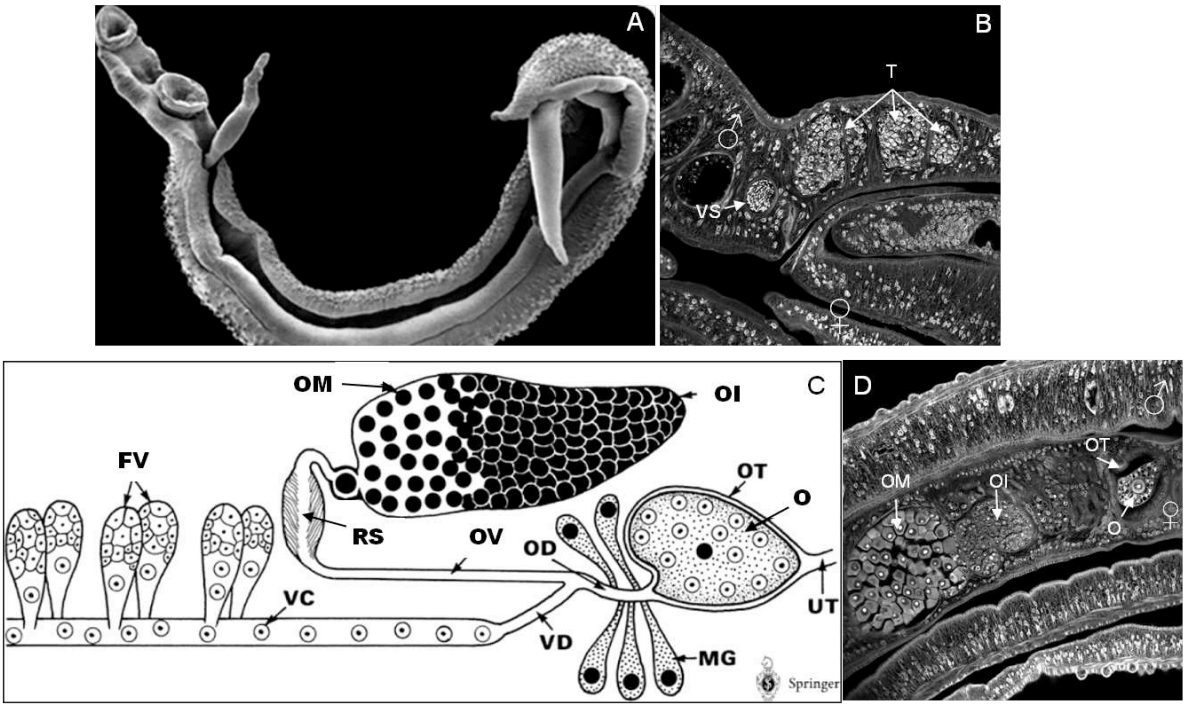


Figure 8 : Les vers adultes. A : Photo prise au microscope électronique à balayage, d'un couple de vers, la femelle se trouve dans le canal gynecophore du mâle**.** B : Photo prise au microscope confocal laser des testicules d'un ver mâle accouplé coloré au rouge carmin. VS : Vésicule Séminale remplie de spermatozoïdes ; T : lobes Testiculaires. C : Schéma du système reproducteur de la femelle (Encyclopedia of Parasitology Volume 2). D : Photo prise au microscope confocal laser des organes génitaux du ver femelle accouplée. FV : Follicules Vitellines ; VC : Cellules Vitellines ; OM : Ovocytes Matures ; OI : Ovocytes Immatures ; OV : Oviducte ; RS : Réceptacle Séminal ; OD : Vitello-oviducte ; MG : Glande de Mehlis ; OT : Ootype ; O : Œuf ; UT : Utérus.

La principale caractéristique du mâle est le canal gynécophore dans lequel se réfugie la femelle lors de l'accouplement (Figure 8A). Le canal est tapissé de spicules, servant probablement à maintenir la femelle, et de pores qui pourraient servir aux transferts de nutriments et d'hormones jusqu'à elle. Le ver femelle est plus long et plus fin que le mâle (< 0,2mm de diamètre). Il possède aussi des ventouses mais plus petites et moins musclées qui ne lui permettraient pas de migrer seul dans les veines mésentériques.
Le schistosome est un organisme monogame vivant en accouplement permanent au sein de l'hôte (Steinauer, 2009 ; Beltran et Boissier, 2009). Un contact étroit entre le mâle et la femelle est indispensable à la maturation des organes reproducteurs de cette dernière et à la production d'œufs. L'origine et la nature du/des signaux impliqués dans ce stimulus sont encore mal connus et sujets à spéculation. Des études ont montré que la maturation des organes de la femelle était directement liée aux zones de contact avec le mâle suggérant l'importance de signaux spécifiques dans le canal gynécophore (Popiel and Basch, 1984). Une femelle provenant d'une infection unisexe (« vierge ») est beaucoup plus petite qu'une femelle mature appariée et ses organes reproducteurs ne sont pas développés. Elle est incapable de produire des œufs. De même, une femelle mature appariée voit ses organes génitaux régresser en 3 à 5 jours après séparation du couple pour revenir à un état immature. Dès qu'elle retrouve un mâle, les organes génitaux de la femelle se redéveloppent et elle retrouve la capacité à produire des œufs.

Le système reproducteur mâle est composé de testicules, d'une vésicule séminale et d'un pseudo-pénis appelé cirrus. Les testicules du mâle sont composés de plusieurs lobes situés dans la partie dorsale supérieure du ver (Figure 8B), un peu en dessous de la ventouse ventrale. Leur nombre et leur forme varient suivant les espèces mais en moyenne on en compte 4 à 9 chez S*chistosoma*. Des genres voisins comme les *ornithobilharzia* en comptent une centaine. La maturation des spermatozoïdes se déroule dans chaque lobe, les cellules germinales se trouvant du coté dorsal et les cellules différenciées du coté ventral du lobe. Un petit *vas eferens* situé à chaque extrémité ventrale des lobes déverse les gamètes matures dans un *vas deferens* relié à la vésicule séminale du mâle (Figure 8B). Les spermatozoïdes passent ensuite par un canal nommé « canal éjaculateur » qui mène au cirrus. Le *vas deferens* et le canal éjaculateur sont entourés de glandes impliquées dans la production de sperme. La nature et la forme du cirrus restent encore mal connues et semblent varier suivant les espèces de schistosome.
Le système reproducteur de la femelle est plus complexe que celui du mâle et représente plus des 2/3 du volume de son corps. Contrairement à la plupart des animaux, la femelle schistosome possède deux organes séparés pour la production des réserves nutritives

destinées à l'embryon assurée par le vitellarium, et pour la production des gamètes assurée par l'ovaire (Figure 8C).

Le vitellarium ou glande vitelline est l'organe le plus volumineux de la femelle appariée. Il s'étend de la partie postérieure du ver jusqu'à l'ovaire situé dans le tiers antérieur du corps. Il est composé de nombreux follicules vitellins reliés au vitelloducte qui traverse longitudinalement le ver jusqu'à l'oviducte. Chaque lobe contient des cellules vitellines à différents stades de maturation. Les cellules de stade 1, de petite taille mais avec un noyau important, se trouvent du côté lobé des follicules. Les cellules de stade 2 développent leur cytoplasme et commencent une activité de synthèse protéique. Les cellules de stade 3, plus grosses, possèdent un important système de Golgi. Enfin, les cellules de stade 4 proches de la sortie du follicule, sont remplies de complexes ribosomaux et de Golgi, ainsi que de gouttelettes lipidiques et vitellines. Les cellules matures vont emprunter le vitelloducte pour rejoindre l'oviducte.

Contrairement aux autres trématodes, le schistosome ne possède qu'un seul ovaire (Figure 8C et D). C'est un organe long de taille variable selon les espèces, celui de *S. japonicum* fait 400µm de long pour 150µm de large, celui de *S. mansoni* est plus petit reflétant peut être la différence de production journalière en œufs. L'ovaire est rempli de cellules à différents stades de maturation. La partie antérieure de l'ovaire (du coté de la tête) regroupe des cellules de petite taille, les ovocytes immatures (Figure 8D), qui semblent se diviser de façon importante (Erasmus, 1973). La partie postérieure de l'ovaire renferme les ovocytes matures prêts à être fécondés. Les cellules contiennent un nucléus bien défini et une petite chromatine nucléaire (Figure 8D). Grâce à l'utilisation de thymidine tritiée, Nollen *et al*. (1983) ont pu déterminer une chronologie de maturation des ovocytes. Pour *S. japonicum,* 6 jours sont nécessaires au passage d'un ovocyte immature à un ovocyte mature, un jour supplémentaire est nécessaire pour *S. mansoni* et *S. haematobium.*

Lors de l'ovogénèse, l'ovocyte mature sort des ovaires du ver femelle, emprunte l'oviducte et traverse le réceptacle séminal rempli de spermatozoïdes. Après fécondation, l'œuf poursuit sa course à travers l'oviducte pour se diriger vers le vitello-oviducte où il va s'entourer d'environ 38 cellules vitellines qui assureront sa nutrition et celle du futur embryon. Elles participent avec les sécrétions des glandes de Mehlis et des cellules épithéliales de l'ootype à la formation de la coquille de l'œuf (Figure 8C et D) (Neves *et al*, 2005, Biolchini *et al*, 2006, Collins III *et al*, 2011).

Le déroulement exact de la ponte n'est pas encore très bien connu. Le couple de vers parcourt un important chemin dans les veines mésentériques afin de déposer ses œufs. Mais aucune observation n'a pu encore démontrer si le couple restait apparié continuellement ou si la femelle continuait seule dans les capillaires les plus fins où le mâle ne peut pas se rendre. Des études font part de la présence de nombreuses femelles seules

au plus près de la lumière intestinale, d'autres au contraire d'une nette prédominance de couples appariés. Une hypothèse intermédiaire pourrait être que la femelle, bien que toujours dans le canal gynécophore s'étire au plus loin à l'intérieur des capillaires pour pondre.

Si un grand nombre d'œufs parvient à traverser la paroi pour rejoindre le milieu extérieur, perpétuant le cycle, une partie emportée par le flux sanguin reste dans l'organisme et s'enkyste dans les tissus de l'hôte entraînant les symptômes de la pathologie.

3. La schistosomiase humaine

a) Pathologie

La schistosomiase, plus connue sous le nom de bilharziose, peut se présenter sous l'aspect d'une infection aiguë ou chronique.

L'infection aiguë est souvent rencontrée dans les zones à haut risque infectieux et touche principalement les migrants et les touristes. Elle se manifeste au moment de l'infestation par l'apparition de rash aux points d'entrée des cercaires dans la peau. Puis en réponse à la migration des schistosomules dans l'organisme, les patients déclarent la fièvre Katayama (Doherty *et al*, 1996) dont les symptômes sont fièvre, fatigue, malaises, myalgies, toux, hyper-éosinophilie et infiltrats dans les poumons. Contrairement aux infections par *S. japonicum,* les infections à *S. mansoni* ou *S. haematobium* aboutissent rarement à une phase aiguë chez la population des zones endémiques.

La phase la plus délétère pour l'organisme est la schistosomiase chronique. Cette phase n'est pas provoquée par la présence des vers eux-mêmes mais par les réactions inflammatoires induites par les œufs piégés dans l'organisme. Ils sécrètent des enzymes protéolytiques et des protéines pro-inflammatoires, qui provoquent l'arrivée massive de cellules immunitaires, comme des lymphocytes T qui recrutent des macrophages, des éosinophiles et des fibroblastes, ainsi que des lymphocytes B qui vont produire des anticorps « anti-bilharziens ». Ces cellules vont s'agglutiner autour des œufs conduisant à la formation des granulomes (Figure 9 à gauche)

Dans le cas d'infections à *S. haematobium*, les œufs touchent le système veineux urogénital, où ils provoquent la formation de granulomes bilharziens et d'ulcérations des parois vésiculaires et urétérales. Ces réactions provoquent entre autres symptômes une hématurie caractéristique de la schistosomiase urinaire. Les granulomes endommagent les organes en bouchant les veinules et les capillaires.

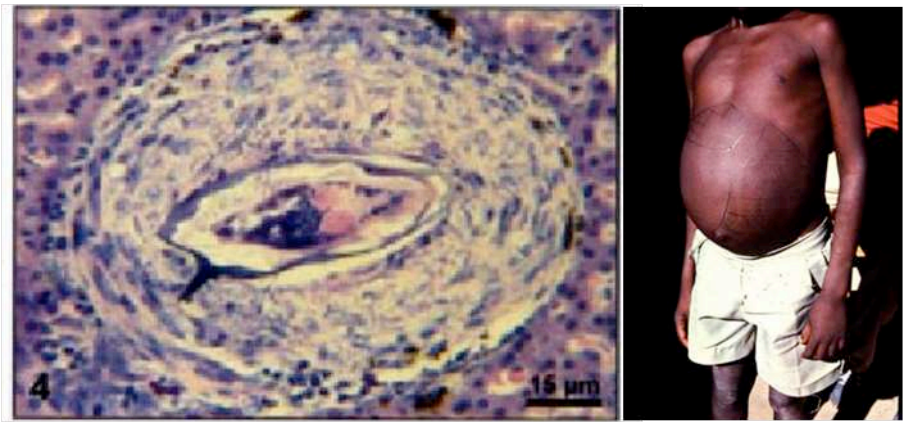


Figure 9 : Impact de la présence des œufs : à gauche : granulome bilharzien avec un œuf au centre entouré de cellules immunitaires. A droite : photo d'un patient souffrant d'hépato-splénomégalie.

La schistosomiase intestinale ou hépato-intestinale est provoquée par les 5 autres espèces de schistosome infectant l'homme. Les organes les plus proches et donc les plus touchés sont le foie et l'intestin. Les œufs qui passent la barrière intestinale induisent des lésions et des réactions inflammatoires provoquant douleurs abdominales et diarrhées. Ceux qui sont emportés par le flux sanguin sont piégés dans les veines du foie et entraînent la formation de granulomes qui bloquent les vaisseaux et entraînent des fibroses cicatricielles diminuant le diamètre des vaisseaux. Cela entraîne une hypertension portale, et au cours du temps, la formation de varices, de splénomégalie et d'hypersplénisme (Figure 9 à droite).
Le diagnostic de la schistosomiase est posé par la détection des œufs dans les selles ou les urines. Dans le cas de la schistosomiase urinaire, une technique de filtration est utilisée pour récolter les œufs. Pour la schistosomiase intestinale, la technique d'enrichissement de Kato est utilisée pour concentrer les œufs. Des tests ELISA recherchant les anticorps anti-schistosome sont aussi pratiqués avec une fiabilité de 95% (Gryseels *et al*, 2006 ; Ross *et al*, 2002).

b) Prévention et traitement :

Plusieurs stratégies de lutte sont utilisées pour tenter de réduire la morbidité de cette maladie (Fenwick et Webster, 2006).

- ***Education***

Comme nous l'avons vu, la transmission de la maladie passe par une contamination des eaux douces par les matières fécales infestées d'œufs. Dans les zones défavorisées comme la région subsaharienne, les points d'eau douce sont le centre de la vie des populations locales, qui y puisent l'eau destinée à la consommation, lavent leur linge et leur vaisselle, se baignent, pêchent, abreuvent leur bétail. Les contacts avec l'eau souillée sont donc très fréquents, spécialement pour les enfants et les femmes. La mise en place de programmes

éducatifs sur le mode de transmission de la schistosomiase aux populations locales et la mise en place de systèmes sanitaires seraient un moyen de lutte efficace à long terme. Cependant, de telles campagnes sont difficiles à mettre en place à grande échelle du fait du manque de moyens financiers, techniques et humains pour assurer un approvisionnement matériel aux zones concernées et assurer un suivi sur place. Seuls les pays les plus aisés ont réussi à mettre en place cette stratégie et à obtenir des résultats satisfaisants, comme par exemple l'Arabie Saoudite et Porto Rico.

- ***Contrôle vectoriel***

Une autre stratégie consiste à contrôler la population de l'hôte intermédiaire dans les régions endémiques du fait de son rôle majeur dans le cycle du parasite. Des campagnes d'éradication des mollusques d'eau douce ont été lancées au moyen de mollusquicides, d'implantations de prédateurs ou d'élimination de la nourriture des mollusques. Cependant, le coût financier de ces opérations à grande échelle, a vite été mis en cause face aux résultats mitigés obtenus sur les populations de gastéropodes. De plus, l'impact écologique majeur d'une telle stratégie a été pointé du doigt. Non seulement la disparition d'une ou plusieurs espèces de mollusque aurait un impact encore mal évalué sur l'écologie locale, mais la toxicité des produits employés sur le reste de la faune et de la flore (poissons, amphibiens etc.) rend ces stratégies délicates à long terme.

- ***Chimiothérapie***

La chimiothérapie reste à l'heure actuelle la principale arme utilisée contre la schistosomiase. L'arsenal thérapeutique est cependant très limité et se centralise autour du Praziquantel (Bayer) (Figure 10).

Ce dérivé de pyrazinoisoquinoline était à l'origine utilisé comme anxiolytique avant de montrer une très grande efficacité contre les helminthes comme les cestodes, les douves du foie et bien sûr les schistosomes, qu'ils infectent l'homme ou les animaux. Utilisé en dose unique dans la plupart des cas de contamination de touristes, le Praziquantel présente peu d'effets secondaires délétères et un coût de production faible.

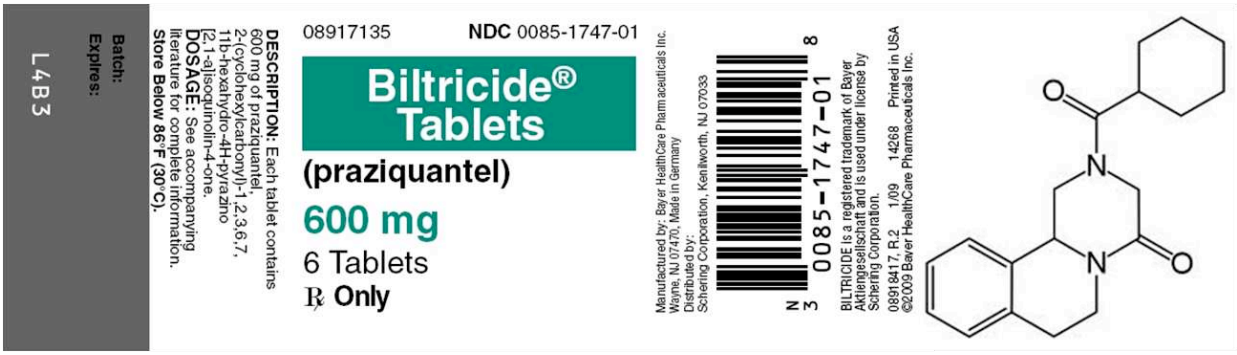


Figure 10 : Le Praziquantel. A gauche : Praziquantel commercialisé sous le nom du Biltricide ; A droite : formule chimique du Praziquantel

Son mode d'action est encore mal connu. Il semblerait qu'il induise une tétanie des muscles du ver adulte ainsi qu'une dégradation de son tégument, entrainant un détachement du ver et sa mort. Cependant, ce médicament a peu voire pas d'effet sur les stades œufs et larvaires. En zone d'endémie, les personnes infectées hébergent plusieurs stades d'évolution du parasite suite à des infestations successives. Plusieurs doses de Praziquantel sont donc nécessaires pour une guérison totale. De plus, ce composé ne procure aucune protection contre la ré-infestation.

Selon le rapport 2011 de l'OMS, sur les 21 pays participant à la récolte des données sur l'utilisation du Praziquantel, près de 20 millions de personnes ont été traitées, dont 55% d'enfants pour l'année 2009. Ceci correspond à une augmentation depuis 2006 de 58% du nombre de personnes prises en charge. De même, le nombre de pays communiquant leurs données sur ces traitements est passé de 17 en 2008 à 21 en 2009. En effet, plusieurs pays ont entamé des campagnes de traitement suite à la mise en place de programmes tel que CONTRAST, une alliance multidisciplinaire pour la surveillance et la lutte contre la schistosomiase en Afrique sub-saharienne (http://www.eu-contrast.eu/index.php). Certains pays n'ont toujours pas accès à suffisamment de Praziquantel pour mettre en place ce genre de campagne.

Si de réels progrès ont été signalés pour le contrôle de la morbidité par ces programmes à grande échelle en monothérapie, une inquiétude subsiste quant à leurs conséquences. Certaines souches de schistosomes tolérantes au Praziquantel ont été identifiées en Egypte (Alonso *et al*, 2006). De plus, il est possible d'obtenir des souches résistantes en laboratoire *(*Xua *et al,* 2005*)*.

L'ensemble de ces données démontre les limites du Praziquantel et encourage les autorités sanitaires et les chercheurs à continuer leurs efforts sur la compréhension de la biologie des schistosomes dans le but d'identifier de nouveaux médicaments à utiliser en parallèle ou à la place du Praziquantel.

- ***Vaccination***

Une alternative intéressante à l'utilisation de la chimiothérapie est la production d'un vaccin qui serait efficace sur les différents stades infestant l'homme et qui surtout préviendrait de toute ré-infestation.

Depuis plusieurs dizaines d'années, de nombreuses équipes se penchent sur ce problème pour tenter d'une part de mieux définir la nature des réponses immunitaires impliquées lors d'une infestation par le schistosome et d'autre part pour caractériser des antigènes capables de déclencher ces réponses chez l'homme.

De nombreux programmes en association avec l'OMS ont permis de tester des vaccins candidats utilisant divers antigènes comme la paramyosine, la triose phosphate isomerase, la Sm23, IrV-5, la Sm14 et la glutathione S-transferase (p28/GST) (Pearce, 2003, McManus et Loukas, 2008). Certains de ces composés ont entrainé une diminution importante de la quantité de vers présents dans des animaux vaccinés et sont entrés en phases I ou II d'études cliniques.

A l'heure actuelle, le candidat vaccin le plus développé et le plus caractérisé est le Bilhvax développé à l'Institut Pasteur de Lille. Ce vaccin utilise la protéine Sm28GST comme antigène. Le Bilhvax a passé avec succès les deux premières phases d'essais cliniques, démontrant le déclenchement de réponses immunitaires proches de celles induites en cas d'infestation (majoritairement Th2) avec production d'anticorps neutralisants (Capron *et al*, 2002). Ceci est d'autant plus important que la 28GST semble jouer un double rôle chez le parasite servant à l'élimination des produits toxiques du métabolisme et jouant un rôle dans la fécondité de la femelle. De plus, la GST jouerait également un rôle dans la production de prostaglandine E2 qui inhibe la réponse inflammatoire de l'hôte (Capron *et al*, 2005).

Le Bilhvax est actuellement en phase III d'essais cliniques. Depuis 2009, plusieurs groupes d'enfants au Sénégal ont été traités sous la surveillance de l'OMS. Les premiers résultats sont attendus dès 2012.

Le Bilhvax est une solution prometteuse pour l'avenir si les résultats sont concluants, mais il est primordial de continuer nos efforts sur la compréhension de la biologie du schistosome et sur la recherche de nouveaux traitements performants et facilement exploitables pour les populations vivant en zones endémiques. Différentes pistes sont explorées par les chercheurs mais il est évident que les moyens financiers mis en œuvre pour les maladies tropicales négligées sont limités dans le domaine de la recherche médicale. Ceci pousse les chercheurs à envisager des stratégies alternatives plus économiques et applicables aux maladies négligées. Une stratégie peu onéreuse consiste à appliquer des molécules préexistantes déjà utilisées pour le traitement d'autres pathologies

au traitement des parasitoses par exemple (Dissous *et al*, 2007, Dissous et Grevelding, 2011, Nzila *et al,* 2010). De nombreuses données ont confirmé la conservation chez l'ensemble des eucaryotes d'acteurs cellulaires clés comme les Protéines Kinases (PKs). D'importances capitales en cancérologie, de nombreux composés sont développés pour inhiber leur fonctionnement anarchique dans les cellules cancéreuses. Plusieurs études (dont certaines effectuées dans notre laboratoire) ont déjà démontré que certaines drogues anti-kinase étaient capables d'induire une diminution de la fécondité du schistosome et d'induire la mort de vers en culture (Beckmann *et al*, 2010a, Beckmann et Grevelding 2010, Long *et al*, 2010, Brehm, 2010).

Le nombre de protéines kinases caractérisées chez le schistosome restant encore limité, notre équipe s'est spécialisée dans la caractérisation des protéines kinases du schistosome et particulièrement celles qui sont impliquées dans les mécanismes de reproduction et de développement du parasite.

II. Les Protéine Kinases

1. Présentation :

Au milieu du 20ème siècle, plusieurs équipes ont isolé et caractérisé différentes enzymes ayant la capacité de phosphoryler de façon réversible des protéines (Phosphorylase kinase : Krebs, 1998 ; PKA : Walsh, 1968 ; Src : Hunter and Sefton, 1980). Nommées Protéines Kinases (PKs), ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement phosphate provenant d'un ATP sur l'hydroxyle des chaînes latérales des acides aminés possédant une fonction alcool : sérine, thréonine, tyrosine et histidine.

Les PKs sont représentées dans l'ensemble du vivant depuis les procaryotes jusqu'aux eucaryotes évolués comme l'homme (Leonard *et al*, 1998). Cette conservation dénote l'importance de la phosphorylation comme modification post-traductionnelle au sein des organismes.

2. Classification

Au fil des années, la découverte de centaines de PKs a mis en évidence la nécessité de la mise en place d'un système de classification de ces protéines.

Les PKs ont été principalement divisées en deux super familles les « eukaryotic Protein kinase » (ePKs) et les « Eukaryotic-like Protein Kinase » (ELKs). (Manning *et al*, 2002a ; Manning *et al*, 2002b ; Manning *et al*, 2005 ; Kannan *et al*, 2007).

Ces deux superfamilles possèdent une structure tridimensionnelle de base identique, comprenant un lobe N et un lobe C qui emprisonnent l'ATP et catalysent le transfert du phosphate. Cependant les ePKs possèdent différents domaines supplémentaires impliqués

dans une régulation très fine des évènements de phosphorylation, souvent sous la dépendance de signaux extracellulaires (Taylor et Kornev, 2011).

On a longtemps cru que les procaryotes ne possédaient que des Histidine kinases et des Asparagine kinases qui forment des complexes protéiques appelés systèmes à deux composants, indispensables à la survie de ces organismes. Cependant le séquençage du génome d'un grand nombre de procaryotes a remis en question ces certitudes. Il a été montré que non seulement les ELKs jouent un rôle prépondérant dans leurs fonctions cellulaires mais qu'elles seraient plus nombreuses que les systèmes à deux composants (Kannan *et al*, 2007).

Les ePKs sont retrouvées chez les organismes eucaryotes où elles jouent un rôle majeur pour la cellule. Elles représentent une part importante du génome, près de 2 %, et influencent environ 30% du protéome (Manning *et al*, 2005). Elles sont impliquées dans la transduction du signal, le métabolisme, la transcription, la progression du cycle cellulaire, les réarrangements du cytosquelette, les mouvements cellulaires, l'apoptose ou encore la différenciation. Chez les métazoaires, les ePKs sont indispensables à la communication intercellulaire, l'immunité, le fonctionnement du système nerveux, le développement, les réponses physiologiques et l'homéostasie.

La super famille des ePKs a été subdivisée en familles puis en groupes sur la base des identités de séquence et de structure des différentes protéines. La classification actuelle se base sur les travaux de Manning (2002 et 2005) et de l'équipe de G. Barton (Miranda-saavedra et Barton, 2007, Martin *et al*, 2009). Ils classent les PKs eucaryotes en ePKs « conventionnelles » (qui gardent l'abréviation ePKs) et en « atypical Protein Kinases » (aPKs).

Les aPKs forment un petit groupe de protéines qui ne partagent pas la même similarité de séquence et de structure que les ePKs mais qui présentent tout de même une activité catalytique. Il existe 4 groupes d'aPKs : les alpha-kinase (myosine heavy chain kinase), les PIKK (phosphatidyl inositol 3' kinase-related kinase), les RIO et les PDHK (pyruvate dehydrogenase kinase) (Martin *et al*, 2009).

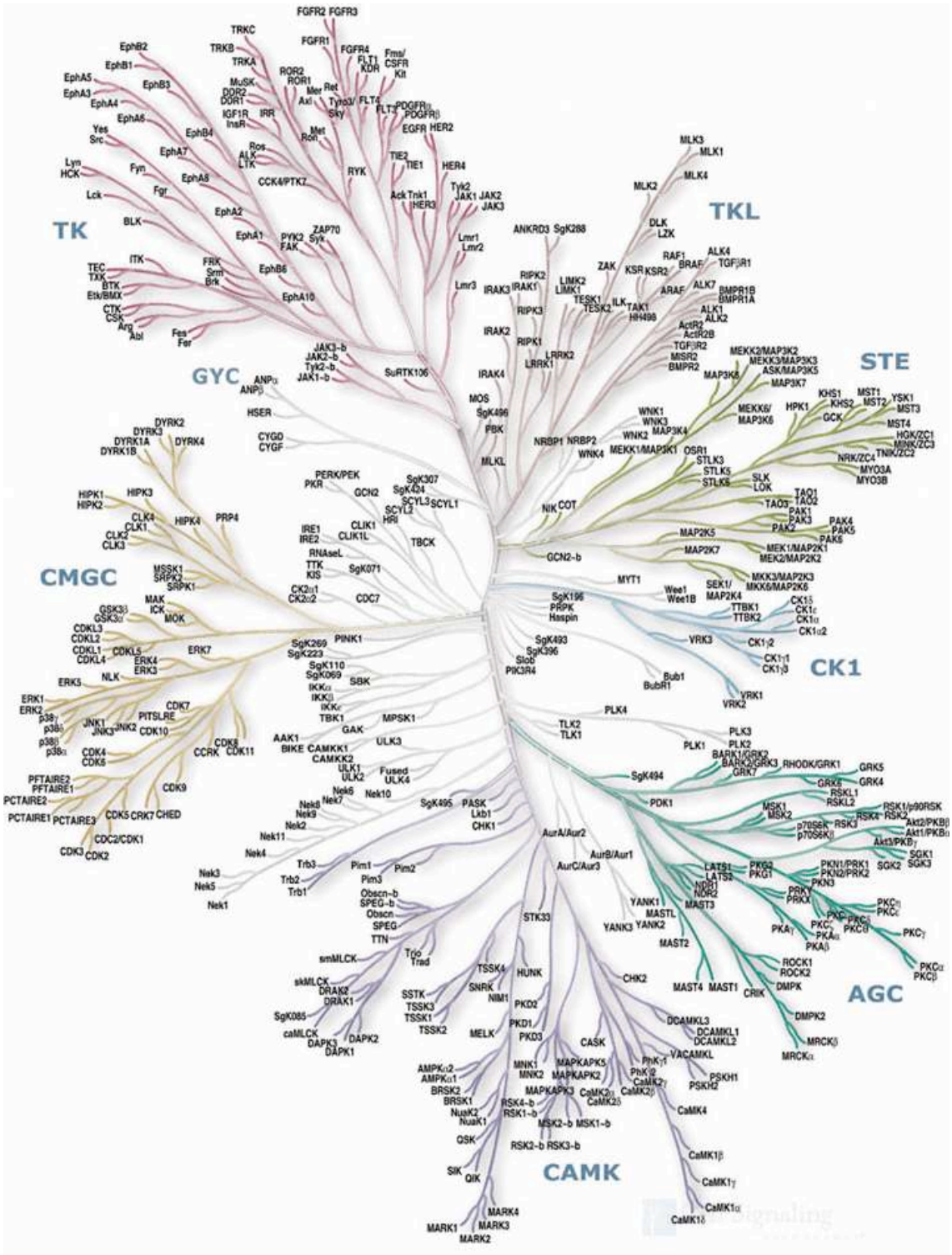


Figure 11 : Dendrogramme des familles de kinases humaines. Abréviations : AGC: groupe contenant PKA/PKG/PKC ; CaMK : Ca2+/calmodulin-dependent kinase ; CK1 : Casein Kinase 1 ; CMGC : CDK/MAPK/GSK/CDK ; STE : homologs of yeast sterile; TKL : Tyrosine Kinase Like; TK : Tyrosine Kinase ; GYC : Guanylate Cyclase.

Les ePKs sont plus nombreuses et plus diversifiées. Chez l'homme, elles sont divisées en 8 groupes représentés Figure 11:

- AGC : Ce groupe contient une soixantaine de membres chez l'homme comme la cAMP-dependent protein kinase A (PKA), la cGMP-dependent protein kinase (PKG), la protéine kinase C (PKC), AKT (ou PKB), p70 ribosomal S6 kinase, PDK1 etc… (review : Pearce *et al*, 2010). Ce groupe est impliqué dans un grand nombre de processus cellulaires, notamment la réponse aux hormones, ou facteurs de croissance, induisant transcription, traduction, divisions cellulaires…

- CaMK : pour Ca2+/calmodulin-dependent kinase, qui sont impliquées dans le système nerveux et plus précisément dans la mémoire (Yamauchi, 2005). Ce groupe comprend aussi les PKD impliquées dans les voies des Récepteurs couplés aux protéines G et des Récepteurs Tyrosine Kinase (LaValle *et al*, 2010). On retrouve également des MAPK-activated protein kinases (MAPKAPK).

- CK1 : pour Casein Kinase 1, est un petit groupe comprenant 6 gènes isoformes ainsi que des produits de splicing alternatif. Ces kinases sont impliquées dans divers processus cellulaires comme le contrôle du rythme circadien, la signalisation Wnt, le trafic membranaire, la maintenance du cytosquelette, la réplication et la réponse aux dommages de l'ADN et le métabolisme de l'ARN (review : Cheong et Virshup, 2011).

- CMGC : ce groupe important de kinases comprend les CDK (Cycline Dependent Kinase), les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), les GSK (Glycogen Synthase Kinase) et les kinases apparentées aux CDK. Ces kinases majeures sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, la division, la différenciation etc

- STE: pour homologs of yeast sterile 7, sterile 11, sterile 20 kinases. Ce groupe contient les protéines kinases activatrices des MAPKs.

- TKL: pour Tyrosine Kinase Like. Ce groupe est en fait composé de sérine/thréonine kinases dont la séquence est proche des TKs. On y retrouve le récepteur au Transforming Growth Factor-beta.

- TK: pour Tyrosine Kinase est le seul groupe composé de protéines tyrosine kinases. Ce groupe joue un rôle majeur dans la transduction du signal, la division, la différenciation et la communication intercellulaire.

- RGC (noté GYC sur la figure): Les Récepteurs Guanylate Cyclase comme le récepteur à « l'atrial natriuretic factor », possèdent un domaine catalytique inactif. Ils sont impliqués dans la régulation des effets endocrine, l'homéostasie et la pression artérielle, le transport d'eau et la croissance cellulaire (Kuhn, 2009).

3. Evolution des « eukaryotic PKs »

Avec les progrès réalisés dans le séquençage du génome des espèces, une meilleure compréhension des mécanismes évolutifs des ePKs se met en place. Ainsi, il apparait que sur les 12 groupes présentés, les membres de 7 d'entre eux (AGC, CAMK, CK1, CMGC, STE, PIKK et RIO) sont retrouvés chez l'ensemble des eucaryotes, des organismes les plus simples (champignons, protistes, amibes) aux plus évolués (diatomées et animaux). Ces données suggèrent que ces protéines kinases sont indispensables au fonctionnement de base d'une cellule eucaryote (Martin *et al*, 2009). Les autres groupes apparaissent au fil de l'évolution, répondant aux besoins des différents organismes.

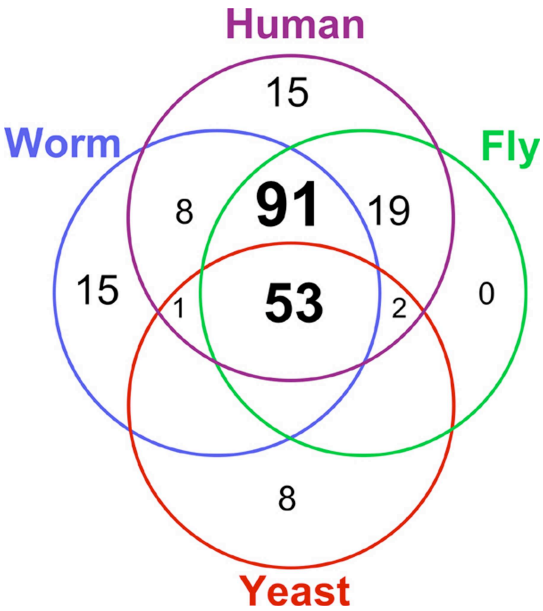


Figure 12 : Distribution des 212 familles de kinase des kinomes de levure *Saccharomyces cerevisiae*, du nématode *Caenorhabditis elegans*, de drosophile *Drosophila melanogaster* et d'humain. (Manning *et al*, 2005)

Sur les 212 sous-familles identifiées dans les génomes de *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* et de l'homme, 53 sont conservées chez toutes les espèces, et 91 sont communes aux organismes métazoaires (Figure 12) (Manning *et al*, 2005). La séparation entre les levures et le reste des métazoaires a notamment été marquée par l'apparition de plusieurs groupes de kinases comme les TKL et TK qui semblent requises pour les fonctions de signalisation et de contrôle sophistiquées, des

mécanismes de développement, de différenciation et de communication intercellulaire. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la complexité du kinome ne semble pas être en corrélation directe avec l'évolution des organismes métazoaires. En effet *C. elegans*, un organisme peu complexe, possède deux fois plus de protéines kinases que *D. melanogaster*, parmi lesquelles 15 familles de PKs qui lui sont propres, notamment dans le groupe des CK1 (spe-6), des CMGC (GSK3), des RGC (daf-11) et des TK (spe-8, Kin-9 et Kin 16). Cependant *C. elegans* semble avoir perdu 6 groupes de protéines retrouvées chez l'humain ou la drosophile comme des senseurs de glucose (CAMKL), des protéines impliquées dans le cycle cellulaire (TTK) ou la réparation de l'ADN (PIKK), des facteurs contrôlant la transcription (TIF) ou la croissance cellulaire (TK : CCK4) (Manning *et al*, 2005).
Dix-huit familles sont retrouvées chez la drosophile et l'homme mais pas chez le nématode (Figure 12). On retrouve ainsi de nombreux acteurs du système immunitaire, de la neurobiologie, du contrôle du cycle cellulaire et de la morphogénèse. Plusieurs de ces familles appartiennent au groupe des Protéine Tyrosine Kinase (PTK) qui nous intéresse particulièrement.

4. Les PTK

a) Généralités

Découvertes en 1979 avec l'identification de Src (Sarcoma), les PTKs représentent 10 à 15% des PKs totales d'un génome. Elles ont la particularité de transférer un phosphate sur un résidu tyrosine et non sur les résidus sérine et thréonine comme les autres groupes de PKs.
Les PTKs sont subdivisées en deux classes : les Non Receptor Tyrosine Kinase (NRTK) et les Receptor Tyrosine Kinase (RTK) (Figure 13). La première classe est composée de protéines cytoplasmiques formées d'un domaine kinase et de domaines d'interaction protéine-protéine. La seconde classe comprend des récepteurs transmembranaires composés d'un domaine extracellulaire de fixation aux ligands, d'un domaine transmembranaire et de son domaine intracellulaire Tyrosine Kinase.

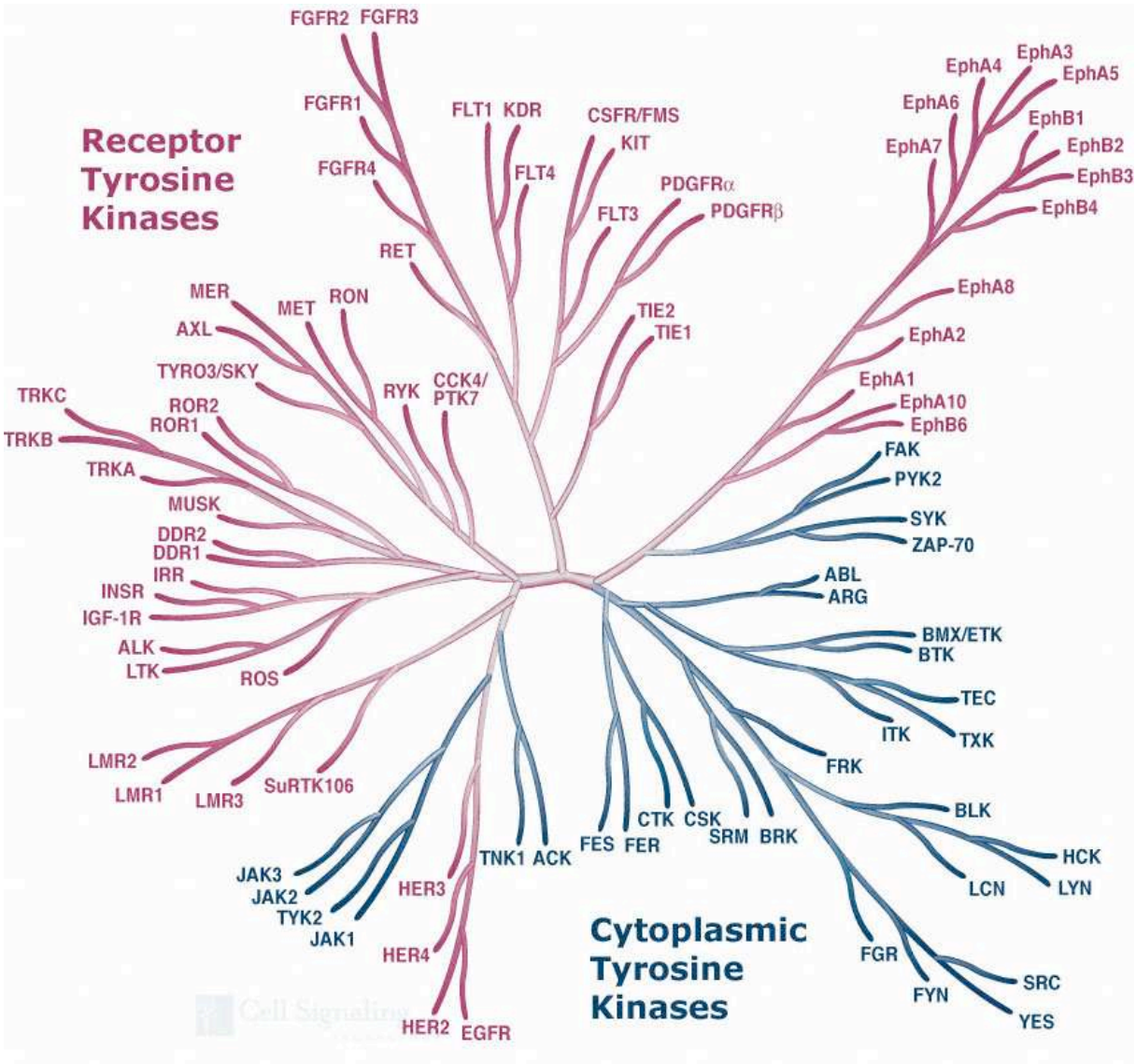


Figure 13 : Représentation de l'ensemble des protéines tyrosine kinases connues à ce jour chez l'homme. (D'après http://www.cellsignal.com)

b) Le domaine kinase

Sur les 30 gènes suppresseurs de tumeurs et l'ensemble des oncogènes dominants répertoriés (>100), les PTKs représentent une part importante des protéines proto-oncogènes. En effet, au moins 44 PTKs ont été associées avec des cancers sur les 90 connues chez l'homme, soit presque la moitié. Au vu de l'importance des PKs, de nombreuses structures cristallographiques ont été résolues, dont celles de 7 PTKs. Des études récentes (Taylor and Kornev, 2011) ont apporté de nouveaux éléments percutants sur le fonctionnement et la régulation des domaines kinases, complétant les travaux réalisés par Hanks et Hunter en 1995 sur PKA. Ils ont notamment mis en évidence qu'en plus des séquences consensus conservées déjà identifiées, des acides aminés répartis dans l'ensemble du domaine jouaient un rôle majeur dans l'activité kinase.

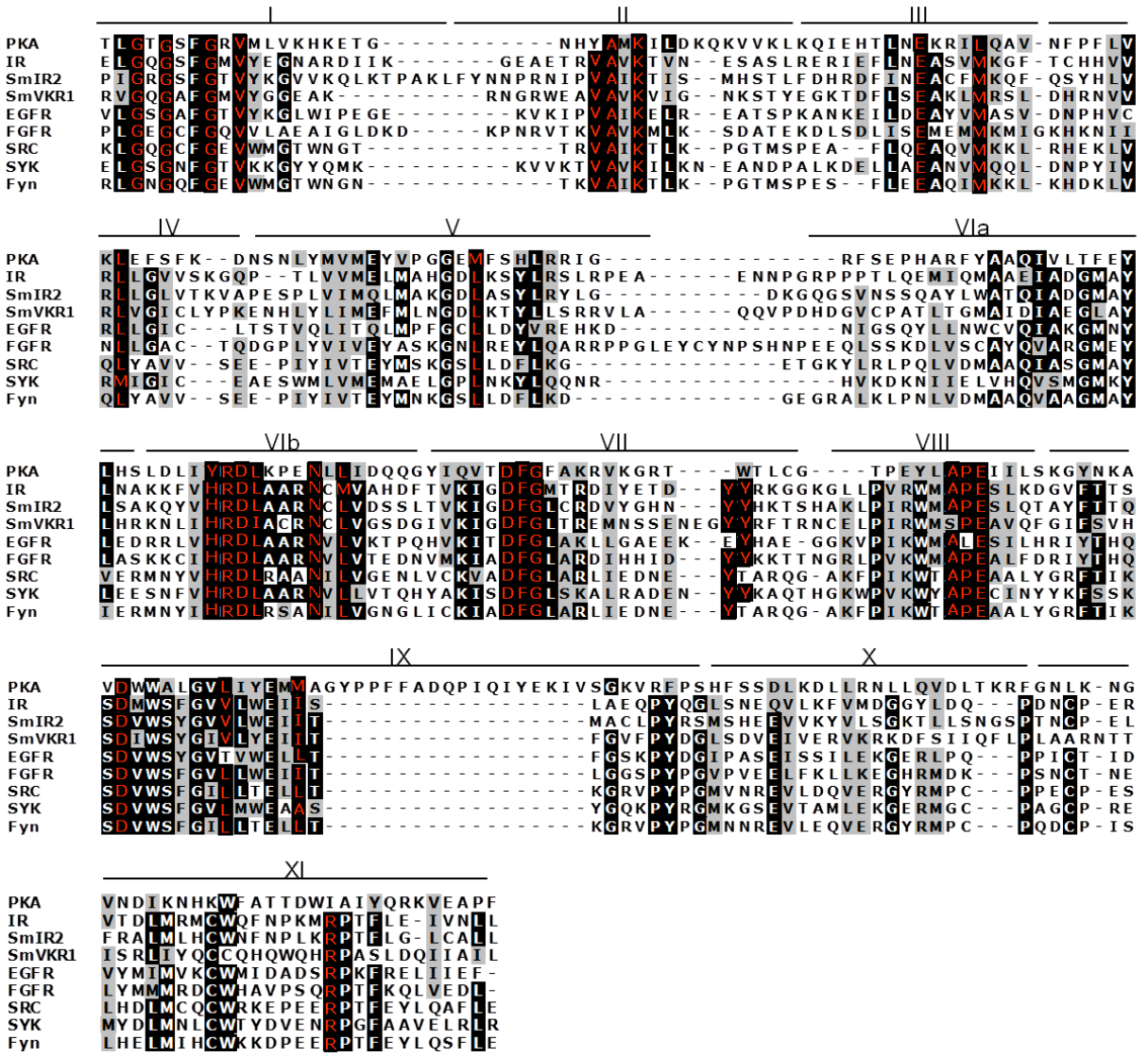


Figure 14: Alignement multiple de 9 domaines kinases représentatifs de différents membres des RTKs et CTKs et de la PKA. IR : Récepteur à l'insuline humaine, SmIR2 : Récepteur à l'insuline de *S. mansoni*, SmVKR1 : Venus kinase receptor de *S. mansoni*, EGFR : Récepteur à l'Epidermal growth factor humain, EGFR : Récepteur au Fibroblast growth factor humain. SRC humaine, SYK : Spleen tyrosine kinase humaine, FYN humaine. Les sous unités sont indiqués en chiffres romains. Les séquences consensus sont indiquées en rouge.

Afin de bien comprendre le fonctionnement d'un domaine kinase et l'implication des différents acteurs responsables de l'activité catalytique, il faut prendre en compte à la fois les structures secondaire et tertiaire du domaine.

La Figure 14 montre un alignement de séquences de domaines kinases de différents RTK et NRTK ainsi que de la PKA, première protéine kinase cristallisée. Les positions citées ci-après correspondent à la séquence de PKA qui sert encore à l'heure actuelle de référence.

La structure secondaire des domaines kinases est divisée en 12 sous-domaines numérotés de I à XI (VI étant subdivisé en deux régions VIa et VIb). Chacun des sous-domaines contient des acides aminés conservés chez les protéines kinases.

Dans le sous-domaine I, on retrouve le site $G_{50}xGxxG_{55}xV_{57}$ ou boucle Glycine-rich qui sert de site de fixation à l'ATP. Dans les sous-domaines II et III, on retrouve le motif $V_{69}AxKx_{16}E_{91}$ et le résidu M_{95} (parfois remplacé par une leucine). Deux autres résidus L_{106} et M_{128} sont retrouvés respectivement dans les sous-domaines IV et V. Dans le sous-domaine VIb se trouve le site de phosphotransfert, le motif H_{164}RDL(/I)xxRNxL. Il est suivi du motif $D_{184}FG_{186}$ impliqué dans la fixation du cofacteur Mg^{2+} et du résidu Y_{196} site d'autophosphorylation des TKs du sous-domaine VII. Le sous-domaine VIII renferme la séquence $xA_{206}PE_{208}$, et le sous-domaine IV les résidus D_{220}, L/V_{227} et $M(I)_{231}$. Le dernier résidu l'R_{280} se trouve dans le sous-domaine XI.

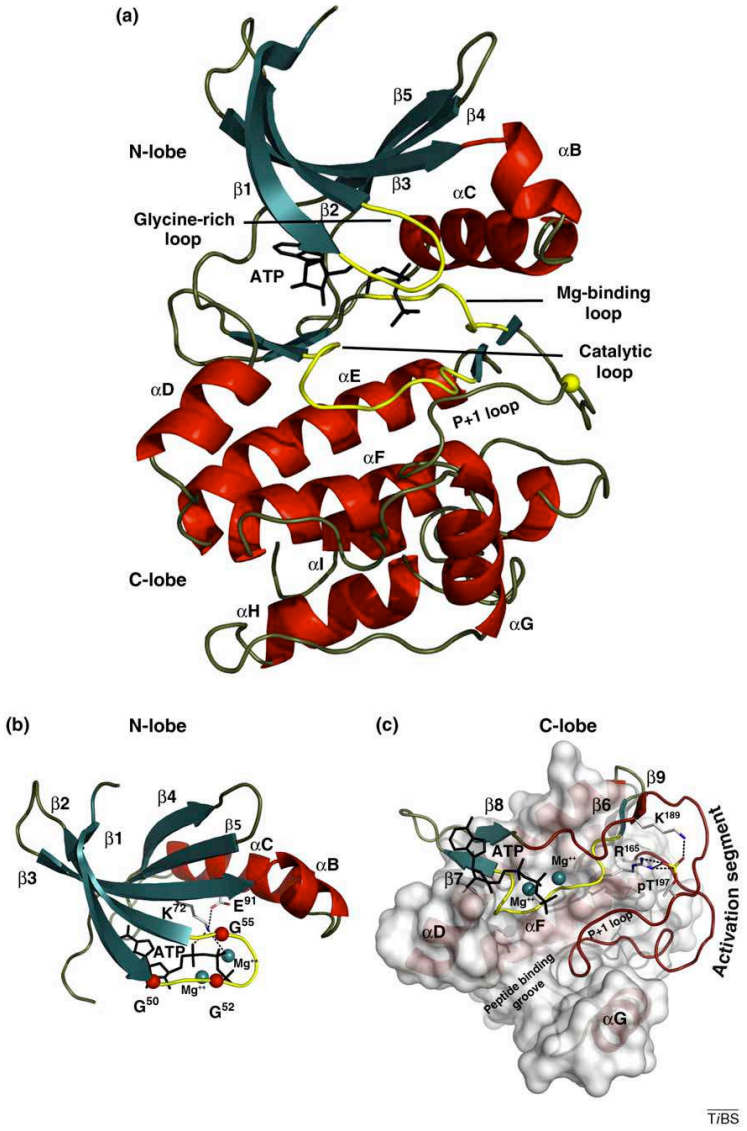


Figure 15 : Structure d'un domaine kinase conservé. A : Domaine kinase complet comprenant les lobes N et C. La boucle riche en glycine, la boucle de fixation du Mg^{2+} et la boucle catalytique sont indiquées. B : Le lobe N représenté avec l'ATP fixé entre les branches 1 et 2. C : Le lobe C représenté avec les résidus lysine, arginine, tyrosine et la P+1 loop, impliqués dans l'activité kinase (Taylor and Kornev, 2011).

Les résidus qui ne sont pas impliqués dans la fixation de l'ATP ou du Mg^{2+} permettent au domaine de prendre une conformation catalytiquement active.

Cette conformation tridimensionnelle est complexe et contient des structures plus ou moins flexibles permettant une régulation très fine de l'activité catalytique. Les 12 sous-domaines vont former les deux lobes caractéristiques d'un domaine kinase (Figure 15A).

Le lobe N est constitué d'un feuillet β à 5 branches (β1 à β5) couplé à une hélice nommée C-helix (Figure 15B). Le lobe C, plus gros, est formé d'hélices α et d'un petit feuillet β à 4 branches (β6 à β9) (Figure 15C). La structure bilobée est stabilisée par des interactions ioniques entre les différents résidus conservés non-consécutifs formant des assemblages tridimensionnels très importants. En effet la « spine » régulatrice (Spine R), la « spine » catalytique (spine C) et l'hélice F sont indispensables aux rapprochements des sites responsables de l'activité catalytique présentés précédemment (Figure 16A et B).

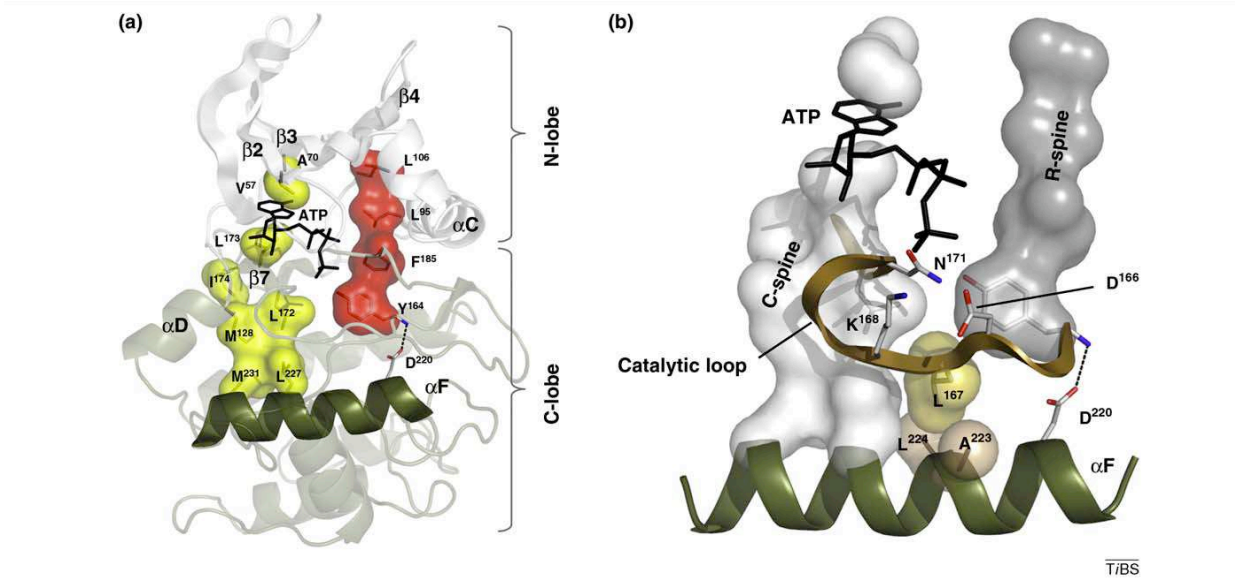


Figure 16 : Représentation des deux spines hydrophobes et de l'hélice C. A : la spine catalytique est représentée en jaune, la spine régulatrice en rouge et l'hélice C en vert. B : Liaisons ioniques de l'hélice C avec des résidus du domaine kinase.

La spine R est composée des radicaux hydrophobes des résidus L_{95}, L_{106}, F_{185} et H_{164} (Figure 16A). Cette composition et les charges des acides aminés entraînent le rapprochement des deux lobes et particulièrement de la boucle « glycine rich » avec la D_{184} impliquée dans la fixation d'une liaison Mg-ATP et le site H_{164}RDx.

La spine C est aussi composée de résidus hydrophobes appartenant aux deux lobes, la V^{57}, l'A_{70}, les L_{171}, L_{172}, I_{173}, L_{227}, M_{128} et M_{231} (Figure 16A). Cette structure stabilise la fixation de l'ATP assurée par le motif GxGxxGxV. La boucle glycine-rich emprisonne l'ATP entre deux branches β (β1-β2), la V_{57} fixe la base de l'ATP et la spine C « coince » le cycle purine entre

les groupements de la L_{172} et de l'A_{70}. L'ATP est orienté de façon à ce que le phosphate gamma soit dirigé vers le site de phosphotransfert. Les autres motifs servent à la structure de la spine C.

Enfin, l'hélice F est une structure hautement hydrophobe servant de point d'ancrage aux deux spines par des liaisons ioniques, mais aussi à la boucle catalytique (Figure 16B). Cette hélice est indispensable à la coordination des mouvements des deux spines et donc au passage d'une kinase de forme inactive à une forme active. La conformation fermée est stabilisée par une liaison ionique entre les résidus K_{72} et E_{91}. En présence d'ATP cette liaison est coupée.

La régulation de l'activation des TKs est complexe et souvent spécifique de chaque type de kinase. La cinétique de l'activation des tyrosines kinases sera développée dans le chapitre dédié aux RTKs qui nous intéressent particulièrement.

c) Les CTK

• *Présentation*

Les CTK ou NRTKs sont des protéines majoritairement cytoplasmiques. Certaines familles sont ancrées à la membrane suite à une myristoylation ou à une palmitoylation. Elles sont réparties en 10 familles chez l'homme (Figure 17) : Src, Abl (Abelson leukemia oncogene), Jak (Janus Kinase), Ack (Activated Cdc-42-associated kinases), Csk (C-src Tyrosine Kinase), Fak (Focal Adhesion Kinase), Fes (Feline sarcoma retrovirus), Frk (Fyn-related kinase), Tec et Syk (Spleen tyrosine kinase).

Ce sont des partenaires privilégiés des récepteurs transmembranaires comme les RTKs mais aussi des récepteurs couplés aux protéines G ou des récepteurs aux cytokines, à qui elles servent d'intermédiaires pour la transmission des signaux. Elles sont ainsi impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires et biologiques.

Par exemple, la famille JAK qui comprend 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3, et TYK2 joue un rôle majeur dans la régulation des réponses aux cytokines. Ses membres s'associent de façon non covalente aux récepteurs à l'IFN-I, IFN-γ et à un grand nombre d'interleukines et s'autophosphorylent suite à la fixation du ligand. Puis Jak phosphoryle le récepteur offrant des sites de fixation au facteur de transcription STAT. Sa phosphorylation par Jak entraine sa dimérisation et son passage dans le noyau où il va réguler la transcription de gènes cibles (maturation des lymphocytes et des érythrocytes) (Schindler *et al*, 2007).

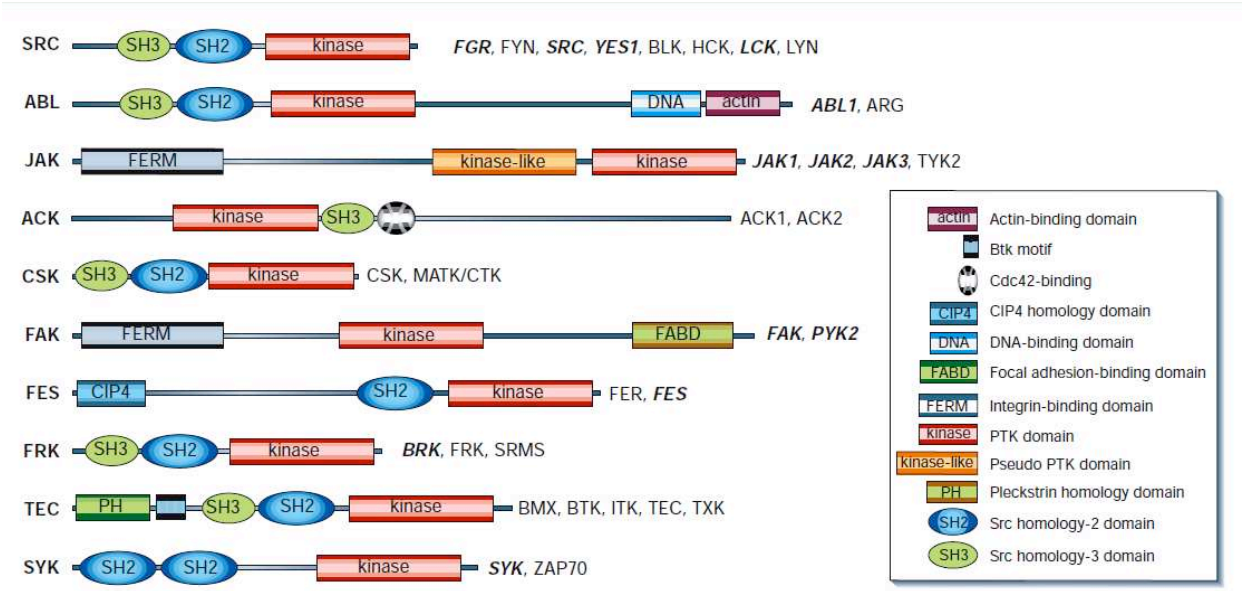


Figure 17 : Familles de non receptor tyrosine kinases humaines. Le nom des familles est indiqué à gauche, et le nom des membres à droite.

La famille FAK est impliquée dans la migration cellulaire, le développement embryonnaire et la cicatrisation. Cette famille ne comprend que deux membres FAK et PYK2. L'activation des récepteurs intégrines qui assurent l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire ou de récepteurs aux facteurs de croissance (chimiotactisme) provoque l'activation de FAK. Ceci déclenche différentes voies de signalisation dépendantes des familles Rho et Ras aboutissant à la réorganisation du cytosquelette et à la régulation de gènes cibles comme les facteurs d'adhésion. Ceci module la capacité d'une cellule à migrer (Hauck *et al,* 2002, Tomar et Schlaepfer, 2009).

Ces deux exemples montrent bien la diversité de réponses cellulaires induites par les CTK. On les retrouve également impliquées dans les voies de prolifération cellulaire, de signaux de survie et de maturation des lymphocytes T et B comme nous le verrons plus tard.

- ***Structure***

Toutes les CTKs possèdent un domaine kinase actif conservé, généralement placé du coté C-terminal de la protéine. La spécificité de chaque famille de CTKs et leur classification est liée à la combinaison de domaines spécifiques d'interaction protéine-protéine, protéine-lipide ou protéine-ADN. Ces domaines sont indispensables à plus d'un titre. Ils sont impliqués dans la localisation subcellulaire des CTKs assurant leur proximité avec leurs partenaires et substrats. Ils jouent aussi un rôle très important dans la reconnaissance spécifique proprement dite de ces partenaires *via* des séquences consensus clés. Cette spécificité de fixation peut être accentuée par la coopération de différents domaines situés sur une même

CTK. Enfin, l'activité du domaine kinase lui-même peut être régulée par des repliements de la protéine suite à des fixations en Cis sur des sites internes qui induisent une auto-inhibition de la CTK comme nous le verrons plus tard. Les principaux domaines d'interactions retrouvés dans cette famille de protéines sont les domaines SH2, SH3, PH ou les domaines de fixation aux intégrines. Ces domaines ne sont pas spécifiques des CTKs mais sont indispensables à leur fonction et seront décrits dans ce cadre.

- PH :

Les pleckstrin homology domain sont des régions d'environ 100 acides aminés impliquées dans la reconnaissance et la fixation des phosphoinositides. Les PHs sont retrouvés dans différentes protéines dont la fonction dépend de leur localisation à la membrane cellulaire. On retrouve ainsi PLCδ (Phospholipase C delta), BTK (Bruton's Tyrosine Kinase), AKT et GEFs (Guanine nucleotide-Exchange Factors). Suite à l'activation de la PI3K, les phosphatidylinositol (3, 4, 5)P_3 et les phosphatidylinositol (3,4)P_2 sont phosphorylés et servent de sites de fixation aux protéines contenant un PH, conduisant à leur activation et/ou au rapprochement de leurs partenaires.
Les domaines PH forment un feuillet β à 7 branches qui se replient sur elles-mêmes pour former une sorte de sandwich. La boucle entre les branches β1 et β2 sert de plateforme d'interaction avec la tête du phosphoinositide. Cette boucle contient les motifs $KX_n(K/R)XR$, dont les chaines basiques forment des interactions avec les phosphates (Lemmon et ferguson, 2000 ; Lemmon, 2008).
Parmi les CTKs seule la famille TEC possède ce domaine.

- FERM :

Les domaines FERMs ont été décrits pour la première fois en 1979 dans les globules rouges avec la protéine 4.1 R, puis plus tard dans un nombre croissant de protéines (Tyler *et al*, 1979). Afin d'harmoniser les nomenclatures, le nom FERM pour Four-point-one, Erzin, Radixin, Moesin a été proposé par Chishti *et al*, en 1998. Ce nom fait référence aux quatre premières protéines identifiées possédant ce domaine. A l'heure actuelle, on compte 50 protéines contenant un domaine FERM chez l'homme codées par 30 gènes différents. *D. melanogaster* en possède 22, dont la majorité sont des homologues des protéines humaines. Il existe trois groupes de protéines possédant des domaines FERM (nommées FDCPs) : le groupe Kindlin, Talin ; le groupe guanine nucleotide exchange factors (GEFs), Kinases et phosphatases ; le groupe myosine et KRIT (Krev interaction trapped protein).
Ce domaine fait environ 300 acides aminés de long, et se compose de 3 sous-domaines globulaires notés F1, F2, F3. Le sous-domaine F1 possède une structure proche de celle de

l'ubiquitine, le sous-domaine F2 a une conformation proche de protéines fixant l'Acyl-CoA et enfin, le sous-domaine F3 ressemble à un domaine de fixation PH (pleckstrin homology)/PTB (phosphotyrosine binding). Grâce à leurs 3 lobes, les protéines composées de FERMs sont capables d'interagir avec de nombreux partenaires de nature totalement différente, comme des canaux ioniques, des molécules d'adhésion, des protéines cytoplasmiques mais aussi des lipides membranaires comme la phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP_2). Les FERM, jouent un rôle important dans plusieurs processus biologiques liés à la régulation du cytosquelette, comme la morphogénèse, l'endocytose des récepteurs, ou la régulation de la croissance (Tepass *et al*, 2009 ; Frame *et al,* 2010).
Deux familles de CTKs possèdent un domaine FERM, la famille JAK et la famille FAK. Le fonctionnement et la régulation du domaine FERM de FAK sont très étudiés.

- Les domaines SH2 :

Le domaine SH2 pour Src homology 2 est un module spécifique des voies de signalisation Tyrosine Kinase. En effet, ce domaine a la particularité de reconnaitre des séquences peptidiques contenant une tyrosine phosphorylée. Il est conservé chez l'ensemble des eucaryotes et a été à l'heure actuelle identifié chez plus de 106 protéines différentes. On retrouve ainsi des adaptateurs liés aux récepteurs tyrosine kinase (GRB), des protéines de voies de signalisation (PI3K, RHO) et bien sûr des CTKs. Une catégorie plus ancienne de SH2 est retrouvée sur les protéines STAT, SAP ou Cbl. Une légère différence dans la structure et la composition en acides aminés permet un fonctionnement moins dépendant de la phosphorylation de la tyrosine (Machida et Mayer, 2005).
Les domaines SH2 classiques sont composés d'environ 100 acides aminés formant une structure comprenant 2 hélices α et 7 branches β, qui forment le motif βαβββββαβ. Ce motif se divise en deux régions principales. La première est nommée pTyr pocket et la seconde « Specificity determining region ». La pTyr pocket est comme son nom l'indique le siège de la reconnaissance de la tyrosine phosphorylée. Elle contient une arginine conservée qui reconnaît et se lie aux charges du phosphate. La deuxième région intervient dans la spécificité de la liaison. Elle implique des résidus qui reconnaissent l'environnement de la tyrosine, principalement les résidus situés aux positions +3 et +5. Ce sont en général des acides aminés à chaines radicales négatives. (Kuriyan *et al*, 1997, Schlessinger et Lemmon, 2003). Certaines protéines augmentent leur spécificité de liaison grâce à des séquences supplémentaires présentes dans leur domaine SH2, capables de se fixer à leur partenaire phosphorylé (Bae *et al*, 2009)
Des études sur les constantes de dissociation de ces domaines ont révélé qu'ils ne sont pas aussi affins ou stables qu'il l'avait été spéculé. En effet, un domaine SH2 a une constante de dissociation seulement 30 à 150 fois plus élevée pour son peptide spécifique phosphorylé

que pour un peptide non spécifique phosphorylé. Cette différence est peu importante si on considère que ce même domaine SH2 aura une constante de dissociation 10^4 fois plus élevée pour son peptide spécifique phosphorylé que pour son peptide spécifique non phosphorylé. En effet, la reconnaissance par l'arginine du phosphate est un élément clé de la fixation du domaine entier. Une mutation ponctuelle de cet acide aminé empêche toute liaison du SH2, mettant l'accent sur le caractère indispensable de la phosphorylation de la tyrosine (Ladbury *et al*, 1995 ; Bradshaw *et al*, 1999). Il existe cependant quelques cas de fixations indépendantes de la phosphorylation du site de fixation (Muller *et al*, 1992).

Les domaines SH2 jouent un rôle important dans les voies de signalisation tyrosine kinase qui sont comme nous l'avons vu une part importante des protéines oncogènes. De ce fait, les domaines SH2 sont considérés comme faisant partie des cibles thérapeutiques potentielles dans la lutte contre le cancer. De nombreuses équipes ont mis en place des études d'inhibiteurs, qui interféreraient dans les voies de signalisation aberrantes des tissus cancéreux et qui cibleraient entre autres Src, Lck et Zap70. Le substrat des domaines SH2 étant de petits peptides de 6-7 acides aminés, il est facile de les synthétiser et de les tester. Cependant le caractère très négatif des acides aminés impliqués rend difficile le passage des barrières cellulaires (Machida et Mayer, 2005).

Chez les CTKs, le domaine SH2 est très souvent placé en N-terminal du domaine kinase. En plus de leur rôle dans la fixation à leur partenaire protéique, les domaines SH2 servent aussi de mécanisme d'auto-inhibition de l'activité kinase des CTKs en se refermant sur le domaine kinase. L'activation des CTKs sera décrite un peu plus loin.

- Les domaines SH3 :

Les domaines SH3 (Src-homology 3) sont les représentants les plus connus de la famille des domaines de reconnaissance de séquences riches en proline nommées PRD (proline-recognition domain). Ce sont des modules de 60 résidus environ qui reconnaissent et fixent spécifiquement des peptides contenant le noyau PxxP (x étant en général un acide aminé hydrophobe). Ils sont retrouvés dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires et sont donc très représentés. Ainsi, *D. melanogaster* et *C. elegans* possèdent respectivement 63 et 55 protéines contenant un domaine SH3 (Rubin *et al*, 2000).

De même, les recherches de motifs conservés dans les protéomes des organismes modèles ont mis en évidence l'abondance et la conservation des domaines riches en proline chez les eucaryotes. Ils correspondent à la première catégorie de motifs en termes d'importance chez *D. melanogaster (*présents sur 579 protéines), et à la seconde chez *C. elegans* (retrouvés dans 398 protéines). Leur importance dans les phénomènes d'interaction protéine-protéine a été attribuée à la nature même de la proline. En effet, sur les 20 acides aminés codés par l'ADN, elle est la seule à posséder un cycle pyrrolidine, à la place du groupement amine

primaire, qui impose un angle particulier à la séquence protéique. Bien connus pour « casser » les structures tertiaires (hélice α et feuillet β), les prolines se situent majoritairement à la surface des structures protéiques, et sont donc exposées à l'environnement. De plus, les propriétés physico-chimiques du cycle permettent des interactions de type Van der Waals importantes, notamment avec des acides aminés aromatiques présent dans les domaines de reconnaissance (Kay *et al,* 2000).

Le noyau PxxP prend une structure particulière et unique reconnue par le domaine SH3. Il s'agit d'une hélice nommée PPII pour PolyProline type II, dont le sens de rotation part vers la gauche, et qui contient 3 résidus par tour. En plus de ce noyau, le domaine SH3 a besoin de la présence d'acides aminés à charges positives aux environs immédiats, qui assurent la stabilisation de la fixation ainsi que sa spécificité. Lorsqu'ils se situent en amont du noyau, on parle de ligand de type I, et lorsqu'ils se situent en aval, d'un type II. Il semblerait sans que les raisons en soient très claires, que les domaines SH3 puissent se fixer dans un sens ou dans l'autre, ce qui pourrait influer sur les interactions suivantes. Des résidus aromatiques présents dans le domaine SH3 sont également très importants pour la fixation des séquences riches en prolines, puisque ce sont eux qui assurent les liaisons ioniques avec les noyaux de la proline. Du fait de la petite taille des motifs reconnus et de la nature même du site de fixation, la constante de dissociation de ces interactions est très faible. Ces interactions fugaces semblent privilégiées dans les voies de signalisation telle que les voies incluant les CTKs, permettant une meilleure modulation des signaux enclenchés et donc une meilleure régulation des réponses cellulaires (Wiliamson *et al*, 1994).

Présents sur la majorité des CTKs, les domaines SH3 semblent jouer un rôle de stabilisateur des interactions CTK-substrat en coopérant par exemple avec les domaines SH2 ou les autres domaines d'interaction. Comme nous allons le voir, les domaines SH3 servent aussi à la régulation de l'activité catalytique des CTKs à l'instar des SH2.

- ***Activation***

Les CTKs jouent un rôle primordial dans la transduction de signaux cellulaires captés par les différents récepteurs membranaires. La transduction du signal se doit d'être rapide, éphémère et contrôlée. Afin d'assurer une telle réponse, les CTKs se trouvent dans la majorité des cas dans une forme « prête à l'emploi » mais inhibées afin de garantir que leur activation se fasse au moment précis où elle est nécessaire. Si la majorité des CTKs ont un mode de fonctionnement homologue, les mécanismes qui régissent leur régulation varient d'une famille à l'autre, voire d'un membre à l'autre d'une même famille. Ainsi, Src prend une conformation inactive suite au repliement et à la fixation du domaine SH2 sur une tyrosine phosphorylée de sa queue C-terminale. Son domaine SH3 stabilise la conformation fermée

en se fixant sur la séquence qui sépare le domaine SH2 et le domaine catalytique. Un mécanisme équivalent existe pour Abl mais reste encore mal connu. D'autres mécanismes inhibent l'activité des autres CTKs, mais il serait trop long de les détailler tous. Cependant le mécanisme d'activation des CTKs est équivalent quelque soit la famille impliquée et consiste en la fixation des domaines de liaison aux partenaires ou substrats des kinases qui vont ainsi adopter une conformation active capable de phosphoryler le substrat. La nature peu affine des liaisons engendrées par les domaines SH2/SH3 permet un passage rapide d'une conformation fermée/inactive à une conformation ouverte/active au contact du ligand et/ou du substrat (Pawson et Kofler, 2009). Les signaux d'activation des voies CTKs sont initiés en grande partie par les autres membres du groupe des PTK, les Récepteurs Tyrosine Kinase que nous allons étudier maintenant.

d) Les RTK

- ***Présentation***

A l'heure actuelle, 58 RTKs humains ont été décrits et répartis en 20 sous-familles en fonction de leur structure, notamment celle de leur domaine extracellulaire (Figure 18). En effet, c'est cette partie du récepteur qui fixe les ligands et qui de ce fait présente la plus grande variabilité. Les RTKs peuvent lier des ligands de type, de forme et de taille extrêmement variés, ce qui explique leur polyvalence. On retrouve ainsi des domaines riches en cystéine (cysteine-rich domain), des régions riches en leucine (leucine-rich domain), des domaines de fixation de type fibronectine, cadhérine, discoidin, immunoglobuline…

Le reste du récepteur est moins variable entre les différentes sous-familles. Le domaine transmembranaire est toujours une hélice α unique qui relie le domaine extracellulaire au domaine intracellulaire. Ce dernier est principalement constitué du domaine tyrosine kinase qui peut être interrompu par une insertion plus ou moins importante sans que cela n'affecte l'activité catalytique du récepteur. C'est le cas des sous familles PDGFR (Platelet-derived Growth Factor Receptor), VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), FGFR (Fibroblast growth Factor Receptor), Ret et STYK (Serine, Threonine, Tyrosine Kinase). Le domaine kinase est entouré en N-terminal d'une séquence appelée juxtamembranaire et en C-terminal de la queue C-term. Ces deux éléments renferment des motifs importants comme les sites de fixation aux protéines partenaires via leurs domaines d'interaction (SH2, SH3, PTB…) (Lemmon et Schlessinger, 2010). Ils peuvent aussi être importants pour la stabilisation de la structure du domaine, comme nous le verrons plus tard.

Figure 18 : Familles des Récepteurs tyrosine kinases humaines : Le nom des familles est indiqué en haut et le nom des membres sous le schéma (Lemmon et Schlessinger, 2010).

Les RTKs sont connus depuis plus de 30 ans et ont été largement étudiés du fait de leur importance dans de nombreuses maladies humaines comme le diabète, les maladies métaboliques et le cancer. La compréhension des mécanismes d'activation des RTKs est directement liée à la compréhension des signaux anormaux et dérégulés induisant ces pathologies.

- ***Mécanisme d'activation***

Au fil des années, nos connaissances liées aux mécanismes d'activation des RTKs se sont beaucoup améliorées. D'abord perçue comme un mécanisme simple imputable à tous les récepteurs, l'activation des RTKs est apparue à l'instar de leurs différences de structure, très

complexe et presque spécifique à chaque sous-famille. Cependant on peut discerner « des mécanismes types » adaptables à plusieurs RTKs et quelques généralités.
Ainsi, tous les RTKs fonctionnent sous forme d'oligomères, en général des dimères (homo, ou hétéro-dimère). A l'exception des récepteurs à l'insuline et à l'insulin-like growth factor (IGF), qui sont des dimères constitutifs, et des récepteurs à l'EGF, qui ont été retrouvés sous formes oligomères inactifs, les RTKs se dimérisent suite à la fixation de leur ligand. Cela entraîne un changement de conformation du récepteur, répercuté dans le domaine intracellulaire, conduisant à l'activation du domaine kinase. Celle-ci se déroule en deux ou trois phases suivant les récepteurs qui résultent toutes de la phosphorylation de tyrosines clés.
Cependant en fonction du récepteur étudié, la nature du ligand, sa façon de se fixer, la dimérisation elle-même, et l'activation du domaine catalytique sont variables.

- Fixation du ligand :

Il existe 4 grands modèles de fixation de ligands sur les RTKs en fonction de l'interaction ligand/récepteur (Figure 19) (Lemmon et Schlessinger, 2010).
Le premier modèle (Figure 19A) met en jeu un ligand divalent qui lie les deux récepteurs entre eux sans qu'il y ait contact entre les domaines extracellulaires. C'est le cas du récepteur TrkA qui lie le NGF, une molécule divalente, sur un domaine similaire aux immunoglobulines, Ig-C2. Les autres parties de son domaine extracellulaire ne rentrent jamais en contact (Wiesmann *et al*, 1999).
Le récepteur Kit est un parfait exemple du deuxième modèle qui consiste en une dimérisation via le ligand et une interaction directe des récepteurs (Figure 19B). Son ligand, le Stem Cell Factor est lui aussi divalent. Il se fixe sur les domaines similaires aux immunoglobulines 1 à 3 (Ig-like) du récepteur. Ceci entraîne une rotation des deux molécules Kit qui vont alors se lier entre elles via leurs deux autres domaines Ig-like proches de la membrane. Cette seconde liaison oriente les deux récepteurs pour leur activation (Liu *et al*, 2007).
Le troisième modèle implique un ligand monovalent, et une molécule accessoire (Figure 19C). Le récepteur au FGF (FGFR), va former un complexe composé de 2 FGFR, 2 FGF, et 2 molécules d'héparine. Chaque FGF se lie aux deux FGFRs (l'un par une forte interaction, l'autre par une plus faible) et chaque ligand fixe les deux molécules d'héparine. Ce qui entraîne la formation de liaisons ligand/héparine, ligand/récepteur, récepteur/récepteur, récepteur/héparine, qui stabilisent le dimère FGFR (Schlessinger *et al*, 2000).
Le dernier modèle se situe à l'opposé du premier, puisque cette fois les deux récepteurs se dimérisent par contact direct entre eux (Figure 19D). Les récepteurs de la famille EGFR possèdent sur leur domaine extracellulaire deux domaines appelés LRR-like « solenoide »

(domaines 1 et 3) et deux domaines riches en cystéines (domaines 2 et 4). En absence de ligand les domaines 2 et 4 se lient l'un à l'autre dans une conformation « fermée ». En présence d'EGF (Epidermal Growth Factor), celui-ci se lie aux domaines 1 et 3 d'un même récepteur, ce qui libère le domaine 2 dans lequel se trouve le site de dimérisation. Donc le ligand n'intervient qu'indirectement dans la liaison récepteur/récepteur (Garrett *et al*, 2002 ; Ogiso *et al*, 2002)

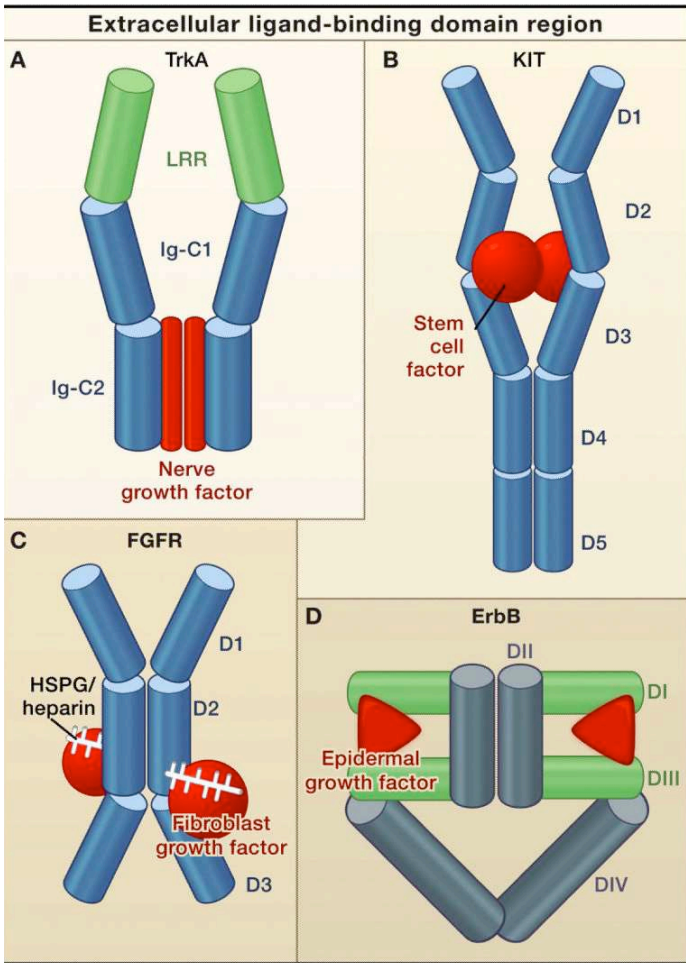


Figure 19 : **Modèles de fixation de ligand par les RTKs** ; A : exemple de TrkA, B : exemple de KIT, C : exemple de FGFR, D : exemple de l'EGFR d'après Lemmon et schlessinger, 2010.

Si la plupart des 58 récepteurs semblent intégrer l'un de ces quatre modèles, il n'est pas étonnant que certains sortent du lot et utilisent des mécanismes d'activation spécifiques ou singuliers. Ainsi les récepteurs DDR1/2 (Discoidin domain receptor) activés par le collagène ont un mécanisme de liaison à leur ligand peu compris (Shrivastava *et al*, 1997 ; Vogel *et al*, 1997). De même les récepteurs Ryk (Related to receptor Tyrosine Kinase), Musk (Muscle-Specifique Kinase) et Ror (RTK-like Orphan Receptor) qui jouent un rôle dans les voies Wnt ont probablement un mécanisme d'activation particulier qui reste à caractériser (Van Amerongen *et al*, 2008).

- Phases d'activation du domaine catalytique :

Suite à la fixation du ligand, le domaine TK des récepteurs va s'activer en suivant deux ou trois phases distinctes et successives. Ces phases correspondent à la phosphorylation en trans de tyrosines bien précises qui vont permettre dans un premier temps de déclencher l'activation du domaine, c'est-à-dire de le libérer de sa conformation inactive. Cela va créer dans un deuxième temps des sites de fixation pour des partenaires cytoplasmiques des récepteurs et dans un troisième temps, une augmentation de l'activité catalytique du domaine.

La première phase d'activation est une étape primordiale au déclenchement de l'activité kinase. La majorité des kinases se trouvent sous forme inactive, en prenant une conformation spéciale stabilisée par des liaisons intramoléculaires pour éviter toute activité anarchique. A l'heure actuelle, trois types de liaisons inhibitrices ont été décrits et sont représentés Figure 20. Dans le premier modèle, la conformation fermée est stabilisée par la boucle d'activation du domaine. Pour le deuxième et le troisième modèle, il s'agit d'une inhibition stabilisée par les domaines juxtamembranaire et C-terminal (Figure 20A).

Le mode d'auto-inhibition par la boucle d'activation est commun aux récepteurs à l'insuline et à l'IGF ainsi qu'aux récepteurs au FGF. La tyrosine Y1162 de l'IR qui se trouve dans la boucle d'activation, est dirigée vers le domaine kinase comme si elle était prête à être autophosophorylée par son propre domaine catalytique. Cette orientation de la boucle masque le site de fixation de l'ATP ainsi que celui des protéines substrats du récepteur. Lors de son activation par son ligand spécifique une trans-phosphorylation de la tyrosine s'effectue, faisant basculer la tyrosine phosphorylée et levant l'auto-inhibition. La boucle d'activation prend alors sa conformation active, en même temps que se déroule une réorientation de l'hélice C dans le lobe N, qui permet l'accès au site de fixation de l'ATP.

La boucle d'auto-activation du FGFR ne bloque pas directement le domaine mais induit une série d'interactions qui bloquent seulement le site de fixation à l'ATP. L'inhibition est levée par l'activation du récepteur comme pour l'IR.

Pour ces deux exemples, la phosphorylation des tyrosines de la boucle d'activation joue deux rôles en un, la levée de l'inhibition du domaine et la stabilisation de la conformation ouverte. Cette stabilisation est retrouvée pour tous les domaines Tyrosine kinase (exception faite de l'EGFR (Sherrill, 1997)) quelque soit le mécanisme d'inhibition, et aura donc toujours lieu.

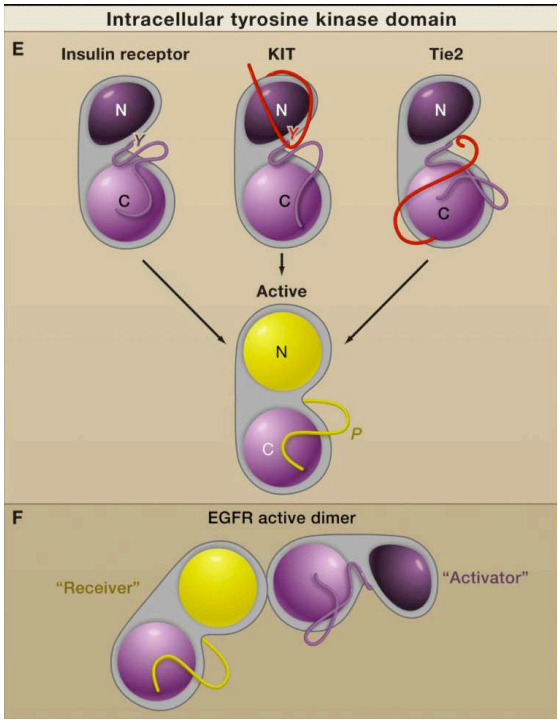


Figure 20 : Modèle d'activation des domaines kinase. A : Cas de l'IR, de KIT et de Tie2 ; B : Activation allostérique de l'EGFR. (Lemmon et Schlessinger, 2010)

Le domaine juxtamembranaire des récepteurs KIT, MuSK, Flt3 et de la famille des récepteurs à Eph, est responsable de la conformation inactive en établissant de multiples interactions avec le domaine kinase, dont la boucle d'activation (Hubbard, 2004).

Les Récepteurs Tie2, PDGFR et Ron possèdent des sites d'autophosphorylation sur leur domaine C-terminal qui bloquent l'accès des substrats au site catalytique. L'activation des récepteurs induit la phosphorylation en trans des tyrosines de ces domaines, qui basculent pour rendre les tyrosines de la boucle d'activation accessibles. Plusieurs mutations constitutives du domaine juxtamembranaire de la famille KIT/PDGFR ont été identifiées dans le cadre de cancer (Irusta et DiMaio, 1998 ; Irusta *et al*, 2002).

Pour ces trois modèles, le premier événement de trans-phosphorylation est critique. Mais comment s'effectue-t-il si les deux unités du dimère sont inhibées? La réponse à cette question est liée aux propriétés intrinsèques du domaine kinase. Comme nous l'avons vu, il présente des sous-domaines rigides et souples qui lui permettent d'osciller entre un état fermé et un état partiellement ouvert. Dans ce cas, et de façon transitoire, le domaine est capable de phosphoryler et d'être phosphorylé. L'accumulation de récepteurs et la stabilisation des dimères par le ligand augmentent la probabilité qu'un domaine kinase partiellement ouvert se trouve à proximité d'un autre domaine prêt à être phosphorylé, déclenchant la première phase. La première trans-phosphorylation augmente le Vmax de l'enzyme de façon importante. Dans le cas de l'IR, son activité catalytique augmente de 50 à 200 fois (Cobb *et al*, 1989).

La seconde phase de l'activation du domaine va augmenter son Km c'est-à-dire son affinité pour son substrat. En effet, cette phase va permettre la phosphorylation toujours en trans de tyrosines qui serviront de sites de fixation des partenaires composés de domaines de reconnaissance des tyrosines phosphorylées (PTB, SH2). Cette phase se déroule dans un ordre très précis spécifique de chaque récepteur. Dans le cas du FGFR, la Y583 qui se trouve dans l'insert du domaine kinase est la première phosphorylée, puis ce sont les Y463, du domaine juxtamembranaire, et Y585 du domaine kinase. Toutes les trois servent à la fixation de molécules de la voie de signalisation.

Enfin, comme c'est le cas du FGFR, une troisième phase de phosphorylation sur la Y654 permet d'obtenir une activité maximale du domaine, pour atteindre une augmentation du Vmax de 100 à 500 fois par rapport à l'activité basale du récepteur. Cette dernière phase peut être associée à la phosphorylation de substrats spécifiques.

Ces cinétiques d'activation ont aussi été décrites pour l'IGFR, l'IR et le récepteur MuSK (Favelyukis *et al*, 2001 ; Till *et al*, 2002).

- Activation de la famille EGFR/ErbB :

Certains récepteurs ne suivent pas le mode d'activation décrit précédemment. La famille EGFR/ErbB fait office d'exception car ils ne dépendent pas d'une trans-phosphorylation pour s'activer. Ils utilisent une activation allostérique de leur TK (Figure 20B). Les deux TKs forment un dimère asymétrique où le lobe C d'un TK appelé «activateur », va fixer le lobe N de l'autre TK, appelé « receveur ». C'est ce contact qui induit les changements conformationnels du receveur, et qui déclenche la levée de l'inhibition. Le domaine juxtamembranaire du receveur induit et stabilise la dimérisation des TKs (Zhang *et al*, 2006).

- ***Voies de signalisation associées aux RTKs***

Il est très difficile de passer en revue l'ensemble des voies de signalisation initiées ou impliquant l'action d'un RTK. D'une part leur nombre est très important (58 chez l'homme), chaque famille pouvant fixer des ligands de nature très variée. D'autre part, ils interagissent avec tout un panel de protéines cytoplasmiques déclenchant des activations en cascade dans la cellule. Celles-ci ne s'effectuent pas de façon directe mais sous la forme d'un éventail ou d'un entonnoir inversé partant du récepteur. De plus, les coopérations qui peuvent exister entre différents récepteurs d'une même cellule, les interconnexions entre les voies de signalisations identifiées ainsi que les rétrocontrôles positifs et négatifs mis en évidence, ne nous permettent qu'une compréhension partielle des événements.

Dans un souci de simplicité et de clarté, seules quatre grandes voies seront décrites ici pour illustrer l'impact de l'activation d'un RTK : La voie RTK/Ras/MAPK, la voie Pi3K/AKT, la voie PLCγ et une voie dépendante des Rho GTPases.

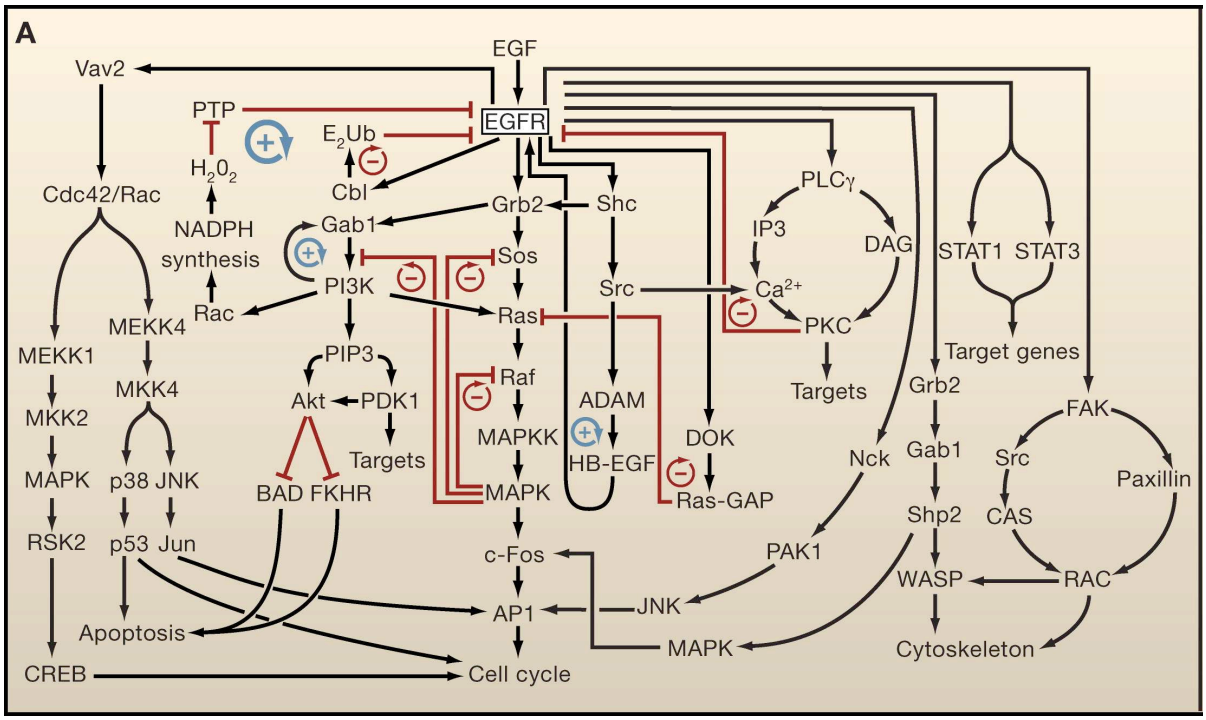


Figure 21 : Réseau des voies de signalisation intracellulaires activé par l'EGFR. Exemple des acteurs intracellulaires impliqués par l'activation de l'EGFR. Flèche noire : activation ; Flèche rouge : inhibition ; flèche arrondie bleue : boucle de rétrocontrôle positive ; flèche arrondie rouge : boucle de rétrocontrôle négative.

Les voies Ras/MAPK font partie des voies les plus connues et les plus étudiées. Elles regroupent quatre cascades principales dont les noms correspondent aux mitogen-activated protein kinase (MAPK) qui les composent. On identifie ainsi la voie ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), JNK 1-3 (c-Jun N-terminal kinase), p38MAPK α, β, γ, δ, et ERK5.

Chaque cascade est composée d'un trio de protéines, la MAPK, la protéine responsable de son activation, la MAPK kinase (MAPKK) et enfin l'initiatrice du trio la MAPKK kinase (MAP3K) (Figure 21).

Si on prend l'exemple de la voie ERK1/2, lors de l'activation des RTKs, des protéines adaptatrices tels que SHC (SRC Homology 2 containing) ou GRB2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein-2) sont recrutées *via* leurs domaines d'interaction protéine-protéine. GRB2 forme alors un complexe avec la protéine SOS (Son of sevenless), une protéine GEF (Guanine-Nucleotide Exchange Factor), qui va activer la protéine Ras (RAt Sarcoma), en remplaçant un GDP par un GTP nécessaire à son activité. Ras va alors induire l'activation de RAF, la MAP3K de la cascade, qui va à son tour phosphoryler la protéine MEK (MAPKK), une sérine-thréonine-tyrosine kinase. MEK phosphoryle ERK, qui migre vers le noyau où elle

phosphoryle différents facteurs de transcriptions comme ElK1, c-Fos, TIF1A etc… Ces facteurs de transcription jouent principalement un rôle dans la division et la différenciation cellulaire (Tan et Kim, 1999). Dans le cas des cascades JNK et p38, ce sont des protéines de réponse au stress qui sont activées, tandis que la voie ERK5 permet à la fois une réponse au stress mais induit aussi des signaux mitogéniques (Cargnello et Roux, 2011).

Lors de l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance, la Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) est recrutée *via* ses domaines SH2, à la membrane. Cela lui permet de rencontrer ses substrats, les Phosphatidylinositol-4-phosphate et Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, qui sont phophorylés sur la position D3 du cycle inositol pour produire respectivement du PI(3,4)P2 et du PI(3,4,5)P3. Ces lipides particuliers sont des messagers secondaires très importants pour les événements cellulaires. Ils sont spécifiquement reconnus par différentes protéines comme la PDK1 et AKT par leur domaine d'interaction PH. Cette interaction permet à AKT d'être phosphorylée sur des résidus masqués par un repliement intramoléculaire en absence de PIP3. Cette phosphorylation activatrice est majoritairement assurée par PDK1, mais d'autres éléments comme le complexe mTOR/GβL/SIN1/Rictor peuvent induire une activation d'AKT.
AKT activée est un acteur extrêmement important, qui assure l'activation de très nombreuses protéines impliquées dans la synthèse protéique (activation de la voie TOR), la survie cellulaire (inhibition des voies d'apoptose), la prolifération (activation du cycle cellulaire), le métabolisme (activation de transporteur de glucose), etc (Franke, 2008 ; Engelman *et al*, 2006).
Parmi la famille des Phospholipase C, l'isozyme γ est la seule à posséder des domaines SH2 et un domaine SH3 qui lui permettent d'interagir avec des protéines phosphorylées ou riches en proline. Ainsi lors de l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance, la PLCγ peut être directement recrutée via ses domaines SH2 au récepteur, ou par son domaine SH3 par des adaptateurs. Dans les deux cas, la protéine subit une phosphorylation activatrice. Comme toutes les PLC, la PLCγ catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 phosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG) (Figure 21). Ce sont des messagers secondaires nécessaires à la transduction de signaux. L'IP3 va s'accumuler et se fixer sur ses récepteurs du réticulum endoplasmique entraînant une sortie massive du calcium qu'il contient vers le cytoplasme. Le DAG en coordination avec le calcium permet l'activation de la protéine kinase C (Carpenter et Ji, 1999).

Une quatrième voie initiée par les RTKs prend de plus en plus d'importance dans la littérature et implique l'activation de membres des RhoGTPases du groupe des protéines G (Figure 21). Ces protéines font partie de la super famille des protéines Ras, à faible poids

moléculaire. Elles sont principalement impliquées dans la polarisation cellulaire, la migration et la morphologie en influant sur le cytosquelette. Comme toutes les GTPases, les RhoGTPases existent sous deux formes, une forme inactive associée à un GDP, et une forme active associée à un GTP. Le passage de la forme inactive à la forme active se fait sous l'influence d'une protéine GEF, tandis que l'hydrolyse du GTP est favorisée par une GAP (GTPase activating protein).

Plus de la moitié des 58 RTKs humains (dont PDGFR, IR, IGFR, ROS, VEGFR) sont capables de lier un membre de la sous famille RhoGEF. Lors de son activation, la protéine RhoGEF se fixe sur le récepteur, ce qui le place à proximité de la protéine RhoGTPase, qu'elle active. Les protéines Rho vont alors activer des protéines kinases effectrices comme PAK (p21 activated kinase) ou ROCK (Rho-kinase), cette dernière stabilise les filaments d'actine en activant la protéine LIMK (LIM kinase) qui phosphoryle la cofiline, inhibant son activité de dépolymérisation. ROCK entraîne aussi la contraction des filaments d'actine en phosphorylant les chaines légères de myosine. Une interaction directe des RhoGTPases avec les protéines Arp2/3 (responsable de la nucléation de l'actine), les Formines (comme diaphanous qui permet la croissance du filament), les profilines et les microtubules entraîne la formation de filaments d'actine et une régulation du cytosquelette en général (Schiller, 2006 ; zeng *et al*, 2000 ; Jaffe et Hall, 2005).

- ***Dégradation recyclage, déphosphorylation***

Comme nous l'avons vu, l'activation d'un RTK se doit d'être rapide et forte. L'augmentation exponentielle de son activité kinase est indispensable à l'induction des voies de signalisation cellulaire nécessaires aux réponses moléculaires adaptées. Cependant, il est tout aussi primordial pour le bon fonctionnement de la cellule, de mettre un terme à ces signaux, et « d'éteindre » les RTKs. Différents processus d'inhibition des voies de signalisation existent comme les rétrocontrôles négatifs, la dégradation des acteurs de ces voies et l'internalisation des récepteurs de surface (Figure 21).

Les rétrocontrôles négatifs existent à plusieurs niveaux dans les voies de signalisation (Figure 21). Dans les voies MAPKs, la MAPK va phosphoryler des protéines de sa cascade d'activation comme la MAP3K, ce qui diminue son activité catalytique. MAPK phosphoryle aussi la protéine SOS ce qui diminue les interactions SOS/Gbr2. Dans les deux cas, l'activation de la voie est diminuée voire interrompue. Enfin, MAPK intervient dans la voie PI3K en phosphorylant sa protéine adaptatrice diminuant le recrutement de la PI3K à la membrane et donc l'empêchant de rencontrer son substrat. La voie PLCγ peut être inhibée par la phosphorylation du récepteur lui-même par la protéine PKC, ce qui déclenche une perte d'activité comme dans le cas de l'EGFR.

Le RTK activé va aussi activer des protéines inhibitrices comme les tyrosines phosphatases. Ces protéines font partie de la famille des Protéines Tyrosines Phosphatases (PTP) dont l'importance dans les différents mécanismes cellulaires est de plus en plus mise en lumière. Ainsi, il a été démontré que les récepteurs EGFR, PDGFR, CSF-1R, IGFR, IR sont les substrats de deux PTP, la PTP-1B et TC-PTP, qui semblent réguler leurs voies de signalisation. Ces données ont été obtenues grâce à des lignées de souris déficientes pour ces deux phosphatases, qui présentent des résistances à l'insuline ou meurent rapidement après leur naissance suite à une probable activité chaotique des tyrosines kinases (Soulsby et Bennett, 2009 ; stman et b hmer, 2001).

Enfin, une part importante de l'extinction des signaux est due à l'internalisation des récepteurs dans la cellule. Ces mécanismes impliquent de nombreux acteurs et différentes voies d'endocytose, comme les voies dépendantes ou indépendantes des clathrines. Le modèle d'étude majeur des mécanismes d'endocytose des RTKs est l'EGFR. De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre les mécanismes d'internalisation et de recyclage du récepteur, particulièrement dans des modèles de lignées cellulaires cancéreuses. En condition normale et physiologique, le recyclage des récepteurs est en grande partie dépendant de leur activation par leur ligand. Cela entraîne une internalisation dépendante des clathrines qui conduit à l'acheminement des récepteurs vers l'endosome précoce. Cette étape est directement dépendante de la protéine Cbl (Huang et Sorkin, 2005 ; Thien et Langdon, 2005). Il s'agit d'une E3 ubiquitinyl ligase qui transfère la molécule ubiquitine portée par la protéine E2 sur une ou plusieurs lysines de sa protéine substrat. Composée d'un domaine TKB (tyrosine kinase binding), Cbl se fixe aux tyrosines phosphorylées contenues dans le domaine kinase d'un récepteur activé. Si son implication a été définie comme indispensable, les mécanismes moléculaires précis mis en jeu restent encore soumis à controverse. Des travaux ont montré que EGFR était monoubiquitinylée sur différentes lysines de son domaine intracellulaire et qu'elles seraient indispensables à l'internalisation du récepteur (Haglund *et al*, 2003). Cependant une étude réalisée par spectrométrie de masse a aussi mis en évidence la présence de polyubiquitinylation de type K69 (Huang *et al*, 2006). Plusieurs hypothèses mettent en avant la possibilité que d'autres acteurs impliqués dans l'internalisation du récepteur soient aussi ubiquitinylés par Cbl, mais à ce jour aucune donnée concrète n'est disponible. Les événements qui ont lieu à partir des endosomes précoces sont mieux compris. Il semblerait que par défaut, les récepteurs soient redirigés vers la membrane une fois leur ligand dissocié par le pH de l'endosome. Cependant, dans certaines conditions, comme l'accumulation de récepteurs, ou la polyubiquitinylation, les endosomes vont être reconnus par des protéines spécifiques qui vont conduire l'endosome précoce vers un endosome tardif, où le récepteur sera dégradé (Roepstorff *et al*, 2008).

Comme nous venons de le voir, les protéines kinases ont un rôle essentiel dans le fonctionnement de chaque cellule, dans la communication intercellulaire, ainsi qu'entre les organes. Des événements biologiques majeurs à l'échelle de l'organisme entier, comme l'immunité, la survie cellulaire, le cycle cellulaire, la reproduction et le développement des organismes dépendent de ces enzymes et ce dans l'ensemble du règne du vivant. Cependant malgré les nombreuses études qui y sont consacrées, notre compréhension de tous ces processus moléculaires et cellulaires reste partielle, particulièrement lorsque l'on s'éloigne des organismes modèles bien étudiés et qu'on s'adresse à des espèces invertébrés moins connues, comme le schistosome.

III. Protéine Kinases du schistosome – Importance dans le développement et la reproduction

Notre laboratoire s'intéresse aux processus biologiques et moléculaires qui ont lieu lors du développement et de la reproduction de *Schistosoma mansoni*. Comme nous l'avons vu, le cycle du schistosome passe par six stades morphologiquement très différents dont plusieurs stades larvaires impliquant des événements de différenciation extrêmement importants. De plus, les vers femelles sont caractérisés par une activité mitotique intense dans leurs organes reproducteurs conduisant à la formation de centaines d'œufs chaque jour, et ce sous l'influence directe du mâle. Ces deux caractéristiques font de ce parasite un modèle d'étude très intéressant. D'autre part, comme les œufs sont principalement responsables des symptômes de la maladie, l'identification de certains acteurs impliqués dans leur formation pourrait conduire à la mise en place de stratégies thérapeutiques. Les protéines kinases ont été identifiées comme des protéines de grand intérêt pour la recherche de nouveaux traitements contre le schistosome (Dissous et Grevelding, 2011). Chez les invertébrés, de plus en plus d'études établissent leur caractère essentiel dans le maintien des cellules souches, la division cellulaire, dans le développement des organismes (particulièrement les larves) et la reproduction.

1. Exemples d'implication de protéine kinases dans les mécanismes de développement/reproduction des invertébrés

a) Prolifération des cellules germinales :

Au cours d'études réalisées sur l'organisme modèle *C. elegans*, de nombreuses lignées mutantes ont été isolées et en partie caractérisées. Les gènes *daf* (dauer formation), qui influent sur le devenir d'une forme larvaire résistante aux conditions défavorables à son développement, ont été identifiés. L'un des plus célèbres est le gène *daf-2* qui code pour

l'homologue du récepteur à l'insuline. De nombreuses mutations du gène ont été constatées conduisant parfois à des phénotypes différents, probablement dus à des gains ou des pertes de fonction plus ou moins radicales. Il a été démontré que plusieurs mutations délétères aboutissaient à une fécondité réduite voire une stérilité des vers adultes, suggérant un rôle de DAF-2 dans la gonadogénèse ou le développement des cellules souches (Tissenbaum et Ruvkun, 1998 ; Patel *et al*, 2008). Cette hypothèse a été confirmée pour le mutant *daf-2(e1370)*, pour lequel une diminution très importante du nombre de cellules souches dans la zone proliférative des organes génitaux des adultes a été constatée. Le renouvellement de ces cellules non différenciées est indispensable pour la production des œufs tout au long de la vie du ver. Cette diminution est liée à une baisse de l'index mitotique des cellules germinales (et pas à une différenciation ou à de l'apoptose), qui découlerait d'une diminution de la signalisation DAF-2/AGE-1 (PI3K) initiée par deux ligands nommés ins-3 et ins-33 (Michaelson *et al* 2010).

Des études réalisées sur les cellules germinales de *D. melanogaster*, ont montré un mécanisme similaire à ce qui se déroule chez *C. elegans.* Le maintien et la prolifération des cellules souches de la mouche sont strictement dépendants de son régime alimentaire. En cas de régime pauvre, les cellules diminuent leur prolifération suite à une augmentation de la durée de leur phase G2. Plusieurs senseurs de nutriments sont impliqués dans cette régulation. Il y a d'une part le récepteur à l'insuline (IR) qui, *via* une voie dépendante de la PI3K va conduire à l'activation de la transition G2-M. Cette activation peut aussi se faire via l'activation de la protéine TOR (Target of Rapamycine). La voie TOR peut être activée par l'IR mais aussi par des mécanismes plus directs n'impliquant pas de récepteur transmembranaire. Les acteurs exacts de cette activation n'ont pas encore été identifiés mais ils pourraient être des senseurs cytoplasmiques d'acides aminés. Une implication de la voie TOR dans la transition G1-S à l'instar de *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* est aussi envisagée (Hsu *et al,* 2008 ; Lafever *et al,* 2010).

b) Ovogénèse :

D'autres récepteurs aux facteurs de croissance prennent une part active à l'ovogénèse de la drosophile, dans une phase plus tardive que l'IR. Au commencement de l'ovogénèse, une partie des cellules souches de la mouche subit un début de différenciation dans une partie de l'ovaire appelée germarium. Les cellules germinales forment un cystoblaste en se divisant par cytokinèse imparfaite pour donner 15 cellules nourricières et 1 ovocyte liées entre elles par des jonctions membranaires qui permettent le passage d'ARNm, de protéines et de réserves nutritives. Chaque cystoblaste est entouré de cellules folliculaires, provenant des cellules souches folliculaires, qui vont former la chambre de l'œuf (Figure 22A). Cet

ensemble subit alors une maturation en 10 stades avant la fécondation. L'ovocyte mature est polarisé chez la drosophile, la mise en place des axes A-P (apical proximal) et D-V (dorsal-ventral) est marquée dès le stade 5. La migration de certaines cellules est nécessaire pour assurer cette polarisation et la structure du futur embryon (Sardet *et al,* 2004). C'est le cas de cellules folliculaires particulières, appelées « border cells », qui vont traverser de A vers P (où se situe l'ovocyte) à travers les cellules germinales (Figure 22B), puis de V vers D (Figure 22C). Ces cellules permettent la formation du micropyle qui assure l'entrée du sperme dans l'ovocyte mature pour la fertilisation (Montell *et al*, 1992).

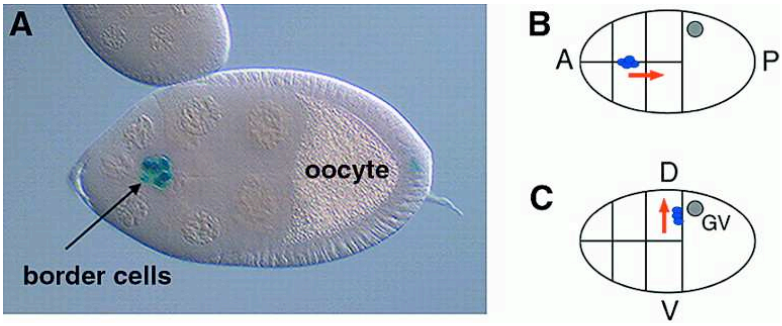


Figure 22 : A : Œuf de stade 9, les border cells sont marquées en bleu, B : Schéma de la migration des border cells sur l'axe A-P, C : migration des cellules vers la partie dorsale de l'œuf.

La migration des border cells est assurée par un mécanisme chimio attractif mettant en jeu deux types de molécules solubles et deux récepteurs transmembranaires. La première partie de la migration met en jeu un homologue des récepteurs au PDGF/VEGF humain nommé PVR (et son ligand PVF-1) et l'homologue du récepteur à l'EGF (et ses ligands Gurken, Vein et Spitz). Les deux récepteurs sont exprimés par les border cells. PVF-1 a été détecté en grande quantité au stade 7-8 dans l'ovocyte grâce à des anticorps spécifiques. Puis au stade 9, les cellules germinales qui séparent les border cells de l'ovocyte semblent produire le ligand le long du chemin qu'elles devront suivre. Vein et Spitz semblent avoir le même profil d'expression tandis que Gurken est exprimé par la vésicule germinale (GV). Les deux récepteurs ont montré un rôle essentiel dans la migration A-P, mais seul l'EGFR est nécessaire à la migration V-D sous l'influence de Gurken. Les deux récepteurs induisent l'activation de la voie MAPK classique, ainsi que des voies PI3K et PLCγ. Cependant la migration est spécifiquement due à l'activation d'une autre voie, dépendante d'un membre de la famille des RhoGTPases, la protéine RAC et de son activateur MBC, un homologue de la protéine DOCK180 mammifère (Duchek et Roth, 2001 ; Duchek *et al,* 2001).

c) Différenciation : exemple de l'abeille mellifère

Le cas de l'abeille est un parfait exemple de l'importance des voies de signalisation dans le devenir des individus en réponse aux facteurs environnementaux. En effet, chez cette espèce d'insecte social, il existe deux types d'individus femelles. La première, la reine, est extrêmement différenciée dans l'unique but ou presque de produire des œufs et d'assurer le renouvellement de la population de la ruche. Elle possède des organes reproducteurs très développés avec plus de 180 ovarioles (éléments constitutifs des ovaires responsables de la formation des œufs). A l'inverse les ouvrières qui assurent les différentes tâches de la ruche possèdent des organes reproducteurs atrophiés (2 à 12 ovarioles), maintenus dans cet état par des hormones produites par la reine (Snodgrass, 1956). La reine et les ouvrières sont morphologiquement très distinctes pourtant elles proviennent toutes du même œuf et de la même larve. La détermination de la caste dépend de la façon dont seront nourris les larves durant leur développement. Au cours des trois premiers jours, la larve est nourrie de gelée royale, une nourriture très riche en élément nutritif produite par les abeilles nourricières. Puis les larves destinées à devenir des ouvrières sont nourries avec un mélange de pollen et de miel beaucoup moins riche. Quant aux larves de reines, elles continuent à être alimentées de gelée royale et ce en grande quantité.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le choix de caste ont longtemps été mal connus. Quelques études impliquaient la protéine kinase TOR mise en évidence chez l'abeille. Cette protéine est connue comme un senseur de nutriments et particulièrement d'acides aminés. Des expériences d'ARNi ciblant TOR chez des larves encore non différenciées ont montré que ces larves nourries suivant un régime riche s'engageaient vers la production d'abeilles ouvrières et non vers la production de reine. De même, des larves destinées à devenir reine (à un stade plus avancé) donnent majoritairement des ouvrières après interférence de AmTOR (Patel *et al,* 2007). Les voies IR/IR-like ne semblent pas être impliquées dans ces événements de différenciation (Vicente de Azevedo et Hartfelder, 2008), suggérant l'implication d'autres acteurs sensibles au régime alimentaire subi par la larve. La découverte très récente de la royalactine, une protéine de 57 kDa présente dans la gelée royale a démontré son implication décisive dans le devenir reine/ouvrière. Un effet de la royalactine sur la taille et le développement de *D. melanogaster* a été aussi été constaté. L'utilisation de souche de drosophiles mutantes pour différents récepteurs a montré l'implication directe de l'EGFR. Ces données ont été confirmées chez l'abeille par des expériences d'ARNi. Ainsi la royalactine induit la formation des reines via l'action de l'EGFR (Kamakura, 2011).

2. Protéine kinases et développement/reproduction du schistosome

Suite au séquençage complet du génome (Berriman *et al*, 2009) et à l'analyse de son kinome, 252 ePKs putatives ont été identifiées comprenant des membres des principaux groupes. Ainsi le groupe CaMK comprend 18 membres dont une MAPKAPK (MAPK associated protein kinase) et une MLCK (myosin light chain kinase). Le groupe CMGC est représenté par 27 membres dont 14 CDKs et 9 MAPKs (ERK, p38, JNK). Dans le groupe STE, 7 STE7 (MAPKK), 2 STE11 (MAP3K) et 13 STE20 (MAP4K) ont été identifiées. Les groupes RGC et CK1 sont les plus petits chez le schistosome, avec respectivement 3 et 6 membres. Le groupe des AGC comprend 13 familles de protéines dont 5 PKA, 4 PKC, et 4 PKG ainsi que plusieurs sous-unités de PKA et PKC suggérant des combinaisons d'holoenzymes importantes. Le groupe des TLK est composé de 19 membres dont Raf (MAP3K) et les STKR (Serine/threonine kinase Receptors qui fixent l'activine et le TGFβ). Enfin le groupe des TK comprend 15 RTKs et 19 CTKs, dont deux IR, quatre EGFR, deux SRC, une SYK et deux Abl (Andrade *et al*, 2011). Actuellement seule une fraction de ces kinases fait l'objet d'études expérimentales. Plusieurs d'entre elles ont été associées aux organes reproducteurs des vers adultes et/ou aux stades larvaires et seraient indispensables à la reproduction du parasite et à son développement (Knobloch *et al*, 2007 ; Beckmann *et al,* 2010b).

a) Les sérine-thréonine kinases

Plusieurs membres du groupe des sérine-thréonine kinases ont été clonés et caractérisés. C'est le cas de la Protéine kinase SmPlk1 (*Schistosoma mansoni* Polo-like Kinase), un homologue de la protéine Polo de *Drosophila* (Long *et al*, 2010). Les Plks sont d'importants régulateurs de la progression du cycle cellulaire pendant la phase M. Elles sont impliquées dans la formation des fuseaux mitotiques et dans l'activation des Cdks. SmPlk1 est abondamment transcrit dans les sporocystes ainsi que dans les cellules vitellines et les ovocytes des vers adultes femelles, deux stades connus pour leur activité mitotique élevée. L'expression de SmPlk1 en système hétérologue a permis de montrer son implication directe dans l'activation de la protéine Cdc25C qui active le MPF (mitogen promoting factor) responsable de la transition G2/M. L'utilisation sur des vers adultes en cultures du BI 2536 un inhibiteur spécifique des Plks (et très efficace sur SmPlk1), provoque une altération importante des organes reproducteurs des vers. Ce composant semble interférer avec la gamétogénèse et empêcher la formation des spermatozoïdes et des ovocytes (Long *et al*, 2010).

Plusieurs protéines de la voie TGFβ (Transforming growth factor beta) ont aussi été identifiées chez le schistosome (LoVerde *et al*, 2007). SmTRI (Sm TGFβ Receptor type I),

SmTRII, et leurs partenaires cytoplasmiques SmSmad 1B, 2 et 4 ont été localisés au niveau du tégument des vers adultes (Osman *et al*, 2001 ; Osman *et al*, 2004 ; Carlo *et al*, 2007). Des expériences *in vitro* ont montré que les récepteurs étaient activables par le TGFβ humain. SmTRI et SmTRII pourraient donc jouer un rôle important dans les relations hôte/parasite. De plus, la voie TGFβ régule l'expression de la protéine SmGCP (Gynecophoral canal protein), produite au niveau du canal gynécophore et qui permet aux vers de s'apparier. Des expériences d'ARNi ciblant SmTRII ont montré une diminution de la production de SmGCP (Osman *et al*, 2006). Chez *S. japonicum* les expériences d'ARNi ciblant SjGCP ont montré que les vers interférés n'étaient plus capables de s'apparier (Cheng *et al*, 2005). Sans appariement, les vers femelles ne peuvent développer leurs ovaires et pondre.

Deux ligands ont été identifiés chez *S. mansoni,* une molécule proche de l'Inhibine/ Activine (SmInACT) et une molécule proche des Bone Morphogenic Protein (SmBMP) (Freitas *et al,* 2007 ; Freitas *et al*, 2009). Chez la femelle, SmInAct, SmTRI et SmTRII sont aussi exprimés dans les cellules vitellines. Des expériences d'ARNi de SmInAct sur des vers adultes ou des œufs ont montré que la majorité de ces derniers étaient incapables de se développer correctement. Ces expériences ont été complétées par une autre équipe avec l'utilisation d'un inhibiteur de la voie TGFβ, le TRIKI (TβRI kinase inhibitor). Les vers traités par TRIKI ont une activité mitotique dans le vitellarium réduite de 40%, corrélée à une production d'œufs diminuée de 30% (Knobloch *et al*, 2007).

Dans cette étude, les auteurs ont mis en avant la possibilité d'une interaction entre la voie TGFβ et des voies impliquant des Tyrosine Kinases.

b) Les PTKs

Grâce au travail de différentes équipes dont la nôtre, plusieurs PTKs ont été identifiées, clonées et en partie caractérisées.

SmFes est un orthologue des membres de la famille Fes/Fps/Fer humaine. Ces protéines sont principalement impliquées dans la régulation des interactions cellule/cellule et cellule/matrice et semblent activées par les kinases SRC et JAK (Greer, 2002). La structure de SmFes diffère de ses orthologues mammifères puisqu'elle ne possède pas le site de fixation aux microtubules FCH, se rapprochant de celle de *C. elegans*. Elle possède en plus une insertion dans le domaine SH2 dont la conséquence sur sa capacité à fixer les séquences phosphorylées n'a pas été évaluée. Les transcrits de SmFes ont été détectés à tous les stades parasitaires en faible intensité. De même, la protéine a été détectée dans tous les stades avec une intensité plus importante dans les cercaires. L'immunolocalisation de la protéine montre qu'elle est présente dans le tégument des cercaires et des

schistosomules ainsi que dans le térébratorium des miracidiums. Des expériences préliminaires de pull-down ont montré une interaction entre SmFes et la PI3K impliquée dans la voie IR. SmFes pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes de fixation de la larve à son hôte (miracidium/mollusque et cercaire/mammifère) ainsi que dans la transformation du schistosomule pour s'adapter à son hôte définitif. La présence des transcrits SmFes en grande quantité chez le mâle suggère un autre rôle de la kinase à ce stade (Ludolf *et al*, 2007 ; Bahia *et al*, 2007).

Les kinases SmTK3, SmTK4 et SmTK5 ont été découvertes par criblage d'une banque d'ADNc de femelles, à l'aide d'une séquence, correspondant à une partie conservée des domaines Tyrosine kinase. SmTK3 et SmTK5 présentent de fortes homologies avec les kinases SRC tandis que SmTK4 se rapproche des kinases SYK.

La découverte d'une protéine homologue à SYK chez le schistosome est surprenante si l'on considère que ces kinases sont principalement associées à la réponse immunitaire adaptative des organismes supérieurs. Cependant, la découverte de protéines semblables aux SYK chez différents invertébrés suggère une origine plus ancienne de la protéine. Aucune SYK n'a été identifiée chez *C. elegans*, cependant *D. melanogaster* possède une « SH2 domain ankyrin repeat kinase » (SHARK), une SYK possédant en plus un domaine de fixation ankyrin. Le cnidaire Hydra et certaines éponges possèdent deux SYK, une proche de celle des vertébrés et l'autre de la drosophile. Ces données suggèrent des pertes et des gains au cours de l'évolution des métazoaires. Elles confirment aussi la forte possibilité que les SYK ne soient pas dédiées exclusivement à la réponse immunitaire adaptative puisque celle-ci n'a pas lieu chez les insectes ou les invertébrés peu évolués. Ainsi, de plus en plus de preuves sont données sur les fonctions « non immunitaires » des SYK, comme l'adhésion cellulaire, le métabolisme osseux, les fonctions plaquettaires et le développement vasculaire. Une fonction encore peu documentée associerait SYK aux voies de signalisation des intégrines et du récepteur au TNF (Móscai *et al,* 2010).

SmTK4 possède quelques particularités de structure qui pourraient induire une fonction différente des SYK de vertébrés. SmTK4 a une taille double de celle des SYK répertoriées, soit 1264 acides aminés. De larges domaines C- et N-terminaux ainsi qu'une insertion entre les deux domaines SH2 (caractéristique des SYK) expliquent cette différence de taille (Knobloch *et al,* 2002). Chez les vertébrés, les deux domaines SH2 fonctionnent en tandem majoritairement pour la reconnaissance de séquences appelées ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Based Activation Motifs) qui possèdent deux tyrosines phosphorylées à la suite de l'activation des récepteurs. Cependant, certaines voies de signalisation sont indépendantes des ITAM comme celles relayées par les intégrines et les lectines (Móscai *et al,* 2010). SmTK4, du fait de l'insertion importante entre ses deux domaines SH2 et de l'absence d'une séquence consensus impliquée dans la reconnaissance des ITAM, pourrait médier une voie

indépendante des ITAM en accord avec l'absence d'immuno-récepteur chez le parasite (Knobloch *et al*, 2002).

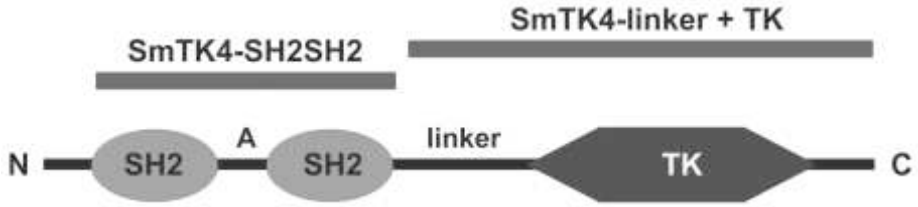


Figure 23 : Schéma de la structure de SmTK4 ; Les séquences utilisées pour le criblage de la banque double hybride sont indiquées (SmTK4-SH2SH2 et SmTK4-linker+TK) (Beckmann *et al*, 2010).

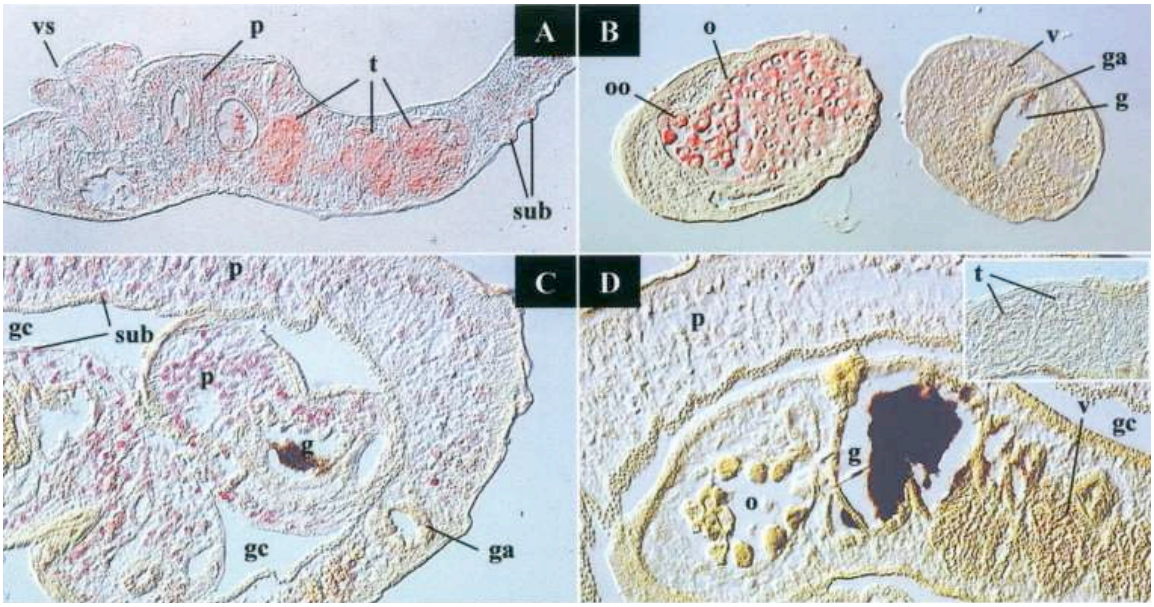


Figure 24 : Hybridation in situ de SmTK4 sur coupe de vers mâles et femelles : (A–C) Résultats obtenus avec la sonde antisens : marquage dans les testicules (t) chez le mâle, dans les ovocytes (oo) de la femelle ainsi que dans le parenchyme (p) et la zone soutégumentaire (sub) des deux vers. (D) sonde sens servant de contrôle négatif. (vs, ventouse ventrale, ovaire (o), vitellarium (v), gastroderme (ga), tube digestif (g).

Pour identifier les partenaires de SmTK4, un criblage d'une banque en levure d'ADNc de couples de schistosome adultes a été effectué en utilisant les domaines SH2 ou le domaine TK et ses séquences adjacentes comme appâts (Figure 23). Les domaines SH2 interagissent *in vitro* avec les kinases SmTK3, SmTK5 et SmTK6 (identifiée durant cette étude). Le domaine TK interagit avec une mapmoduline (protéine interagissant avec les protéines associées aux microtubules (MAPs)) et la protéine homologue humaine PM20/PM21 (MAPK-activating protein). Ces deux dernières protéines pourraient être des substrats de SmTK4 tandis que les premières seraient des partenaires situés en amont dans la voie de signalisation. SmTK4 et ses partenaires potentiels ont été localisés par hybridation

in situ dans les ovaires, les testicules ainsi que dans le parenchyme des deux sexes (Figure 24).

Des expériences utilisant un inhibiteur spécifique des SYK, le piceatannol, sur des vers adultes en culture, ont montré que les organes reproducteurs visualisés au microscope confocal laser après coloration au rouge carmin présentaient des anomalies importantes par rapport aux vers témoins. Des expériences d'ARNi de SmTK4 ont confirmé ces phénotypes : diminution de la taille des testicules, accumulation d'ovocytes matures au détriment des ovocytes immatures dans les ovaires, résultant en une diminution de 50% du nombre d'œufs pondus. SmTK4 serait donc impliquée dans un mécanisme d'arrangement des microtubules important pour la gamétogénèse du schistosome en agissant potentiellement avec SmTK3 et SmTK5 (Beckmann *et al*, 2010a).

SmTK3 est l'une des premières CTK caractérisées chez le schistosome. Elle est homologue à SRC et fait l'objet de nombreuses recherches depuis des dizaines d'années. Les protéines de la famille SRC sont composées d'un domaine SH3 suivi d'un domaine SH2 et d'un domaine kinase en C-term. En N-term se trouve le site de myristoylation. Les SRC peuvent être activées par des kinases cytoplasmiques comme CSK (C-terminal SRC kinase) ou FAK, mais aussi par des RTKs (exemple : EGFR, HER2, FGFR, PDFGR, VEGFR). Les SRC jouent un rôle dans l'adhésion et la prolifération cellulaire (Aleshin et Finn, 2010).

SmTK3 est exprimée à tous les stades parasitaires, y compris chez les adultes provenant d'infections unisexes. Transcrits et protéines ont été localisés respectivement par hybridation *in situ* et immuno-localisation dans le cytoplasme des cellules vitellines, dans les ovaires, les testicules et dans le parenchyme des adultes mâles et femelles (Figure 25). Tout comme SmTK4, SmTK3 est beaucoup plus grande que ses homologues à cause d'un domaine C-terminal important. La justification d'une telle différence de taille n'est pas très claire mais pourrait être liée à une spécificité de substrat.

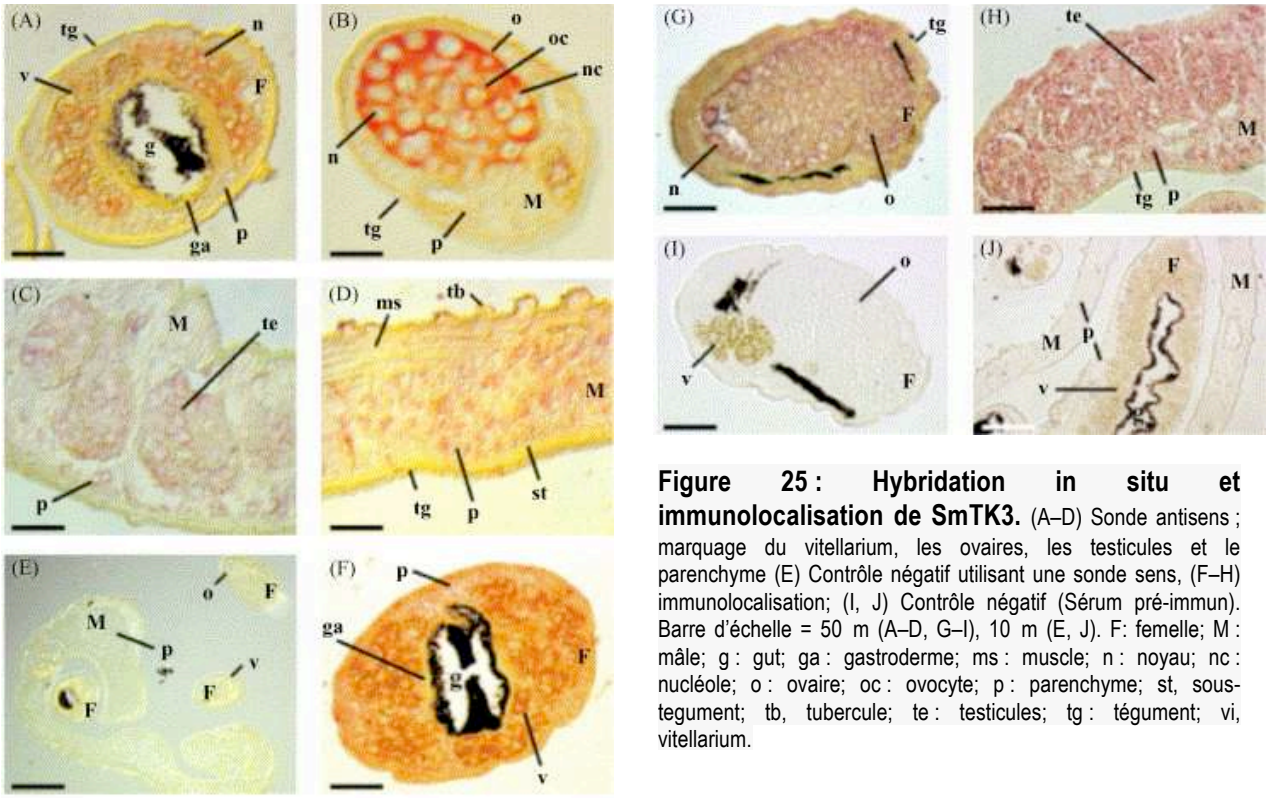


Figure 25 : Hybridation in situ et immunolocalisation de SmTK3. (A–D) Sonde antisens ; marquage du vitellarium, les ovaires, les testicules et le parenchyme (E) Contrôle négatif utilisant une sonde sens, (F–H) immunolocalisation; (I, J) Contrôle négatif (Sérum pré-immun). Barre d'échelle = 50 m (A–D, G–I), 10 m (E, J). F: femelle; M : mâle; g : gut; ga : gastroderme; ms : muscle; n : noyau; nc : nucléole; o : ovaire; oc : ovocyte; p : parenchyme; st, sous-tegument; tb, tubercule; te : testicules; tg : tégument; vi, vitellarium.

Pour identifier les partenaires de SmTK3 deux approches de criblage de banque d'ADNc ont été utilisées. La première consistait à cribler une banque d'ADNc de drosophile avec le domaine SH3 de SmTK3. Plusieurs protéines ont été identifiées comme la vinculine (protéine associée à l'actine), dAbi (protéine interagissant avec Abl) et la β-tubuline (Kapp *et al*, 2004). Ces trois protéines jouent incontestablement un rôle dans la réorganisation du cytosquelette et dans l'adhésion cellulaire et ont déjà été décrites comme des partenaires des SRC humaines (Aleshin et Finn, 2010). Plus tard, les auteurs ont utilisé une banque d'ADNc de schistosome et l'ont criblée avec le domaine SH3 ou le domaine SH3 associé à la séquence en amont du domaine « le site unique ». Dans cette étude, SmTK3 s'associe à différents partenaires comme des représentants de la famille des Smad appartenant à la voie TGF-β et au facteur d'initiation de la transcription eIF-4. Les auteurs ont aussi confirmé l'association de SmTK3 avec des protéines du cytosquelette comme une protéine homologue à la protéine humaine verproline (similaire à la protéine vinculine identifiée précédemment), la pericentrine B, ainsi que la protéine SmDia, de la famille des Diaphanous, connue pour son rôle dans la voie Rho (Quack *et al*, 2009).

L'utilisation d'Herbimycine A, un inhibiteur spécifique des kinases SRC, sur des vers adultes en culture, entraine une diminution de 25 à 75% de l'activité mitotique des femelles matures suivant la concentration utilisée. Cette diminution est similaire à celle obtenue lors du désappariement des femelles et à la régression de leurs organes reproducteurs. Les mâles ne semblent pas affectés par l'inhibiteur, suggérant un rôle spécifique des SRC dans

l'activité mitotique des femelles. Sachant que l'organe possédant l'activité mitotique la plus intense est le vitellarium, il est intéressant de supposer que SmTK3 jouerait un rôle décisif dans la multiplication des cellules vitellines. Bien sûr, le nombre d'œufs pondus diminue chez les vers traités par rapport aux témoins. Cependant, de façon inattendue, une augmentation de la transcription du gène p14, une protéine associée à la formation de la coquille de l'œuf a été constatée. L'activation de la voie SmTK3 serait strictement dépendante de l'appariement et d'une stimulation par le mâle (Knobloch *et al,* 2006).

L'ensemble des données disponibles suggèrent que SmTK3 est impliquée dans la régulation de la transcription de gènes indispensables au fonctionnement des organes reproducteurs et dans la prolifération des cellules non différenciées du vitellarium en régulant la réorganisation du cytosquelette.

La kinase SmTK6 s'est révélée être le partenaire le plus fort de SmTK4 lors des tests de double hybride en levure. Elle possède un domaine SH2, un domaine SH3 et un domaine TK, une structure spécifique des protéines SRC. Cependant, des analyses phylogénétiques placent plutôt SmTK6 hors du groupe des SRC mais proche du groupe des Abl (Beckmann *et al*, 2010a). Cet hybride SRC/Abl semble spécifique du schistosome. Deux autres « vraies » Abl (SmAbl1 et SmAbl2) ont été par la suite identifiées puis clonées (Beckmann et Grevelding, 2010). Les transcrits de ces trois kinases ont été localisés dans les ovaires, les testicules, faiblement dans les cellules vitellines ainsi que dans le parenchyme et le gastroderme des deux sexes (Figure 26 et 27).

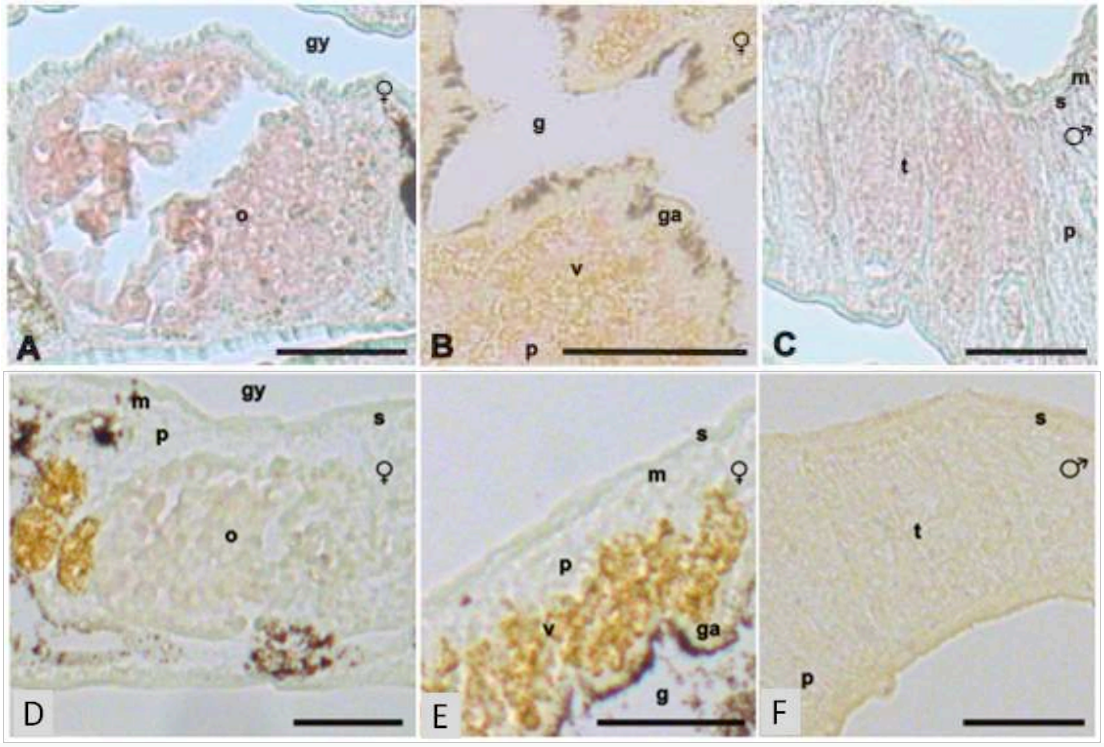


Figure 26 : Hybridation in situ de SmTK6 sur coupes de vers adultes. (A-C) Sonde antisens, marquage des ovocytes (o), dans vitellarium (v), le parenchyme (p) et les testicules (t). (D-F)Contrôle négatif utilisant une sonde sens. Barre d'échelle: 5µm. (g, gut; gy, Canal gynécophore) (d'après Beckmann *et al*, 2010).

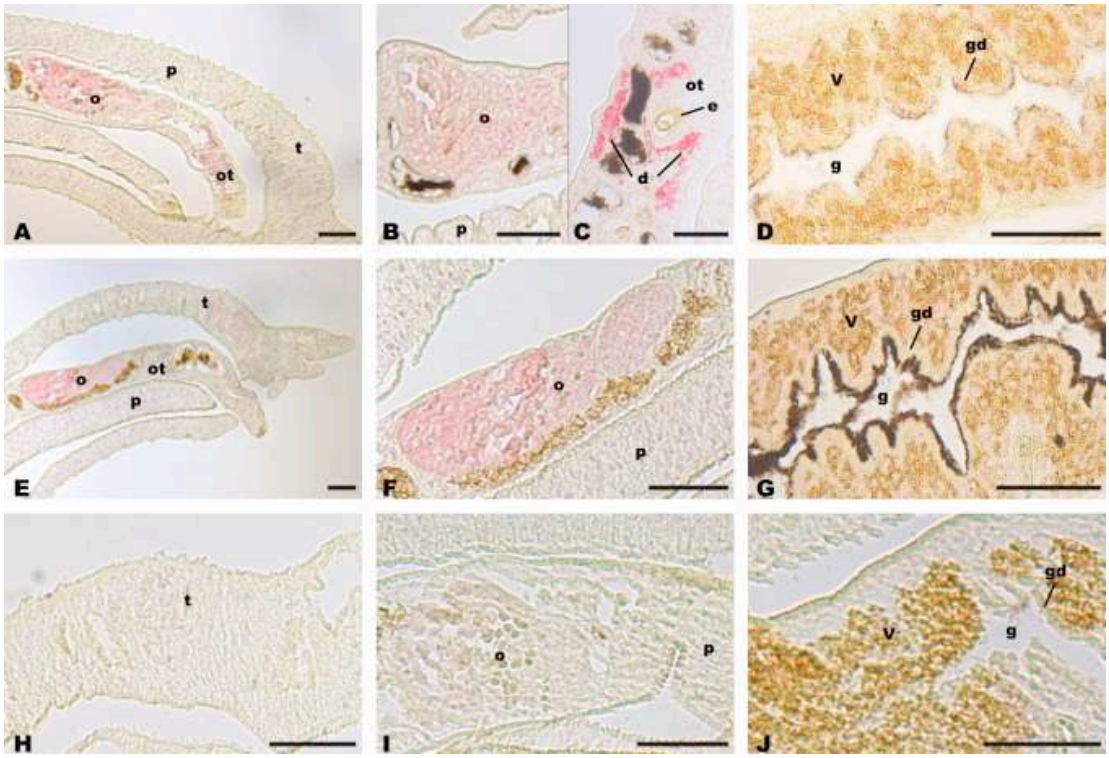


Figure 27 : Hybridation in situ de SmAbl1 et SmAbl2 sur coupes de vers adultes. A-D : Sondes anti-sens de SmAbl1 ; E-F : Sonde anti-sens de SmAbl2 ; Marquage important de l'ootype (ot) ((d) comprenant vitelloducte et oviducte), de l'ovaire (o) chez la femelle et des testicules (t) chez le mâle. Marquage faible du vitellarium (v), du gastroderme (gd) et du parenchyme (p). H-J : Contrôle négatif utilisant les sondes sens de SmAbl2. (e, œufs; g, gut; barre d'échelle : 50 m) (D'après Beckmann et Grevelding, 2010).

Etant donné l'efficacité des inhibiteurs kinases sur les autres CTKs parasitaires, l'impact de l'utilisation d'un inhibiteur d'Abl a été évalué sur des vers adultes en culture. L'imatinib ou gleevec est une molécule très connue dans le domaine de la cancérologie, puisqu'elle est utilisée comme traitement contre la leucémie myéloïde chronique et les tumeurs gastro-intestinales, où elle cible le récepteur oncogène BCR-Abl et le récepteur Kit. Chez le schistosome, l'effet de cet inhibiteur est spectaculaire dès 24 heures à une dose de 100µM. Les ovaires, les testicules et le vitellarium subissent des dommages très importants : taille des organes modifiée, désorganisation des structures tissulaires, cellules anormales… En plus des organes reproducteurs, le gastroderme des vers subit ce qui semble être une désagrégation importante. Les tissus touchés coïncident bien avec la localisation des transcrits des trois kinases SmTK6, SmAbl1 et 2. Des doses plus faibles d'inhibiteur (≤50µM) provoquent le désappariement des vers dès 24h, et induisent leur mort dès 48h (Beckmann et Grevelding, 2010). L'efficacité de l'imatinib *in vivo* dans la protection des souris contre l'infection est envisagée.

La majorité des voies impliquant des CTKs sont activées par des récepteurs tels que les récepteurs tyrosine kinase. Chez le schistosome, plusieurs RTKs ont déjà été caractérisés.

En 1992, l'équipe de C.B. Shoemaker a cloné le premier RTK de *S. mansoni*, l'orthologue du récepteur à l'EGF, appelé SER (Schistosoma EGF Receptor) (Shoemaker *et al*, 1992). Cette protéine de 190 kDa possède une forte homologie avec ses orthologues vertébrés au niveau de son domaine intracellulaire mais un domaine extracellulaire de fixation au ligand plus variable. Il a été montré par immuno-localisation que SER est exprimé principalement dans les muscles des vers adultes (Ramachandran *et al*, 1996). Par des expériences de RT-PCR quantitative, notre équipe a ensuite montré que le gène *ser* est exprimé à tous les stades parasitaires, et particulièrement chez le mâle qui l'exprime 30 fois plus que le stade sporocyste (Vicogne *et al*, 2004). SER a montré une activité tyrosine kinase dépendante de son activation par l'EGF humain et entraînant la phosphorylation de la protéine Erk dans deux modèles d'expression hétérologues distincts (cellules de mammifères et ovocytes de xénope) (Vicogne *et al*, 2004). Pour déterminer l'impact de l'EGF sur les parasites, des sporocystes en culture ont été traités en présence d'une dose croissante d'EGF. Une augmentation significative du taux de synthèse d'ADN et protéique a été constatée en fonction de la dose d'EGF (Vicogne *et al*, 2004). Etant donné que les principaux acteurs de la voie Ras/MAPK sont retrouvés chez le schistosome (Schussler *et al*, 1997), et que SER est capable *in vitro* d'induire son activation, on peut supposer que sous l'influence de son ligand (potentiellement l'EGF de l'hôte), SER active une voie Ras/MAPK induisant la prolifération cellulaire chez l'adulte mais aussi chez le sporocyste et participant donc à son développement. Un mécanisme similaire a été démontré chez le parasite cestode *Echinococcus multilocularis* (Spiliotis *et al*, 2003 ; Brehm, 2010).

La capacité du ver à fixer les facteurs de croissance de son hôte a poussé notre équipe à rechercher d'autres récepteurs chez le schistosome. En utilisant des amorces dégénérées ciblant le domaine catalytique des RTKs, trois récepteurs ont été identifiés dont deux protéines homologues aux IR humaines (SmIR-1 et SmIR-2) (Khayath *et al*, 2006 ; Vicogne *et al*, 2003). La découverte de deux IRs chez un invertébré est très surprenante, en effet, il est connu qu'un seul IR régule la croissance et le métabolisme chez les invertébrés contrairement aux vertébrés chez lesquels IR et IGF-R assurent respectivement ces fonctions. SmIR-1 et SmIR-2 sont exprimés dans l'ensemble des stades parasitaires, rejetant la possibilité d'un rôle stade spécifique. De plus, SmIR-2 est relativement plus exprimé que SmIR-1 dans tous les stades. SmIR-1 et SmIR-2 ne partagent que 26% d'identité de séquence entre eux. Ils ne possèdent pas l'ensemble des caractéristiques des IR, comme le site de clivage des furines protéases, ou dans le cas de SmIR-1, les sites de fixation des protéines adaptatrices tels que les IRS ou SHC. D'ailleurs si une protéine SHC potentielle est présente dans le génome du schistosome aucun IRS n'a été trouvé. Les deux IRs possèdent en plus un insert dans leur domaine catalytique comme c'est le cas pour l'IR d'*E. multilocularis (*Konrad *et al*, 2003). Des résultats préliminaires ont montré que SmIR-1

possède bien une activité kinase (Vanderstraete, non publié), les expériences sont en cours pour SmIR-2. L'utilisation d'anticorps polyclonaux sur des coupes de vers adultes a montré la présence de SmIR-1 dans la membrane basale du tégument, dans les muscles et l'épithélium intestinal des parasites. SmIR-2 est retrouvé dans le parenchyme des deux sexes (Figure 28).

La colocalisation de SmIR-1 avec les transporteurs de glucose SGTP1 et SGTP4 suggère une participation de l'IR dans le métabolisme du glucose et notamment le déclenchement de son incorporation (Ahier *et al*, 2008). La participation de SmIR-2 dans le métabolisme ne peut pas être exclue, mais il est tentant de supposer qu'à l'instar de l'IGFR vertébré, SmIR-2 influerait plus sur le contrôle de la croissance, *via* la fixation des protéines adaptatrices à son domaine intracellulaire (dont les sites de fixation sont absents chez SmIR-1). Des expériences visant à évaluer l'impact des SmIRs dans la transformation et le développement des stades larvaires sont engagées au laboratoire (Vanderstraete, non publié).

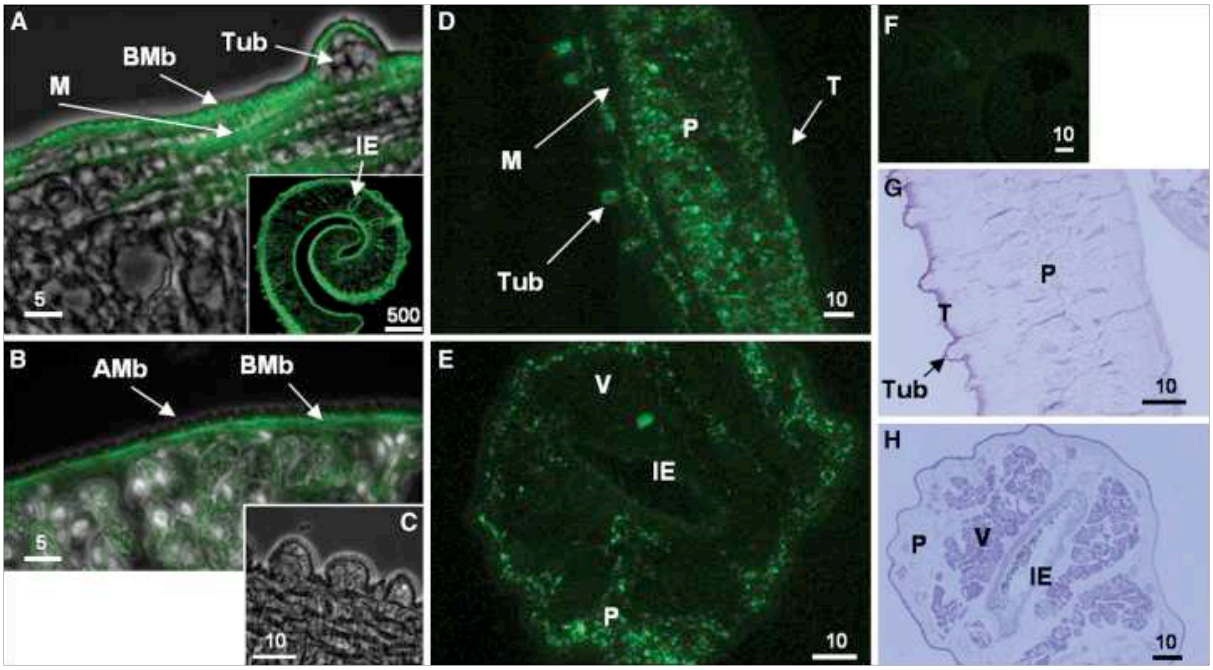


Figure 28: Immunolocalisation de SmIR-1 et SmIR-2 sur des coupes de vers adultes. A, B: Sérum anti-SmIR-1; D, E Sérum anti-SmIR-2. Des anticorps secondaires couplés au fluorophore Alexa 488 sont utilisés pour la révélation. La fluorescence est visualisée avec un microscope à fluorescence. SmIR-1 est détecté dans la membrane du tégument, dans les muscles et dans l'épithélium intestinal du mâle et de la femelle. SmIR-2 est localisé dans le parenchyme du mâle (D) et de la femelle (E). Contrôle négative: Sérum pré-immun (C-F). Coloration au bleu de Toluidine de coupes de vers adultes mâle et femelle. Barre d'échelle en µm. AMb, membrane apicale; BMb, membrane basale; IE, épithélium intestinal; M, muscles; P, parenchyme; T, tégument; Tub, tubercule; V, cellules vitellines (D'après Khayath *et al*, 2006).

Lors de la découverte des SmIRs, un troisième récepteur a été identifié. D'abord nommé SmRTK-1, il a vite été renommé VKR pour Venus Kinase Receptor à cause de sa structure particulière.

IV. Les VKRs (Venus Kinase Receptors)

1. SmVKR : découverte d'un récepteur atypique chez *S. mansoni*

SmVKR1 (anciennement SmRTK-1) a été découvert lors de la recherche des récepteurs à l'insuline grâce à des amorces dégénérées ciblant une partie conservée des domaines tyrosine kinase des IR. Après amplification et détermination des extrémités, une séquence de 6022 pb a été obtenue, codant pour une protéine de 1559 acides aminés (Vicogne *et al*, 2003). Les analyses structurales confirmaient la présence d'un domaine tyrosine kinase partageant une forte identité de séquence avec les domaines TK des IR de *C. elegans*, *Mus musculus* et *D. melanogaster*. Cependant, de façon totalement inattendue, le domaine extracellulaire de fixation au ligand n'avait rien de commun avec celui des IR. Les recherches dans les bases de données ont révélé la présence d'un domaine proche des domaines de fixation aux ligands des récepteurs métabotropiques au GABA (acide γ-aminobutyrique) nommés Venus FlyTrap modules (Pin *et al*, 2003). Jusqu'alors aucun RTK recensé n'était composé d'un tel domaine.

Les domaines VFT sont retrouvés dans un grand nombre de famille de protéines dans l'ensemble du vivant. Chez les bactéries, ce domaine est très représenté, souvent retrouvé sous le nom de PBP (Periplasmic Binding Protein), il sert de senseur de molécules et participe à leur transport ou déclenchant des mécanismes de chimiotactisme en activant les flagelles. Chez les eucaryotes ces domaines sont retrouvés chez les récepteurs couplés aux protéines G de classe III, des récepteurs ioniques et le récepteur à l'ANF (Atrial Natriuretic Factor) (Pin *et al*, 2003).

Les domaines VFT sont des structures globulaires composées de deux lobes séparés par trois charnières qui permettent la fermeture des deux lobes lors de la fixation du ligand à l'instar du piège à mouche de la plante carnivore *Dionae*, d'où le domaine tire son nom. De nombreuses petites molécules peuvent pénétrer dans la poche du VFT telles que des acides aminés, des ions, des monosaccharides, des oligosaccharides, des vitamines, des oxoacides (acide sulfurique ou acide nitrique par exemple) ou de petits peptides (Felder *et al*, 1999).

Le domaine tyrosine kinase présente tous les motifs consensus indispensables à une activité catalytique. Ceci suggère que SmVKR1 puisse être une kinase active.

La structure unique de SmVKR1 entraînait de nombreuses questions relatives à sa fonction chez le schistosome et nous a poussé à continuer la caractérisation de ce RTK intrigant.

Les transcrits SmVKR1 sont produits à tous les stades parasitaires, ce qui exclut une fonction stade spécifique. Chez le ver adulte, des expériences d'hybridation *in situ* ont localisé les ARNm dans les ovocytes matures et l'oviducte des femelles ainsi que dans les cellules parenchymateuses des mâles. Chez les miracidiums et les sporocystes, un

marquage intense est retrouvé dans les cellules entourant la masse neurale et correspondant très certainement aux cellules germinales. Grâce à des anticorps polyclonaux dirigés contre la partie N-terminale du récepteur, la protéine native a été localisée dans des extraits membranaires de vers adultes ainsi que dans les sporocystes par Western Blot. Les expériences d'immunolocalisation sur coupe de vers adultes et de sporocystes semblent confirmer le profil d'expression de la protéine avec celui des ARNm (Figure 29).

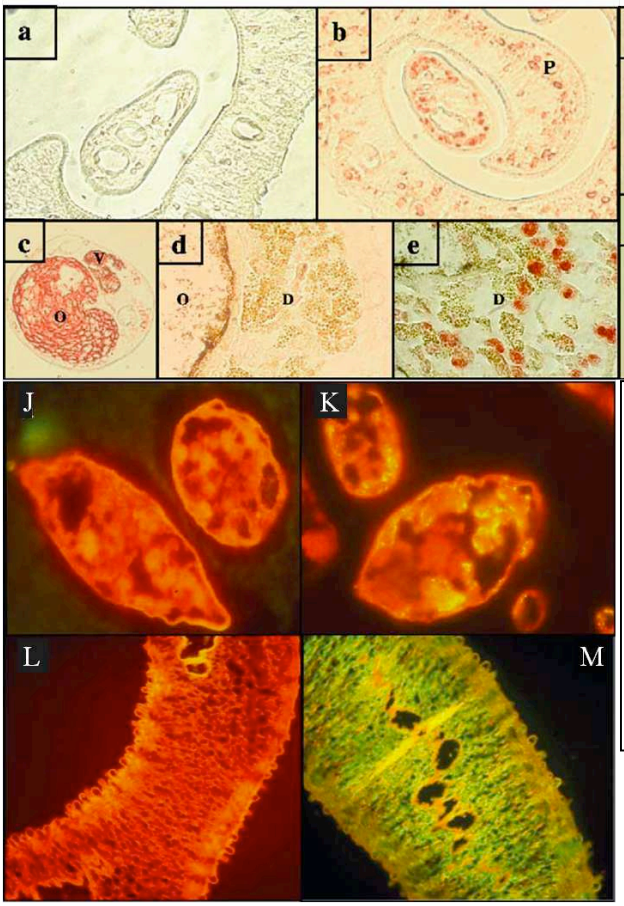


Figure 29 : Localisation de SmVKR1 :
Détection des transcrits SmVKR-1 par hybdridation *in situ* sur des coupes de mâles (a et b), de femelle (c, d, e), de miracidium (f et g) et de sporocystes (h et i). Contrôles négatifs (a, d, f and h) ont été réalisés avec les sondes sens. Les transcrits ont été détectés dans les cellules parenchymateuses (P) du mâle (b). Chez la femelle, un intense marquage est retrouvé au niveau des ovocytes matures de l'ovaire (O) et dans l'oviducte (D). Les transcrits sont retrouvés dans les cellules entourant la masse neurale (NM) des miracidia (g) et des sporocystes (i).
Détection de la protéine par immunolocalisation sur coupes de

Le profil d'expression de SmVKR1 dans les organes génitaux de la femelle ainsi que dans les cellules germinales des stades miracidium et sporocyste suggèrent l'implication du récepteur dans des voies de signalisation associées à la reproduction et au développement du parasite. L'identité importante qui existe entre le domaine catalytique de SmVKR1 et celui des récepteurs à l'insuline suggère que le récepteur pourrait activer une voie proche de celle des IR sous l'influence d'un ligand totalement différent de l'insuline.
Au-delà de la compréhension des mécanismes biologiques imputés à ce nouveau récepteur, notre équipe s'est intéressée à son origine. Est-il spécifique de *S. mansoni*, ou peut-il être retrouvé dans d'autres organismes ?

2. Evolution des VKRs

Pour déterminer si SmVKR était le seul RTK de son genre, un criblage des banques de données nucléiques référencées sur le serveur NCBI a été effectué, en utilisant la séquence de SmVKR1 comme sonde. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication: **A New Family of Receptor Tyrosine Kinases with a VenusFly trap Binding Domain in Insects and Other Invertebrates Activated by Aminoacids**, *A. Ahier, P. Rondard, N. Gouignard, N. Khayath, S. Huang, J. Trolet, D.J. Donoghue, M. Gauthier, JP. Pin, C. Dissous; PlosOne 2009 4 (5) e5651.*

En plus du schistosome, 14 autres organismes se révélaient contenir un gène codant pour une protéine similaire à SmVKR1. La majorité des organismes était des insectes avec 7 drosophiles (*Drosophila ananasse, D. pseudoobscura, D. persimilis, D. wilistoni, D. mojavensis, D. virilis et D. grimshawi*), 3 moustiques (*Anopheles gambiae, Aedes Aegypti, Culex pipiens*), un coléoptère (*Tribolium castaneum*), 2 hyménoptères (*Apis mellifera* et *Nasonia vitripennis*), un phthiraptère (le pou *Pediculus humanus corporis*) et un échinoderme (*Strongylocentrotus purpuratus*). Depuis, la publication de nouveaux génomes a permis la découverte de trois nouvelles séquences de VKRs chez *Solenopsis invicta* (SiVKR), *Camponotus floridanus* (CfVKR), *Harpegnathos saltator* (HsVKR) (Séquences en Annexe 2 pages 153 et 154) (Figure 30).

Le gène *vkr* n'a été retrouvé dans aucun organisme vertébré dont le génome est actuellement disponible, ce qui laisse penser que les VKRs pourraient être spécifiques des invertébrés. Il est cependant important de noter que tous les invertébrés ne possèdent pas ce gène, un exemple intrigant étant son absence dans le génome des organismes modèles *D. melanogaster* ou *C. elegans.* Ce qui pourrait aussi expliquer que ce gène n'ait pas été découvert plus tôt. Parmi les insectes, les lépidoptères, représentés ici par *Bombyx mori*, ne semblent pas non plus posséder de VKR. Il semble évident que d'autres organismes phylogénétiquement situés entre les trématodes et les insectes possèdent ce gène et qu'au fur et à mesure de la publication des génomes des organismes nous serons à même de compléter notre inventaire. Des analyses phylogénétiques des séquences des domaines fonctionnels obtenues (VFT et TK) ont permis de prouver que les VKRs forment un groupe monophylétique distinct des autres familles de protéines contenant des VFT et des TK. Les domaines VFT des VKRs sont très proches de ceux des récepteurs au GABA de type 1 et 2, tandis que le domaine TK est proche de ceux des récepteurs à l'insuline. Ces données prouvent que les VKRs forment une nouvelle famille de RTK.

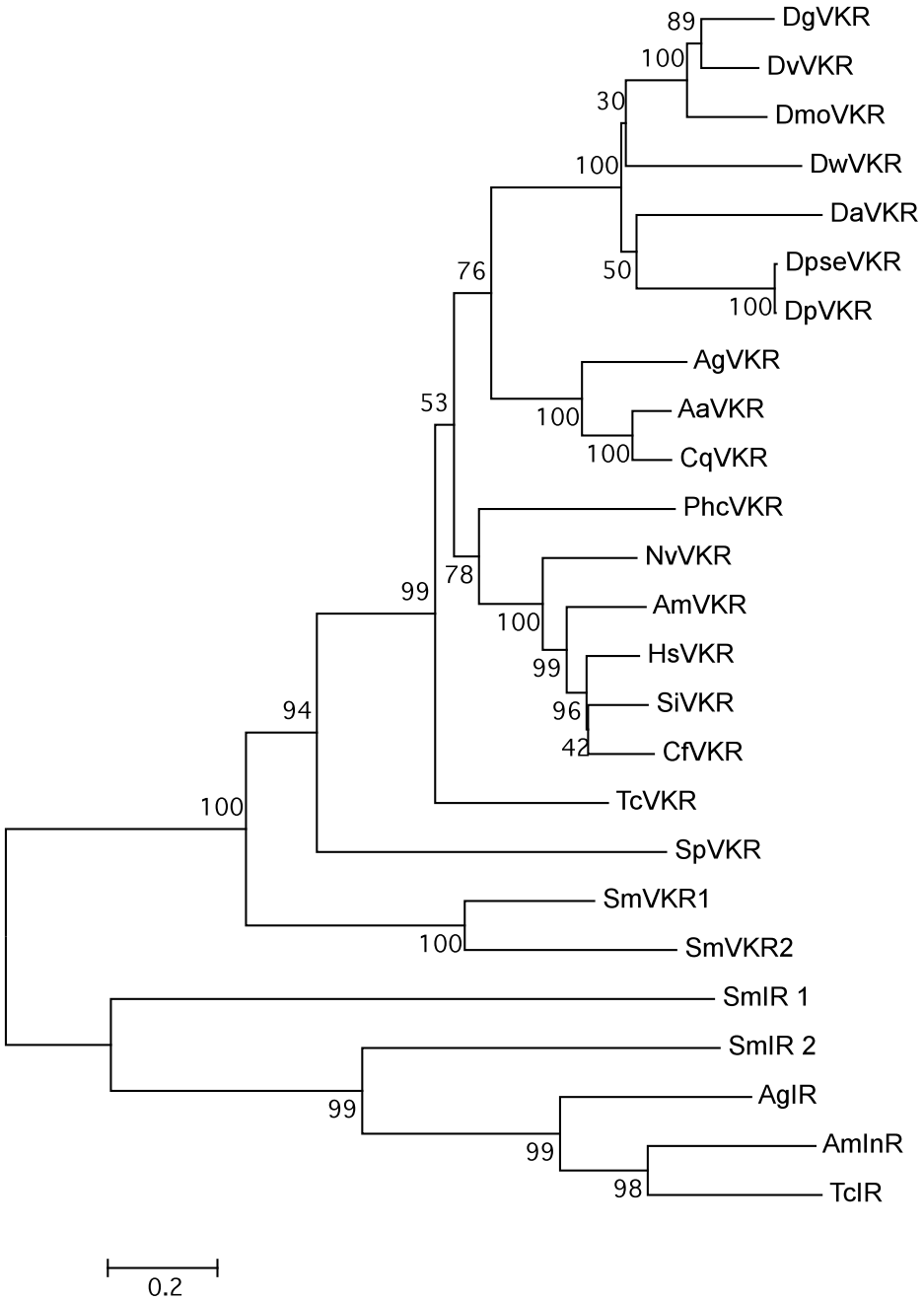


Figure 30: Arbre phylogénétique des VKRs d'insectes disponibles sur Flybase ainsi que de *S. mansoni* et *S. purpuratus* mis à jour en sept 2011. Arbre phylogénétique comprenant les séquences protéiques des VKRs de *S. mansoni* (SmVKR1; Genbank accession No. AF101194, SmVKR2; GU270860), *Apis mellifera* (AmVKR; EU878396), *Tribolium castaneum* (TcVKR; EU878395), *Pediculus humanus corporis* (PhcVKR; BK006717), *Anopheles gambiae* (AgVKR; EU878397), *Nasonia vitripennis* (NvVKR; EU878397), *Culex quinquefasciatus* (CqVKR; BK006726), *Aedes aegypti* (AaVKR; BK006725), *Drosophila pseudoobscura* (DpseVKR; EU598264), *D. persimilis* (DpVKR; BK006723), *D. ananassae* (DaVKR; BK006724), *D. mojavensis* (DmoVKR; BK006720), *D. grimshawi* (DgVKR; BK006721), *D. virilis* (DvVKR; BK006719), *D. willistoni* (DwVKR; BK006722), *Strongylocentrotus purpuratus* (SpVKR; BK006716) et des séquences prédites de trois nouveaux récepteurs identifiés chez *Solenopsis invicta* (SiVKR : EFZ12829.1), *Camponotus floridanus* (CfVKR : EFN73169.1), *Harpegnathos saltator* (HsVKR : EFN85558.1). Les récepteurs à l'insuline de *S. mansoni* (SmIR-1; AAN39120; SmIR-2; AAV65745), *A. mellifera* (AmInR2; XP_001121597), *T. castaneum* (TcIR; XP_975373), *A. gambiae* (AgIR; XP_320130) sont utilisés en tant que séquence outgroup.

3. Données acquises sur les VKRs

La conservation du gène au cours de l'évolution, ainsi que celle des séquences protéiques laisse supposer une conservation de la fonction du récepteur dans ces organismes. Tous les VKR présentent un domaine catalytique conservé contenant tous les motifs consensus indispensables à une activité kinase. Des tests d'expression en système hétérologue ont été effectués afin de confirmer l'activité des VKRs. L'expression d'AmVKR (le VKR d'A. *mellifera*) a permis de prouver qu'il possédait une activité tyrosine kinase *in vitro* (Ahier *et al*, 2009). Même si des tests complémentaires sont nécessaires pour généraliser ce fait chez l'ensemble des VKRs, il est tentant de supposer que les VKRs sont bien des récepteurs actifs et non des réceptrices « kinases dead » constitutivement inactifs comme certains décrits (Kroiher *et al*, 2001).

Tous les RTKs fonctionnent sous forment de dimères, ce qui est aussi les cas des récepteurs couplés aux protéines G de classe III. Pour vérifier si les VKRs se dimérisaient lors de leur activation, des mesures de signaux de FRET utilisant la technologie SNAP (Maurel *et al*, 2008) ont été réalisées. Un fort signal de FRET a été obtenu dans des cellules HEK293 exprimant AmVKR (Ahier *et al*, 2009). Les analyses des séquences des domaines VFT révèlent la présence d'une face beaucoup plus conservée et ne présentant aucun site de glycosylation, contrairement au reste du domaine. Cette face pourrait correspondre à la face de dimérisation des VKRs.

Les analyses de séquences des VFT et leur modélisation par rapport au cristal du récepteur au glutamate ont montré une conservation partielle de la poche de fixation au ligand suggérant que les VKRs pourraient fixer des acides aminés ou des dérivés d'acides aminés. Cependant, ni le glutamate, ni le GABA n'activent AmVKR lors de tests kinase *in vitro*. Seule l'arginine à 100 µM entraîne son activation et son autophosphorylation *in vitro* (Ahier *et al*, 2009).

Des tentatives d'identification de la ou des voies de signalisation activées par les VKRs, n'ont pas donné de résultats satisfaisants. En effet, aucune phosphorylation de la voie ERK 1/2 ou de la protéine p38, n'a été détectée. D'autres voies restent à être testées comme la voie PI3K/AKT, ou la voie PLCγ. De plus, une voie de signalisation spécifique des VKRs n'est pas à exclure.

Notre objectif principal est de comprendre la fonction de ces nouveaux récepteurs au sein des organismes qui les expriment. Nos investigations ont révélé que les transcrits des VKRs étaient particulièrement abondants dans les stades larvaires de l'abeille, du *Tribolium*, ainsi que dans les gonades de l'oursin et de l'anophèle. Ces derniers résultats étant corrélés à ceux obtenus chez le schistosome pour SmVKR1, l'implication des VKRs dans les mécanismes de reproduction et/ou de développement est de plus en plus probable.

L'objectif de ce travail de thèse se situe dans la continuité de la thématique du laboratoire et vise à comprendre l'implication des RTKs dans les mécanismes moléculaires de la reproduction et du développement du schistosome. Dans le contexte actuel où un seul médicament efficace existe contre la schistosomiase, et face à la peur de l'apparition de souches résistantes à ce composé, la recherche de solutions alternatives pour endiguer et éradiquer la schistosomiase est essentielle.

Les VKRs forment une nouvelle famille de RTKs retrouvée exclusivement chez les invertébrés. Un ciblage des VKRs de schistosomes sans croisement possible avec les protéines humaines semble être une piste prometteuse pour l'établissement d'une stratégie thérapeutique. Cependant nos connaissances sont, à l'heure actuelle, beaucoup trop partielles. Une étude approfondie des VKRs, de leur mécanisme d'activation, des voies de signalisation enclenchées ou encore de leurs mécanismes de régulation sont des pré-requis indispensables.

Ainsi au cours de ma thèse, j'ai entrepris la caractérisation moléculaire du VKR de schistosome, ce qui a permis la découverte d'un second gène, *smvkr2*. L'étude comparative des deux récepteurs SmVKR1 et SmVKR2 du schistosome constitue la majorité du travail et des résultats présentés ici. Afin de parfaire nos connaissances et de m'affranchir de certaines contraintes techniques inhérentes au modèle schistosome, j'ai également entrepris la caractérisation du VKR d'A*nopheles gambiae*. Prises dans leur ensemble, les données obtenues au cours de ces travaux de thèse contribuent à une meilleure compréhension du fonctionnement et de l'utilité de ces récepteurs tout à fait originaux que sont les VKRs.

RESULTATS

Au vu des profils d'expression des transcrits des différents VKRs que nous avons étudiés, il est très tentant de les associer au développement ou à la reproduction des organismes.

Au cours de ma thèse, j'ai choisi d'étudier les VKRs de deux organismes phylogénétiquement très différents, le schistosome et l'anophèle. Le schistosome est le modèle d'étude de notre laboratoire et les différents stades de ce parasitaire sont aisément accessibles. Cependant, ce modèle présente des difficultés techniques qui nous empêchent d'explorer certaines voies. En effet, aucune lignée cellulaire de schistosome n'est disponible. De même, aucune transgénèse n'est possible chez ce parasite. C'est pourquoi nous avons choisi de développer un autre modèle d'étude pour tenter de s'affranchir de ces difficultés. *Anopheles gambiae* est un insecte très étudié car il est le vecteur principal du paludisme en Afrique. Des lignées cellulaires d'anophèle sont disponibles ainsi que des techniques de transgénèse et d'ARN interférence. L'anophèle présente en plus quelques caractéristiques intéressantes qui ont orienté notre choix vers cet organisme. D'une part cet insecte est hématophage tout comme le schistosome. D'autre part le développement de ses ovaires et sa capacité à pondre sont strictement dépendants de la prise d'un repas sanguin par la femelle. Il nous a semblé intéressant d'établir un parallèle avec la femelle schistosome chez laquelle la production des œufs est dépendante aussi d'un apport nutritionnel qui est assuré par le mâle.

Au cours de ma thèse, nous avons découvert que le schistosome possède deux VKRs contrairement aux autres organismes. La majorité des résultats présentés ici concernent la caractérisation fonctionnelle et biochimique de ces deux VKRs. Une partie des travaux a fait l'objet d'une publication (Gouignard *et al*, 2011) qui sera présentée dans le premier chapitre. Les autres données encore non publiées seront exposées dans le deuxième chapitre. Enfin un troisième chapitre sera consacré aux avancées réalisées sur l'étude du VKR de l'anophèle.

I. Caractérisation structurale et biochimique de deux Récepteurs Venus Kinases chez *Schistosoma mansoni*

Suite à la publication du génome du schistosome en 2009 (Berriman *et al*, 2009), nous avons décidé de comparer la structure du gène de SmVKR à celle déjà obtenue pour les séquences des autres VKRs (Ahier *et al*, 2009). Pour cela nous avons utilisé la séquence de l'ADNc de SmVKR pour cribler la banque de données génomiques du schistosome sur le serveur NCBI Blast. De façon surprenante, ce criblage a abouti à deux résultats sur deux scaffolds différents (Smp_scaff000037 et Smp_scaff000159) présentant de fortes similarités de séquence avec SmVKR. Le premier correspondait parfaitement à la séquence de SmVKR. Le second, par contre, présentait un pourcentage d'identité plus faible et correspondait à une protéine prédite comme une Tyrosine Kinase. Une analyse plus poussée de la séquence traduite révèle qu'en plus d'un domaine TK en C-Ter, elle code pour un domaine VFT en N-Ter, la structure typique des VKRs. Nous avons donc nommé cette nouvelle protéine potentielle SmVKR2.

Nous avons déterminé la séquence des extrémités du transcrit de SmVKR2 par RACE-PCR. L'ARNm de SmVKR2 est long de 5981 pb avec un cadre ouvert de lecture de 4923 bases, codant pour une protéine de 1641 acides aminés. La séquence complète de SmVKR2 a été clonée, séquencée puis déposée dans la base de données GenBank sous le numéro d'accession GU270860.

Pour confirmer l'appartenance de SmVKR2 à la famille des VKRs, nous avons entrepris une analyse phylogénétique des séquences complètes de tous les VKRs connus incluant SmVKR2. Les résultats obtenus montrent sans ambiguïté que SmVKR2 s'intègre parfaitement à la famille des VKRs. Comme nous pouvions le supposer, SmVKR1 et SmVKR2 sont très proches l'un de l'autre.

La confirmation de l'existence d'un second VKR chez le schistosome est des plus surprenantes. En effet, aucun autre organisme dont le génome est parfaitement séquencé ne présente deux VKRs. Pour tenter de comprendre pourquoi le schistosome a besoin de deux VKRs nous avons entrepris une étude comparative de SmVKR1 et de SmVKR2.

Dans un premier temps, nous avons analysé la structure de leur gène en criblant la banque génomique avec les séquences de leur ADNc respectif. Le gène *smvkr1* est divisé en 16 exons et 15 introns pour une longueur totale d'environ 30 kb. Le gène *smvkr2* est lui divisé en 18 exons, cependant sa taille totale est similaire à *smvkr1*. Si la taille des introns varie, celle des exons est particulièrement bien conservée. En effet les 15 premiers exons des deux gènes sont pratiquement de tailles identiques et semblent coder pour les mêmes parties de la protéine. Ainsi, le domaine VFT de SmVKR1 et SmVKR2 est codé par les

exons 7 à 10, et le domaine TK par les exons 11 à 14 dans les deux cas. Cette similarité de structure pourrait être expliquée par l'existence d'un gène ancestral qui aurait subi une duplication aboutissant à *smvkr1* et *smvkr2.*

Afin d'évaluer le profil d'expression des deux VKRs, nous avons effectué des RT-PCR en temps réel sur tous les stades parasitaires. Les transcrits des deux VKRs sont retrouvés à tous les stades parasitaires, ce qui exclut une fonction spécifique de stade des récepteurs. Les transcrits sont particulièrement abondants dans les stades larvaires, excepté pour les schistosomules. Chez les adultes, les transcrits des deux récepteurs sont plus abondants dans les femelles que dans les mâles. Nous avons évalué le ratio SmVKR2/SmVKR1 pour chaque stade et nous avons constaté que les transcrits SmVKR2 sont plus abondants que ceux de SmVKR1 dans tous les stades parasitaires, excepté pour les sporocystes. Dans les cercaires et les schistosomules, cette différence est très marquée, avec respectivement 50 et 14 fois plus de transcrits SmVKR2. SmVKR1 et SmVKR2 sont donc régulés différemment au cours du cycle parasitaire.

Après avoir déterminé le profil d'expression des VKRs, nous nous sommes intéressés à la structure des deux protéines. SmVKR1 et SmVKR2 présentent une taille similaire avec respectivement 1559 et 1641 acides aminés. L'alignement des séquences protéiques complètes montre une identité de 40 %. Les domaines catalytiques sont plus conservés avec 48% d'identité pour le domaine VFT et 71% pour le domaine TK. A l'instar des autres VKRs, SmVKR2 présente l'ensemble des motifs consensus d'un domaine TK actif. Nous avons aussi retrouvé dans le domaine VFT des résidus conservés chez tous les VKRs (Ahier *et al*, 2009). Il est cependant intéressant de noter que les domaines C-terminaux des deux VKRs ne sont pas du tout conservés, et que celui de SmVKR2 est plus long. Compte tenu du fait que la queue C-ter des RTKs est souvent le siège de la fixation des partenaires cytoplasmiques nécessaires à la transduction des signaux, cette différence pourrait suggérer que les deux récepteurs interagissent avec des partenaires différents.

Pour déterminer si SmVKR1 et SmVKR2 étaient des kinases actives, nous avons tenté de les exprimer en système hétérologue. Malheureusement, comme c'est souvent le cas pour les protéines de schistosome, nous avons été incapables de les produire en système cellulaire mammifère (cellules HEK 293) ou invertébré (cellules de drosophile S2) (données non présentées). Nous avons donc utilisé le système d'expression en ovocyte de xénope qui s'est avéré efficace pour la production de plusieurs protéines de schistosome dont des RTKs (Vicogne *et al*, 2004). Les ovocytes étant naturellement bloqués en début de prophase I, l'addition de kinases actives peut entraîner la reprise du cycle cellulaire qui se traduit par la GVBD (Germinal Vesicule Break Down) visualisée par l'apparition d'un spot blanc au pôle animal de l'ovocyte. Il est ainsi aisé d'identifier une kinase active.

En exprimant les VKRs rendus constitutivement actifs suite à une mutation dans leur domaine catalytique, nous avons été capables de montrer que SmVKR1 et SmVKR2 sont deux récepteurs à activité Tyrosine Kinase capables de déclencher la GVBD des ovocytes. Le construit sauvage de SmVKR1 semble inactif et n'entraîne pas la GVBD. Nous avons donc essayé de l'activer avec de l'arginine pour vérifier si, comme pour AmVKR, cet acide aminé est capable de fixer le VFT de SmVKR1 et d'induire son activité. En effet, suite à l'addition d'arginine dans le milieu de culture (ND96), les ovocytes exprimant SmVKR1 poursuivent leur cycle cellulaire et déclenchent une GVBD.
Dans le cas de SmVKR2 nous avons constaté que la forme native du récepteur était spontanément capable d'induire la maturation des ovocytes sans ajout de ligand dans le milieu. Le milieu utilisé pour le maintien des ovocytes est un milieu minimum salin contenant des ions comme le calcium. Or les VFT sont connus pour pouvoir fixer de petites molécules telles que les ions et différentes protéines possédant un VFT sont activables par le calcium (Pin *et al*, 2003). Pour tester l'hypothèse d'une liaison du Ca^{2+} à SmVKR2, nous avons réalisé un milieu ND96 sans calcium. Dans ces conditions, les ovocytes exprimant la forme sauvage de SmVKR2 ne déclenchent plus de GVBD, alors que des ovocytes contrôles en sont toujours capables sous l'effet de l'insuline.

En résumé, nous avons montré l'existence d'un second VKR chez le schistosome qui présente une forte identité de séquence nucléique et protéique avec SmVKR1. SmVKR1 et SmVKR2 semblent dériver d'un gène ancestral par duplication de gène. Les transcrits des deux récepteurs sont retrouvés à tous les stades parasitaires, particulièrement dans les stades larvaires et dans les femelles adultes. Les deux récepteurs sont des kinases actives activables par des ligands de petite taille, l'arginine pour SmVKR1 et le calcium pour SmVKR2. Ceci pourrait suggérer un rôle différent pour les deux récepteurs mais leur profil d'expression semble confirmer nos hypothèses sur leur importance à tous deux dans le développement et/ou la reproduction des organismes.

II. Caractérisation fonctionnelle des récepteurs SmVKR1 et SmVKR2

Dans ce chapitre seront présentés les résultats non publiés relatifs à la poursuite de la caractérisation fonctionnelle de SmVKR1 et SmVKR2.

Les VKRs forment une nouvelle famille de récepteurs tyrosine kinase spécifiques des invertébrés et conservés au cours de l'évolution depuis les échinodermes jusqu'aux diptères. Les VKRs sont retrouvés dans plusieurs organismes d'intérêt sanitaire et économique de première importance. Etant donné leur probable implication dans la biologie de ces organismes, la compréhension de la fonction des VKRs nous a semblé nécessaire.

Dans ce but, nous avons par différentes approches complémentaires tenté de définir la fonction des VKRs chez le schistosome. Dans un premier temps nous avons cherché à localiser les transcrits mais aussi les protéines dans des vers adultes appariés. Nous avons aussi complété ces analyses par des expériences de RT-PCR quantitative sur des vers immatures sexuellement, afin d'affiner les profils d'expression des deux VKRs et ainsi mieux comprendre leur rôle chez ces parasites.

Suite à l'identification préliminaire de ligands potentiels des VKRs, nous avons poursuivi la déorphanisation des récepteurs exprimés dans le système d'ovocyte de xénope. Grâce aux données connues sur la structure des VFT et l'implication de motifs consensus clés pour la reconnaissance des ligands, nous avons identifié des résidus conservés dans les domaines VFT des deux VKRs. En utilisant des stratégies de mutagénèse dirigée, nous avons testé et confirmé l'importance de ces résidus pour la fixation des ligands de SmVKR1 et SmVKR2. L'identification des ligands pourraient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'activité des VKRs et ainsi mieux appréhender leur fonction, ainsi que les voies de signalisation qu'ils activent.

Pour identifier ces voies, nous avons mis en place un criblage d'une banque d'ADNc de schistosome en levure par la technique de double hybride. Nous avons utilisé les domaines intracellulaires des deux récepteurs sous leur forme sauvage ou constitutivement active pour permettre la fixation phospho-dépendante de partenaires cytoplasmiques pouvant être impliquées dans la transduction des signaux cellulaires. Les résultats obtenus donneront des indications majeures sur l'activité des VKRs au sein des cellules.

Enfin, nous avons mis en place des expériences d'ARNi sur le stade adulte et le stade larvaire sporocyste pour diminuer l'expression des transcrits smvkr1 et smvkr2 indépendamment, mais aussi ensemble, afin d'appréhender la fonction des VKRs *in vivo*.

Considérés dans leur ensemble, ces résultats permettent dès à présent d'émettre des hypothèses sur le fonctionnement et l'utilité des ces récepteurs uniques et encore trop mal connus.

1. Expression des VKRs chez *S. mansoni*

a) Expression et localisation des transcrits des VKRs dans les organes reproducteurs des schistosomes

La présence des transcrits smvkr1 a été localisée par hybridation *in situ* dans les ovocytes matures et l'ootype des vers femelles (Vicogne *et al*, 2003). Il nous a semblé indispensable de définir le profil d'expression des transcrits smvkr2 afin de le comparer à celui des transcrits smvkr1. Des sondes ARN sens et anti-sens marquées à la digoxigenine ont été synthétisées *in vitro*. Ces deux sondes correspondent à une région de 391 pb comprenant le domaine transmembranaire de SmVKR2 (AA 2490-2881), qui présente peu d'homologie avec celui de SmVKR1, et ce afin d'éviter toute réaction croisée entre les deux VKRs. L'hybridation *in situ* a été réalisée sur des sections de couples de vers adultes appariés.

Avec la sonde anti-sens, un marquage spécifique et intense est obtenu chez la femelle autour de l'ootype (Ot) ainsi que dans les ovaires (O), particulièrement dans les ovocytes immatures (Oi) de la femelle (Figure 31A). Aucun marquage n'est détecté dans le vitellarium (V) (Figure 31C), le parenchyme (P) ou les testicules du mâle (T) (Figure 31E). On remarque un marquage plus léger sous forme de points dans le corps de la femelle et du mâle, certainement dû à un artefact de coloration (Figure 31A). Un léger marquage est aussi détecté dans l'ootype de la femelle avec la sonde sens (Figure 31B).

Les transcrits smvkr2 à l'instar de smvkr1 sont donc majoritairement présents dans les organes génitaux de la femelle ce qui est en accord avec les résultats déjà obtenus par RT-PCR en temps réel (Gouignard *et al*, 2011).

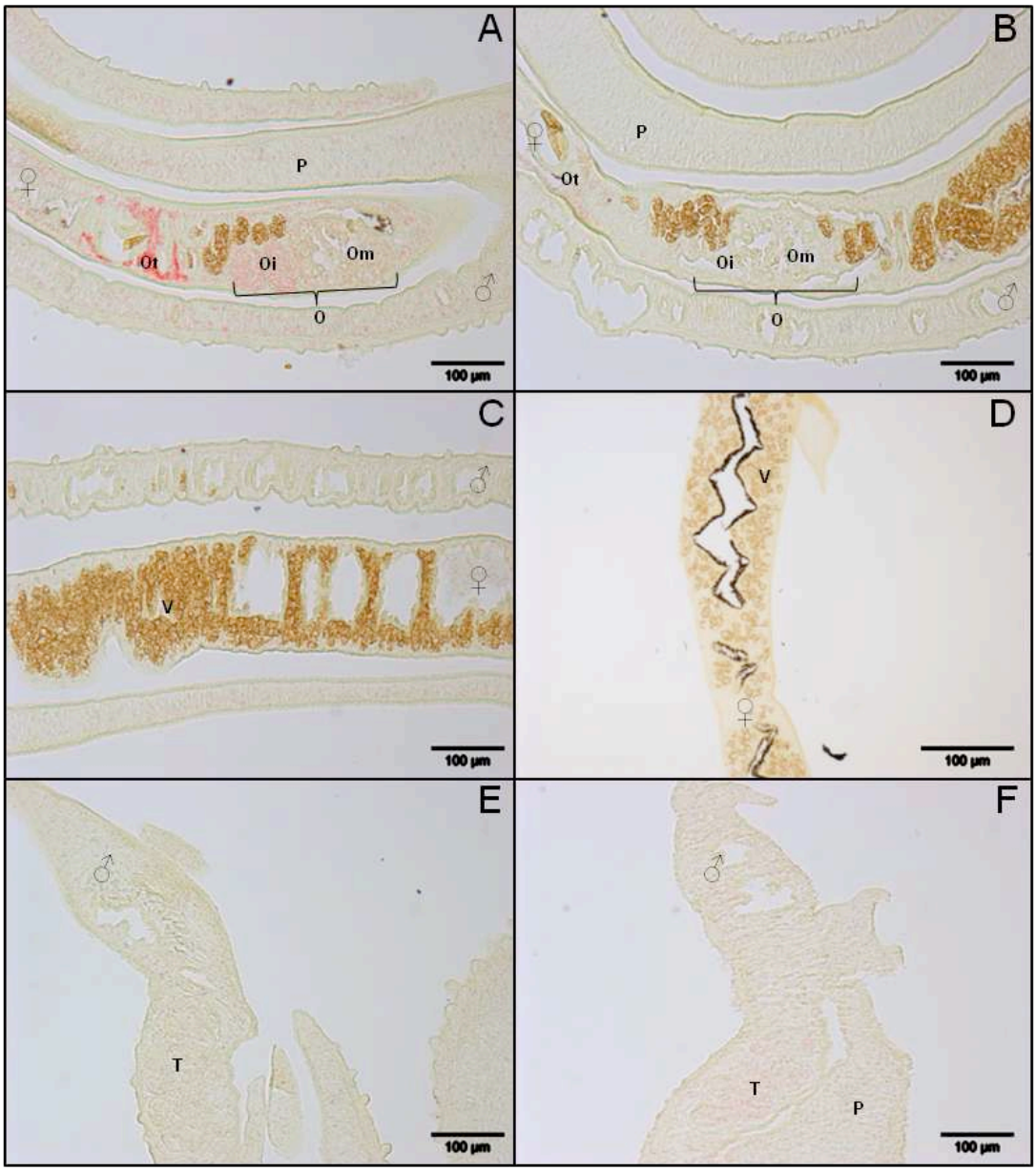


Figure 31 : Hybridation *in situ* de SmVKR2 sur coupes de vers adultes. A, C, E : Sondes anti-sens; Marquage important de l'ootype (ot), des ovocytes immatures (Oi) de l'ovaire (o) chez la femelle. B, D, F : Sonde sens (T : testicules, P : parenchyme, V : vitellarium, Om Ovocytes matures; barre d'échelle : 100 m).

b) <u>L'expression des VKRs pourrait être associée à la maturation sexuelle</u>

Compte tenu de la présence abondante de transcrits smvkr dans les organes reproducteurs de la femelle, nous avons voulu quantifier ces mêmes transcrits dans des schistosomes sexuellement immatures. Le sexe des schistosomes est déjà défini dans l'œuf, y compris dans les stades larvaires même si aucune différence morphologique entre mâle et femelle n'est encore visible. Des infections monomiracidiales (mâle ou femelle) de mollusques, permettent donc d'obtenir des cercaires exclusivement mâles ou femelles. L'infection de hamsters avec ces cercaires conduit au développement chez l'hôte de vers mâles ou

femelles n'ayant jamais été appariés. Comme on le sait, le développement des organes génitaux, en particulier chez le ver femelle, est strictement dépendant de l'accouplement des parasites. La femelle sexuellement immature possède par conséquent un ovaire et un vitellarium atrophiés. Le mâle non apparié lui ne présente apparemment pas de différence morphologique majeure avec un mâle mature, mais des études transcriptomiques ont mis en évidence une régulation de l'expression de certains gènes dépendante de l'appariement avec la femelle (Fitzpatrick et Hoffmann, 2006).

En conséquence, les infections monomiracidiales ou « single sex » donnent naissance à des parasites immatures sexuellement à l'inverse des infections dites « bi-sex » (BS) qui donnent des vers matures. Nous avons comparé le taux de transcrits des VKRs par RT-PCR en temps réel sur des vers mâles et femelles provenant d'infections BS et SS.

Pour la représentation graphique, les résultats ont été exprimés en fonction du taux de transcrits smvkr1 mesuré dans les mâles ou les femelle BS. Chez les mâles et les femelles BS, nous retrouvons les mêmes profils d'expression des transcrits smvkr1 et smvkr2 que ceux obtenus précédemment (Gouignard *et al*, 2011). Ainsi chez le mâle les deux VKRs sont transcrits à un taux équivalent tandis que la femelle exprime 2 fois plus de smvkr2 que de smvkr1 (Figure 32). Par contre, les résultats indiquent que, les mâles et les femelles SS ont des taux de transcrits extrêmement faibles comparé à ceux des adultes BS. Ainsi la femelle SS et le mâle SS expriment respectivement 5 et 20 fois moins de transcrits smvkr1 et 64 et 13 fois moins de transcrits smvkr2 que leurs correspondants BS. L'appariement semble donc jouer un rôle favorable sur l'expression des transcrits smvkr et ce dans les deux sexes.

Ces résultats préliminaires ont été obtenus à partir de deux expériences et méritent d'être confirmés.

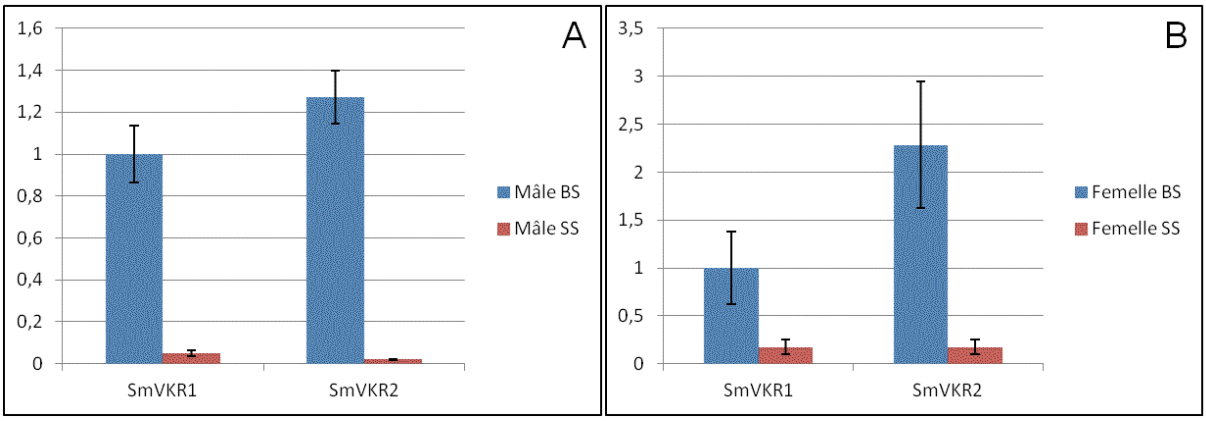


Figure 32 : Quantification des transcrits smvkr1 et smvkr2 dans des mâles (A) et des femelles (B) provenant d'infection normale (BS), ou unisexe (SS). L'amplification des transcrits a été réalisée en triplicates à partir d'ADNc (n=2) d'adultes. Le taux d'expression du gène PDI (protéine disulfide isomérase) a servi de référence interne. Pour la représentation graphique des résultats, les valeurs de Ct de chaque condition ont été exprimées en fonction de l'expression de smvkr1 dans les mâles BS (A) ou les femelles BS (B) par la méthode du Ct.

c) Etude de l'expression des protéines SmVKR1 et SmVKR2 chez le parasite

La présence d'une grande quantité de transcrits dans un tissu ne reflète pas obligatoirement l'abondance des protéines traduites, en effet différents facteurs dont la stabilité des ARNm peuvent influer sur le taux de traduction.

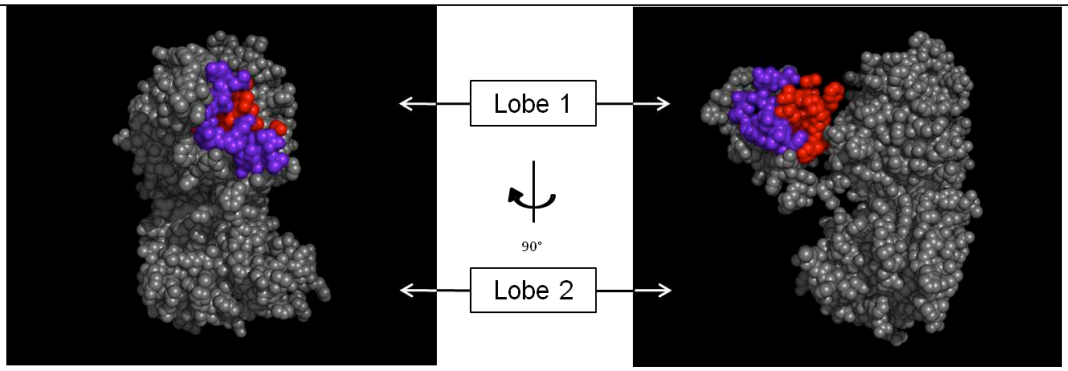
Pour étudier par immunolocalisation l'expression des récepteurs dans les tissus du schistosome, nous avons mis en place une stratégie de production de deux sérums polyclonaux anti-SmVKR1 et anti-SmVKR2. Nous avons fait appel à l'entreprise Eurogentec pour la production de peptides spécifiques de chaque VKR et pour l'immunisation d'animaux. Ainsi, sur la base de la séquence protéique des domaines VFT des deux récepteurs, deux peptides ont été choisis sur des critères d'hydrophilie, d'antigénicité et de probabilité d'exposition à la surface des protéines.

La Figure 33 présente la séquence des VFT de SmVKR1 et SmVKR2 ainsi que les peptides sélectionnés pour chaque VKR. Une modélisation des domaines VFT nous a permis d'évaluer les probabilités d'exposition à la surface des peptides.

Chaque peptide a été couplé à l'ovalbumine. Ce « carrier » a été choisi à la place de la KLH (très souvent utilisée dans les protocoles d'immunisation) afin d'éviter toute réaction croisée entre le carrier et les protéines du schistosome (Dissous *et al*, 1986). Les peptides de SmVKR1 (ensembles) ont été injectés à deux rats, et ceux de SmVKR2 à deux lapins. D'après les résultats des tests Elisa réalisés par l'entreprise, les anti-sérums de lapin reconnaissent bien le peptide 1 de SmVKR2 (titre évalué 1/5000) et le peptide 2 de SmVKR2 (titre 1/50000), mais les deux rats n'ont répondu efficacement que contre le peptide2 de SmVKR1 (titre 1/50000). Cependant, des résultats récents montrent que les anticorps anti-SmVKR1 obtenus chez le rat reconnaissent en Western Blot le domaine VFT recombinant de SmVKR1 produit en système bactérien (Vanderstraete, communication personnelle). Les anticorps anti-SmVKR2 seront testés sur le domaine VFT recombinant de SmVKR2 dès qu'il sera disponible.

Nous avons analysé en Western Blot l'expression des protéines SmVKR1 et SmVKR2 dans les parasites à l'aide des anticorps produits. Pour cela des extraits protéiques de 500 à 3000 miracidiums ont été analysés en SDS-PAGE puis révélés avec les anti-sérums. Parallèlement, des analyses ont été réalisées sur des extraits totaux de couples de vers (0,4 à 0,8 couple par piste) ou des fractions membranaires (équivalent de 1,4 à 2 couples par piste) mais dans tous les cas, aucune bande spécifique de taille attendue pour les récepteurs n'a été révélée. Il est possible que ceci soit le résultat d'une extraction partielle des récepteurs membranaires et aussi de leur faible représentation. La mise au point de la technique d'extraction des protéines membranaires du schistosome est en cours.

Domaine VFT de SmVKR1:
402-HVAEQAINFVNHNPDYFSNTEYALTLDVRNLTCSQDVVLNDYFDLLTASKNRKIIGVIAALCSDSIEPVVEVANMRRQIV
VSPTVESVRFAKRYQYPYFFRTVPSMTHVSLILIRLFSSWGWRRVAVFRGDDHFFDPLIFQSNGIDLIADFVMKENQLTYVTVL
QALKLMNDRTSRIFMVEYFAKGTAIILCAAYHLGMHFDAGYVWFLNPWLSSNWWQAPDVHPRECTHEEMHNITSWTFTVGHQLI
MEPLAHKFMPSSFSDGNLFAFDSSSHKLQGTSRRFRRYSNQYAQDLRIRKFKHPLYNGHFTNNYDDSPSDSELQRSVFNTKSED
VEYVHSSHDYAIHTYESVIVLAAALIHLLHQNPSAISVFESMSVAEAYRELVFETDFRYTISSRFIMDDSFANPVISLDTGFHY
VYRKDEIKSASQLRFNNLNERVADFWLLKQHQINI-854



Domaine VFT de SmVKR2:
347-RVAQEAVNFVNADSDYFRNSEYALSLDVRNLTCEPDVVLSDYFKVLENAVNTRLIGSIAALCSDSIEAVVELANIRKQII
VSPTVGSARFLEQQQYHYFFRTVPSMTLANFILLRLFLVWGWHRIVVFRKSDHFFEPLLFQAKGIEIIANIEMDEQQLTYKLAK
DTLEELKQQNSRIFVVEYDARGTYLILCAAYHEGMYFSAGYVWFLNPWLSDQWWSELVGRNTECNFSEMLNITSWTFTVGHQLL
IGPMVHSFIPRTSEFMDSDSKSGNNSSGTPNRTSSEQIRRRRHVFAQSQTLEVPPVLSRTKHNPNPNDLGKSIFSDHSKRKLIK
DPLHDYTVYTYDAVILLASAVVHLLRENPAAASALDHPDVSETLRTLVARTNFGYRFQTDNSTTGQSSEINELVPGINDDNFGV
DAGFQLAGDYYGIRSQSPASASNLRFNDHNERIADYWLLKQRHLNT-808

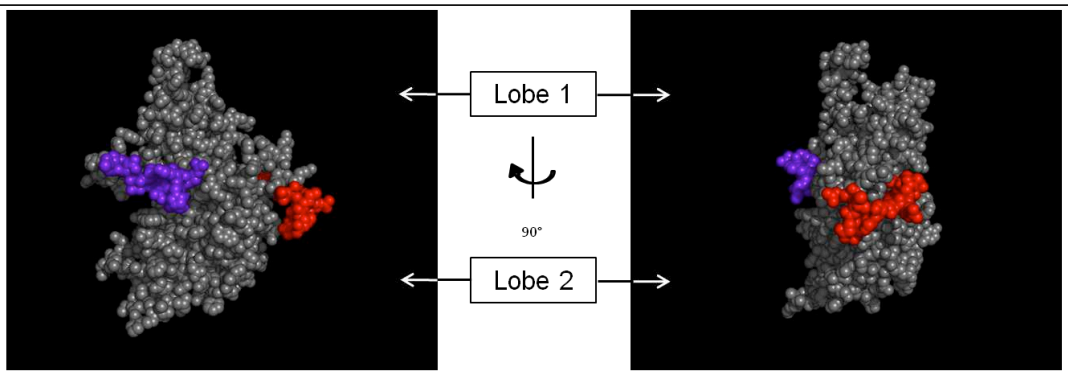


Figure 33 : Exposition des peptides 1 et 2 de SmVKR1 et SmVKR2 : Les séquences protéiques du domaine VFT de SmVKR1 et de SmVKR2 sont présentées avec le peptide 1 en rouge et le peptide 2 en bleu. Leur emplacement dans le VFT a été indiqué sur des modélisations des deux domaines réalisés sur le serveur Modeller (https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/modweb.cgi).

2. Recherche de ligands et mécanismes d'activation des récepteurs SmVKR

Une part importante de la caractérisation des SmVKRs est bien sûr l'identification de leurs ligands respectifs. Nous avons déjà établi que, dans le système d'expression hétérologue de xénope, SmVKR1 est activable par la L-Arginine (100µM) et que SmVKR2 est quant à lui dépendant de la présence d'ions calcium (Gouignard *et al*, 2011, Figure 5). Nous avons entrepris des expériences complémentaires visant à déterminer précisément l'efficacité de diverses molécules sur l'activation du potentiel kinase et la nature des ligands de l'un et l'autre des récepteurs.

a) Activation de SmVKR1 par des acides aminés

Des ovocytes de xénope exprimant SmVKR1 ont été incubés dans le milieu ND96 complémenté avec 1mM de chacun des 20 L-acides aminés (AA) classiques. Après 18h, nous avons évalué le pourcentage de GVBD obtenu pour chaque condition. Sur les 20 AA testés, seulement 7 (Arg, Ser, Gly, Ala, Cys, Thr, Glu) induisent une reprise de l'activité méiotique de l'ovocyte dépendante de l'activation de SmVKR1 qui s'autophosphoryle (cf Gouignard *et al*, 2011, Figure 5). Les ovocytes contrôles n'exprimant pas ce récepteur ne subissent pas de GVBD en présence d'acides aminés (résultats non présentés), confirmant la spécificité de liaison.

Des ovocytes exprimant SmVKR1 ont alors été incubés avec des doses croissantes (0 à 1mM) des 7 AA positifs afin d'évaluer leur affinité pour le récepteur. La Figure 34A représente de manière graphique le pourcentage de GVBD obtenu en fonction de la concentration d'AA. Les résultats confirment l'efficacité particulière de l'Arg à induire l'activation de SmVKR1 (active à 1µM) mais ils montrent également que d'autres AA comme Ser, Gly, Ala, et Cys sont capables d'agir à la dose de 100µM alors que l'activité de Glu et Thr réclame une concentration plus importante, ces deux AA étant actifs à 1mM. Afin d'évaluer une influence possible du Ca^{2+} sur la fixation de l'arginine sur SmVKR1, nous avons effectué les mêmes expériences dans un milieu ND96 dépourvu de Ca^{2+}. Aucune diminution de la sensibilité de SmVKR1 pour L-Arg n'a été constatée, suggérant que contrairement à SmVKR2, SmVKR1 ne requiert pas de Ca^{2+} pour son activation.

L-Arg est le seul AA à posséder un radical composé d'un groupement guanidine (Figure 35A). Afin de vérifier si l'affinité du VFT pour L-Arg est due à sa structure, nous avons analysé l'effet, sur des ovocytes exprimant SmVKR1, de dérivés métaboliques de l'Arg (Figure 35A) dépourvus soit de la fonction guanidine comme l'ornithine, soit de la fonction α-aminoacide comme la créatine ou les deux dans le cas de l'agmatine. Nous avons aussi analysé l'action de deux analogues de L-Arg, la D-Arg et la canavanine (Acide L-α-amino-(quanidinoxy-n)butyrique), un anti-métabolite puissant de l'Arg dont l'effet sur l'activation d'un récepteur à VFT de la classe GPCR (DmXR) chez les insectes a été récemment démontré (Mitri *et al*, 2009). Nos résultats montrent qu'aucun de ces dérivés n'est capable d'induire la GVBD même à une concentration 1000 fois supérieure (1mM) à celle qui active pour L-Arg (Figure 35B).

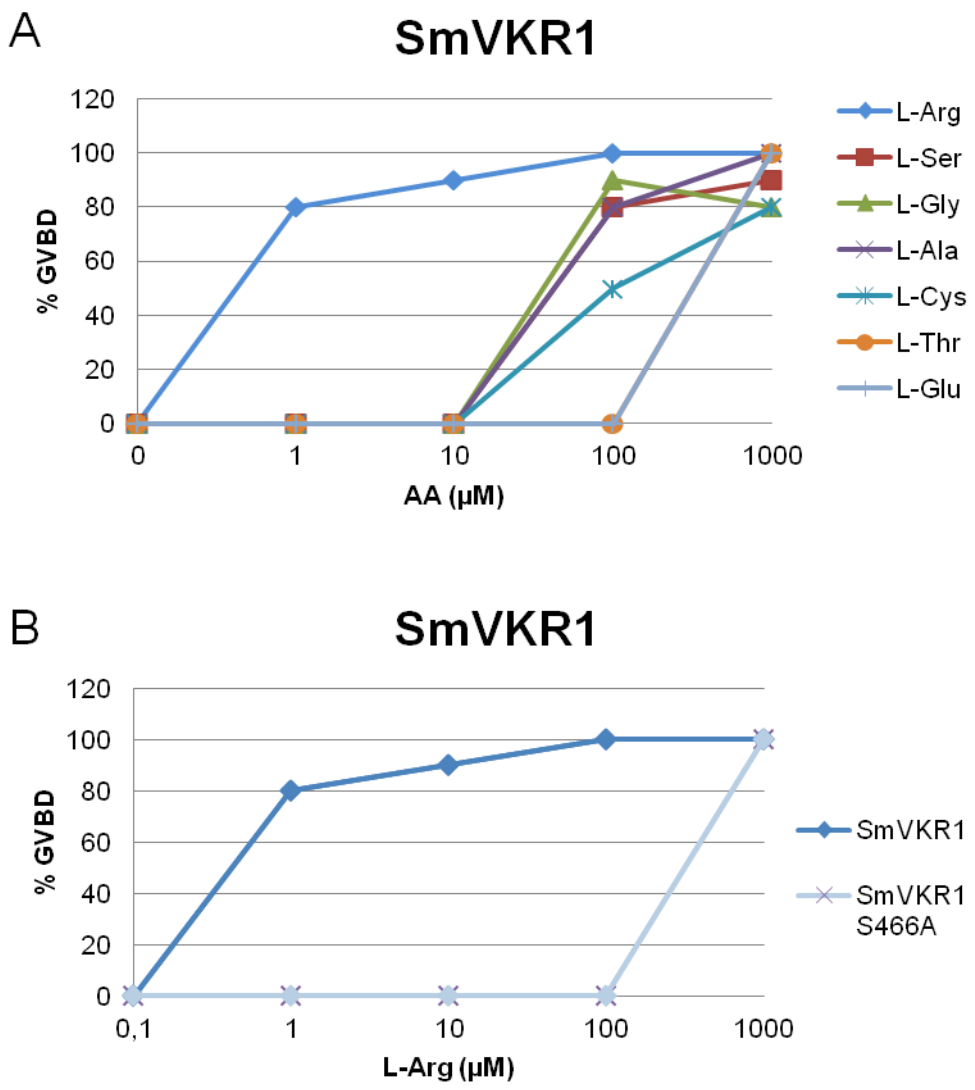
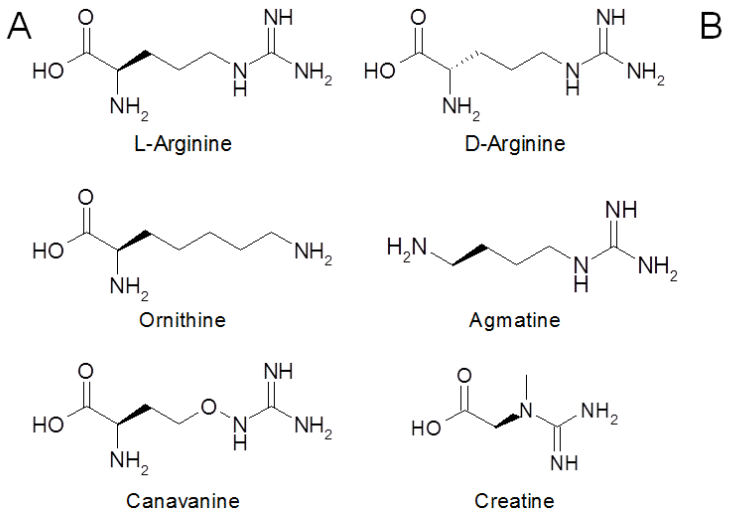


Figure 34 : Effet de divers AA sur l'activation de SmVKR1 exprimé en ovocyte de Xénope. A : Pourcentage de GVBD en fonction de la concentration d'AA (de 1µM à 1 mM). L'arginine est efficace à une concentration au moins 100 fois inférieure à celle des six autres acides aminés. B : Influence du résidu S466 dans le domaine VFT de SmVKR1 sur son activation par L-Arg. L'activation du mutant S466 requiert des concentrations de L-Arg 1000 fois supérieures.

Nous avons constaté dans la séquence protéique du domaine VFT des VKRs la conservation d'un résidu Ser qui est très important pour la reconnaissance du glutamate par le récepteur humain mGluR1. La Ser 165 de mGluR1 est retrouvée en position 466 dans le VFT de SmVKR1. Pour déterminer si ce résidu joue un rôle dans la fixation du ligand à SmVKR1, nous l'avons remplacé par un résidu Ala. Des ovocytes exprimant le mutant $SmVKR1^{S466A}$ et le construit sauvage $SmVKR1^{WT}$ ont ensuite été mis en présence d'une dose croissante de L-Arg (0,1 à 1mM). Les résultats (Figure 34B) montrent que le récepteur $SmVKR1^{S466A}$ n'est plus sensible à la dose de 1µM d'Arg comme l'est le récepteur $SmVKR1^{WT}$, et que son activation requiert une concentration de ligand 1000 fois supérieure. Ces résultats laissent penser que Ser_{466} serait fortement impliquée dans la reconnaissance de l'Arg.



B

AA et dérivés (1mM)	GVBD
L-arg	**100%**
D-Arg	0%
Ornithine	0%
Agmatine	0%
Canavanine	0%
Creatine	0%

Figure 35 : Test d'activation de SmVKR1 par des dérivés d'Arginine. A : Formules chimiques de L-Arg, D-Arg, Ornithine, Agmatine, Canavanine et Creatine. B : Effet des dérivés d'Arg à 1mM. Seule L-Arg induit la GVBD.

b) Activation de SmVKR2 par le calcium

Des études précédentes ont prouvé que le calcium présent dans le milieu ND96 des ovocytes de xénope est nécessaire et suffisant pour induire son activation et son autophosphorylation (Gouignard *et al*, 2011). Pour vérifier si d'autres cations divalents étaient capables aussi d'induire l'activation de SmVKR2, nous avons incubé des ovocytes exprimant le récepteur avec 1mM de $ZnCl_2$, $NiCl_2$, $FeCl_3$, $MnCl_2$, $CuCl_2$. Le cuivre s'est montré toxique à cette concentration pour les ovocytes et a induit leur lyse au bout de 2h, empêchant de conclure sur sa capacité à activer SmVKR2 dans ce modèle. De même, le zinc a entraîné la maturation spontanée de tous les ovocytes incluant les contrôles n'exprimant pas le récepteur. Pour ces deux ions, un modèle d'essai kinase *in vitro* serait plus approprié. En ce qui concerne le fer, le manganèse et le nickel, nous n'avons constaté aucune action toxique sur les ovocytes, mais aucun d'entre eux n'a induit l'activation de SmVKR2.

En analysant la séquence protéique du domaine VFT des deux VKRs, nous avons identifié la présence d'un site potentiel de fixation du calcium D-x-D (Geiger et Ayalon, 1992) en N-ter du VFT de SmVKR2 (D_{359}-x-D_{361}). Ce site n'est pas conservé dans le domaine VFT de SmVKR1 (Figure 36), ce qui pourrait expliquer que les deux récepteurs s'activent différemment. Pour définir l'importance de ce site pour la fixation du calcium, nous avons produit par mutagénèse dirigée un construit SmVKR2$^{D359A/D361A}$ en remplaçant la séquence D-S-D par A-S-A.

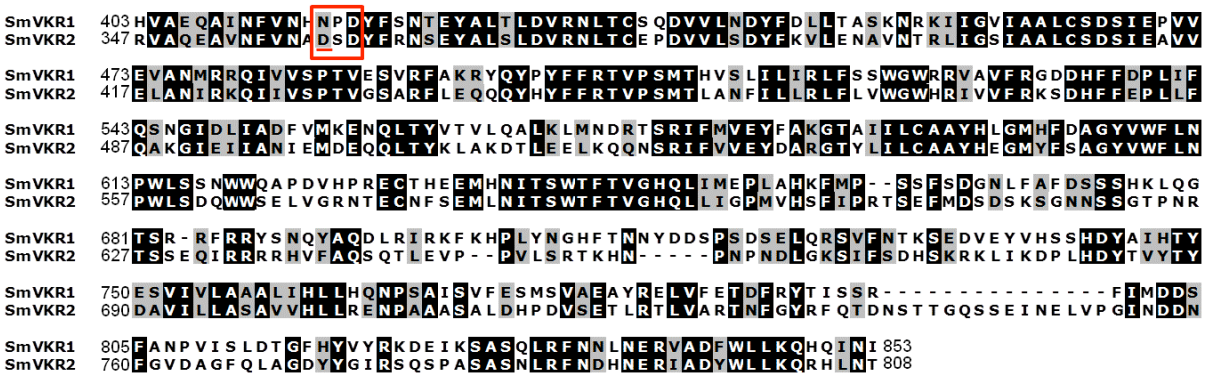
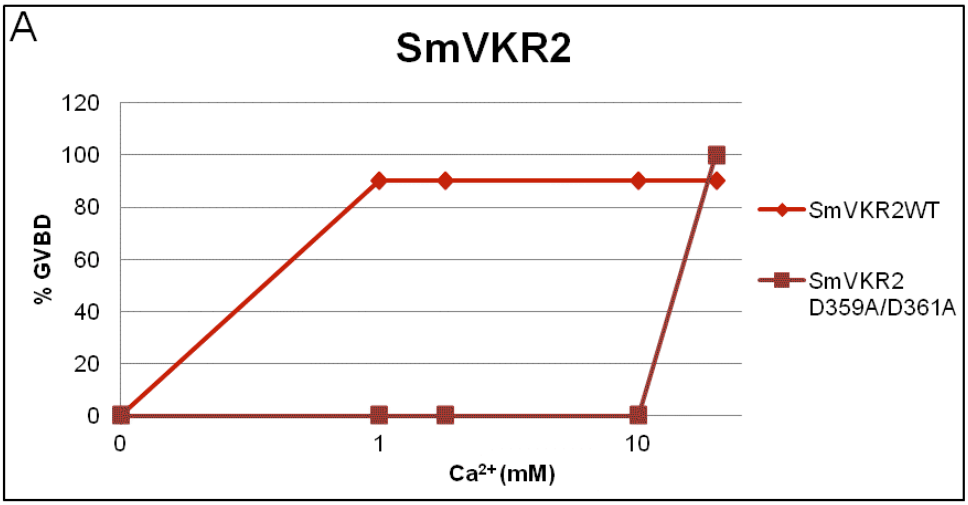


Figure 36 : Alignement des séquences protéiques des VFT de SmVKR1 et SmVKR2. Le domaine de fixation potentiel du calcium est encadré en rouge, le résidu non conservé est souligné.



B

AA (µM)	100	1000
L-Arg	0	100%
L-Thr	0	90%
L-Trp	0	90%
L-Cys	0	90%

C

Ca^{2+} (µM)	-	-	1000	100	100	1000
L-Arg (µM)	1000	100	-	-	100	1000
GVBD	100%	0%	100%	0%	0%	100%

Figure 37 : Tests d'activation de SmVKR2. A : Influence du site de D_{359}-X-D_{361} sur la fixation du Ca^{2+}. Le mutant est 20 fois moins affin pour le calcium. B : Induction de l'activation du récepteur par les L-AA. Seules la L-Arg, la L-Thr, la L-Trp et la L-Cys induisent la GVBD. C : Test de la potentialisation de l'Arg par le calcium. La co-incubation avec des concentrations inférieures au seuil d'activation du récepteur n'induit pas la GVBD. Les ligands fonctionnent donc séparément.

Pour définir la sensibilité de $SmVKR2^{WT}$ et $SmVKR2^{D359A/D361A}$ au calcium, nous avons incubé des ovocytes exprimant l'un ou l'autre des deux construits avec une dose croissante de calcium (de 0,1 à 20mM) et évaluer le pourcentage de GVBD obtenu.

Comme le montrent les résultats de la Figure 37A, 1mM de calcium suffit à activer le récepteur sauvage mais une concentration 20 fois plus grande est nécessaire à l'activation

du mutant. Le motif D-x-D semble donc important pour la fixation du calcium et en conséquence pour l'activation du récepteur.

Même si la présence de calcium se révèle nécessaire et suffisante pour induire l'activation de SmVKR2, il est important de souligner la présence dans SmVKR2 du résidu Ser conservé contenu dans le VFT de SmVKR1 (Ser_{466}) et, d'après nos données, impliqué dans sa forte affinité pour L-Arg. En conséquence, nous avons recherché un effet activateur sur SmVKR2 des AA, et en particulier de L-Arg, qui pourrait être comparable à celui observé pour SmVKR1.

Des ovocytes exprimant $SmVKR2^{WT}$ ont été incubés dans un milieu ND appauvri en calcium en présence de chacun des 20 L-AA (1mM). Après 18h, nous avons observé que seuls l'Arg, Thr, Trp, Cys induisent la maturation des ovocytes. Cependant, ces AA testés à 100µM n'ont aucun effet sur l'activation de SmVKR2 (Figure 37B). La sensibilité de SmVKR2 pour les AA semble donc beaucoup plus faible que celle de SmVKR1 notamment pour L-Arg (en absence de calcium). Nous avons également muté la Ser_{410} de SmVKR2 suivant la même stratégie que pour SmVKR1. Nous avons incubé les ovocytes exprimant $SmVKR2^{S410A}$ avec les quatre AA actifs sur $SmVKR2^{WT}$ à 1mM. Dans ces conditions aucun des AA n'induit l'activation de $SmVKR2^{S410A}$. Cependant l'ajout d'1mM de Ca^{2+} induit bien la GVBD, confirmant que la mutation de la sérine ne perturbe pas la conformation du domaine VFT.

Plusieurs études ont montré que le calcium module la fixation du glutamate sur le récepteur mGluR1 (Tabata et Kano, 2004). Pour vérifier si SmVKR2 pouvait être régulé de la même manière que mGluR1, nous avons incubé des ovocytes exprimant le construit sauvage du récepteur avec des concentrations de calcium et de L-Arg inférieures à leurs seuils d'activation, pour vérifier une éventuelle synergie sur l'activation du récepteur (Figure 37C). Les résultats confirment que 100 µM d'Arg ou de calcium ne sont pas suffisants pour induire la GVBD et qu'une dose de 1mM est requise pour chacun des ligands. Ils montrent aussi qu'aucun effet de synergie n'est obtenu lorsqu'on ajoute les deux ligands simultanément.

SmVKR2 semble donc capable de fixer certains acides aminés à forte concentration ainsi que du calcium à 1mM.

c) Recherche du ligand naturel des VKRs

L-Arg et Ca^{2+} apparaissent donc comme deux ligands potentiels des VKRs du schistosome mais qu'en est-il du ligand naturel ? La présence préférentielle des VKRs dans les tissus reproducteurs des vers ainsi que la dépendance bien connue de l'appariement entre mâles et femelles pour le développement de ces tissus, nous a conduit à envisager que le ligand naturel puisse être présent dans le canal gynécophore du mâle lors de l'accouplement.

Des couples de vers ont donc été isolés, lavés dans un milieu salin (PBS) puis désappariés par simple refroidissement rapide sur glace afin de récupérer le contenu du canal gynécophore (ainsi qu'éventuellement des composants d'excrétion). La fraction soluble GDC (Gynaecophorical Duct Content) provenant d'un seul couple de schistosomes s'est révélée suffisante pour induire dans un volume de 200µl de ND96 l'activation de la GVBD d'ovocytes exprimant SmVKR1^{WT}. En revanche, même à une dose plus importante (10 et 100 fois plus), GDC n'a pas eu d'action sur les ovocytes exprimant SmVKR2^{WT} (pas de GVBD dans le milieu sans Ca^{2+}). Des fractions solubles préparées dans les mêmes conditions à partir de vers mâles ou femelles isolés n'ont aucun effet sur les ovocytes exprimant l'un ou l'autre des VKRs, signifiant qu'un ligand naturel de SmVKR1 serait présent exclusivement dans la zone d'interaction entre les deux partenaires. Des expériences sont en cours pour déterminer la nature de la molécule impliquée. En collaboration avec le Dr O. Marcillat de l'Université de Lyon 1, nous avons pu démontrer par la technique de dérivation du groupement guanidylique par la benzoïne (Kai *et al*, 1984) la présence de composés guanidino dans le GDC (concentration estimée à 50µM). Leur purification par HPLC et leur analyse en spectrométrie de masse pourront nous renseigner sur la structure chimique des composés, et en particulier sur la présence d'Arg ou de dérivés spécifiques d'Arg, pouvant représenter les ligands de SmVKR1.

3. Recherche de partenaires cytoplasmiques des VKRs

a) Stratégie de criblage

Pour identifier les voies de signalisation déclenchées par les VKRs, nous avons entrepris le criblage d'une banque d'ADNc de couples de schistosomes adultes en levure par la technique de double hybride, en utilisant les domaines intracellulaires (DIC) des deux récepteurs comme appâts. Afin de garantir et d'identifier les fixations phospho-indépendantes et/ou phospho-dépendantes des partenaires cytoplasmiques, nous avons utilisé le DIC des formes sauvages (SmVKR1DIC^{WT} et SmVKR2DIC^{WT}) et constitutivement actives (SmVKR1DIC^{YYRE} et SmVKR2DIC^{YYRE}) des deux récepteurs, ces dernières permettant d'obtenir des domaines phosphorylés (Gouignard *et al*, 2011, Figure 5) en dépit de l'absence d'activité TK dans la levure.

Les quatre formes ont été clonées dans un vecteur d'expression en fusion avec la moitié « Binding domain » (BD) d'un facteur de transcription. Des levures *Saccharomyces cerevisiae* de souche Y187 ont été transformées avec ces quatre construits et sélectionnées sur milieu sélectif. Les levures haploides transformées avec l'appât ont été fusionnées avec la banque d'ADNc en fusion avec « l'activating domain », la seconde moitié du facteur de transcription, contenue dans les levures de souche AH109, elles aussi haploïdes. Si une

interaction protéine-protéine a lieu entre l'appât et la proie, les deux parties du facteur de transcription se rapprochent et permettent la transcription de gènes de sélection indispensables à la croissance des levures sur milieu sélectif.

b) Identification préliminaire des protéines cibles

A la suite de l'accouplement des levures, nous avons pu sélectionner, en observant les colonies capables de pousser sur milieu restrictif, 161 clones positifs pour SmVKR1DIC^{WT}pGBKT7, 191 pour SmVKR1DIC^{YYRE}pGBKT7, 55 pour SmVKR2DIC^{WT}pGBKT7 et 61 pour SmVKR2DIC^{YYRE}pGBKT7.

Nous avons extrait les ADN plasmidiques de chacun des diploïdes sélectionnés puis nous avons transformé des bactéries compétentes pour les amplifier. Les bactéries transformées ont été étalées sur un milieu riche complémenté en ampicilline afin de sélectionner les plasmides proies qui portent le gène de résistance à cet antibiotique. L'ensemble des plasmides a été séquencé. Après analyse des résultats, nous avons obtenu 35 protéines différentes pour l'appât SmVKR1DIC^{WT}, 35 pour SmVKR1DIC^{YYRE}, 10 pour SmVKR2DIC^{WT} et 8 pour SmVKR2DIC^{YYRE}. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 1. Une analyse préliminaire des séquences obtenues par BLAST sur les banques de données NCBI, nous a permis d'identifier ces protéines lorsque des homologues existent et de les classer suivant leur fonction potentielle. Ainsi 9 grands groupes ressortent : le groupe 1 regroupe des protéases et des métalloprotéases, dans le groupe 2 ont été classées des protéines associées au complexe ribosomique. Le groupe 3 contient des protéines nucléaires, tandis que le groupe 4 est composé de protéines mitochondriales. Le groupe 5 est principalement composé de protéines du cytosquelette et de molécules participant à son réarrangement. Dans le groupe 6 ont été rassemblées des protéines participant à des voies de signalisation associées aux RTKs. Le groupe 7 rassemble des protéines impliquées dans des voies de biosynthèse ou de métabolisme. Le groupe 8 contient des protéines de structure ou chaperonnes. Et enfin le groupe 9 regroupe des protéines inconnues ou dont la séquence protéique ne contient aucun domaine fonctionnel connu. Certaines protéines ont été sélectionnées avec plusieurs appâts comme le collagène ou la cathepsine reflétant sans doute des interactions aspécifiques. Pour démontrer la spécificité des interactions que nous avons mises à jour, il est nécessaire de procéder à des co-immunoprécipitations entre l'appât et la cible. Devant le nombre de protéines identifiées, spécialement pour les construits SmVKR1, nous avons décidé d'effectuer une première sélection des partenaires présentant à nos yeux le plus grand intérêt pour la suite des expériences. Ainsi plusieurs protéines intéressantes ressortent comme SmRho1, PP2C, Ftz-F1 interacting protein (FIP)

identifiées avec SmVKR1DIC^{WT}, Notch, Zyxin, Mek7 pour SmVKR1DIC^{YYRE}, Cbl et PDE-12 pour SmVKR2DIC^{YYRE} et enfin SmSirt7 identifiée grâce à SmVKR1DIC^{WT} et SmVKR2DIC^{WT}.
A noter la présence d'une protéine inconnue (N° XM_002581273.1) interagissant avec SmVKR1DIC^{YYRE} dont l'analyse de la séquence protéique a révélé la présence d'un domaine d'interaction SH2.
Toutes ces protéines sont connues pour faire partie de voies de signalisation dépendantes ou associées aux RTKs. Cependant peu de données sont disponibles sur les possibles interactions directes qui existent entre les récepteurs et des protéines comme Mek7, Notch ou des protéines nucléaires. Il est donc impératif pour nous de confirmer ces interactions. Pour ce faire, les séquences pleine longueur des protéines choisies doivent être clonées dans le vecteur pGAD, équivalent à celui qui renferme la banque, pour effectuer des co-transformations en levure et ainsi établir par co-immunoprécipitation la relevance des interactions identifiées.
Les séquences complètes de SmRho1 (Santos *et al*, 2002), fournie par le Dr T. Quack et SmFIP (Oger *et al*, 2006) sont déjà disponibles au laboratoire. Pour les autres protéines, nous avons effectué des RACE-PCR à partir d'ADNc de couples de vers et des données disponibles sur SchistoDB. Les séquences complètes obtenues pour SmZyxin, SmMek7, SmSirt7, SmPP2C, et la protéine contenant un domaine SH2 se trouvent en Annexe 3 page 156 à 163.

	SmVKR1DIC^{WT}	SmVKR1DIC^{YYRE}	SmVKR2DIC^{WT}	SmVKR2DIC^{YYRE}
Groupe 1: Protéases/Métalloprotéases	Cathepsin B: M21309.1			
	zinc metalloproteinase: XM_002573446.1	26S protease regulatory subunit S10b : XM_002573132.1		
	Thimet oligopeptidase (M03 family): XM_002574355.1			
	26S protease regulatory subunit: XM_002572663.1			
	Carboxypeptidase: XM_002581470.1			
Groupe 2: Protéines associées au Ribosome	elongation factor Tu GTP binding domain containing protein: XM_002571419.1	methionyl aminopeptidase 2 (M24 family): XM_002572527.1	Elongation factor Tu GTP binding domain containing protein: XM_002571419.1	60S ribosomal protein L26-like: DQ480541.1
	40S ribosomal protein S28, putative: XM_002573998.1	Elongation factor 1-alpha: Y08487.1	tRNA d(2)-isopentenylpyrophosphate transferase: XM_002571087.1	
		Ribosomal protein S2: XM_002572774.1		
Groupe 3: Protéines Nucléaires	TFIIA Large subunit: XM_002579091.1	Cellular nucleic acid binding protein: XM_002581028.1		
	nuclear autoantigenic sperm protein: XM_002577077.1	phd finger protein, putative: XM_002577142.1	SmSirt7: XM_002573861.1	
	SmSirt7: XM_002573861.1	pre-mRNA processing protein prp39-related: XM_002579875.1		
	Ftz-F1 interacting protein: AY456264.1	nuclear autoantigenic sperm protein: XM_002577077.1		
		HRX histone methyltransferase: XM_002574332.1		
Groupe 4: Protéines Mitochondriales	Mitochondrial solute carrier-related: XM_002576745.1			PDE-12 like protein: XM_002577997.1
	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kD subunit: XM_002578142.1			
Groupe 5: Protéines associées au cytosquelette et à son réarrangement	Rho GTPase (SmRho1): AY158212.1	Synaptotagmin: XM_002576619.1	Coatomer gamma subunit: XM_002580203.1	Actin: XM_002580135.1
	Fibrillin 2: U54588.1	Filamin-related protein: XM_002577611.1		
	Actin: M80334.1	Gamma adaptin: XM_002569944.1		
		Junctophilin-like protein: XM_002576132.1		
		Spectrin, Beta chain: XM_002579838.1		
Groupe 6: Protéines associées aux Voies de signalisation RTK	PP2C: XM_002575792.1	Notch: XM_002574857.1		Cbl: XM_002571919.1
		zyxin/trip6: XM_002575737.1		
		Guanidino kinase: J05410.1		
		SH2 domain-containing protein: XM_002581273.1		
		Protein Kinase (Mek7): XM_002574592.1		
		Peter-pan related protein: XM_002580320.1		
Groupe 7: Métabolisme	Glutathione peroxidase: M86510.1	dihydropyrimidinase (M38 family): XM_002579567.1		Endoglycosylceramidase: XP_002577487.1
	ATP-dependent transporter: XM_002576209.1	subfamily T1A non-peptidase homologue (T01 family): XM_002574652.1		
	NADH-cytochrome B5 reductase: XM_002576573.1	serine hydroxymethyltransferase putative XM_002575420.1		
	Autophagy-related protein 101 like: XM_002577493.1	GAPDH: XM_002576948.1		
	ornithine aminotransferase: EU042598.1			
	microsomal glutathione s-transferase: XM_002576747.1			
	chitobiosyldiphosphodolichol alpha-mannosyltransferase: XM_002571918.1			
Groupe 8: Protéines de structure/ Chaperonne	Collagen alpha-1(V): XM_002575487.1			
	Collagen alpha-1(I): XM_002573866.1			
	Prefoldin subunit: XM_002578485.1			
		eggshell precursor protein: X05842.1	HSP70: L02415.1	
		Peptidylprolylisomerase: XM_002577985.1		
Groupe 9: Protéines inconnues	Expressed protein: XM_002580307.1	Hypothetical protein: XM_002577441.1	Expressed protein x: XM_002572699.1	
	Expressed protein: XM_002579419.1	Sj-TS4 protein homolog: XM_002572541.1		
	Expressed protein: XM_002571743.1	Expressed protein: XM_002575228.1		
	Expressed protein: XM_002576151.1	Expressed protein: XM_002572591.1		
	Expressed protein: XM_002577690.1	Plac8 homolog: XM_002573812.1		
	Hypothetical protein: XM_002575402.1			
	female-specific protein 800 (fs800): XM_002571442.1			

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des protéines obtenues par screening de la banque d'ADNc de schistosomes adultes avec les appâts SmVKR1DIC^{WT}, SmVKR1DIC^{YYRE}, SmVKR2DIC^{WT}, SmVKR2DIC^{YYRE}. Les protéines sont classées en 9 groupes suivant leur fonction.

c) Caractérisation d'une nouvelle protéine à domaine SH2 (SmSH2)

Nous avons analysé la séquence prédite de la protéine non annotée correspondant au numéro d'accession XP_002581319.1 et qui possède un domaine SH2. Cette protéine serait composée de 1141 AA et ne coderait qu'un seul domaine globulaire en C-ter, le domaine SH2. La séquence située en N-ter du domaine SH2 est très riche en résidus proline (78) qui sont soit réparties dans la séquence soit concentrées en séquences « proline-rich » (PPXXPP ; PXXPXXP ; PPPPPXP ; PPXPPXPPPXXPPXPPXxP ; XPPX ; XPPX). Les séquences riches en Pro sont connues pour servir de site de fixation à des domaines de reconnaissance comme les domaines SH3 et WW. De plus, nous avons retrouvé 26 résidus Tyr répartis sur l'ensemble de la séquence qui pourrait subir une phosphorylation soit par le récepteur (comme SmVKR1) soit par une protéine partenaire.

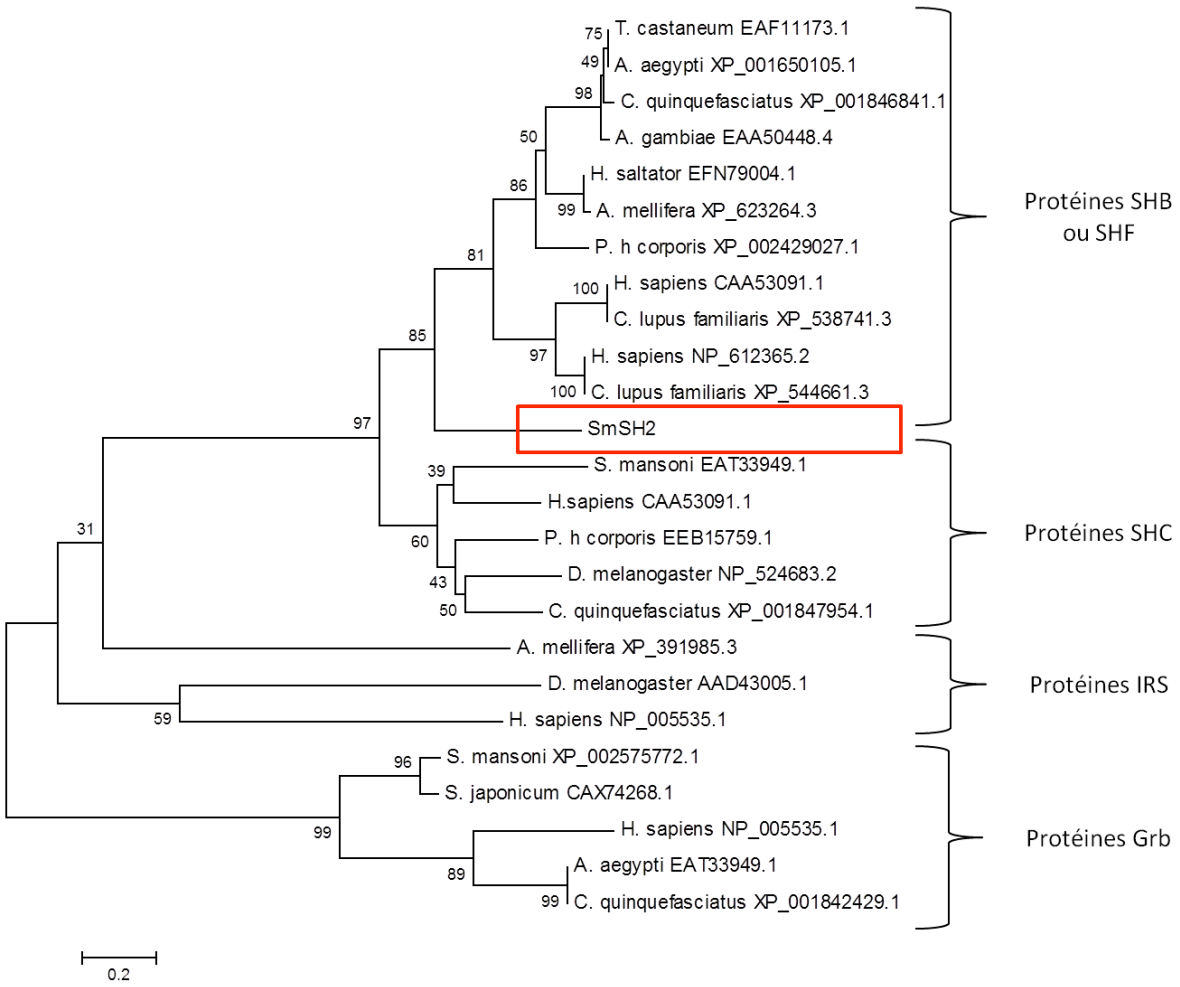


Figure 38 : Relation phylogénétique de protéines adaptatrices contenant un domaine SH2. Arbre du lien phylogénétique de la protéine inconnue SmSH2 avec d'autres protéines contenant un domaine SH2. Nous avons utilisé les séquences des protéines SHB, SHC, Grb2, et IRS de différentes espèces animales. L'arbre phylogénétique a été obtenu suivant la méthode du Neighbor-joining utilisant un test de bootstrap (100000 réplicats) et une méthode de correction de Poisson.

Nous avons effectué une analyse par BLAST puis une analyse phylogénétique pour tenter d'affilier cette protéine à une famille de protéines connues. Les résultats montrent une homologie de séquence du domaine SH2 avec les domaines SH2 des protéines adaptatrices SHB (Src Homology 2 containing adaptor B) et leurs homologues SHF. L'arbre phylogénétique présenté Figure 38 inclut les séquences de diverses protéines adaptatrices possédant un domaine SH2. Les résultats montrent que la protéine serait plus proche des protéines SHB et SHF. Nous ne pouvons pas discriminer ici à laquelle des deux familles appartient la protéine SmSH2. Cependant les résultats mettent clairement en évidence que SmSH2 n'appartient pas aux familles SHC, IRS ou GRB2 (se distinguant bien de SmSHC et SmGRB2 caractérisés chez *S. mansoni*).

4. Recherche de la fonction des VKRS

En parallèle des expériences réalisées *in vitro*, nous avons mis en place des expériences d'ARNi ciblant SmVKR1 et/ou SmVKR2 afin d'évaluer l'impact de la diminution de leur transcrits sur les stades adulte et larvaire sporocyste.

Des dsRNA de SmVKR1 et de SmVKR2 ont été délivrés dans le milieu de culture des larves au cours de leur transformation miracidium-sporocyste, puis nous avons suivi leur croissance pendant 7 jours (Mourão *et al*, 2009). Nous avons évalué par RT-PCR en temps réel l'efficacité de l'interférence par rapport à des sporocystes non interférés. Deux jours après interférence, nous avons constaté une diminution importante des transcrits dans les sporocystes interférés (Figure 39).

En effet, les sporocystes interférés pour SmVKR1 ont vu leur taux de transcrits smvkr1 diminuer de plus de 50%. De même, des sporocystes interférés pour SmVKR2 ont perdu 60% de leur transcrits smvkr2. Cependant, on observe une diminution de 80% du taux de smvkr2 chez les sporocystes interférés avec des dsSmVKR1 et une diminution de plus de 20% des transcrits smvkr1 chez des sporocystes interférés avec des dsSmVKR2. Ces résultats sont surprenants si on considère le témoin interne de l'expérience qui montre que le taux de transcrit du gène de la Protein Disulfide Isomerase (PDI) varie très peu. Il se pourrait donc que les dsVKRs entrainent la diminution des deux récepteurs sans distinction malgré les précautions que nous avons prises pour éviter tout croisement entre les deux récepteurs.

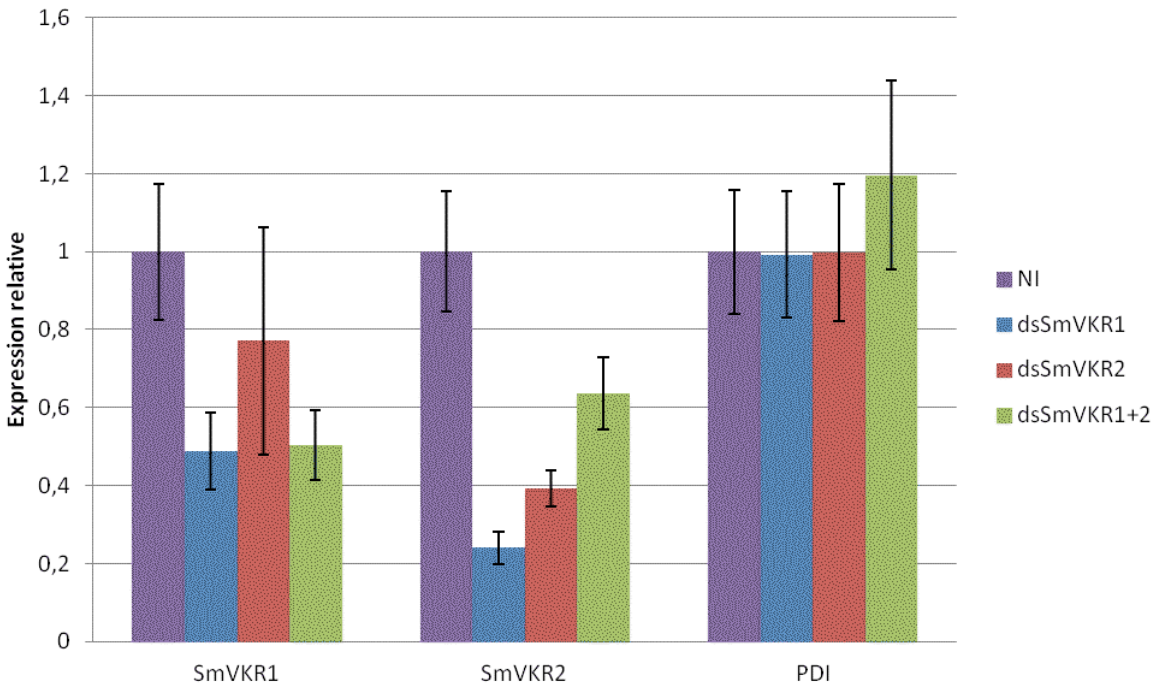


Figure 39: Quantification des transcrits smvkr1 et smvkr2 dans les sporocystes interférés avec des dsSmVKR. L'amplification des transcrits a été réalisée en triplicates à partir d'ADNc (n=3) de sporocystes 48h après interférence. Le taux d'expression du gène PDI (protéine disulfide isomérase) a servi de référence interne. Pour la représentation graphique des résultats, les valeurs de Ct de chaque condition ont été exprimées en fonction de l'expression de smvkr1, de smvkr2 et de PDI de sporocystes contrôles non interférés (NI) par la méthode du Ct.

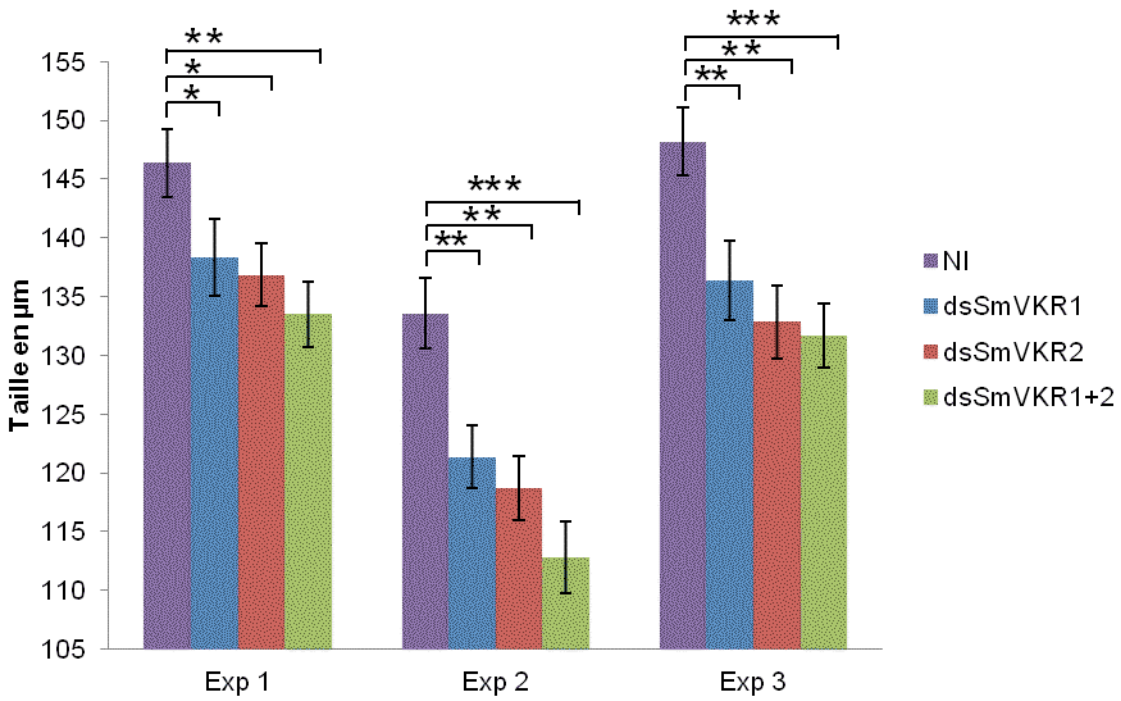


Figure 40 : Effet de l'interférence dsSmVKR sur la taille (µm) des sporocystes. NI : Non interférés (Violet). Sur les 3 expériences réalisées (Exp 1 à 3), les sporocystes interférés présentent une diminution significative de taille (Test de student : * <0,05 ; **<0,01 ; ***<0,001).

Pour chaque expérience d'interférence, nous avons évalué la taille de 50 sporocystes pris au hasard et répété les expériences à trois reprises. Dans tous les cas, la diminution des transcrits des deux VKRs est associée à une diminution significative de la taille des sporocystes en culture après 7 jours (Figure 40) par rapport à des sporocystes non interférés mais aussi par rapport à des sporocystes interférés avec des dsRNA non relevants (résultats non présentés). A noter que la diminution de taille des sporocystes est chaque fois plus importante dans le cas de sporocystes interférés pour les deux VKRs.

Il semblerait donc que les VKRs jouent un rôle dans le développement et la croissance du stade larvaire sporocyste mais qu'en est-il chez l'adulte ?
Les mêmes dsRNA ont été délivrés par électroporation à des couples de vers adultes. Après 5 jours de culture nous avons évalué la diminution des transcrits par RT-PCR en temps réel. Malgré plusieurs essais, les dsSmVKR2 n'ont pas eu d'impact sur le taux de transcrits smvkr2 (ni sur ceux de smvkr1). Nous avons donc choisi de cibler une partie différente de la protéine pour tenter de pallier ce problème.
Avec ces nouveaux dsSmVKR2, nous avons constaté une diminution importante (60%) du taux de transcrits smvkr2 (Figure 41). De même, les dsSmVKR1 ont permis une très forte diminution de smvkr1 (plus de 80%). La double interférence a entrainé une diminution respective de 35 et 57% des transcrits smvkr1 et 2.

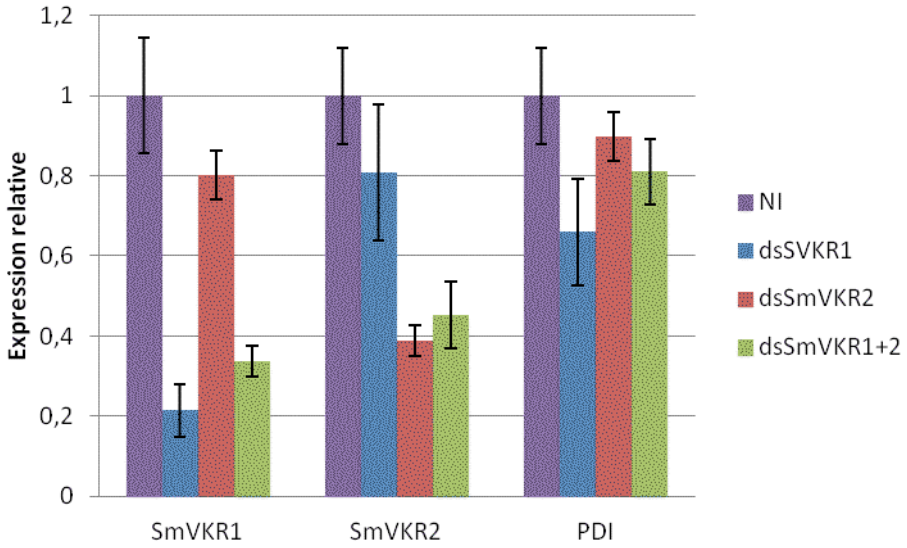


Figure 41 : Quantification des transcrits smvkr1 et smvkr2 de couples de vers adultes interférés avec des dsSmVKR. L'amplification des transcrits a été réalisée en triplicates à partir d'ADNc (n=3) de parasites 5 jours après interférence. Le taux d'expression du gène PDI (protéine disulfide isomérase) a servi de référence interne. Pour la représentation graphique des résultats, les valeurs de Ct de chaque condition ont été exprimées en fonction de l'expression de smvkr1 et de smvkr2 de vers contrôles non interférés (NI) par la méthode du Ct.

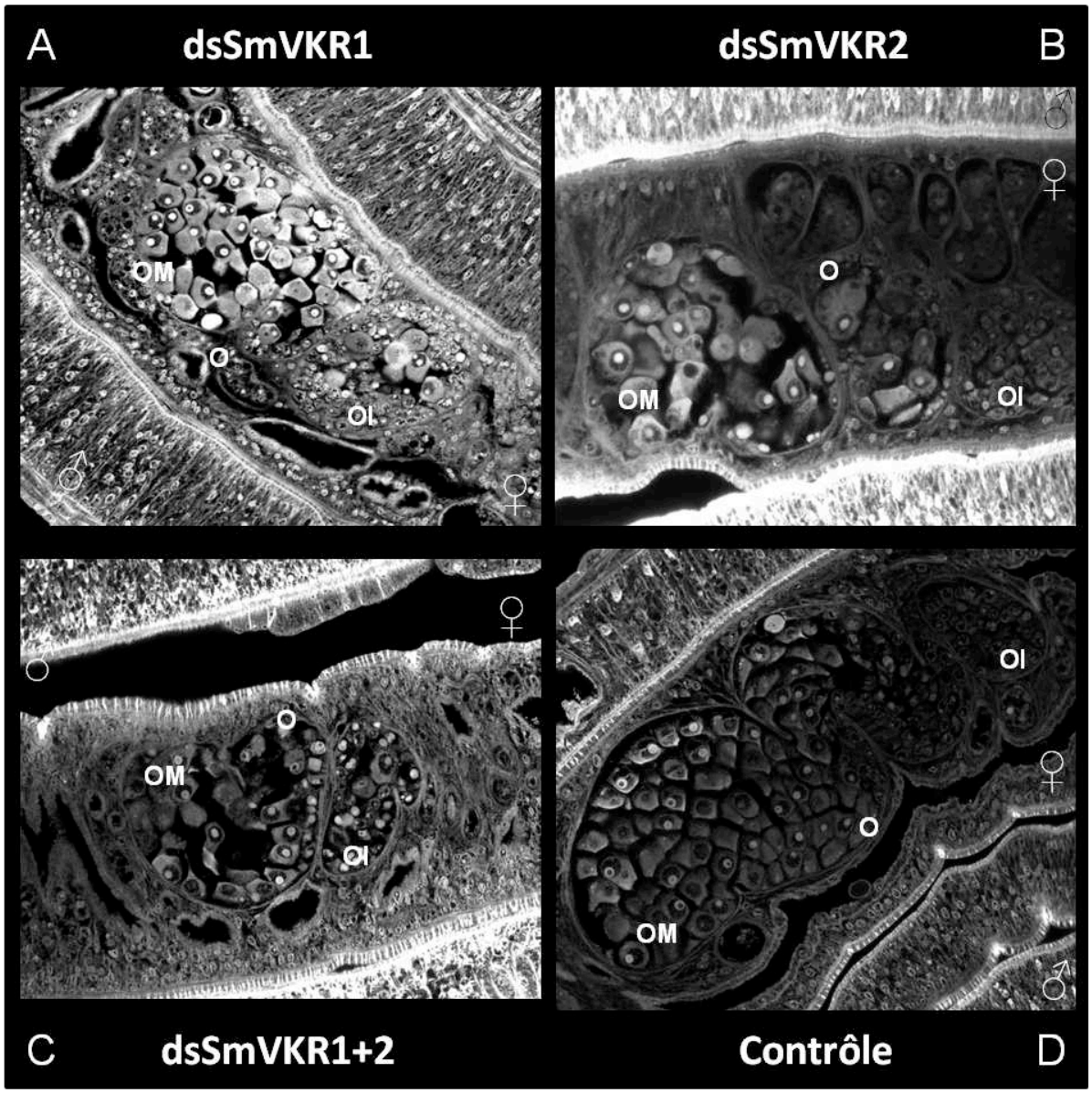


Figure 42 : Observations au microscope confocal laser des vers adultes interférés avec les dsSmVKR1 (A), dsSmVKR2 (B) ou les deux à la fois (C) et de vers non interférés (D). O : Ovaire ; OI : Ovocytes immatures, OM, Ovocytes matures (grossissement X60). Une désorganisation des ovaires est observée dans les vers interférés ainsi qu'une réduction de leur taille dans le cas d'une interférence SmVKR2.

Comme nous pouvons le constater, contrairement à ce qui s'est passé pour le stade sporocyste, il y a eu peu de croisement dans l'interférence des deux VKRs. Nous pouvions donc envisager de visualiser l'impact de l'interférence de SmVKR1 et de SmVKR2 séparément pour attribuer un phénotype propre à chaque récepteur.

Les vers interférés ont été observés au microscope confocal à balayage laser après coloration au rouge carmin afin d'étudier leur organes internes. Nos observations n'ont pas révélé de changement majeur dans la structure du système digestif des vers, ni dans celle du vitellarium pour les femelles ou des testicules pour les mâles (résultats non présentés). Cependant, nous avons observé une architecture aberrante des ovaires de la femelle comme le montre la Figure 42. Les femelles non interférées (Figure 42D) présentent un

ovaire plurilobé (O) composé du côté antérieur de petits ovocytes immatures (OI) et du coté postérieur de gros ovocytes matures (OM). Suite à l'interférence, les femelles présentent une désorganisation des ovocytes (Figure 42A, B, C), avec des ovocytes matures dans la partie antérieure de l'ovaire au milieu des ovocytes immatures. De plus dans le cas des parasites interférés par les dsSmVKR2 (Figure 42B) ou par les deux dsRNA (Figure 42C), les ovaires présentent une importante diminution de taille. Ce phénotype pourrait être lié au knock-down de SmVKR2.

5. Sensibilité des VKRs aux inhibiteurs kinases

Nous avons constaté par des analyses phylogénétiques que le domaine TK des VKRs était proche de ceux des IR ainsi que des FGFR (Ahier *et al*, 2009). Pour confirmer cette observation, nous avons étudié la sensibilité des deux VKRs aux inhibiteurs de kinase commerciaux qui ciblent différents RTKs. Pour cela nous avons incubé des ovocytes exprimant SmVKR1 et SmVKR2 actifs, avec des inhibiteurs d'IR (Tyrphostines AG1024, AG538 et HNMPA-(AM)3), d'EGFR (AG1478), de FGFR (BIBF1120) et du récepteur Met (SU11274) ainsi qu'avec du Genistein, un inhibiteur général des TK. Nous avons ensuite évalué la capacité des inhibiteurs à bloquer la GVBD induite par les VKRs activés (Tableau 2).

	SmVKR1	SmVKR2
Contrôle	100%	90%
Genistein 10µM	0%	0%
AG1024 0,1µM	0%	0%
AG538 1µM	0%	0%
HNMPA-(AM)3 0,1µM	0%	0%
AG1478 0,1µM	0%	0%
BIBF1120 10µM	100%	0%
SU11274 1µM	100%	70%

Tableau 2 : Evaluation de la sensibilité des SmVKRs à différents inhibiteurs de kinases. Les chiffres indiquent les pourcentages de GVBD induite par SmVKR1 et SmVKR2 actifs en présence ou en absence d'inhibiteurs. Les tyrphostines (AG1024, AG538, AG1478), l'HNMPA et le Genistein bloquent la maturation des ovocytes exprimant SmVKR1 et SmVKR2. Le BIBF1120 bloque la GVBD induite par SmVKR2 mais pas par SmVKR1. Le SU11274 n'a aucun effet inhibiteur.

Les ovocytes contrôles exprimant SmVKR1 et SmVKR2 actifs ont maturé en absence d'inhibiteur. En présence de 10µM de Genistein, de 0,1µM d'AG1024, d'AG1478 et d'HNMPA et de1µM d'AG538, aucune GVBD n'a été obtenue, ni pour SmVKR1 ni pour SmVKR2. Nous avons pu vérifier que l'ajout de progestérone sur ces ovocytes induit la maturation méiotique, ce qui confirme que les inhibiteurs n'ont pas agi sur la machinerie moléculaire de l'ovocyte mais bien sur les VKRs.

En présence de BIBF1120, la GVBD chez les ovocytes exprimant SmVKR1 n'est pas inhibée. Par contre de façon surprenante, les ovocytes exprimant SmVKR2 se sont montrés sensibles à cet inhibiteur de FGFR. Comme précédemment, l'induction de la GVBD a été obtenue après ajout de progestérone, confirmant que l'inhibition concerne spécifiquement SmVKR2.
Enfin, nous avons constaté que l'inhibiteur de Met SU11274 n'a aucun effet sur les VKRs.

Nous avons également utilisé le modèle d'expression en ovocyte pour tester des inhibiteurs de différentes kinases, acteurs de voies de signalisation de l'ovocyte et pouvant être activées par les VKRs.
En collaboration avec l'équipe du Pr Christoph Grevelding, nous avons montré que SmVKR1 pouvait interagir *in vitro* avec SmTK6 et SmTK3, deux CTKs de la famille Src (Beckmann *et al*, soumis). Nous avons donc envisagé que des CTKs endogènes à l'ovocyte puissent prendre part à la voie de signalisation activée par les VKRs, induisant la GVBD. Pour tester cette hypothèse des ovocytes exprimant SmVKR1 ou SmVKR2 ont été incubés avec des inhibiteurs de Src, Herbimycin A et PP2. De plus, nous avons testé la Rapamycine, un inhibiteur de la voie TOR, la Wortmannin et la molécule LY294002 qui inhibent la PI3K et enfin l'U0126 qui inhibe Mek (MAPKK).

	SmVKR1	SmVKR2
Herbimycin A 0,1µM	90%	0%
PP2 10µM	100%	0%
Rapamycine 1µM	60%	90%
Wortmannin 50 nM	0%	0%
LY294002 20µM	0%	0%
U0126 10 µM	0%	0%

Tableau 3 : Identification des voies activées par les SmVKRs dans l'ovocyte. Le pourcentage de GVBD induite par l'activation de SmVKR1 et SmVKR2 est évalué en présence ou en absence d'inhibiteurs commerciaux ciblant les principales voies de signalisation impliquées dans la maturation de l'ovocyte. Les inhibiteurs de PI3K (Wortmannin et LY294002) bloquent la maturation des ovocytes exprimant SmVKR1 et SmVKR2. Les inhibiteurs de Src bloquent la GVBD induite par SmVKR2 mais pas par SmVKR1. La Rapamycine n'a pas d'effet inhibiteur.

Les deux inhibiteurs de Src entrainent l'inhibition de la GVBD induite par l'activation de SmVKR2 mais pas de SmVKR1 (Tableau 3). Ce qui montre que SmVKR2 induit la GVBD via l'activation d'au moins une kinase Src endogène contrairement à SmVKR1.
Aucune inhibition n'est obtenue avec la Rapamycine à 1µM mais les inhibiteurs de PI3K et de MAPKK (Mek1 et Mek2) bloquent la maturation méiotique de l'ovocyte dans le cas des deux VKRs (Tableau 3).

Ces résultats suggèrent que SmVKR1 et SmVKR2 possèdent un domaine catalytique effectivement proche de ceux des IR et qu'ils induisent l'activation d'une voie similaire à l'IR, dépendante dans le cas de SmVKR2 d'une Src endogène.

6. Discussion :

Les VKRs forment une nouvelle famille de récepteurs présents à l'heure actuelle exclusivement dans des organismes invertébrés. La récente découverte de nouveaux membres de cette famille chez les fourmis *Solenopsis invicta (SiVKR)*, *Camponotus floridanus* (CfVKR) et *Harpegnathos saltator* (HsVKR) est des plus intéressantes. En effet, elle conforte l'idée que les VKRs forment une famille de RTKs importante dont la taille ne cessera d'augmenter au fur et à mesure du séquençage et de la publication des génomes d'invertébrés. Dans ces conditions, il nous semble essentiel de continuer à étudier ces récepteurs originaux conservés au cours de l'évolution pour comprendre leur fonction au sein des organismes qui les expriment.

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés à *Schistosoma mansoni*, le seul organisme actuellement connu qui exprime deux VKRs. La présence de ces deux protéines distinctes pose de nombreuses questions et laisse entrevoir de nombreuses hypothèses. Nous savons que tous deux sont exprimés à tous les stades parasitaires mais sont-ils exprimés dans les mêmes tissus ? Fonctionnent-ils indépendamment l'un de l'autre ou sont-ils deux unités d'un même hétérodimère ? Répondent-ils aux mêmes mécanismes d'activation ? Activent-ils les mêmes voies de signalisation ? Ont-ils une fonction conjointe ou antagoniste ? Et surtout quelle est cette fonction ?

Sont-ils exprimés dans les mêmes tissus ?

Des études préliminaires avaient montré que les transcrits smvkr1 sont exprimés dans les ovaires des vers femelles et particulièrement dans les ovocytes matures (Vicogne *et al*, 2003). Ici nous avons montré par hybridation *in situ*, que les transcrits smvkr2 sont eux aussi présents dans les organes génitaux de la femelle. (Figure 31). Cependant, contrairement à smvkr1, les transcrits smvkr2 sont principalement retrouvés dans les petits ovocytes correspondant à des ovocytes immatures, ainsi qu'au niveau de l'ootype. Les résultats que nous avons obtenus ne montrent pas de marquage dans les autres organes de la femelle (parenchyme, vitellarium) ni chez le mâle. Pourtant nous avons déjà démontré la présence et quantifié par RT-PCR les transcrits smvkr2 chez les vers adultes mâles (Cf, Gouignard *et al*, 2011, Figure 3D). Bien que l'hybridation *in situ* ne soit pas une méthode de détection quantitative, nous pouvons supposer que les transcrits smvkr2 sont exprimés dans l'ensemble du parasite et donc globalement en concentration trop faible dans les tissus du

mâle pour être détectée par cette méthode. La « disparition » des transcrits smvkr2 entre les ovocytes immatures et les ovocytes matures suggèrent que les ARNm ont été traduits lors de la transition entre ces deux types d'ovocytes, impliquant la présence éventuelle des protéines dans les ovocytes matures.

Dans les parasites analysés avec des sondes contrôles sens, nous pouvons voir un léger marquage de l'ootype (Figure 31B) qui pourrait être expliqué par la présence d'ARN antisens. Au laboratoire, nous avons déjà observé un marquage des schistosomes adultes en hybridation *in situ* avec des sondes sens de la kinase SmSLK (Yan *et al*, 2007). Au cours de sa thèse, Thavy Long a réussi à caractériser ces ARN antisens de SmSLK et démontrer leur rôle possible dans la régulation post-transcriptionnelle de SmSLK (Non publié). Une étude récente démontre que 10,2% des « Expressed Sequence Tags » (ESTs) de *S. mansoni* sont des séquences d'ARN non codant, incluant les ARN antisens (Oliveira *et al*, 2011). De plus en plus d'ARN antisens sont identifiés mais leurs rôles restent encore mal compris. A l'avenir il serait intéressant de rechercher la présence d'ARN smvkr2 antisens qui pourraient être, comme nous le pensons pour SmSLK, des régulateurs potentiels de l'expression du récepteur.

Compte tenu du profil d'expression de SmVKR1 et de SmVKR2, nous nous sommes intéressés à leur présence chez des vers immatures sexuellement. En effet, si des vers femelles ne se sont jamais appariés, ils ne développent pas leurs organes reproducteurs faute de stimulus provenant du mâle. Comme nous pouvions le prévoir, les femelles immatures n'expriment que très peu de transcrits vkr (Figure 32B), confirmant que la majorité des ARNm codant les VKRs doivent se trouver dans les ovaires des femelles matures.

De façon plus surprenante, les mâles immatures expriment eux aussi beaucoup moins de transcrits que les mâles matures (Figure 32A), alors qu'aucune différence morphologique majeure n'est constatée entre eux. Néanmoins une étude transcriptomique a démontré que la transcription de nombreux gènes du mâle était elle aussi influencée par l'appariement. Ces gènes joueraient une fonction dans la consommation des globules rouges, la stabilisation de l'appariement et la reproduction (Fitzpatrick et Hoffmann, 2006).

Si nous avons montré que les ARNm des deux VKRs sont présents dans les organes reproducteurs et que leur régulation semble être influencée par l'appariement, nous devons encore confirmer l'expression et la localisation des protéines. SmVKR1 a été localisé chez le ver adulte mâle dans le parenchyme, mais aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne le ver femelle. Nous avons donc initié la production d'anticorps anti-SmVKR1 et anti-SmVKR2 ciblant le domaine extracellulaire des deux récepteurs. Notre stratégie a été basée sur l'immunisation d'animaux contre des peptides de SmVKR1 ou de SmVKR2 (Figure 33) une stratégie déjà utilisée avec succès pour la production d'anticorps anti-AmVKR (Gouignard *et al*, mémoire M2R, 2008). Malgré de nombreuses tentatives, nous

n'avons pas été capables de détecter les protéines SmVKR1 et SmVKR2 dans des extraits parasitaires à l'aide de ces anticorps. Dans le cas des anticorps anti-SmVKR1, ces derniers reconnaissent pourtant en Western Blot le domaine VFT recombinant SmVKR1 produit en bactérie. Cette expérience contrôle suggérerait que notre incapacité à détecter les VKRs dans les extraits parasitaires est due à une concentration insuffisante des récepteurs dans les extraits analysés et probablement à leur extraction partielle à partir des membranes du parasite. En effet, le schistosome possède un tégument difficile à lyser et des mises au point des conditions d'extraction des protéines membranaires sont encore à réaliser. Parallèlement à la détection des protéines en Western Blot, nous envisageons de tenter de localiser dans des coupes de vers adultes les récepteurs dans les tissus par immunolocalisation.

Nous ne pouvons pas non plus exclure que le stade adulte ne soit pas celui qui contient majoritairement les protéines SmVKR. En effet SmVKR1 et SmVKR2 pourraient être effectivement transcrits dans les ovocytes de la femelle, mais leur traduction pourrait avoir lieu au stade œuf. L'expression des deux récepteurs n'a pas encore été testée dans ce stade.

Fonctionnent-ils indépendamment l'un de l'autre ou sont-ils deux unités d'un même hétérodimère ?

Bien que les transcrits smvkr1 et 2 soient concentrés dans des parties différentes de l'ovaire, nous pouvons malgré tout envisager que les protéines soient exprimées dans les mêmes cellules. L'homodimérisation mais aussi l'hétérodimérisation de SmVKR1 et de SmVKR2 sont des questions importantes qu'il nous faut élucider. Nous avons déjà montré que AmVKR de l'abeille se comporte comme tous les RTKs et s'homodimérise *in vitro* (Ahier *et al*, 2009). Dans le cas des VKRs de schistosome plusieurs combinaisons sont envisageables : SmVKR1/SmVKR1 et SmVKR2/SmVKR2 ou SmVKR1/SmVKR2 ou les trois en même temps. Quelques résultats préliminaires seraient en faveur d'une interaction possible entre les deux récepteurs. Ainsi lors de nos tentatives d'expression de SmVKR1 et de SmVKR2 en cellules de drosophile S2 nous avons constaté que la co-expression des deux récepteurs modifiait leur profil d'expression au sein de la cellule transfectée. Les observations en immunofluorescence montraient pour SmVKR1 et SmVKR2 exprimées individuellement des protéines semblant être piégées dans le réticulum endoplasmique de la cellule en périphérie du noyau. Dans le cas des cellules co-transfectées par les deux VKRs, les protéines semblaient sortir du réticulum endoplasmique et se concentrer dans le cytoplasme des cellules. De même, lors de la mise au point de l'expression de SmVKR1 et de SmVKR2 en ovocyte de xénope (discutée ci-dessous), nous avions constaté que l'expression additionnelle de SmVKR1 dans des ovocytes exprimant SmVKR2 et ce en

conditions équimolaires pour les deux récepteurs, inhibait la GVBD induite par SmVKR2. Cette inhibition s'est révélée être dépendante du ratio SmVKR1/SmVKR2. En effet, lorsque celui-ci était de 0,5, aucune modification de l'activité de SmVKR2 sur la GVBD n'était observée. Ces données suggèrent qu'en conditions équimolaires une majorité d'hétérodimères ayant pu se former, SmVKR1 (non actif en absence de son ligand) pourrait réguler négativement l'activité de SmVKR2 et montrent donc qu'une interaction est possible entre SmVKR1 et SmVKR2. Pour confirmer cette interaction, nous envisageons d'exprimer les deux récepteurs couplés à des épitopes différents pour permettre d'établir des expériences de coimmunoprécipitations. Ainsi que de réaliser des co-immunolocalisation et des co-immunoprécipitation à partir d'extraits parasitaires si les sérums anti-SmVKR1 et SmVKR2 que nous avons produit dans des espèces différentes (respectivement rat et lapin) se montrent effectivement spécifiques.

Répondent-ils aux mêmes mécanismes d'activation ?

En parallèle à l'étude de l'expression des récepteurs dans le parasite, nous nous sommes intéressés à leurs mécanismes d'activation et de régulation et ce en priorité dans le système de l'ovocyte de xénope. Ce système présente plusieurs avantages : 1) l'injection directe de grandes quantités d'ARNm produits *in vitro* permet de contourner les difficultés liées à l'efficacité réduite de la transcription et de la traduction (usage différent des codons) des gènes de schistosome en cellules mammifères ; 2) l'expression de kinases actives ou leur activation entraîne pour la plupart la reprise méiotique de l'ovocyte, visualisable par l'apparition d'une tache blanche au pôle animal correspondant à la GVBD (Germinal Vesicule BreakDown). Lors d'études antérieures nous avions montré que les VKRs étaient exprimés à la membrane de l'ovocyte, et que l'activation de SmVKR1 et de SmVKR2 était dépendante de ligands de petite taille, L-Arg pour SmVKR1 et Ca^{2+} pour SmVKR2 (cf Gouignard *et al*, 2011, Figure 5).

Pour approfondir la spécificité de SmVKR1 pour L-Arg, nous avons dans un premier temps testé les L-20 AA naturels. Les résultats ont montré que L-Arg activait bien SmVKR1 à 1µM, tandis que 6 autres AA activaient aussi SmVKR1 mais à des quantités 100 à 1000 fois plus importantes (Figure 34A), confirmant le fait que l'Arg est un ligand potentiel des VKR en général et renforçant les résultats précédemment obtenus sur AmVKR (Ahier *et al*, 2009). L-Arg étant le seul AA à posséder un groupement guanidine, nous nous sommes interrogés sur son importance dans la fixation au récepteur. Nous avons donc testé différents dérivés de L-Arg, comme son énantiomère D-Arg, l'ornithine, qui ne possède plus le groupement guanidine, la créatine et l'agmatine qui ne possède plus la fonction α-amino acide et la canavanine dont un carbone est remplacé par un oxygène (Figure 35A).

Aucun de ces dérivés n'active SmVKR1 même à de fortes doses (1mM) (Figure 35B). La forme dextrogyre de l'AA ne permet pas l'activation du récepteur suggérant que seuls des L-AA se fixent à SmVKR1. La canavanine qui présente une structure très similaire à la L-Arg, n'induit pas non plus l'activation du récepteur. Une telle discrimination entre ces deux molécules a été constatée pour DmXR, un récepteur de la famille des Récepteurs couplés aux protéines G de classe C, spécifique des invertébrés. Il a récemment été démontré que DmXR était activé spécifiquement par la canavanine alors que la L-Arg en est incapable (Mitri *et al*, 2006 ; Mitri *et al*, 2009). Nous pouvons donc conclure qu'à la fois le groupement guanidine et la fonction α-amino acide sont importants pour la fixation de la L-Arg et sa fonction comme ligand.

SmVKR1, comme tous les VKRs, possède dans son domaine VFT un résidu sérine (S_{466}) conservé chez le récepteur mGluR1 et connu pour être impliqué dans la fixation du groupement α-amino acide du glutamate (Brauner-Osborne *et al*, 2007). Le constat que le mutant SmVKR1^{S466A} possède une affinité 1000 plus faible pour son ligand que SmVKR1 sauvage (Figure 34B) indique que S_{466} joue un rôle primordial dans la fixation de la L-Arg à SmVKR1.

Nous avons montré le rôle important des ions Ca^{2+} dans l'induction de la GVBD par SmVKR2 et repéré un motif D-X-D aux positions 359-361, connu pour fixer le Ca^{2+} (Figure 36). L'analyse fonctionnelle du mutant SmVKR2$^{D359A/D361A}$ a montré que contrairement à SmVKR2^{WT} qui est actif en présence de 1mM de Ca^{2+}, SmVKR2$^{D359A/D361A}$ nécessite 20 fois plus de ligand pour s'activer. Ce site semble donc bien responsable de la fixation du Ca^{2+} et de l'activation de SmVKR2. Aucun autre site connu pour la fixation de cations n'a été identifié. Cependant, d'autres cations, minéraux essentiels retrouvés dans la plupart des organismes vivants, ont été testés à la place du Ca^{2+} à la même concentration de 1mM. Malheureusement le Cu^{2+} s'est montré toxique pour les ovocytes à la concentration testée et le Zn^{2+} a induit une activation spontanée de la GVBD. Dans ces deux cas nous ne pouvons pas conclure sur leur fixation à SmVKR2. Il serait intéressant de les tester *in vitro* par essais kinases si nous parvenons à extraire SmVKR2 des membranes ovocytaires sans altérer son activité. Fe^{3+}, Ni^{2+} et Mn^{2+} n'activent pas SmVKR2 à 1mM. Il serait intéressant de tester ces cations à doses plus importantes si toutefois cela reste compatible avec la survie des ovocytes.

SmVKR2, comme SmVKR1, possède la Ser conservée impliquée dans la fixation du groupement amino acide en position 410, suggérant qu'il puisse être lui aussi sensible aux AA. Nous avons donc tenté d'activer SmVKR2 en présence des 20 L-AA comme nous l'avions fait pour SmVKR1. Nous avons alors constaté que SmVKR2 peut être activé par seulement 4 AA (Thr, Tyr, Cyt et Arg) à forte concentration (1mM).

Même si 1mM de Ca^{2+} et d'Arg suffisent à l'activation de SmVKR2, nous ne pouvions pas exclure qu'ils puissent agir ensemble pour activer le récepteur. En effet, plusieurs membres de la famille C des RCPG voient leur sensibilité à leur ligand AA augmenter en présence d'ions divalents (Tabata et Kano, 2004). Dans les conditions où nous avons testé l'addition simultanée de Ca^{2+} et Arg à des doses sous-optimales (100µM chacun), nous n'avons pas constaté d'effet potentiateur de Ca^{2+} sur l'Arg dans le processus d'activation de SmVKR2.
Il apparait donc que l'Arg et le Ca^{2+} pourraient être des ligands spécifiques de SmVKR1 et SmVKR2, mais sont-ils les ligands naturels chez le parasite ? Dans le sang de l'hôte vertébré, lieu de vie des schistosomes adultes, on retrouve ces deux éléments à des concentrations suffisantes et même supérieures aux seuils d'activations démontrés pour les VKRs (de l'ordre du mM pour Arg, et plus précisément 2,2 à 2,6mM pour le Ca^{2+}).
Les VKRs sont retrouvés préférentiellement dans les organes reproducteurs de la femelle dont le développement dépend de l'appariement avec le mâle. Nous avons donc également envisagé que les ligands des VKRs puissent se trouver dans le canal gynécophore des vers appariés. Pour obtenir le contenu du canal (GDC), nous avons déclenché chez des couples de vers le relâchement de la femelle par le mâle grâce à un choc thermique à 4°C et récupéré les produits libérés lors de la séparation. Les résultats ont montré que le GDC contient des molécules capables d'activer SmVKR1, mais pas SmVKR2. Leur caractérisation est en cours, en collaboration avec le Dr O. Marcillat de l'Université de Lyon 1. Nous pourrons ainsi savoir si, comme nous l'avons observé *in vitro,* la L-Arg est bien le ligand naturel de SmVKR1 ou s'il s'agit d'un autre dérivé « inconnu » provenant peut être du métabolisme du schistosome. En attendant cette identification, nous pensons qu'il est important d'établir le lien entre l'implication du Ca^{2+} et de l'Arg dans les mécanismes liés à la fécondation et leur présence en forte concentration dans le sperme. La présence de sperme dans le GDC n'est pas à exclure, et il serait intéressant d'envisager que les protéines VKRs potentiellement exprimées dans les organes génitaux de la femelle répondent aux ligands présents dans le sperme du mâle.

Quelle est leur fonction ?

L'identification des signaux cellulaires initiés par ces deux ligands est un élément essentiel dans notre compréhension de la fonction de SmVKR1 et de SmVKR2. C'est pourquoi nous avons mis en place le criblage d'une banque d'ADNc de couples de vers adultes en levure en utilisant comme appâts les domaines intracellulaires (DIC) de SmVKR1 et SmVKR2. Etant donné que ces deux récepteurs diffèrent au niveau de leur régulation, de leur activation par les ligands et de leur domaine C-ter (qui interagit avec les partenaires cytoplasmiques) (Cf Gouignard *et al*, 2011, Figure 4), nous pouvons envisager que les protéines cibles de SmVKR1 et SmVKR2 soient différentes.

La levure ne contient pas de Tyrosine kinases et celles-ci sont nécessaires pour phosphoryler les VKRs et permettre une fixation phospho-dépendante de certains partenaires cytoplasmiques. Nous avons donc utilisé en plus des formes sauvages SmVKR1DIC^{WT} et SmVKR2DIC^{WT}, les formes constitutivement actives SmVKR1DIC^{YYRE} et SmVKR2DIC^{YYRE}.

De nombreuses protéines partenaires potentielles des DIC ont été identifiées dont 35 pour SmVKR1DIC^{WT}, 35 pour SmVKR1DIC^{YYRE}, 10 pour SmVKR2DIC^{WT} et 8 pour SmVKR2DIC^{YYRE}. Devant le nombre important de séquences obtenues, nous avons établi un classement en 9 groupes en fonction du rôle connu de ces protéines chez d'autres organismes. Pris tous les quatre, les appâts VKRs ont ciblé des protéines de natures variées impliquées dans des mécanismes cellulaires très différents. Plusieurs d'entre elles semblent liées à des mécanismes de bases de la cellule, comme les métalloprotéases et protéases impliquées dans le protéasome, les protéines structurales (collagène, fibrilline, filamine…), la transcription (facteurs de transcription) ou la traduction (protéines du ribosome, chaperonnes). Il nous semble extrêmement difficile d'intégrer l'ensemble de ces acteurs dans un schéma logique et de les relier à l'activation de SmVKR1 et SmVKR2 en l'état actuel de nos connaissances. De plus, sans validation expérimentale (par immunoprécipitation par exemple), nous ne pouvons pas conclure sur la spécificité des interactions qui ont eu lieu. Nous avons donc fait le choix de cloner certaines protéines qui nous semblaient les plus prometteuses pour la suite de nos investigations, tout en essayant de comprendre comment elles pourraient s'intégrer dans une voie RTK. Nous avons déjà obtenu par RACE-PCR les séquences de SmSH2, SmSirt7, PP2C, Mek7 et Zyxine (Séquences présentées en Annexe 3 page 156 à 163). Les séquences de Notch, Cbl et PDE-12 sont encore en cours d'analyse. La séquence de SmFIP a été obtenue au laboratoire (Oger *et al*, 2007) tandis que celle de SmRho1 nous a été fournie par l'équipe du Pr Grevelding à Giessen.

SmRho1, ciblé par l'appât SmVKR1^{WT}, est une protéine bien caractérisée chez le schistosome (Quack *et al*, 2009). Il a notamment été démontré *in vitro* par la technique de double hybride en levure, qu'elle interagissait avec la protéine SmDia impliquée dans la polymérisation de l'actine. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la voie Rho-GTPase est souvent initiée par des RTK. Elle induit des réarrangements du cytosquelette importants pour l'adhésion ou la migration cellulaire. Une autre protéine impliquée dans ces processus a été piégée par SmVKR1DIC^{YYRE}, il s'agit d'un homologue de la zyxine. Cette protéine semble impliquée dans la polymérisation de l'actine. Elle est composée de domaines LIM qui servent aux interactions protéine-protéine. Le domaine LIM est capable de se fixer à des séquences contenant des tyrosines, ce qui pourrait expliquer sa fixation à SmVKR1DIC^{YYRE} (Wu *et al*, 1996). La zyxine se retrouve à la membrane des cellules, mais une séquence NLS lui permet d'entrer dans le noyau pour une raison encore peu claire (Nix *et al*, 2001).

Comme nous pouvons le voir dans le tableau 1, SmVKR1DIC^{WT} a interagi avec l'actine et SmVKR1DIC^{YYRE} a ciblé de nombreuses protéines associées au cytosquelette. Ainsi nous avons retrouvé 1) une protéine homologue aux filamines, protéines de structure indispensables à l'organisation du cytosquelette d'actine et à la fixation de protéines importantes à la migration cellulaire (Nakamura *et al*, 2011) ; 2) un homologue de la spectrine, appartenant à la famille « spectrin, ankyrin, 4.1 », une protéine se fixant à l'actine, impliquée dans la régulation de l'accumulation des protéines à la surface des cellules et à leur trafic (Baines, 2010) ; 3) la gamma adaptine qui joue un rôle dans la formation des vésicules dépendantes des clathrines (Rost *et al*, 2008). La zyxine et Rho ont été impliquées dans un même mécanisme de régulation de l'adhésion et de la migration dans un modèle de fibroblastes (Totsukawa *et al*, 2004). Toutes ces données suggèrent que SmVKR1 pourrait activer une voie liée au cytosquelette d'actine, régulant sans doute l'adhésion et/ou la migration des cellules exprimant le récepteur.

Cette voie ne serait pas la seule initiée par SmVKR1, puisque nous avons aussi identifié la protéine Notch avec SmVKR1DIC^{YYRE}. Le récepteur Notch est d'une grande importance pour la différenciation des cellules en réponse à un contact cellule-cellule. Il a aussi été impliqué dans la résistance aux signaux apoptotiques et de ce fait lié à plusieurs cancers (Artavanis-Tsakonas *et al*, 1999). Récemment une étude a montré une interaction directe entre le récepteur tyrosine kinase DDR1 et le récepteur Notch via son domaine de transcription. Cette interaction entraîne l'activation de Notch qui va induire la transcription de gènes de prolifération (Kim *et al*, 2011). SmVKR1 activé pourrait interagir avec Notch et promouvoir une induction de cette voie chez le schistosome.

Toujours avec l'appât SmVKR1DIC^{YYRE}, nous avons obtenu la protéine Mek7, une MAPKK qui intervient dans la voie JNK en réponse au stress cellulaire. Curieusement cette protéine est un substrat de la phosphatase PP2C, identifiée avec l'appât SmVKR1DIC^{WT} (Lammers et Lavi, 2007).

Enfin, SmVKR1DIC^{YYRE} a ciblé une protéine non annotée, possédant un domaine de fixation SH2. Son analyse a révélé que sa structure est proche des protéines adaptatives SHB ou SHF (Welsh *et al*, 1994 ; Karisson et Welsh, 1997) composées d'un domaine SH2 en C-ter et de séquences riches en prolines souvent impliquées dans les interactions protéine-protéine. SHB est connue pour intervenir dans des voies de signalisation dépendantes du PDGFR, FGFR, TRKA et FAK (Annerén *et al*, 2003)), ce qui ouvre de grandes perspectives concernant cette protéine chez le schistosome.

Les appâts SmVKR2 ont ciblé beaucoup moins de protéines qui nous semblent intéressantes. SmVKR2DIC^{YYRE} a fixé l'actine comme SmVKR1DIC^{WT}ainsi que la protéine Cbl qui joue un rôle crucial dans le recyclage des RTKs activés (Voir Introduction, chapitre Voies de signalisation associées aux RTKs).

Trois autres protéines ont été fixées par les appâts SmVKR, la protéine SmFIP qui interagit avec le facteur de transcription SmFTZ-F1 (Oger *et al*, 2007), SmSirt7, une protéine histone déacétylase et une PDE, que les analyses de BLAST rapprochent de la PDE12 humaine. Les deux premières protéines sont des protéines nucléaires tandis que la troisième est prédite pour se trouver dans la mitochondrie. Ces interactions nécessitent donc que le DIC des SmVKR soit clivé et transporté vers des compartiments cellulaires différents. Il existe de nombreux exemples de clivage de RTK dont le domaine intracellulaire est transporté soit dans le noyau (Carpenter and Liao, 2009) soit dans la mitochondrie (ex : pour ErbB-1 (Boerner *et al*, 2004)). Ainsi, SmSirt7 pourrait interagir avec SmVKR1DIC^{WT} et SmVKR2DIC^{WT}, et SmFIP avec SmVKR1DIC^{WT} après leur translocation dans le noyau, peut-être suite à l'activation des RTKs et à leur clivage par des métalloprotéases. De même SmVKR2DIC^{YYRE} serait transporté dans la mitochondrie pour interagir avec PDE12, qui serait impliquée dans la déadénylation des ARNm des mitochondries (Rorbach *et al*, 2011).

Il n'existe pas toujours de données confirmant l'existence d'une interaction directe entre les RTK et certaines des protéines que nous avons obtenues (MEK7, PP2C, PDE12). Nous supposons que des protéines endogènes à la levure pourraient être responsables de complexes protéiques faisant le lien entre les DIC de VKR et les protéines appâts. C'est pourquoi les interactions entre les SmVKR et leurs partenaires potentiels doivent être confirmées avant de poursuivre nos spéculations.

Cependant, nous pouvons présumer que SmVKR1 pourrait activer différentes voies : 1) une voie liée au cytosquelette d'actine passant par Rho et/ou Zyxine ; 2) une voie dépendante de Notch et 3) une voie qui pourrait passer par une protéine adaptatrice contenant un domaine SH2. Cette voie pourrait être similaire à celle des IR et ceci serait en accord avec la forte identité déjà observée entre les IRs et les VKRs au niveau de leur site catalytique et que nous avons confirmé dans ce travail par les tests d'inhibiteurs kinases en ovocyte de xénope. Ces tests ont montré que l'induction de la GVBD par SmVKR1 est sensible aux inhibiteurs d'IR et d'EGFR impliquant que le domaine catalytique de SmVKR1 ressemble à celui de ces récepteurs. Elle est aussi sensible aux inhibiteurs de PI3K et de MAPKK, deux voies de signalisation majoritaires des IRs dans les organismes modèles.

Les données concernant SmVKR2 sont moins abondantes et ne nous permettent pas de spéculer sur son rôle. Nous pouvons seulement envisager qu'il soit sans doute recyclé grâce à la protéine Cbl, et qu'il puisse être transporté dans le noyau pour se fixer à SmSirt7. Le nombre plus limité de protéines ciblées par SmVKR2 est d'autant plus étonnant que le domaine C-ter de SmVKR2 est plus long que celui de SmVKR1 (Cf Gouignard *et al*, 2011, Figure 4), nous aurions pu supposer que SmVKR2 puisse interagir avec un éventail plus grand de partenaires.

La technique de criblage de banque que nous avons suivie ne nous garanti évidemment pas l'identification exhaustive de toutes les protéines qui peuvent se fixer à SmVKR1 et à SmVKR2. De plus, une limite importante de cette technique est l'impossibilité ou la grande difficulté de cibler des protéines transmembranaires. En effet, une fusion des protéines à un signal NLS doit garantir la présence des protéines appâts et cibles dans le noyau et ainsi permettre la transcription des gènes de sélection. Or, les protéines avec des domaines transmembranaires hydrophobes pourraient ne pas être capables d'entrer dans le noyau, ou pourraient ne pas se conformer correctement. Il n'est donc pas impossible que SmVKR2 puisse interagir avec d'autres récepteurs ou protéines transmembranaires que nous n'avons pas pu identifier incluant SmVKR1. Il existe des exemples d'hétérodimères où une unité fixe le ligand et où l'autre interagit avec des partenaires cytoplasmiques comme c'est le cas pour les Récepteurs au GABA (Margeta-Mitrovic *et al*, 2001). Nous pouvons envisager que SmVKR2, serve à fixer les ligands et permette l'activation de son hétérodimère mais qu'il n'interagit pas avec des protéines cytoplasmiques. Cependant, les résultats que nous avons obtenus en ovocyte de xénope montrent que SmVKR2 est capable d'induire la GVBD des ovocytes via une voie de signalisation dépendante d'une Src, inhibée par l'Herbymicin et PP2 (Tableau 3).

Pour identifier la fonction des deux VKRs chez le parasite nous avons interférés SmVKR1 et SmVKR2 au stade larvaire sporocyste et au stade adulte.

Les résultats de RT-PCR en temps réel ont indiqué que l'interférence était efficace, montrant une diminution importante des transcrits smvkr1 et smvkr2 dans les sporocystes interférés par rapport aux sporocystes témoins (Figure 39). La taille des sporocystes après 7 jours diminue significativement suggérant que les VKRs sont impliqués dans le développement des stades larvaires (Figure 40). Cependant nos expériences ne nous ont pas permis de discriminer l'effet de l'un ou l'autre des VKRs dans la croissance des parasites, étant donné que chacun des dsRNA induit une diminution du taux de transcrits des deux VKRs à la fois.

Les dsSmVKR2 utilisés chez les sporocystes se sont montrés inefficaces chez l'adulte. Nous avons donc produit de nouveaux dsRNA ciblant une partie différente de la séquence du récepteur. Ces nouveaux dsRNA se sont montrés très efficaces chez l'adulte, induisant une diminution importante du taux de transcrits smvkr2 (Figure 41). Nous avons aussi remarqué que contrairement à ce qu'il se passait chez le sporocystes, les dsRNA ne provoquaient pas une diminution croisée des taux de transcrits, nous permettant d'envisager l'identification d'un phénotype propre à SmVKR1 et à SmVKR2.

L'observation des organes internes des couples de vers adultes au microscope confocal montre que l'interférence a un impact ciblé sur les ovaires de la femelle (Figure 42). En effet, aucun phénotype reconnaissable n'a été observé dans les testicules des mâles, ni dans les

autres tissus. De même, chez la femelle, nous n'avons pas vu de modification du parenchyme, du tube digestif ou du vitellarium.
Les ovaires de femelles contrôles sont composés de deux parties. La partie antérieure qui contient des cellules de petites tailles appelées ovocytes immatures. La partie postérieure renferme des cellules plus grosses correspondant aux ovocytes matures. Au fur et à mesure de leurs divisions puis de leurs différenciations, les ovocytes immatures se déplacent dans l'ovaire vers les ovocytes matures. Puis ils sortent de l'ovaire pour être fécondés (Figure 42D). Chez les vers interférés, cette structure n'est pas retrouvée. En effet, on voit des ovocytes matures du côté antérieur de l'ovaire, entourés d'ovocytes immatures (Figure 42A, B, C). De plus, on constate une diminution de la taille des ovaires dans le cas de l'interférence SmVKR2 ou SmVKR1+2 qui semble associée à une diminution du nombre d'ovocytes. Ces phénotypes suggèrent que les protéines SmVKRs sont potentiellement exprimées dans les ovocytes comme nous l'avons discuté dans le cas de SmVKR2, ce qui expliquerait l'altération subit par les ovaires.
Prises ensemble, ces deux expériences montrent que les VKRs sont bien impliqués dans le développement et la reproduction chez le schistosome.

En résumé, nous avons montré dans ce travail par hybridation *in situ* que les transcrits smvkr2 comme smvkr1 sont exprimés dans les ovaires de la femelle adulte. Nous avons aussi montré que l'expression des transcrits des deux VKRs étaient très faibles dans les vers adultes immatures sexuellement provenant d'infection unisexe. *In vitro*, nous avons identifié la L-Arg comme ligand spécifique de SmVKR1 et le Ca^{2+} pour SmVKR2, ainsi qu'un ligand naturel potentiel de SmVKR1 détecté dans le canal gynécophore des couples de vers, en cours d'identification. Le criblage d'une banque d'ADNc de schistosome en levure par double hybride nous a permis de montrer que SmVKR1 pourrait induire l'activation d'une voie de signalisation liée au cytosquelette d'actine, une voie dépendante de Notch, ainsi qu'une voie utilisant un adaptateur contenant un domaine SH2. Par ARNi nous avons montré que SmVKR1 et SmVKR2 joue un rôle dans le développement des sporocystes ainsi que dans la reproduction des vers adultes.

7. Matériel et méthodes :

a) Matériel biologique et culture de parasites

Une souche portoricaine de *S. mansoni* est maintenue au laboratoire par passage dans des mollusques albinos *Biomphalaria glabrata* et des hamsters *Mesocricetus auratus*. Les schistosomes adultes sont collectés par perfusion portale à partir d'hamsters infectés. Les vers sont maintenus en culture dans du milieu M199 complet (complémenté par 10% SVF,

10mM Hepes pH 7,4, 60µg/ml rifampicine, 50U pénicilline/streptomycine) sous 5% CO2 à 37°C. Le milieu de culture est changé toutes les 48h. Les infections dites « unisexe » sont réalisées chez des hamsters dans les conditions standards, chaque hamster étant exposé à une population de cercaires issues d'un seul mollusque infecté par un seul miracidium. Le phénotype sexuel des schistosomes est déterminé après observation à la loupe binoculaire.
Les miracidiums ont été préparés comme décrit précédemment (Dissous *et al*, 1986). Ils ont été transformés *in vitro* en sporocystes par incubation dans un milieu minimum salin (CBSS) à 28°C pendant 18h. Les sporocystes sont maintenus en culture dans du milieu CBSS à 28°C.

b) Mutagénèse dirigée

Des mutations dans le domaine VFT de SmVKR1 ($SmVKR1^{S466A}$) et SmVKR2 ($SmVKR2^{S410A}$) ont été réalisées en substituant un résidu alanine au résidu sérine S_{466} de SmVKR1 et S_{410} de SmVKR2. Les mutations ont été effectuées à partir des construits SmVKR1pcDNA3.1-V5-His (SmVKR1pcDNA) et SmVKR2pcDNA3.1-V5-His (SmVKR2pcDNA) par la technique de mutagénèse dirigée en utilisant le kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) et les amorces SmVKR1S466Af et SmVKR2S410Af et leur séquence complémentaire inverse. Le double mutant $SmVKR2^{D359A/D361A}$pcDNA a été réalisé suivant la même stratégie pour substituer deux résidus alanine aux résidus D_{361} et D_{363} à l'aide de l'amorce SmVKR2D359A/D361Af et de sa séquence complémentaire inverse (L'ensemble des amorces est regroupé Tableau 4).

c) Hybridation *in situ*

Des couples de vers adultes ont été fixés dans une solution de Bouin (acide picrique/acide acétique/Formaldéhyde en rapport 15 :1 :5) (Sigma) pendant 90 min. Après déshydratation dans des bains d'éthanol (30, 50, 70, 90, 96%), les vers sont colorés au Chromotrop 2R pendant 45 min, puis incubés 30 min dans du benzoate de méthyle et enfin lavés deux fois dans du benzol. Les vers fixés sont pré-incubés dans la paraffine (Paraplast plus, Leica) pendant 2h à 60°C avant d'être transférés dans des moules pour une incubation à 60°C sur la nuit. Le lendemain, les moules sont placés à température ambiante pour la polymérisation de la paraffine puis stockés à -20°C. Des coupes de 5µm sont réalisées à l'aide d'un microtome et placées sur des lames (prétraitées dans un mélange acétone/ (3-aminopropyl) triethoxysilane (50 :1)). La paraffine est dissoute dans deux bains de xylol pendant 5 min. Les lames sont ensuite réhydratées par des bains successifs de 5 min en éthanol (100, 96, 70 %), en eau et 20 min en acide chlorhydrique (0,2N). Les lames sont traitées par la protéinase K (1µg/ml) pendant 20 min à 37°C.

A partir de la séquence complète de SmVKR2, un fragment de 391 pb a été amplifié par PCR en utilisant la Taq polymérase Advantage 2, selon le protocole du fabricant (Clontech Laboratories, Inc), et le couple d'amorces SmVKR2HISf/SmVKR2HISr (Tableau 4). Le produit de PCR a été purifié à partir d'un gel d'agarose avec le kit d'extraction Wizard® SV Gel and PCR clean-up system (Promega) et inséré dans le vecteur de clonage pDrive (Qiagen). Les construits SmVKR2 des clones sélectionnés ont été séquencés par GATC Biotech.

Pour l'hybridation *in situ*, des transcrits ont été préparés in vitro et marqués à la digoxigénine suivant le protocole du fabricant (Roche). La taille des sondes sens et anti-sens de SmVKR2 a été contrôlée par électrophorèse sur gel agarose. Un Blot a été réalisé pour vérifier l'efficacité du marquage des transcrits à l'aide d'anticorps anti-digoxigénine couplés à la phosphatase alcaline et révélés au naphtol-AS-phosphate et au Fast Red TR (Sigma).

L'hybridation *in situ* a été réalisée à 57°C pendant 16h. Les coupes ont été lavées avec des solutions 1XSSC (150mM NaCl, 15mM citrate de sodium, pH7) et 0,5XSSC (75mM NaCl, 7,5mM citrate de sodium, pH7) 15 min chacune. La détection des transcrits est la même que celle réalisée pour le Blot.

d) Expression en ovocytes de xénope

Des ARNm « coiffés » ont été produits *in vitro* à partir des construits SmVKR1^{WT}pcDNA, SmVKR2^{WT}pcDNA, SmVKR1^{S466A}pcDNA, SmVKR2$^{D359/361A}$pcDNA et SmVKR2^{S410A}pcDNA, linéarisés par l'enzyme *Pme*I, à l'aide du mMessage mMACHINE® High Yield Capped RNA Transcription Kit (Ambion®). Les ARNc produits ont été précipités par 2,5M LiCl, lavés par de l'éthanol 70% et resuspendus dans de l'eau traitée au diethylpyrocarbonate. 1µg d'ARNc de chaque construit a été analysé sur un gel agarose en conditions dénaturantes et révélé avec 10µg/ml de bromure d'éthidium pour confirmer la taille des ARNm.

Les ARNc ont été micro-injectés dans des ovocytes de *Xenopus laevis* suivant le protocole déjà utilisé (Vicogne *et al*, 2004). Chaque ovocyte a été injecté avec 60nl (60ng ARNc) dans la région équatoriale et incubés pendant 18h à 19°C en milieu ND96 (96mM NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl2, 1,8mM CaCl2, 5mM Hepes pH 7,4 complété avec 50µg/ml streptomycine/pénicilline, 225 µg/ml pyruvate de sodium, 30µg/ml d'inhibiteur de trypsine).

e) Criblage d'une banque d'ADNc de schistosome adulte en levure par la technique de double hybride

Les domaines intracellulaires de SmVKR1^{WT} et de SmVKR2^{WT} ainsi que ceux de leur forme constitutivement active SmVKR1^{YYRE} et SmVKR2^{YYRE} (Gouignard *et al*, 2011) ont été amplifiés par PCR avec la Taq Advantage 2 et les amorces SmVKR1DICf et SmVKR1DICr

pour les construits SmVKR1, et SmVKR2DICf et SmVKR2DICr pour SmVKR2. Les produits de PCR ont été purifiés, clonés en vecteur pCR2.1-TOPO (Invitrogen) et séquencés par GATC Biotech. Les quatre domaines SmVKRDIC ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression pGBKT7 DNA-BD (Clontech) par insertion directionnelle en utilisant les sites de restrictions PstI/EcoRI pour SmVKR1 et NcoI/BamHI pour SmVKR2. Par séquençage, nous avons vérifié que les séquences SmVKR1DIC^{WT}, SmVKR1DIC^{YYRE}, SmVKR2DIC^{WT}, SmVKR2DIC^{YYRE} des différents construits pGBKT7 étaient bien en phase avec l'étiquette Myc présente dans le plasmide à l'extrémité N-Term.

Des levures de la souche Y187 ont été transformées avec les construits servant d'appâts (SmVKR1DIC^{WT}pGBKT7, SmVKR1DIC^{YYRE}pGBKT7, SmVKR2DIC^{WT}pGBKT7, et SmVKR2DIC^{YYRE}pGBKT7) par la méthode à l'Acétate de lithium (Yeast Protocols Handbook, Clontech) et sélectionnées sur milieu sélectif. Les levures Y187 exprimant les appâts sont « matées » aux levures AH109 contenant la banque d'ADNc de vers adultes de *S. mansoni* disponible au laboratoire (Quack *et al*, 2009). Les levures diploïdes dans lesquelles se sont produites des interactions entre l'appât et une protéine de la banque (proie) sont sélectionnées sur un milieu de culture synthétique dépourvu des acides aminés tryptophane, leucine, adénine, et histidine. Les clones s'étant développés sur le milieu de sélection, subissent un test d'activité β–galactosidase sur papier filtre, en utilisant une solution de X-Gal comme substrat suivant les instructions du fabricant (Yeast protocols handbook, Clontech). Une extraction des ADN plasmidiques de chaque clone positif est réalisée en utilisant le kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel) après avoir lysé les levures avec des billes en verre (Sigma). Les plasmides isolés servent à transformer des bactéries compétentes Dh5α (Invitrogen), étalées sur un milieu riche complémenté en ampicilline pour sélectionner les bactéries contenant les plasmides proies de la banque qui contiennent le gène de résistance à cet antibiotique. Pour l'identification de la séquence des proies, chaque plasmide a été séquencé par GATC Biotech.

f) Race PCR des construits sélectionnés

Les extrémités 5' et 3' des ARNm de SmMek7, SmSirt7, SmPP2C, SmZyxin, « Protéine contenant un domaine SH2 » (SmSH2) ont été déterminées à partir d'ADNc de vers adultes en utilisant le kit GeneRacer (Invitrogen) en suivant les instructions du fabriquant. Les amorces utilisées sont regroupées dans le Tableau 4.

g) ARN interférence

Des fragments d'environ 600 pb de SmVKR1 et SmVKR2 ont été amplifiés avec respectivement les amorces SmVKR1RNAiF/SmVKR1RNAiR et

SmVKR2RNAiF/SmVKR2RNAiR. Les produits de PCR ont été ré-amplifiés avec les amorces SmVKR1RNAiT7F/SmVKR1RNAiR et SmVKR1RNAiF/SmVKR1RNAiT7R pour SmVKR1 et SmVKR2RNAiT7F/SmVKR2RNAiR et SmVKR2RNAiF/SmVKR2RNAiT7R pour SmVKR2 afin d'introduire la séquence d'un promoteur T7 sur le brin sens ou anti-sens de l'un et l'autre des fragments. Les ARN doubles brins ont été produits à l'aide du MEGAscript® RNAi Kit (Ambion®) suivant les instructions du fabricant.

Pour les expériences réalisées sur le stade larvaire, 500 sporocystes ont été mis en contact avec 3µg de dsRNA dans 200µl de milieu CBSS en plaque 96 puits. Après 6 jours d'incubation la taille des sporocystes a été mesurée et les parasites récoltés.

Pour le stade adulte, 20 µg de dsRNA ont été délivrés par électroporation à 8 couples de vers par un pulse unique à 125V pendant 20ms en milieu M199 sans sérum. Les vers ont ensuite été incubés dans 4 ml de milieu complet pendant 5 jours. La moitié des vers a alors été fixée dans du milieu AFA (95% éthanol, 3% formaldéhyde, 2% acide acétique glacial) pour l'analyse morphologique, tandis que l'autre moitié a été destinée à l'évaluation du taux de transcrits par RT-PCR en temps réel.

h) RT-PCR en temps réel

Les ARNm des vers adultes et des sporocystes interférés ainsi que les parasites non interférés servant de contrôles, ont été extraits en utilisant le Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit suivant les instructions du fabricant (Invitrogen). Les ARNm ont ensuite été rétrotranscrits avec le kit ThermoScript™ RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen).

Les ADNc obtenus ont servi de matrices pour une amplification utilisant le KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR Master Mix (Clontech) et un système de détection ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les amorces SmVKR1qPCRf/SmVKR1qPCRr et SmVKR2qPCRf/SmVKR2qPCRr ont été utilisées respectivement pour l'amplification de SmVKR1 et SmVKR2 en triplicate. Le gène tubuline (Numéro d'accession GenBank : M80214), a été utilisé comme standard interne. Pour les représentations graphiques des résultats, la méthode du delta-delta Ct (ΔΔCt) a été utilisée (Livak et Schmittgen, 2001), en déduisant le delta Ct (ΔCt) des parasites interférés au ΔCt des parasites contrôles.

Dans le cas des vers adultes provenant d'infection unisexe, le protocole reste identique. Le standard interne utilisé est le gène PDI (N° d'accession GenBank : CAA80520.1) et les représentations graphiques des résultats ont suivi la méthode du ΔΔCt en déduisant le ΔCt de chaque condition au ΔCt de smvkr1 des parasites BS.

i) Analyse en microscopie confocale laser

Les vers fixés en AFA ont ensuite été colorés pendant 30 min dans du rouge Carmin hydrochlorique à 2,5 % final (Certistain®, Merck), puis décolorés dans une solution d'acide acétique et d'éthanol à 70%. Les vers sont ensuite déshydratés pendant 5 min dans des solutions d'éthanol (70%, 100%), et montés entre lame et lamelle dans du liquide de montage Canada Balsam (Merck). Les images de microscopie confocale laser ont été prises à l'aide d'un microscope LeicaLSM 710.

j) Composés chimiques utilisés

Les différents L-AA (Arg, Thr, Ala, Glu, Gln, His, Lys, Leu, Cys, Pro, Ile, Val, Asp, Asn Gly, Met, Ser, Trp, Phe), la L-Tyr disodique ainsi que la L-canavanine ainsi que l'agmatine sulfate, l'ornithine monohydro-chloride, la créatine et la D-Arg (sigma) ont été solubilisés dans l'eau à 50mM.

Pour les tests d'inhibiteurs, les tyrphostines AG1024 (CAS No. : 65678-07-1), AG1478 (CAS No. : 175178-82-2), AG538 (CAS No. : 133550-18-2), HNMPA-(AM)3, Genistein (CAS No. : 446-72-0) et Su11274 (CAS No. : 658084-23-2) proviennent de Santacruz et le BIBF1120 (CAS No.: 928326-83-4) de SELLECK.

k) Analyses *in silico* :

L'analyse des séquences a été effectuée à l'aide du pack LASERGENE (DNAStar, Madison, WI, USA). Les séquences obtenues lors du criblage de la banque ont été identifiées par analyse BLAST sur la banque de données NCBI http://blast.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/Blast.cgi. Les domaines fonctionnels des protéines ont été identifiés grâce au serveur InterProScan (http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/). Les alignements de séquences ont été générés avec le programme Clustal W (MEGΛ4).

Des modèles du domaine VFT de SmVKR1 et de SmVKR2 ont été produits en utilisant le cristal du domaine VFT du mGluR1 (PDB accession number 1EWK) comme référence à l'aide du serveur Modeller 7.0.

Nom	Séquence
SmVKR2HISf	5’-GGACCAACAACAACAATCGTATGATCC-3’
SmVKR2HISr	5’-CGAGGCATATCTAAATCAGCCAATTCTG-3’
SmVKR1DICf	5’-CCCTGCAGTCAAGGTAGAAACGCTAAACTGTTATC-3’
SmVKR1DICr	5’-GGGAATTCCGACGTAAACTGAAAGAAATTGAAAATCG-3’
SmVKR2DICf	5’-CCCCATGGCGACGTAAACTGAAAGAAATTGAAAATCG-3’
SmVKR2DICr	5’-AATGGATCCTAAACGGTCTTCCTACCGGAAAG-3’
SmVKR1S466Af	5'-GATCGCTGCTCTGTGTGCGGATTCAATAGAACC-3'
SmVKR2S410Af	5'-CTATCGCTGCTCTATGCGCAGACTCTATAGAGGCTG-3'
SmVKR2D361A/D363Af	5'-CTGTAAACTTTGTCAACGCCGCCTCAGCTTATTTTCGCAATTCTG-3'
SmVKR1RNAiF	5'-GGACTCAAATTCACCCACCCCCTCATGTC-3'
SmVKR1RNAiT7F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACACCCACCCCCTCATGTC-3'
SmVKR1RNAiR	5'-GATTGACATGACAGGAGATGAAG-3'
SmVKR1RNAiT7R	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGACATGACAGGAGATGAAG-3'
SmVKR2RNAiF	5'-GTCTACATACCTGCGAACTACC-3'
SmVKR2RNAiT7F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTACTGTCTACATACCTGCGAACTACC-3'
SmVKR2RNAiR	5'-GACTAACGGTGTCAACAGTTGAGC-3'
SmVKR2RNAiT7R	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTACTGACTAACGGTGTCAACAGTTGAGC-3'
SmVKR2qPCR1f	5'-CATTACCTTTTCAACCAACTGTGG-3'
SmVKR2qPCR1r	5'-GGACACTTGTATAATATCAGAA -3'
SmVKR1qPCRf	5'-AGACATTGATATTCCACCTGCC-3'
SmVKR1qPCRr	5'-AACGCCCATTACGCTTCG-3'
Smzyxin5'r	5'-GCATCCCAAGCGCGTGAACTACTCTGT-3'
Smzyxin5'nestedr	5'-AAACGCCTGAGATTGTGATAGTAAGC-3'
Smzyxin3'f	5'-GACAGAGTAGTTCACGCGCTTGGGATGC-3'
Smzyxin3'nestedf	5'-CATGCTATCGTTGCGCTGCTCCACTG-3'
SmSirt75'f	5'- CAACAACAACAATTAATTTAGCGGGAGTAT-3'
SmSirt7nested5'f	5'-CATTTGAAGTGGCATTGACAGCATCT-3'
SmSirt73'f	5'-TACATGTGCGCAGTGGTTTAAGTCGTGA-3'
SmSirt7nested3'f	5'-AATACGCTGTTTTCCGGACTTTTGACG-3'
SmSH25'r	5'-GCCGCACCATCTGGTGGACATCTTGGT-3'
SmSH23'f	5'-GCTACCAGTACGTGGTACAACTCCGGT-3'
SmPDE5'r	5'-GAGATGTCTGGTCTGTGCCACGTTGACT-3'
SmPDE3'f	5'-GCCAACTGGGTCTCCCAAATGCCTA-3'
SmMek75'r	5'-GAAACGGGTGACATTTCTGCGCGGGGAA-3'
SmMek73'f	5'-CCAGCGAGTCCCACGGGCGACACCTT-3'

Tableau 4 : Liste des Amorces

III. Caractérisation structurale et fonctionnelle de AgVKR

Les moustiques sont des vecteurs parasitaires de première importance en termes de santé publique. Les femelles anophèles ont besoin de plusieurs repas sanguins pour garantir le développement de leurs œufs après la reproduction. Ces contacts fréquents avec les vertébrés à sang chaud sont idéaux pour la propagation des virus et des parasites. Ainsi *Anopheles gambiae* est le vecteur principal du paludisme en Afrique et fait l'objet de nombreuses recherches destinées à comprendre sa biologie et son interaction avec les *Plasmodiums* dans le but d'endiguer cette parasitose.

L'anophèle comme deux autres moustiques *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus* expriment un VKR. Au cours de mon travail de thèse, nous avons cloné et caractérisé AgVKR, le récepteur d'*A. gambiae*. AgVKR est une protéine de 176kDa, codée par un gène de 65kb situé sur le chromosome 3. Cette protéine présente une très grande identité de séquence avec les séquences prédites des VKRs de moustiques ainsi que plus faiblement avec le VKR de l'abeille (AmVKR). AgVKR présente la structure typique des membres de la famille des VKRs, c'est-à-dire un domaine VFT du coté extracellulaire, un domaine transmembranaire unique et un domaine Tyrosine Kinase du coté intracellulaire. Le domaine TK présente tous les motifs conservés d'un domaine catalytiquement actif comme pour les autres VKRs. Son expression dans deux modèles d'expression différents a montré son adressage à la membrane cellulaire et confirmé son activité catalytique.

AmVKR et SmVKR1 sont activables par l'arginine à au moins 100µM. Etant donné l'identité de séquence importante qui existe entre le domaine VFT d'AgVKR et d'AmVKR, nous nous sommes interrogés sur la capacité de l'Arg à induire l'activation d'AgVKR *in vitro*. Nous avons pu montrer qu'AgVKR (et AmVKR) sont activables par plusieurs acides aminés de la série L (100µM à 1mM), mais que l'Arg est efficace dès 1µM. Cet acide aminé est le plus affin et semble le plus spécifique, puisque la D-Arg n'est pas capable d'activer le récepteur. Toujours *in vitro*, nous avons montré la sensibilité du domaine catalytique d'AgVKR aux inhibiteurs d'IR, confirmant que le domaine catalytique des VKRs est proche de celui des IR.

Très récemment, nous avons démontré que les cellules de la lignée Sua5B d'*A. gambiae*, expriment AgVKR en culture. Après amplification et clonage du récepteur, nous avons confirmé qu'il était parfaitement conservé avec AgVKR. Dans la perspective d'utiliser ce modèle homologue pour la suite de la caractérisation des VKRs, nous avons mis en place une stratégie d'ARNi sur ces cellules. Nous avons pu démontrer l'internalisation des dsRNA utilisé ainsi que la diminution des transcrits AgVKR après 2 à 3 jours d'interférence. A l'heure actuelle nous recherchons le (les) phénotype(s) induit(s) par l'interférence afin d'identifier le rôle de AgVKR dans les Sua5B.

Characterization of the Venus Kinase Receptor of *Anopheles gambiae*

Nadège Gouignard [a], Mathieu Vanderstraete [a], Katia Cailliau [b], Arnaud Ahier [c], Edith Browaeys [b], Colette Dissous [a]

A : Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Inserm U1019, CNRS-UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille, France

B : EA 4479, IFR 147, Universite Lille 1 Sciences et Technologies, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

C : Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch CU Strasbourg, France

Introduction

Parasitic and infectious diseases are the source of major public health and economical problems in many countries in the world. Malaria and schistosomiasis represent important human parasitic diseases with several hundred million people infected in tropical and subtropical areas. A more efficient control of both parasites and vectors of these infections is required. Besides vaccinal approaches, drug development of small molecules that would block the reproduction and development of these organisms, either parasites or vectors, is an interesting strategy to fight against the spread of these diseases.

VKRs (Venus Kinase Receptors) constitute a novel Receptor Tyrosine Kinase family exclusively present in invertebrate organisms. Since their first identification in the trematode parasite *Schistosoma mansoni (*Vicogne *et al,* 2003), 18 other VKRs were discovered in various invertebrate genomes, mainly in insects among which the malaria vector *Anopheles gambiae* (Ahier *et al*, 2009). VKRs are characterized by an atypical structure composed of an extracellular part with a Venus FlyTrap (VFT) domain, a single transmembrane domain and an intracellular part containing a tyrosine kinase (TK) domain. VFT domains are bilobate ligand binding structures found in many receptors from bacteria to mammals. Their function in ligand-binding and receptor activation has been well-documented in class C G protein coupled receptors (GPCR) that include mammalian taste and pheromone receptors as well as fish olfactory receptors and the receptors for the principal neurotransmitters glutamate and GABA (Pin *et al*., 2003). Of interest, the VFT domain of VKR family members is closely related to GABAB receptor and recent results indicate that VKRs are catalytically active receptors activated by amino acids (Ahier *et al*, 2009; Gouignard *et al*, 2011). The TK domain of VKRs is homologous to that of insulin and insulin growth factor receptors, and we have shown that VKRs were highly transcribed in the larval stages of the coleopteran *Tribolium castaneum* and of the honey bee *Apis mellifera* as well as in the reproductive organs of the parasite *S. mansoni* and of the malaria vector *A. gambiae (*Ahier *et al,* 2009*)*. According to this, it was suggested that VKRs could be implicated in processes of growth, differentiation or reproduction.

This work presents the biochemical and structural characterization of AgVKR, the VKR of *A. gambiae*. We have shown that this receptor is encoded by a single gene and that its protein sequence is conserved with that of VKR from other insects. AgVKR could be expressed in *Drosophila* S2 cells and in *Xenopus* oocytes. In these models, we demonstrated the TK activity of AgVKR and identified L-Arginine as the most potent

ligand able to activate the AgVKR kinase. We could also give evidence of the expression of AgVKR in the *A. gambiae* cell line Sua5B and investigate the possibility to use this homologous cellular model to analyze the function of AgVKR and decipher signaling pathways associated with its activation.

Materials and methods

- Cloning of AgVKR

The VKR of *A. gambiae* was identified by screening the available EST and genomic databases of *A. gambiae* (Flybase: http://flybase.org/)) with the protein sequence of SmVKR1 from *Schistosoma mansoni* (Vicogne *et al*, 2003) using the tBLASTn program. The complete cDNA sequence of AgVKR was determined by 5' and 3' RACE amplification (GeneRacer® Kit, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The fragments encompassing the complete coding sequence of AgVKR was obtained by PCR on adult mosquito cDNA using Advantage 2 Polymerase mix (Clontech Laboratories, Inc.) and the following primer sequences, AgVKRflf (5'CCGTCTGTGCCCGTGGATCAC TGCG-3') and AgVKRflr (5'_GCTGTGCAG TGGCAAGGTGACGGATC-3'). PCR products were purified from agarose gels using the extraction kit Wizard® SV Gel and PCR clean-up system (Promega) and inserted into pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Selected clones of AgVKR were sequenced by GATC Biotech.

- VKR constructs:

AgVKR cDNA sequence was subcloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1-V5-His (Invitrogen) (AgVKRpcDNA) and the invertebrate expression vector pMT-V5-His (Invitrogen) (AgVKRpMT) by an inframe insertion using EcoRI and NotI sites.

AmVKR cDNA sequence (GenBank: EU878396.1) was subcloned into the pMT-V5-His vector (AmVKRpMT) containing the human mGluR5 signal sequence (Ahier *et al*, 2009) by an inframe insertion using EcoRI and NotI sites and in the pcDNA3.1-V5-His (AmVKRpcDNA) with the same signal sequence and a N-term HA epitope by an inframe insertion using KpnI and NotI sites.

- Site-directed mutagenesis

Dead kinase (dk) AgVKR ($AgVKR^{dk}$pMT, $AgVKR^{dk}$pcDNA), and AmVKR ($AmVKR^{dk}$pcDNA, $AmVKR^{dk}$pMT) constructs were obtained by site-directed mutagenesis of the active $D_{1124}FG_{1126}$ motif for AgVKR and $D_{1121}FG_{1123}$ motif for AmVKR to a DNA inactive motif using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). The 5'-CGTCAAGCTCGGTGA C*aa*CGcCATGGCCCGGCCAAC-3' mutated sequence and its reverse complement were used as primers for DFG to DNA mutation for AgVKR, and 5′-GTGAAGC TTGGAGAC*aa*TGcTATGACGAGGTTG-3′ and its reverse complement for AmVKR (mutated residues are lowercase italics). The same strategy was used to mutate Serine 505 to an Alanine in the VFT domain of AgVKR ($AgVKR^{S505A}$pcDNA) using the 5'-CTGGGTCCTGCCTGC*gc*TGAAA CGGTCGAACCAATTGC-3' mutated sequence and its reverse complement as primers.

- Insect cell culture

Drosophila S2 cells and Anopheles Sua5B cells were cultured in Schneider medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 50U penicillin/ 50µg streptomycin per ml. Cells were grown in an incubator at 26°C.

- Expression of recombinant AgVKR and AmVKR in S2 cells

2.10^6 cells were cultured in 6-well plates and transiently transfected using the calcium phosphate method according to the manufacturer's instruction (Invitrogen)

with the wild type (WT) and dead kinase AgVKRpMT and AmVKRpMT constructs. After 24h incubation in culture medium, CuSO4 (500 µM) was added to induce recombinant protein expression. Cell were incubated for 24h, then lysed in lysis buffer (5mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 20mM Beta-glycerophosphate, 1mM PMSF, 1mM Na_3VO_4, 1/200 Aprotinin). Cell lysates were analysed by Western blot using anti-V5 mouse monoclonal antibodies according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) Immunochemistry was performed as previously described (Ahier *et al*, 2009).

- In vitro kinase assays

Kinase activity of native or mutated forms of recombinant AgVKR and AmVKR was assayed on antii-V5 immunoprecipitates from detergent lysates of S2 cells.

Briefly, 2.10^6 cells were washed three times in PBS pH 7,4, then lysed in 200 µl lysis buffer placed on ice for 20 min and centrifuged 20 min at 13.000g at 4°C. Cell lysates were added with anti-V5 antibodies according to manufacturer's instructions and incubated overnight at 4°C with 5mg protein A-sepharose beads (Sigma). Beads were washed three times with lysis buffer and three times with kinase buffer (50mM HEPES pH 7.5, 12.5mM $MgCl_2$, 150mM NaCl, 1mM Dithiothreitol, 1mM PMSF, 1mM Na_3VO_4, 1/200 Aprotinin), then incubated in a total volume of 20µl kinase buffer in the presence or not of 50µM ATP at 30°C for 30 min. Kinase reaction were stopped by addition of Laemmli sample buffer and heated at 70°C for 3 min. Eluates were analysed by SDS-PAGE in a 8% polyacrylamide gel, blotted onto nitrocellulose membrane and proteins were detected by Western blot using anti-V5 (1:5000, Invitrogen) or P-Tyr100 (1:2000, Cell signaling) antibodies. Anti-mouse rabbit antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Sigma) were used as secondary antibodies (1:50.000) and signals were detected using the SuperSignal West Femto ™ ECL kit (Pierce).

- Expression of recombinant VKR in *Xenopus* oocytes

cRNA preparations ($1mg.ml^{-1}$) were microinjected in *Xenopus laevis* oocytes according to the protocol previously described (Vicogne *et al*, 2004). cRNA encoding wild-type or mutant proteins was synthesized *in vitro* from AgVKRpcDNA and AmVKRpcDNA plasmids previously linearised by PmeI enzyme, using the T7 mMessage mMachine Kit (Ambion, USA). cRNA transcribed from 1 µg of each linearised plasmid was precipitated by 2.5 M LiCl, washed in 70% ethanol, resuspended in 20 µl diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water, then quantified by spectrophotometry. Finally, 1 µg of cRNA was analysed on a denaturating agarose gel. Gel staining with $10µg.ml^{-1}$ ethidium bromide allowed confirmation of the correct size of cRNA and verification of the absence of abortive transcripts. Each oocyte was injected with 60nl of cRNA in the equatorial region and incubated for 18h at 19°C in ND96 medium (96mM NaCl, 2mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 1.8mM $CaCl_2$, 5mM HEPES pH 7.4 supplemented with $50µg\ ml^{-1}$ streptomycin/penicillin, $225µg\ ml^{-1}$ sodium pyruvate, $30µg\ ml^{-1}$ trypsin inhibitor).

- Kinase activation and germinal vesicle breakdown (GVBD) in oocytes

Kinase activity of wild-type or mutant AgVKR and AmVKR recombinant proteins was determined by their capacity to elicit germinal vesicle breakdown (GVBD) in *Xenopus* oocytes, a process easily detectable by the appearance of a white spot at the centre of the animal pole of the oocyte. In some experiments, oocytes were injected with cRNA encoding wild–type AgVKR and AmVKR, then incubated in ND96 supplemented with L-amino acids

with or without kinase inhibitors in order to evaluate kinase activation and GVBD.

- RNA interference:

Two individual DNA fragments of AgVKR (AgVKRa, AgVKRb) were amplified by a first PCR reaction with the primers AgVKRRNAiaf (5'-GCCTCGGATTACGCCGG ctTTGCG-3') and AgVKRRNAiar (5'-GAAGG TGCGTTACGACCGAAAGA-3') and with AgVKRRNAibf (5'-CCCGGGCGAGATCCGTG AAGC-3') and AgVKRRNAibr (5'-CGTGTTT CACTGGACGCCG-3') respectively. AgVKRa is spanning from positions 3127 to 3647 (520 bp) and AgVKRb from positions 1329 to 1801 (472 bp). A second PCR was performed an AgVKRa and AgVKRb fragments using primers describe above added with the sequence of the T7 RNA polymerase binding site (GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGA).
Final PCR products were purified and used as templates to produce dsAgVKRa and dsAgVKRb using the MEGAscript RNAi kit (Ambion). The firefly (*Photinus pyralis*) luciferase gene dsRNA (pGL3 vector, Promega) was produced using the same strategy with the primers Luciferasef (5'-CTGGAGACATAGCTTACTG-3'), Luciferaser (5'-GGATCTCTCTGATTTTTCTTGCG-3'), LuciferaseT7f (5'-TAATACGACTCACTATAG GGAGACTGGAGACATAGCTTACTg-3'), LuciferaseT7r (5'-TAATACGACTCACTATAG GGAGAGGATCTCTCTGATTTTTCTTGCG-3') and used as a control.
To visualize dsRNA entry in transfected cells, dsAgVKRa and dsAgVKRb (20 µg) were labeled with Cy3 using the *Silencer*® siRNA Labeling Kit - Cy™3 kit according to the manufacturer's instructions.
RNA interference was performed on Sua5B cells. 10^6 cells resuspended in 0.5 ml of culture medium without FCS were placed in 6-well plate and added with 10µg dsRNA. Cells were incubated for 30 min at room temperature with gentle agitation, then added with 2 ml of FCS supplemented Schneider's medium and incubated for 3 days.
Dye labeled dsRNA entry was visualized with a fluorescent microscope Axioimager Z1, at 560nm.
mRNA was extracted from cells using le Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit according to the manufacturer's instruction (Invitrogen). Reverse transcription was performed from total mRNA extracted from each sample for 1 h at 55°C in a total volume of 25 µl following the Thermoscript standard procedure (Invitrogen).
cDNAs were used as templates for PCR amplification using the KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR Master Mix (Clontech) and the detection system ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the primers AgVKRqPCRf (5'-CCGAAATGAACCAGCAGT AT-3') and AgVKRqPCRr (5'-CGACGTGGAC GATAAGGTG-3'). Ribosomal S7 protein (GenBank accession No.L20837.1, positions 328:347; 406:424) was used as internal standard. For graphical representation of quantitative PCR data, the delta-delta Ct (ΔΔCt) method (Livak and Schmittgen, 2001) was applied.

♦ Sequence analyses

Sequence analyses were performed using the LASERGENE package (DNAStar, Madison, WI, USA). The AgVKR cDNA sequence was used to determine genomic structure using BLAST analysis (http://flybase.org/blast/) on FlyBase data bank. The exon-intron boundaries were slightly modified by eye.
The signal peptide, the VFTM and TK domains were delimited by SignalP 3.0 server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), InterProScan (http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/) and BLAST structural analysis algorithms. Motif research was made using ELM server (Eukaryotic Linear Motif: http://elm.eu.org). Pair-wise mannered alignments were

generated with Clustal W program (MEGΛ4).

Results:

Characterization of the *Agvkr* gene

The genome assembly database of *A. gambiae* (available from Flybase) was screened with a TBLASTN program using the *S. mansoni* VKR sequence (SmVKR1). Two partial EST sequences were identified, AGAP009158 and AGAP009157 corresponding respectively to the N-terminal (VFT domain) and C-terminal (TK domain) parts of the query sequence. Both ESTs were close together, ongoing and successive on the genome, indicating that they might be part of the same gene. Using classic and RACE-PCR strategies, we cloned the complete cDNA sequence of AgVKR which contains 5527 bp with a C terminal poly A tail (GenBank accession number EU878397). From BLASTN analyses, we could give the precise location of A*gvkr* on the chromosome 3R, at positions 27712313 to 27775203 in the 33C region, which overlapped the AGAP009158 and AGAP009157 ESTs. *Agvkr* is composed of nine exons and eight introns (Figure 1A). Exon lengths are highly variable with E1, E2, E5 and E8 long of less than 250bp while E9 (2701bp) represents about half of the total cDNA. Introns have also very different sizes with I3 and I4 each of about 20kb whereas I6 and I7 are 100pb long. *In silico* analyses revealed a unique and continuous open reading frame of 1465 residues starting at the ATG codon (position 897-899) in E4 and ending at the TAG codon (5292-5294) in E9.

Structural analysis using SignalP server, SMART and InterProScan revealed the presence in the amino-acid sequence of a signal peptide (residues 1-24), a VFT domain (residues 444-821), a transmembrane domain (residues 889-911) and a TK domain (residues 954-1220), all these domains being characteristic of the VKR family (Ahier *et al*, 2009) (Figure 1B). Interestingly, the exon E9 encodes a part of the VFT domain together with the TM and TK domains. Analysis of the AgVKR sequence by ELM server (Eukaryotic Linear Motif) revealed the presence of two motifs potentially implicated in the binding of intracellular partners, a Grb2-like SH2 binding motif at positions 1299-1302 and a SH3 binding motif at positions 1339-1343.

Comparative analyses of *A. gambiae* with other insect VKR proteins

Amino-acid sequences of the VFT and TK domains of AgVKR were aligned with sequences of VKR from two other *culicidae* *Aedes aegypti* (AaVKR) and *Culex pipiens quinquefasciatus* (CqVKR) and from the hymenopteran *Apis mellifera* (AmVKR). Results in Figure 2A showed that AgVKR was more similar to mosquito (65% identity) than to the honey bee AmVKR (45% identity) in the VFT domain. Structural analysis confirmed the presence of the typical structure of VFT domain composed of two lobes (I and II) and three linkers. In AgVKR, lobe I is divided in two parts of the same size (106 AA), the first one starting at position 444 and the second one ending at position 821. Lobe II (165 AA) extends between the two parts of lobe I. The three linkers assure the flexibility between the two lobes, permitting a closed conformation of the VFT upon ligand binding. Our previous studies have shown that both SmVKR1 and AmVKR possess a partially conserved consensus for amino-acid binding and that arginine was able to induce *in vitro* their activity. Regarding the conservation of the VFT domain between AmVKR and AgVKR, we could already that arginine might be also able to activate AgVKR.

The TK domain of AgVKR is also more similar (92%) to culicidae VKRs than to the honey bee AmVKR (75%). Like the other VKRs, AgVKR possesses the eleven subdomains present in all protein kinases

and the characteristic motifs essential for tyrosine kinase activity (Ahier *et al*, 2009; Gouignard *et al*, 2011). The GXGXXG motif in subdomain I is responsible for ATP binding and the $VAVKX_{16}E$ sequence (Subdomains II and III) is required for ATP stabilization. In subdomain VIb, the HRDXAXRNC sequence is implicated in the phosphotransfer on tyrosine residues. The DFG motif essential for the binding of Mg^{2+} is present in domain VII together with the two tyrosine residues which are the site of receptor autophosphorylation in several RTKs including IR. Finally the PVRWMAPE responsible of the conformation domain stabilization is present in subdomain VIII.

Expression of active recombinant VKR in S2 cells

Drosophila S2 cells were transfected with AgVKRpMT constructs. The specific fluorescent signal detected in transfected cells following their permeabilization and incubation with anti-V5 antibodies showed that AgVKR was efficiently expressed in S2 cells (Figure 3A). A fluorescent membrane labeling was clearly visible along the pseudopodes of transfected cells, indicating the correct addressing of the receptor to the cell surface. The important signal detected in the cytoplasm probably corresponds to the detection of AgVKR molecules along their trafficking in cellular compartments.

The presence of recombinant proteins in transfected cells was confirmed by Western Blot analysis. In these experiments, S2 cells were transfected in parallel with pMT plasmids containing the honey bee AmVKR sequence. Results showed that both AgVKR and AmVKR could be immunoprecipitated from detergent cell extracts using anti-V5 antibodies and detected at their expected molecular weight positions on blots (165kD and 142kD for AgVKR and AmVKR respectively) (Figure 3B). When *in vitro* kinase assays were performed on these immunoprecipitated fractions, anti-phosphotyrosine antibodies revealed the same protein bands, indicating that both AgVKR and AmVKR were able to autophosphorylate on tyrosine residues. This phosphorylation was shown to be dependent on the addition of ATP in the assay. Moreover, experiments performed with mutants of AgVKR and AmVKR, in which kinase potential was disrupted due to mutations in Mg^{2+} cofactor binding site ($D^{1124}FG^{1126}$ to $D^{1124}NA^{1126}$ and $D^{1121}FG^{1123}$ to $D^{1121}NA^{1123}$ respectively) have confirmed that VKR phosphorylation was dependent on the tyrosine kinase potential of the receptors.

Identification of ligands responsible for VKR activation

Xenopus oocytes have been described as an excellent model to express proteins from diverse animal species, and particularly from the invertebrate parasite *Schistosoma mansoni* (Vicogne *et al*, 2004; Yan *et al*, 2007; Long *et al*, 2010). In a recent work, we have shown that schistosome SmVKR could be expressed efficiently in this model following injection of *in vitro* transcribed and capped messenger RNA. Moreover, we have demonstrated that recombinant SmVKR1 expressed in the oocyte membranes was able to autophosphorylate and to induce the maturation (also called GVBD for Germinal Vesicle BreakDown) of oocytes after the addition of L-Arginine, indicating that this amino-acid likely represented an agonist for SmVKR1 activation (Gouignard *et al*, 2011). The VFT domain of a large part of the GPCRs of class C contains a site for binding of natural amino acids defined by eight residue positions (Acher and Bertrand, 2005). However, if the sequence alignment of VFT domains of mGluR1, DmXR (Mitri *et al*, 2004), AgVKR and AmVKR (Figure 4) effectively confirms that mGluR1 and DmXR both possess the eight consensus residue positions ([S]-x(22)-[TS]-x(13,14)-[R]-x(4)-[D]-x(2)-[Q]-x(24,25)-

[Y]-[GA]x(74,84)-[ED]), it indicates that AgVKR and AmVKR only contain two of these conserved residues (Ser_{505} and Arg_{543} in AgVKR) corresponding to Ser_{165} and Arg_{203} in mGluR1. Besides, it is interesting to note that other key residues in the consensus site which are different from those found in GPCR, are identical for most of them in both insect VKRs.

The residue K_{409} in mGluR1 is responsible for the glutamate ligand binding. This residue is not found in DmXR, nor in VKR proteins but at the same position we can find a tyrosine (Y_{749} in AgVKR) strictly conserved in all VKRs from insects but also in SmVKR1 of *S. mansoni*, suggesting that a common ligand different from glutamate could exist for all VKRs.

Blot results in Figure 5C indicated that the protein AgVKR could be produced efficiently in *Xenopus* oocytes and expressed at the membrane. In this model, we tested the capacity of each of the twenty essential L-AA to activate AgVKR. Seven of them (Arg, Ser, Ala, Glu, Thr, Gly, Cys) used at 1mM concentration induced GVBD in oocytes expressing AgVKR. No GVBD occurred in normal oocytes in these conditions, indicating that resumption of meiosis was due to the activation and the phosphorylation of AgVKR. This was confirmed by the detection of phosphorylated AgVKR in oocyte membrane extracts (Figure 5C). Using decreasing concentrations of L-AA, we observed that L-Arg remained efficient at a very low dose (1µM) but not the other AA, for which activity was detected at 100µM. In these experiments, L-Cys was the less efficient AA, requiring a 1mM dose to induce GVBD in oocytes. Similar results were obtained with AmVKR, showing that L-Arg was also the most potent activator of the honey bee receptor, already active at 1µM on AmVKR as for AgVKR. The AA which were shown to activate AgVKR were similarly active on recombinant AmVKR at 100µM to 1mM, yet with slight differences in their respective affinity for the two receptors (Figure 5A). Other data (not shown) indicated that D-Arg (1mM) had no effect on the maturation of oocytes expressing AgVKR or AmVKR.

Role of Ser_{505} in amino acid recognition

AgVKR possesses the strictly conserved Ser_{505} already shown to be responsible for the binding of the acidic group of α-amino-acids in VFT proteins (Brauner-Osborne *et al,* 2007). To investigate the importance of this residue in the binding of α-AA to AgVKR, we used a mutagenesis strategy to replace Ser_{505} by an Ala residue in the lobe I of the AgVKR VFT. When oocytes expressing $AgVKR^{S505A}$ were incubated with the seven AA previously shown to activate native AgVKR (at 1mM concentration), no maturation was observed except in the case of Arg. The loss of affinity of $AgVKR^{S505A}$ for AA and the demonstration that a dose (1mM) of Arg 1000-fold higher than that is active on native AgVKR (1µM) is needed to induce GVBD in $AgVKR^{S505A}$ expressing oocytes, strongly suggest that Ser_{505} is an important residue for ligand binding and activation of AgVKR (Figure 5 A and C).

AgVKR sensitivity to Kinase inhibitors:

We used AgVKR expression in oocytes to test the sensitivity of the TK domain of AgVKR to kinase inhibitors. We evaluated the capacity of tyrphostins AG1024, AG538, HNMPA-(AM)3 (three IR inhibitors), AG1418 (IR/EGFR inhibitor) and SU11274 (Met inhibitor) to inhibit GVBD induced by AgVKR following its activation by Arg. At 1µM concentration, AG1024, AG538, AG1418 and HNMPA inhibited totally oocyte maturation whereas SU11274 had no effect (Figure 5B). Control experiments did not show any effect of these inhibitors on the level of GVBD induced by progesterone in normal oocytes, indicating that the signalling machinery involved in maturation was not

affected by these drugs and that the absence of GVBD in oocytes expressing AgVKR was effectively due to inhibition of AgVKR kinase activity. Furthermore, we could confirm by western blot analysis with anti-phosphotyrosine antibodies the inhibition of AgVKR phosphorylation in the presence of tyrphostin AG1024 (Figure 5C). Besides, the observation that all the IR inhibitors, but not the Met inhibitor SU11274, are able to block AgVKR kinase activity, confirmed the phylogenetic proximity between VKR and IR TK domains (Ahier *et al*, 2009).

Sua5B cells express an endogenous AgVKR

In order to investigate the AgVKR functions in an homologous cellular context, we used the Sua5B hemocyte-like cell line of *A. gambiae* mosquito as a cellular model. Using RT-PCR, we were able to demonstrate that Sua5B cells express significant amounts of AgVKR transcripts when cultured in Schneider medium. Full-length cDNA of AgVKR was amplified from the cells, cloned and sequenced. The protein sequence AgVKR5B from these cells was conserved at 99.5% with that of AgVKR obtained previously from the insect. Both sequences were identical in their functional VFT and TK domains, indicating that Sua5B could represent an excellent cellular model for AgVKR functional studies.

RNA interference is often used to define gene and protein functions in cell biology. We used such a strategy to knock down agvkr transcripts in Sua5B cells with the aim to evaluate further specific phenotypes. Two different dsRNA, named dsAgVKRa and dsAgVKRb, were produced and we analyzed by fluorescent microscopy the efficiency of their entry in cells following their labeling with the Cy3 dye. Results in Figure 6 show that Cy3-labeled dsAgVKRa and dsAgVKRb were efficiently incorporated into the cells after 24h soaking and seemed to concentrate in cytoplasm around nucleus. After 48h, an important decrease of the fluorescent signal was observed in cells, suggesting a degradation of dsRNA (data not shown).

Knock-down of agvkr transcripts was measured at 48h and 72h following the addition of dsRNA. The amount of transcripts was determined by quantitative RT-PCR, using cells treated with irrelevant dsLuc as control (Figure 7). Results show that after 48h, the amount of agvkr transcripts decreased of 50% with dsAgVKRa, of 35% with dsAgVKRb, and of 45% with both dsRNA. At 72h, the level of agvkr transcripts was found to be higher than that registered at 48h in cells treated with dsAgVKRa, whereas in cells treated with dsAgVKRb or with both dsRNA, the decrease of transcripts progressed to 65% and 60% respectively.

Unfortunately, in spite of this apparent knock down of *agvkr* gene expression, we were not able to detect any relevant phenotype that could be related to a decrease of AgVKR function in Sua5B cells.

Discussion:

This paper reports the structural and functional characterization of AgVKR, a member of the VKR family. This protein of 1465 AA is composed of an extracellular VFT domain and an intracellular TK domain linked together by a unique transmembrane domain, and has the typical structure of VKRs (Ahier *et al*, 2009). BLAST analysis of *A. gambiae* genome revealed that the receptor sequence is encoded by a single gene positioning on the 3R chromosome. *agvkr* gene is long of about 65kb, and has a rather simple exon/intron structure with only 9 exons. In *S. mansoni,* two distinct VKRs are encoded by two genes *smvkr1* and *smvkr2* which are more complex with 16 and 18 exons respectively (Gouignard *et al*, 2011). A previous idea was raised that *vkr* gene complexity has decreased

along evolution from schistosomes to insects (Ahier *et al*, 2009) and our present studies on *agvkr* corroborate this hypothesis. The coding sequence of *agvkr* is comprised between the exon 4 and the exon 9. This latter encodes the major part of the protein sequence from the second half of the VFT domain to the end of the TK domain, ruling out the possibility that VFT and TK sequences would have been incorrectly fused during contig analysis and cDNA sequence assemblies. Sequence alignment of AgVKR with other insect VKRs indicated the important conservation of VFT and TK functional domains. AgVKR shares in the VFT sequence 65% of identity with *C. quinquefasciatus* and *A. aegypti* and 45% with *A. mellifera*. Identity is still higher in the TK domain being of 92% with mosquito VKRs and 75 % with the honey bee receptor AmVKR.

Previous analyses of AmVKR expressed in mammalian cells already demonstrated its catalytic tyrosine kinase activity and its activation following the binding of small ligand molecules, such as amino-acids (Ahier *et al*, 2009). Here, we have shown using two other cellular models that AgVKR was a protein transmembrane receptor with tyrosine kinase activity, potentially activable by amino acids. Transfection of AgVKR in *Drosophila* S2 cells has allowed efficient expression of recombinant proteins. They were properly detected at the cell membrane and at their expected size, as shown respectively by immunolocalization and western blotting. Moreover, *in vitro* kinase assays performed on receptor proteins immunoprecipitated from membrane detergent extracts, demonstrated that recombinant AgVKR proteins were able to spontaneously autophosphorylate on tyrosines in standard kinase buffer. Similarly, AmVKR immunoprecipitated from transfected S2 cell extracts also autophosphorylated on tyrosines and these data were contrasting with previous results obtained in mammalian HEK cells in which recombinant AmVKR did not exhibit kinase activity in these assay conditions. In these experiments, receptor autophosphorylation only occurred in the presence of amino-acids or if AmVKR was rendered constitutively active by a mutation in its kinase domain (Ahier *et al*, 2009). These results suggest that expression of insect VKRs in homologous insect cells could be more appropriate to generate a correct conformation of receptor proteins, required for their *in vitro* activation. Besides, the presence in VKRs purified from S2 cells, of a ligand molecule responsible for VKR activation remains possible and should not be excluded.

Therefore, it was obvious that further studies about AgVKR activation processes and ligand identification would require to use another cellular system that would express “quiescent” kinases susceptible to be activated by selected ligands. *Xenopus* oocytes have been already used with success for the expression of schistosome VKRs (Gouignard *et al*, 2011). These cells represent a suitable model for investigating RTK kinase activity and downstream signalling cascades (Browaeys-Poly *et al*, 2000) since activation of RTK-dependent pathways in G2-arrested oocytes provokes the resumption of meiosis and GVBD (Germinal Vesicle BreakDown). For this reason, we decided to express AgVKR in oocytes and to analyse its kinase activity evaluated by its ability to induce GVBD. First results indicated that AgVKR was produced in significant amounts in oocytes without any effect on meiosis resumption and that the receptor AgVKR was not phosphorylated in these conditions. However, in oocytes expressing AgVKR, GVBD could be induced by a selection of L- amino-acids. GVBD was due to the kinase activity of AgVKR since no maturation was obtained using a dead kinase version of the receptor. Dose-response studies indicated that L-Arg was

more potent (1µM) than Ser, Thr, Gly, Ala, Glu, Cys, six other amino-acids active at 100µM or 1mM. Chiral properties of ligands were also important since the D-enantiomorph of Arg was not active on AgVKR. These results together with previous demonstration that Arg could be also a ligand of AmVKR (Ahier *et al*, 2009) and SmVKR1 (Gouignard *et al*, 2011) led us to the assumption that L-Arg could be the common ligand of all VKRs. However, detailed analysis of VFT sequences of all VKRs, let appear that, as a whole, ligand-binding domains of VKRs did not contain the consensus motif for amino-acid binding which is composed of 8 residues and present in many VFT modules (Acher and Bertrand, 2005). Indeed, only two residues of this motif are conserved in VKRs, among which the serine implicated in the interaction with the acidic group of α-amino-acids. We have shown that this serine has also an important function in the affinity of Arg for AgVKR since a single mutation of Ser_{505} in AgVKR is sufficient to decrease its sensitivity to Arg with a factor $x10^3$.

At this position in all the insect VKRs but also in SmVKR1 of *S. mansoni* we could find a strictly conserved tyrosine (Y_{749} in AgVKR), and this already suggested that a common ligand different from glutamate could exist for all these VKRs. Moreover in DmXR, that binds the anti-metabolite of Arg, canavanine, this concerned residue is another amino-acid, glutamine (Mitri *et al*, 2009). Taken together, these results could explain why Arg appears as a privileged ligand for all the VKRs we have already tested. Another important question still concerns the signaling pathway(s) which is(are) activated by AgVKR in the insect. From the experiments performed in *Xenopus* oocytes, we can conclude that AgVKR can find in vertebrate cells molecular partners which are sufficiently conserved to allow their interaction with the receptor and the propagation of the signal. In parallel, the observation that classical IR inhibitors inhibited the GVBD induced by AgVKR activation, suggested that VKR pathways could present some similarities with IR pathways. However, additional experiments centered on the inhibition of potential downstream kinase partners of AgVKR in *Xenopus* oocytes are still needed to confirm this hypothesis. Pull-down assays might be also developed in order to analyse the composition of AgVKR containing-protein complexes formed in insect S2 cells transfected by AgVKR. Besides, we thought that the most appropriate system to study VKR signaling should be an homologous cell line which expresses VKR. In this work, we have demonstrated that Sua5B cells, from the hemocyte-like cell line largely used for studies of immunological response in insects (Dong and Dimopoulos, 2009), produced large amounts of AgVKR transcripts in normal culture conditions. We have also shown that it was possible to decrease significantly the level of these transcripts by using RNA interference and these results already represent an essential first step towards the elucidation of the function of AgVKR in cells by the identification of a cellular phenotype and by transcriptomic analyses in AgVKR interfered cells.

The biological function of AgVKR in the *anopheles* insect is part of a major interrogation about the role of VKR in general. For several invertebrate organisms in which a VKR is present, and especially in *A. gambiae*, the *vkr* gene was shown to be predominantly active in larvae and well as in gonads, suggesting the importance of VKR receptors in larval growth, development as well as in reproduction. In mosquitoes, the ovary development is regulated by TOR (Target of Rapamycin)- mediated amino acid signaling (Hansen *et al*, 2004; Hansen *et al*, 2005), in an anautogenic process, a unique feature in the life of mosquitoes in

which activation of egg development occurs after a blood meal. Taken into account the importance of amino-acids, and particularly of arginine, in insect life and development, and the fact that VKRs are present in reproductive organs and are activated by amino-acids, it is tempting to speculate that VKRs could represent interesting targets for the control of disease-transmitting insects and would open novel approaches to combat parasitic and infectious diseases.

References:

- Acher FC, Bertrand HO. Amino acid recognition by Venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. Biopolymers. 2005;80(2-3):357-66.

- Ahier A, Rondard P, Gouignard N, Khayath N, Huang S, Trolet J, Donoghue 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 activated by aminoacids. PLoS One. 2009 May 21; 4(5):e5651.

- Brauner-Osborne H., Wellendorph P., Jensen A.A., Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors. Curr Drug Targets 8: 169–184, 2007

- Browaeys-Poly E, Cailliau K, Vilain JP., Signal transduction pathways triggered by fibroblast growth factor receptor 1 expressed in Xenopus laevis oocytes after fibroblast growth factor 1 addition. Role of Grb2, phosphatidylinositol 3-kinase, Src tyrosine kinase, and phospholipase C gamma. Eur J Biochem. 2000 Oct;2 67(20):6256-63.

- Dong Y., Dimopoulos G., Anopheles fibrinogen-related proteins provide expanded pattern recognition capacity against bacteria and malaria parasites. J Biol Chem. 2009 Apr 10; 284(15):9835-44. Epub 2009 Feb 4.

- Gouignard N., Vanderstraete M., Cailliau K., Lescuyer A., Browaeys E., Dissous C., Schistosoma mansoni: Structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors. Exp Parasitol. 2011 May 15. [Epub ahead of print]

- Hansen IA, Attardo GM, Park JH, Peng Q, Raikhel AS. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 20; 101(29):10626-31. Epub 2004 Jun 30.

- Hansen IA, Attardo GM, Roy SG, Raikhel AS. 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. 2005 May 27; 280 (21):20565-72. Epub 2005 Mar 23.

- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec; 25(4): 402-8.

- Long T., Cailliau K., Beckmann S., Browaeys E., Trolet J., Grevelding C.G., Dissous C., Schistosoma mansoni Polo-like kinase 1: A mitotic kinase with key functions in parasite reproduction. Int J Parasitol; 40 (9):1075-86, 2010

- Mitri C, Parmentier ML, Pin JP, Bockaert J, Grau Y., Divergent evolution in metabotropic glutamate receptors. A new receptor activated by an endogenous ligand different from glutamate in insects. J Biol Chem; 279(10):9313-20. 2004

- Pin J.P., Galvez T., Prézeau L., Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled

receptors. Pharmacol Ther. 98(3):325-54. Review, 2003

- Vicogne J., Pin J.P., Lardans V., Capron M., Noêl C., Dissous C., An unusual receptor tyrosine kinase of Schistosoma mansoni contains a Venus FlyTrap module, Mol Biochem Parasitol. 126(1): 51-62, 2003

- Vicogne J., Cailliau K., Tulasne D., Browaeys E., Yan Y.T., Fafeur V., Vilain J.P., Legrand D., Trolet J., Dissous C., Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth Schistosoma mansoni. J Biol Chem. 2004 Sep 3; 279(36):37407-14. Epub 2004 Jun 30.

- Vrzal EM, Allan SA, Hahn DA. Amino acids in nectar enhance longevity of female Culex quinquefasciatus mosquitoes. J Insect Physiol. 2010 Nov; 56(11):1659-64. Epub 2010 Jul 13.

- Yan Y, Tulasne D, Browaeys E, Cailliau K, Khayath N, Pierce RJ, Trolet J, Fafeur V, Ben Younes A, Dissous C. Molecular cloning and characterisation of SmSLK, a novel Ste20-like kinase in Schistosoma mansoni. Int J Parasitol. 2007 Dec; 37(14): 1539-50. Epub 2007 Jun 21.

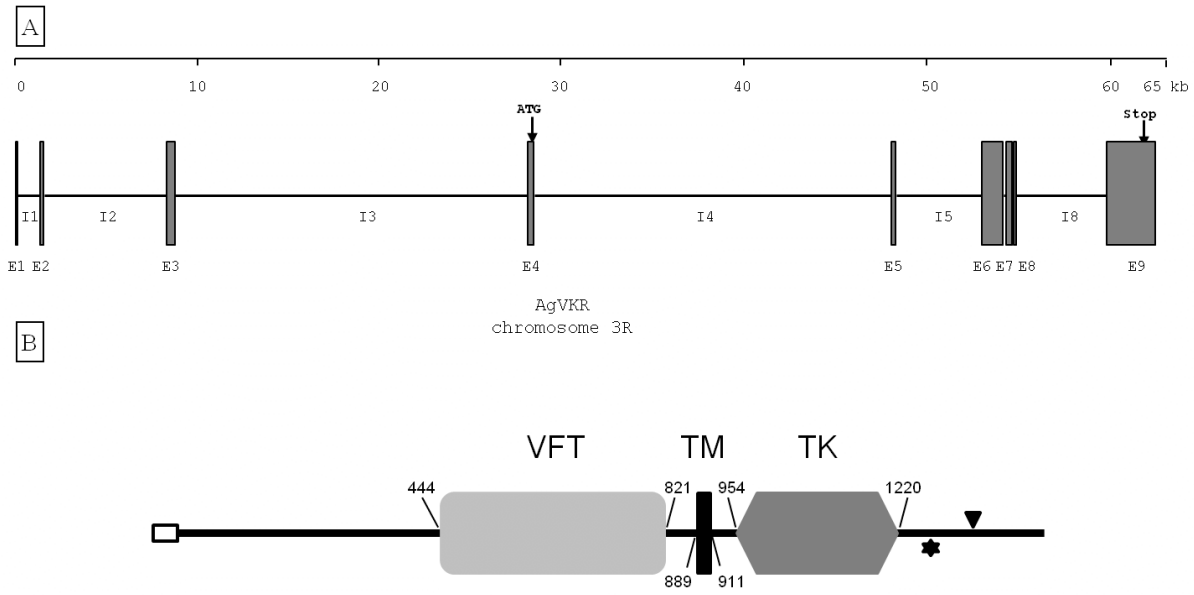


Figure 1:

A) **Exon-intron structure of the *Agvkr* locus**. Exons are represented as numbered boxes and introns as numbered lines. Arrows indicate the positions of the translational start (ATG) and stop (TAG) codons. The scale indicates the length in kb. **B) Schematic structure of the AgVKR protein**. VFT (Venus FlyTrap), TM (TransMembrane), and TK (Tyrosine Kinase) domains and their respective positions inside of the total protein are indicated. The white box represents the signal peptide, the star indicates a potential SH2 binding domain for Grb2 protein, and the triangle indicates a potential SH3 domain binding site.

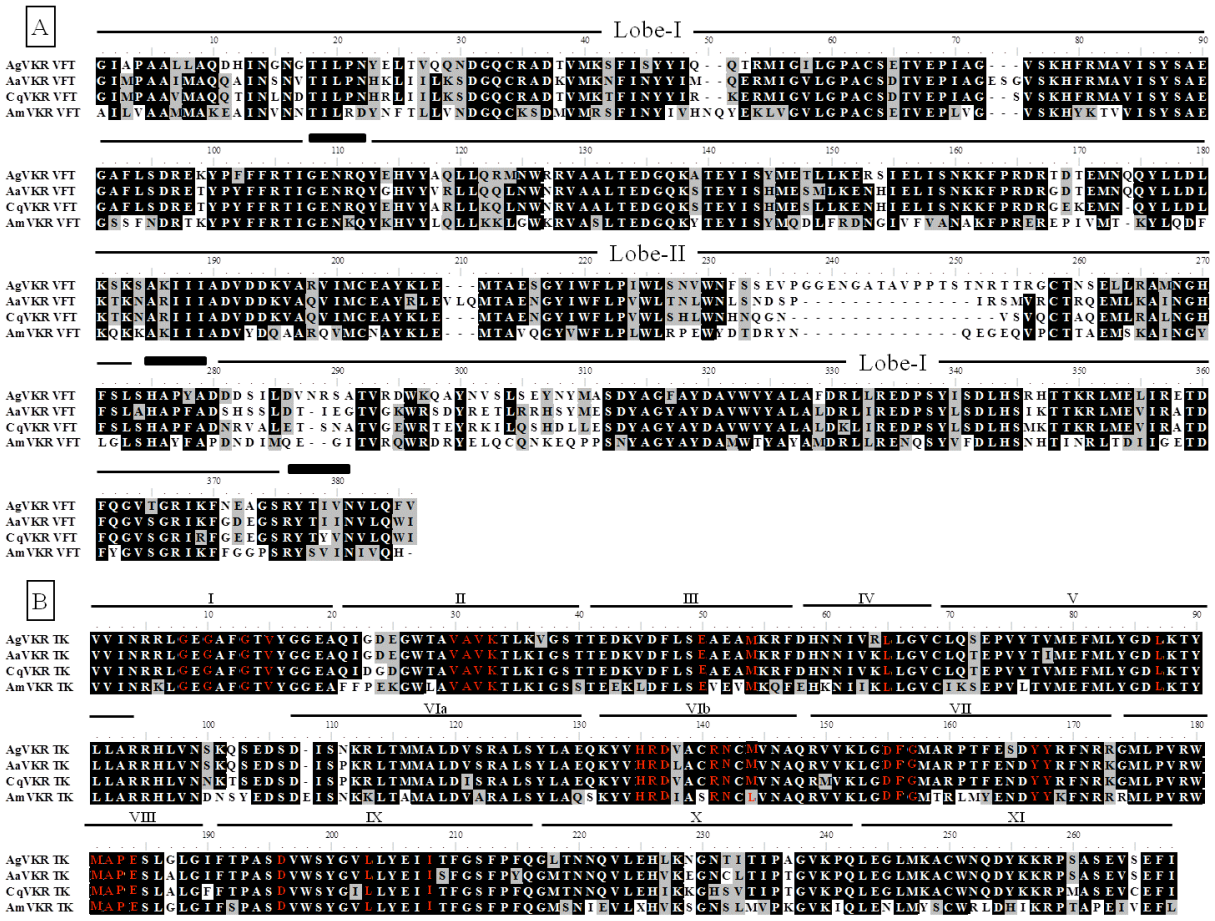


Figure 2:

A) Sequence alignment of VFT from mosquito (AgVKR, CqVKR, AaVKR) and honey bee (AmVKR) receptors using the CLUSTAL W method. Lobe I and Lobe II (indicated by the upper black line) and the three linkers (black boxes) constitute the structure of VFT domains. **B) Sequence alignment of kinase domains**. Numbers I to XI indicate the eleven subdomains conserved in protein kinase domains. Consensus sequences required for tyrosine kinase activity are indicated in red.

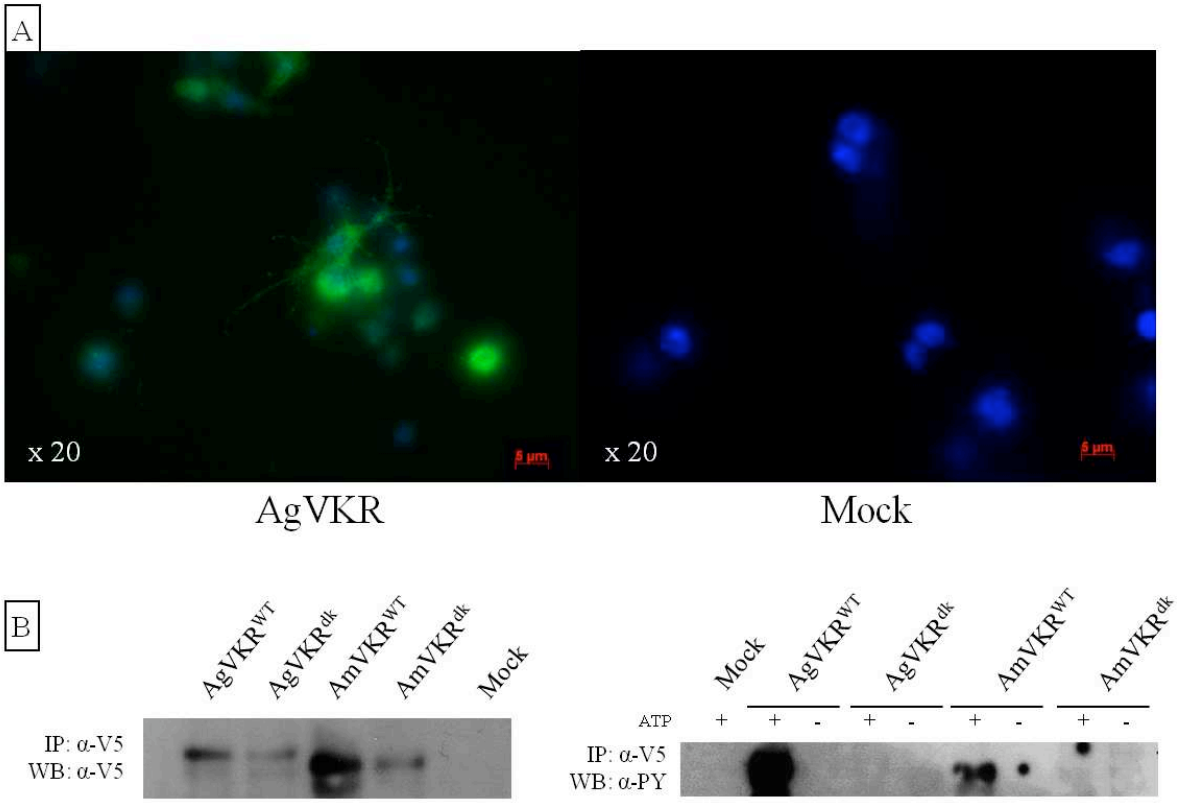


Figure 3: Expression of AgVKR in S2 cells. A) Immunolocalisation of AgVKR proteins in transfected or non transfected (Mock) S2 cells using an anti-V5 antibodies and Alexa 488-conjugated secondary antibodies (green), DAPI staining in blue. B) Kinase activity of recombinant VKR proteins expressed in S2 cells. Anti-V5 immunoprecipitates obtained from membrane extracts of S2 cells transfected with wild type (WT) or dead kinase (dk) AgVKR/ AmVKR constructs were analysed by western blotting using anti-V5 antibodies (left) or anti-phosphotyrosine (α-PY). Non transfected cells (Mock) were used as controls. Autophosphorylation was detected only in wild-type VKR proteins submitted to a complete kinase assay with the ATP substrate.

```
mGluR1  77   QRVEAMFHTLDKINADPVLLPNITLGSEIRDSCWHSSVALEQSIEFIRDS
DmXR    79   QALEAMLFTIDRINRE-QLLPNITLGAHILDDCDKDSYGLEMAVDFIKGS
AgVKR   444  GIAPAALLAQDHINGNGTILPNYELTVQQNDGQCRADTVMKSFISYYIQ-
AmVKR   374  AILVAAMMAKEAINVNNTILRDYNFTLLVNDGQCKSDMVMRSFINYIVHN

mGluR1  127  LISIRDEKDGINRCLPDGQSLPPGRTKKPIAGVIGPGSSSVAIQVQNLLQ
DmXR    128  ISNIDDAEYHCN----------KTQVRKVISGVVGAASSVTSIQVANLLR
AgVKR   493  ----------------------------QTRMIGILGPACSETVEPIAGVSK
AmVKR   424  Q---------------------------YEKLVGVLGPACSETVEPLVGVSK

mGluR1  177  LFDIPQIAYSATSIDLSDKTLYKYFLRVVPSDTLQARAMLDIVKRYNWTY
DmXR    168  LFRIPQVSYFSTSPELSNKQRFEYFSRTIPSDHYQVKAMVEIVKRMGWSY
AgVKR   517  HFRMAVISYSAEGAFLSDREKYPFFFRTIGENRQYEHVYAQLLQRMNWRR
AmVKR   449  HYKTVVISYSAEGSSFNDRTKYPYFFRTIGENKQYKHVYLQLLKKLGWKR

mGluR1  227  VSAVHTEGNYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKIYSN---AGEKSFDRL
DmXR    218  VSIIYEESNYGIKAFEELEELLARHNICIAIKEKLVKDSGVAEDIAYDNI
AgVKR   567  VAALTEDGQKATEYISYMETLLKERSIELISNKKFPRDRT--DTEMNQQY
AmVKR   499  VASLTEDGQKYTEYISYMQDLFRDNGIVFVANAKFPRER---EPIVMTKY

mGluR1  274  LRKLRERLPKARVVVCFCEGMTVRGLLSAMRRLG--VVGEFSLIGSDGWA
DmXR    268  VQKLLT-KPRARGAIIFGSDQEVRQVMRAVRRAN--ATGSFSWIGSDGWS
AgVKR   615  LLDLKS--KSAKIIIADVDDKVARVIMCEAYKLEMTAESGYIWFLPIWLS
AmVKR   546  LQDFKQ--KKAKIIIADVYDQAARQVMCNAYKLEMTAVQGYVWFLPLWLR

mGluR1  322  DRDEVIEGYEV----------EANGGITIKLQSPEVRSFDDYFLKLRLD
DmXR    315  ARNLVSDDYEP----------EVEGTLSVQPQANPVRGFEEYFLSLTVE
AgVKR   663  NVWNFSSEVPGGENGATAVPPTSTNRTTRGCTNSELLRAMNGHFSLSHAP
AmVKR   594  PEWYDTDRYN----------QEGEQVPCTTAEMSKAINGYLGLSHAY

mGluR1  361  TNTRNPWFPEFWQHRFQCRLPG-HLLENPNFKRICTGNESLEENYVQ-DS
DmXR    354  NNQRNPWFVEFWEDHFQCRYPGSTSTPYNNYTKQCTTKERLSRQNTDFED
AgVKR   713  YADDDS--------ILDVNRSATVRDWKQAYNVSLSEYNYM------ASD
AmVKR   631  FAPDND--------IMQE--GITVRQWRDRYELQCQNKEQP------PSN

mGluR1  409  KMGFVINAIYAMAHGLQNMHHALCPGHVGLCDAMKPIDGSKLLDFLIKSS
DmXR    404  QLQFVSDAVMAFAYALRDMHRDLCGGGPSLCEAMKPTKGADLLKYLRKVE
AgVKR   749  YAGFAYDAVWVYALAFDRLLREDPS---YISDLHSRHTTKRLMELIRETD
AmVKR   665  YAGYAYDAMWTYAYAMDRLLRENQS---YVFDLHSNHTINRLTDIIGETD

mGluR1  459  FIGVSGEEVWFDEKGDAPGRYDIMNLQ----485
DmXR    454  FEGLSGDEFRFDGNGDGPARYNIIHFK----480
AgVKR   796  FQG-VTGRIKFNE---AGSRYTIVNVLQFV-821
AmVKR   712  FYG-VSGRIKFFG---GPSRYSVINIVQH--736
```

Figure 4: **Sequence alignment of two VFT-containing GPCRs (mGluR1 and DmXR) with AgVKR and AmVKR.** The signature of amino acid recognition by VFT domains is composed of the 8 residue motif ([S]-x(22)-[TS]-x(13,14)-[R]-x(4)-[D]-x(2)-[Q]-x(24,25)-[Y]- [GA]x(74,84)-[ED]) (boxed in red). The motif is perfectly conserved in mGluR1 and DmXR but not in VKR receptors which contain only two of these conserved residues the first one (S_{505} in AgVKR) and the third one (R_{543} in AgVKR). Also, the residue K_{409} shown to be involved in glutamate binding for mGluR1 is not conserved in VKR proteins, nor in DmXR (demonstrated to bind the Arg-analog, Canavanine).

A

	Minimal concentration of AA inducing GVBD (µM)						
	Arginine	Serine	Alanine	Glutamic acid	Threonine	Glycine	Cysteine
AgVKR^{WT}	**1**	100	100	100	100	100	*1000*
AgVKR ^{S505A}	**1000**	—	—	—	—	—	—
AmVKR^{WT}	1	100	100	100	*1000*	*1000*	100

B

	Control	AG1024	AG538	AG1478	HNMPA-(AM)3	SU11274
AgVKR ^{wt} +Arg 1µM	100	0	0	0	0	100
AmVKR ^{wt} +Arg 1µM	100	0	0	0	0	100

C

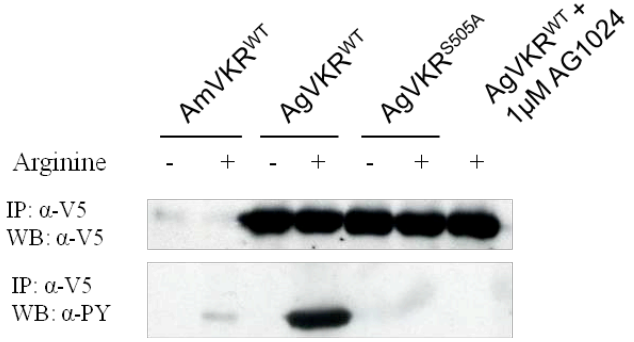


Figure 5 : Functional characterization of AgVKR in *Xenopus* oocyte. A) Percent of GVBD correlate to L-AA concentration (from 1µM to 1mM). Arg is the more efficient L-AA tested for both AgVKR and AmVKR. The Ser_{505} is necessary for AgVKR ligand binding. Higher concentrations were not tested for the mutant. B) Evaluation of the GVBD percent after AgVKR activation under kinase inhibitor treatment. The IR inhibitor AG1024, AG538 and HNMPA inhibits AgVKR activation at 1µM as well as AG1478 (IR and EGFR inhibitor). Su11274 are not able to inhibit AgVKR. AmVKR have the same sensitivity than AgVKR. C) Membrane extracts from oocytes expressing AgVKR (inhibit or not by AG1024), AgVKR^{S505A} or AmVKR activated or not by Arg (1µM), were immunoprecipitated by anti-V5 antibodies and analyses by Western Blot and tyrosine phosphorylation was detected using anti-PY antibodies.

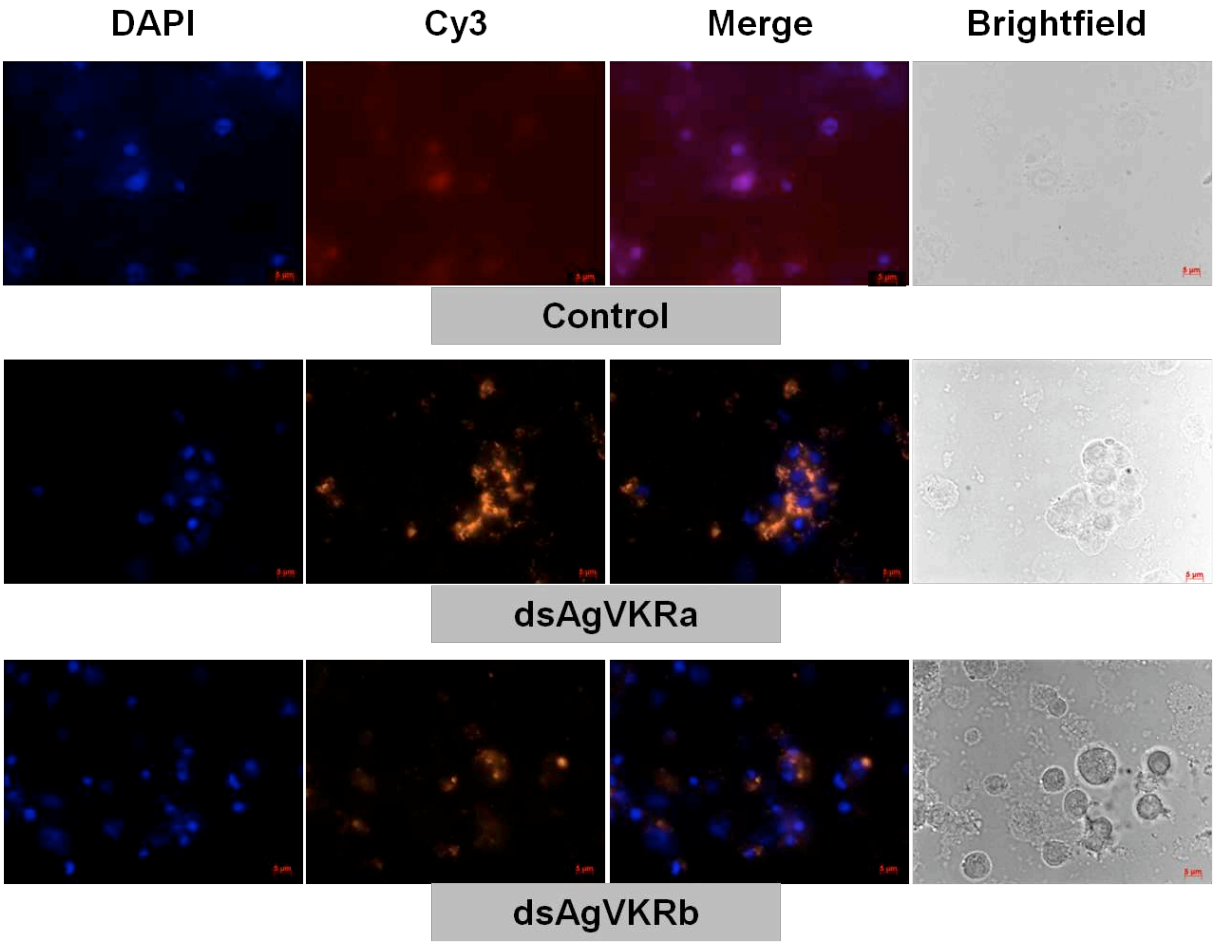


Figure 6: Incorporation of AgVKR dsRNA in Sua5B cells after 24h. Sua5B cells were incubated with dsRNA labeled with Cy3 to visualize their incorporation by fluorescent microscopy (in orange). Nucleus was visualized using DAPI staining (blue).

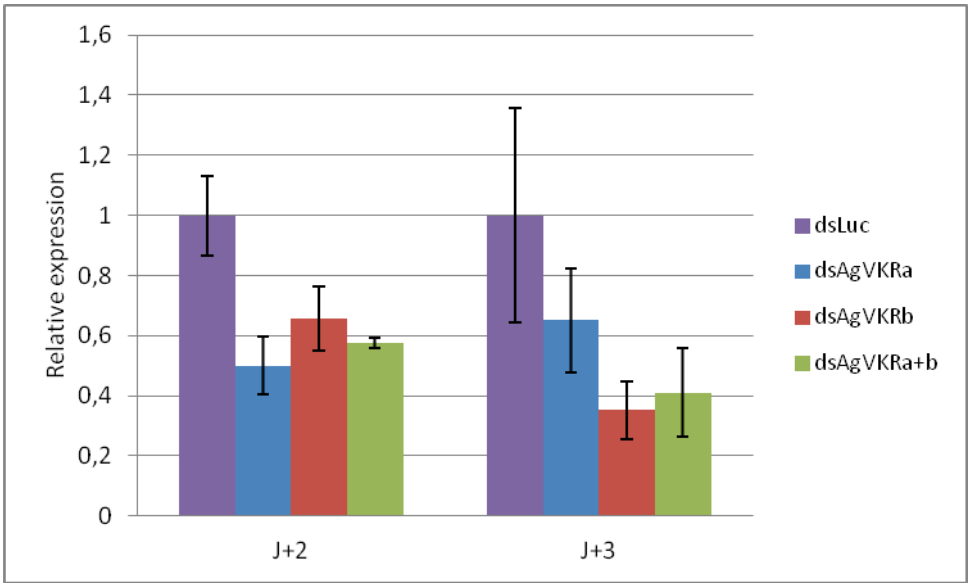


Figure 7 : agvkr transcripts quantification in dsAgVKR interfered cells at J+2 and J+3. For graphical representation of qPCR data, cycle thresholds (ΔCt values) obtained for the different samples were deducted from the ΔCt value obtained for cells treated with dsLuc. Values were normalized as relative fold-difference using the ΔΔCt method. Data are means ±s.e. of triplicates from a typical experiment.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

I. Place des VKRs dans l'évolution

En 2011, la publication des génomes de *Solenopsis invicta, Camponotus floridanus* et *Harpegnathos saltator,* trois espèces de fourmis appartenant à l'ordre des hyménoptères, nous a permis d'identifier trois nouveaux VKRs. Leur présence dans des organismes aussi différents et phylogénétiquement éloignés que sont les schistosomes et les insectes laisse présager la présence de VKRs dans de nombreuses autres espèces intermédiaires dont les génomes ne sont pas encore disponibles. La question de la « création » du récepteur VKR est importante pour comprendre son implication dans la biologie des organismes. A l'heure actuelle, nous pouvons supposer que l'ancêtre des VKRs se situe après la séparation bilatérien/radiaire. En effet, aucun VKR n'a été identifié chez les radiaires. Pour l'heure, l'origine des RTKs a été située chez les éponges marines parmi lesquelles leur représentant le plus ancien, *Geodia cydonium*, possède un récepteur classé dans la sous-famille des IR (Schäcke *et al*, 1994). Cet organisme est l'un des plus vieux métazoaires répertoriés. Il illustre bien les nombreuses adaptations qui ont été nécessaires à l'établissement d'un organisme pluricellulaire comme la mise en place de protéines permettant la communication intercellulaire, dont les RTKs font partie. De même, cette éponge possède un récepteur présentant des similarités de séquence avec les récepteurs mGluR4 et mGluR5 humains, qui répond comme eux à leurs agonistes *in vitro* (Perovic *et al*, 1999). Les éponges ne semblent pas posséder de VKRs mais la présence dans des organismes aussi anciens de récepteurs transmembranaires composés de VFT et de TK conforte la probabilité qu'un organisme ancestral ait pu fusionner les deux domaines pour former les VKRs au moment de la division de l'embranchement menant aux bilatériens. Au cours de l'évolution, il semble que les vertébrés aient perdu le récepteur. On peut imaginer que ce soit parce qu'ils n'en avaient plus besoin, ou parce qu'ils ont développé une voie alternative composée de plusieurs récepteurs (RTK et GPCR séparément par exemple). En effet, de plus en plus de preuves de l'interaction des voies RTK et GPCR ainsi que des récepteurs eux-mêmes sont mis en lumière (Delcourt *et al*, 2007). Ces voies pourraient se substituer chez les vertébrés à l'utilisation d'un seul récepteur.

La disparition des VKRs semble aussi s'être produite plus ponctuellement parmi les invertébrés. En effet, nous n'avons pas trouvé de VKR chez le lépidoptère *Bombyx mori* ni chez l'homoptère *Acyrthosiphon pisum* dont les génomes sont disponibles. De même curieusement les organismes modèles *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* sont également dépourvus de VKR, ce qui explique qu'ils n'aient pas été découverts plus tôt. Ces deux organismes de laboratoire pourraient avoir perdu les VKRs suite à leur isolement du milieu naturel. Cependant, il est intéressant de noter qu'aucun membre du groupe des drosophiles « *melanogaster* » ne possède de VKR excepté *D. ananassae*. Son gène

présente néanmoins une structure différente des autres VKR et nous soupçonnons qu'il puisse s'agir d'un pseudogène. Ainsi une perte naturelle du VKR pourrait avoir eu lieu durant l'évolution du groupe « melanogaster ».

La raison pour laquelle certaines espèces d'invertébrés ont perdu le VKR n'est pas encore expliquée et cela nécessitera encore de nombreuses études fonctionnelles et phylogénétiques dans les années à venir. A l'opposé, nous avons eu la surprise de constater que le génome du schistosome code pour deux VKRs bien distincts l'un de l'autre mais appartenant sans aucun doute à la famille des VKRs. Nos études suggèrent que ces deux récepteurs proviennent d'une duplication de gène survenue assez récemment au cours de l'évolution puisque leur structure génétique est extrêmement conservée. A l'heure actuelle, le schistosome est la seule espèce codant pour deux VKRs différents. La raison de cette duplication n'est pas encore comprise. Nous ne pouvons que spéculer sur les données que nous avons obtenues suite aux études comparatives que nous avons mises en place dans ce travail de thèse. Toutes nos données suggèrent que SmVKR1 et SmVKR2 peuvent avoir deux fonctions différentes, mais complémentaires.

II. Fonctions biologiques des VKRs

Les différentes études structurales, biochimiques et fonctionnelles que nous avons réalisées nous ont permis de collecter un grand nombre de résultats qui nous permettent de mieux appréhender la structure, le profil d'expression, la régulation et le rôle des VKRs. Ainsi, l'étude comparative des VKRs du schistosome et de l'anophèle, associée à nos analyses précédentes sur le VKR de l'abeille, nous ont permis de distinguer deux modes possibles de fonctionnement pour ces récepteurs. Les VKRs d'insectes ainsi que SmVKR1 semblent être régulés de façon similaire alors que SmVKR2 diverge dans son mode d'activation.

Bien que SmVKR1 et SmVKR2 soient deux récepteurs de taille similaire et présentent entre eux une identité de séquence protéique plus importante que celle partagée par SmVKR1 et les récepteurs d'insectes (44, 2% contre 19%), SmVKR2 est indubitablement marginal.

In vitro, nous avons démontré que tous les VKRs étudiés présentent une activité Tyrosine Kinase, confirmant la conservation de leur activité catalytique et potentiellement de leur fonction. Cette activité Tyrosine Kinase est sensible aux inhibiteurs kinase spécifiques des IRs (Tyrphostines), ce qui confirme les données phylogénétiques précédentes rapprochant les TK de VKRs de ceux des IRs (Vicogne *et al*, 2003 ; Ahier *et al*, 2009).

La première distinction constatée entre SmVKR1, AgVKR et SmVKR2 est la sensibilité de ce dernier à l'inhibiteur spécifique du FGFR (BIBF1120). Ceci implique une différence de conformation du domaine TK, qui partage pourtant 72% d'identité avec SmVKR1et suggère aussi que SmVKR2 pourrait avoir un substrat différent des autres VKRs. Nous avons

déterminé *in vitro* que SmVKR1 et SmVKR2 peuvent activer des voies de signalisation proches de celle des IR, comme la voie PI3K et MAPKs. Dans le cas de SmVKR2 ces voies seraient induites par une kinase Src endogène à l'ovocyte de xénope qui ne serait pas nécessaire à SmVKR1. Des résultats préliminaires obtenus lors du criblage d'une banque d'ADNc de schistosomes adultes avec les domaines intracellulaires des deux récepteurs, montrent que SmVKR1 pourrait interagir avec des acteurs du réarrangement du cytosquelette ce qui ne semble pas être le cas pour SmVKR2.

De plus, nous avons découvert une protéine adaptatrice interagissant avec SmVKR1 mais apparemment pas avec SmVKR2, que nous avons nommée provisoirement SmSH2. Cette protéine, de par sa structure, se rapproche des protéines de la super-famille des SHB (Src Homology 2 domain-containing adaptor protein B) qui contient aussi ses homologues SHD, SHE et SHF. A l'heure actuelle, nous ne sommes pas en mesure de dire à quelle sous-famille cette protéine appartient, mais nous savons que l'ensemble des organismes qui expriment un VKR, exprime aussi un membre de cette super-famille. Les SHB sont adaptées à la transmission des signaux induits par de nombreux RTK. SmSH2 serait donc un partenaire/substrat impliqué dans la transmission des signaux initiés par SmVKR1 et éventuellement par les autres VKRs. D'autres acteurs connus des voies de signalisation RTK ont aussi été isolés par la technique du double hybride en levure et si la spécificité de ces interactions était confirmée, cela ouvrirait des perspectives extrêmement intéressantes sur l'identification des voies associées aux VKRs ainsi que sur leur modulation. Une autre avancée importante concerne la déorphanisation partielle de tous les VKRs que nous avons étudiés. En effet, nous avons déterminé qu'AgVKR, SmVKR1 et AmVKR sont activables par différents L-acides aminés dont l'arginine, avec une très forte affinité. L'Arg est un acide aminé très important dans de nombreux processus biologiques. Chez l'abeille, il est présent dans la gelée royale ainsi que dans le pollen qu'elles consomment. Chez les moustiques anautogéniques, l'Arg est aussi l'un des AA essentiels au développement des œufs suite à leur repas sanguin (Uchida, 1998). Il est intéressant de rappeler que le sang est aussi le lieu de vie du schistosome qui est lui aussi hématophage. Une fois encore, SmVKR2 se distingue des autres VKRs, car même si il est lui aussi activable par des AA (à fortes doses), son ligand le plus affin est le calcium (inefficace sur les autres VKRs).

L'identification de ces deux ligands est très intéressante. En effet l'Arg et le Ca^{2+} sont retrouvés dans plusieurs fluides biologiques comme le sang, mais aussi le liquide séminal. Chez l'homme, ces deux composés y sont présents à forte concentration. Or, nous avons établi que les transcrits smvkr1 sont principalement retrouvés dans les ovocytes matures de la femelle tandis que les transcrits smvkr2 se trouvent dans les ovocytes immatures. On peut penser que les transcrits smvkr2 sont « utilisés » lors de la maturation de l'ovocyte, ce qui pourrait suggérer que la protéine SmVKR2 soit produite dans les ovocytes matures. De

même, SmVKR1 pourrait lui être produit en fin de maturation des ovocytes ou au cours de l'ovulation. A la sortie de l'ovaire se trouve le réceptacle séminal de la femelle, rempli de spermatozoïdes provenant de l'appariement avec le mâle. Il est intéressant de noter que chez l'anophèle comme chez l'abeille, les femelles sont elles aussi pourvues d'un réceptacle séminal, où sont stockés les spermatozoïdes indispensables à la fécondation des œufs pour le reste de leur vie. Se pourrait-il qu'un ligand (arginine ou calcium pour le schistosome) soit présent dans ce réceptacle, participant via l'activation des VKRs aux processus de maturation voire de migration des ovocytes vers les spermatozoïdes, impliquant des voies de réarrangement du cytosquelette initiées par les VKRs ?
Une (des) molécule(s) contenant des groupements Guanidine, capable(s) d'activer SmVKR1 a (ont) été récoltée(s) à partir du contenu du canal gynécophore de vers appariés. Leur identification en spectrométrie de masse nous indiquera s'il s'agit d'arginine ou de dérivés d'arginine et si ces derniers sont déjà connus ou spécifiques. Enfin qu'induit l'activation des VKRs *in vivo* ?

Des réponses ont été obtenues grâce aux études d'ARN interférence effectuées sur les vers adultes et sur les sporocystes. Chez ces derniers, un défaut de croissance significatif a été obtenu pour les larves interférées, suggérant que les VKRs sont impliqués dans le développement des stades larvaires. Un rôle équivalent peut être espéré pour le *Tribolium* ou l'abeille dont les stades larvaires expriment aussi de nombreux transcrits VKRs (Ahier *et al*, 2009).
Chez l'adulte, les vers interférés présentent une diminution de taille et une désorganisation importante de leur ovaire, confirmant le rôle primordial de ces récepteurs dans le bon déroulement des mécanismes liés à la ponte. Ces données semblent concorder avec nos hypothèses sur l'implication des VKRs dans l'ovogénèse des organismes.
Nous savons que les VKRs ne sont pas transcrits de façon stade spécifique, mais ils pourraient y jouer des rôles différents. Ainsi, dans les stades larvaires nécessitant une forte multiplication cellulaire, les VKRs pourraient initier des voies MAPKs classiques via une voie ressemblant à celle des IR, éventuellement couplée à une voie de différenciation passant par le récepteur Notch pour l'établissement des tissus de la larve. Chez les stades adultes, les VKRs pourraient initier des voies de différenciation participant également aux mécanismes nécessaires à la production des œufs.
Une confirmation de ces données dans un autre modèle serait idéale. Des expériences préliminaires d'ARNi chez l'anophèle ont été réalisées basées sur l'injection de dsAgVKR dans le thorax d'anophèles femelles en collaboration avec le Dr Bourgouin du Centre de Production et d'Infection des Anophèles à l'Institut Pasteur de Paris. Malheureusement, des problèmes techniques nous ont empêchés de mener à bien ces manipulations dans le temps

qui nous était imparti. Cependant, la découverte récente de l'expression d'AgVKR par les cellules Sua5B apporte une alternative intéressante à la poursuite de l'étude fonctionnelle d'AgVKR, par RNAi en particulier. En effet, l'évaluation de l'impact de l'interférence d'un VKR endogène dans un modèle cellulaire pourrait apporter de nombreuses réponses à nos questions. Nous pourrions, par exemple, évaluer la modulation des voies de signalisation, que nous avons identifiées chez le schistosome, suite à l'interférence d'AgVKR ou à son hyperactivation par des agonistes. Ceci associé à la poursuite des interférences sur organisme entier nous permettrait d'asseoir la fonction des VKRs dans un modèle différent et donc de nous assurer de la conservation de la fonction des VKRs dans l'ensemble des organismes.

III. Les VKRs comme cibles thérapeutiques

Depuis plusieurs années, notre équipe, en collaboration avec celle du Pr Grevelding à Giessen, s'oriente vers l'utilisation de molécules anti-cancéreuse qui ciblent les protéines kinases, pour le traitement potentiel de la schistosomiase (Dissous *et al*, 2007, Dissous et Grevelding, 2011). En effet, de nombreuses protéines kinases cibles des anti-cancéreux sont conservées chez le schistosome et nos équipes ont pu démontrer qu'elles sont sensibles à ces composés (Beckmann *et al*, 2010a, Beckmann et Grevelding 2010, Long *et al*, 2010, Brehm, 2010). L'établissement de stratégies thérapeutiques utilisant des molécules déjà existantes, parfois ayant passé des phases d'essais cliniques avec succès permettrait de pallier les manques de financements dédiés aux maladies tropicales négligées comme la schistosomiase. Bien sûr cette stratégie doit prendre en compte la toxicité éventuelle et les croisements potentiels de ces drogues avec des protéines hôtes, la synthèse de dérivés plus spécifiques pouvant être nécessaire.

La confirmation de l'implication des VKRs dans des mécanismes primordiaux, comme la croissance et la reproduction, associée à leur structure atypique et à leur présence exclusive chez les invertébrés, font des VKRs des candidats incontournables et des cibles privilégiées. Bien que constitués de domaines rencontrés chez les vertébrés, le VFT comme le TK des VKRs pourrait être ciblé spécifiquement.

En effet, les études de déorphanisation que nous avons réalisées montrent que les VKRs semblent capables de fixer des ligands sur des sites consensus très peu conservés, impliquant peut être des motifs qui leur sont spécifiques. Une étude plus poussée de ces domaines VFT serait d'un grand intérêt. Au laboratoire, Mathieu Vanderstraete s'est intéressé à la production des domaines VFT de SmVKR1 et SmVKR2 recombinants dans le but d'effectuer des études structurales par cristallographie qui nous permettraient de mieux comprendre les mécanismes de fixation et d'activation du domaine et particulièrement la

différence entre les domaines VFT de SmVKR1 et SmVKR2. A l'avenir, nous pourrions aussi cribler des composés pharmacologiques capables d'induire ou d'inhiber l'activation des VKRs, comme cela existe pour le Récepteur au GABA par exemple (Agoniste : Baclofen, Antagoniste : Saclofen).

De même, les études réalisées *in vitro* ont permis de montrer que les domaines TK des VKRs sont spécifiquement sensibles aux inhibiteurs d'IR (Tyrphostines). Mathieu Vanderstraete étudie la sensibilité de différents stades parasitaires à l'AG1024, l'AG1478, l'AG538 et l'HNMPA-(AM)3. Les résultats préliminaires confirment l'impact important des inhibiteurs sur la survie et la ponte des schistosomes confirmant l'importance capitale des RTK pour leur biologie. Bien que les tyrphostines ne soient certainement pas adaptées à une utilisation thérapeutique du fait de leurs propriétés toxiques sur les cellules humaines, elles constituent une base de travail intéressante. Suivant la même logique que pour le domaine VFT, une étude cristallographique des domaines TK des VKRs nous permettrait de comprendre la différence de régulation qui existe entre les SmVKR1 et SmVKR2, et permettrait d'envisager dans l'avenir le criblage de nouvelles molécules capables d'inhiber les VKRs.

Au-delà du traitement de la schistosomiase nous pouvons envisager l'application de cette stratégie à d'autres VKRs. En effet, *A. gambiae*, *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* sont des vecteurs de maladies parasitaires de première ordre en terme de santé publique. *T. castaneum* et *A. mellifera* sont des organismes importants dans le domaine agroalimentaire. Si nous parvenions à identifier des molécules capables de moduler l'activation des VKRs, nous pourrions tenter de réguler les populations d'insectes nuisibles, ou au contraire de stimuler la ponte d'insectes bénéfiques. Les opportunités offertes par les VKRs sont encore loin d'avoir toutes été envisagées. La poursuite de la caractérisation des VKRs est donc d'une importance majeure.

ANNEXES

Annexe 2

Séquence protéique des trois nouveaux VKRs : le VFT est surligné en Vert, le domaine transmembranaire en jaune, et le domaine TK en violet.

SiVKR: *Solenopsis invicta* Venus kinase receptor

Séquence protéique prédite disponible dans GenBank : EFZ12829.1

MVNMEVWIPPQEDTTLLLDKYNVKECGSIAPPGHFGWFIPETLTRSDDSWLVFSKLETASRFAVDETYLPKVKKL
MINANTGEYYCHETFCQHGMYIPEQCHGQGQQKPPNCALLLAEYSDVTRFIKEHIDQMKLYVKVAWVGPNLRNLT
KYLTREYTQLAQNSSASIGNRSLVILHYTPSSVIPNEQEFNEIDFPHCGTKKGPPDCAYEMNRLTKLVWNKLATI
AKVAFEAINRVKFNREMYEDLIARRIRAPVNATDEDVACDWLKDNLNYTLKEWKPKNDGKNNLHVGGIFPMNGNS
YTARSIVISALMAKEVINQNNTLLRDYNLNLLVSDGQCKSDMVMKSFIDYIVHNFYQKLIGVLGPACSETVEPLV
GVSKHYRTVIISYSAEGSSFDDRTKYPYFFRTIGENKQYKHVYVQLLQRLRWRRVASLTEDGQKYTEYISYMQDM
LRDNSIDFVANVKFPREREVDVMTKYLQGLKEKRAKIIIADVYGEVARQVMCEAYKLEMTAVQGYVWFLPLWLQP
QWYDTDHYNKEGEQVPCTTSEMMNAINGHLGLSHAYFARDDDIMQEGITVREWRERYENTCRAQNLTPSNYAGYA
YDAMWTYAYAVDRLIRENQSYYFELHSEHSVNRLTQIIGETDFYGVSGRIKFLGGPSRYSVINIVQFIDNETRIV
GNFYPNISETKNEVTGGVLDLNTSSFVWLSETMPDDGSEPPSRCVLGGLAELLDVSCEVAIVVANIIGFGLLGAV
LIVSFIIIKRNYDKKMQIHEKYMKSLGILSQMDTSSLDVWEIPRERVVINRKLGEGAFGTVYGGEAFFPEKGWLA
VAVKTLKVGSSTDEKLDFLSEVEVMKKFEHSNIIKLLGVCIKCEPVLTVMEFMLYGDLKTYLLARRHLVNDRSYE
DSDEISNKKLTAMALDVARALSYLAQLKYIHRDVASRNCLVNAQRVVKLGDFGMTRPMYENDYYKFNRKGMLPVR
WMSPESLALGIFTPASDVWSYGVLLYEIVTFGSFPFQGMSNNEVLTHVKAGNCLTAPKKIKSQLENLMYSCWNVD
HTKRPSAPEIVDFLALNPRIIAPCLDVPLSSVQLEHTAQLDIQLTETNRKFSILWPHRSSSQTQETLKFPNSPTP
LLLDLNGLDDDQTLDSLISQSCEQDSSSPLLDSTRASVLKQAWLHGNSNVKDNEPHRYVNLQPGMLKLPCELNAP
GKNGSAGNIQMEERTSMLPEKKSTDDVSVL

CfVKR: *Camponotus floridanus* Venus kinase receptor

Séquence protéique prédite disponible dans GenBank : EFN73169.1

MLRSRSLVGLLILVIVLKTAHSNHCLTNLEEVNPKRIIHHEGHFLNIQFEVSRRVTHRLTSEIMKIFLTEVLGYT
GIGIINKDDKFNASEVFERLSEKPTYNGHKIDNKDPETMVNMEVWIPPQQDTSPLLSKYNVKECGSIAPPGHFGW
FVPNALARPDDNWLIFSKLETASRFVIDEAIIKNSTMNPDTRDYYCHEVFCKDGMYIPEQCQSQGQRWTPKCALL
LAEYPDVTLFVKEHIDQMKLYVKVAWVGPNLRYLTKNLTEEYIRSARNSSSIENRSLMILHYSPSSVIPNEKDFT
TIYFPRCGAKESISCAYESNRLTKLVWKRLEMIAKMAFQSISRAKFSREMYENLIVRRMWAASNVSDEEIACDWL
KENLNYTLTEWKPSNEYKNTLFVGGIFPMTNDSYIGKSIVIAAKMAKEVINVNNTLLRDYNLTLMANNGQCKSDM
VMKSFINYIVQPDYYQKLVGVLGPACSETVEPLVGVSKHYKTVIISYSAEGSSFDDRSKYPYFFRTIGENKQYKY
VYLQLLQMLGWHRVASLTEDGQKYTEYISYMQDLLRDNGITFVANVKFPREREADVMTNYLKDLKEKRARIIIAD
VYGDVALQVMCEAYKLEMTAAQGYVWFLPLWLQQQWYNPDYYKQEGKKVHCTMSEMMKAINGHLGLSHAYFARDD
SIMQEGITVREWRERYENTCRMQDPPLQPSNYAGYAYDAMWTYAYAMDRLIHENESYVFDLHSDHTVNRLTTIIG
ESDFNGVSGRIQFLGRPSRYSVINIIQFIDNETRIVGNFYPNISEVKHEVIGGTLDLNISAFVWLSETKPDDGSE
PPARCVLAGLAELLDVSCEVAIVIANIIGFGLLGAILIIGFIMIKRKYDEKVRQHEKYMKSLGIDLSQTDTSSLD
VWEIPRDRVVINRKLGEGAFGTVYGGEAFFPDKGWLAVAVKTLKVGSSTDEKLDFLSEVEVMKRFEHKNIIRLLG
VCIKCEPVLTVMEFMLYGDLKTFLLARRHLVNDRSYEDSDEISNKKLTAMALDVARALSYLAQLKYVHRDVASRN
CLVNAQRVVKLGDFGMTRPMYENDYYKFNRKGMLPVRWMSPESLALGIFTPASDVWSYGVMLYEIVTFGSFPFQG
MSNNEVLSHVKAGNCLTVPKKVKMQLENLMYSCWNVDHTKRPSAPEIVDFLATNPRIIAPCLDVPLSSVQLEHTA
QLDIQLSENNRKFSISWPSQRSDSQTQELKSPNSPTSLLLDLNGQDDDQTLDSLLIGISSEQDSSSPLLDSTRAS
ILKQMWLQENSNDNQAHRYVNLQPGMLKLACESGRNGSAGNIQMEEKTSILSEKKSTDNMSVL

HsVKR: *Harpegnathos saltator* Venus kinase receptor

Séquence protéique prédite disponible dans GenBank : EFN85558.1

MLRPGSVAGLLVLVAVLKIADSNRCLTMLEEVNPKRVIHYEGQTLNIQFEVSRRVTQRMASEIMKIFLVEVLGYT
GVAVVEKDSRFDATEAFERLSEIVYQRYTGHRVFPETTVNMEVWISPQQDTTPLLNRYDVKECGSVAPPGHFGWF
VPEALSRPDDTWLVFSKLETAGKFAIDEAYLPIVKNFTINPETWDYYCQAVFCQHGMYVPEQCQGQEQQRPPSCA
LLLAGYPDETGFVKEHIDEMKLYVKVAWVGPSLRHLSKYLTKEYMQLTRNSSAPVGDNRSLVILHYSPSSVIPNE
KEFATIDFPRCGSKNSTISCSYETNRLTKLVWGRLEMIARLAFEAINRAKFSRTMYEDLIARRSRAASGVPDEQV
ACDWLKDNLNYTLARWMPNNDNKNTLFVGGIFPMSGTSYQAKSIVVAASMAKHAINANNTLLRDYTLSLLASDGQ
CKSDMVMKSFIDYIVHNYYEKLVGVLGPACSETVEPLVGVSKHYKTVIISYSAEGSSFNDRARYPYFFRTIGENK
QYKHVYLQLLQKFGWHRVASLTEDGQKYTEYISYMQDMLRDNGIVFVATAKFPREREVDVMTKYLQDLKERRAKI
IIADVYDGVVRQVMCEAYKLDMTAVQGYVWFLPLWLQQKWYDTDYYNQQGEQVPCTTVEMTRAINGYLGLSHAYF
ARDDDIMQEGITVREWRTRYENSCLAQQQQPSNYAGYAYDAMWTYAYAMDRLIHENQSYVFDLHSDQTINRLTDI
IGETDFNGVSGRIKFLGGPSRYSVINVVQFIDNDTRVVGNFYPNISEEKHDVIGGTLDLNMSALVWLSETMPDDG
SEAPSRCVLAGLAELLGVSCEVAIVIVNVIGFGLFGIILFIGFIFIKRKYEKKVRLHEKYMKSLGIHITQADTSS
LDTWEIPRDRVVINRKLGEGAFGTVYGGEAFFPEKGWLAIAVKTLKVGSSTDEKLDFLSEVEVMKRFEHKNIIKL
LGVCIKCEPVLTVMEFMLYGDLKTYLLGRRHLVNDQNYEDSDEISNKKLTAMALDIARALSYLAQLKYVHRQVHL
DVASRNCLVNAQRVVKLGDFGMTRPMYENDYYKFNRKGMLPVRWMSPESLGLGIFTPASDVWSYGVLLYEIVTFG
SFPFQGMSNNEVLSHVKAGNSLTVPKKVKPLLENLMYSCWNVDHSKRPTAPYIVDFLATNPRIVSPCLDVPLASV
QLENTGQLDIQLTENIRKFSLSWPSQRPPSQVHGSKSLDSPTPLLLDLNCQDDEHNLDSLLAGQSYEQDSSSPLL
DPLRTSVLKQTWLQENATDVKDSQAHRYVNLQPGMLKLAGEAAMNGSAGNNIQMEERTSMLHEKKSSDDVSVL

Annexe 3

SmZyxin : XM_002575737.1

Séquence complète de l'ARNm :

ATAATAGTTGATAATGTCTCACCATTCATTCGGTTCTGGAAATAGCCTGTACAGATTGGACAGTGTTTTTAATGAGCGGGCGG
GACCGAGGATGCCAGGAACACAGAGTGAACGACGATATCGTCACCCTGTTGTTCCTATTTCATCAATAGATGCTCCACACTAT
GCTCAAGCATCACAACTATATCCAATGAGAAGTTCTTCGGAGCGTGATAATGTATACTGGTACAAACCCGGGTCTCTTGGGCG
ATCATCGCAGGGGAGTAGCTCAAGCACTATTGGTCAGTCGATTGTAATACCAGTTGTTCATTTAGGTGCCTCTAGAGGATCCA
TTTCATCAAGTTCATACACTATGGCTTCTCATTCTTCTGAAAATCTAGATAACACACCAAATGCTCTACAAACTGATAACGGT
GAAAGTACTAAATCTTCTACATTCAGAACTTCATCAGTCCTTACTGCTGGTAATCGGCCAATAAATCGACCCGCACCACCACT
TTCAGATCCTGAAGCTGAAGTTGATGCTTTAACAAATCTCTTAATGCAAAGTATGGAAACTCGGTCGTCTGTATCTTCAGCTG
GAGCTGGTGGGACATTAACTTCCGGGCCAGACGGAGTCAATTCTTCTCCAGCTGGGAGTTTACGGCGTGGGAGTGGTCTCAAT
TCTCAGTTTGGACGTTTGCAACAGCACTCAGGCCTGAGTTCCGGTGCTGGAGGAACTGTGAATGGTGGTCGAGGTAGTCCATC
GGCAACAGTGATCACTTCTACTTCAACAACTGGGAGCTCATCAACAAACTCTCCCACTGAATCAGCTTCTAGTATGTGTAATT
CTGGTGATACTACCAGTGCAGTGACCAATGCAACTTTTGGTCAGAACATATGTTTCCGATGTCGTCGCTCACTCTTCCCTCCG
GAAGGTACCACACTTAGTGGCAGTATAAATTCGACAAACAATGTTGTGACTCTAACAGGCGCTTTAGGTGTAAAACTTCATGT
GGCTTGTTTTACATGCTATCGTTGCGCTGCTCCACTGAAGTCAGATGCTTACTATCACAATCTCAGGCGTTTGTTATGCCCAG
CTTGTGTACGTGACGGGGCTGTAGAAGCATGTTCAAATTGTCATAGACCCATAGGTGACAGAGTAGTTCACGCGCTTGGGATG
CCCTATCATCCTAACTGCTTCGTCTGTGTAGTATGCGCAGGTAGACTAGATTCCCGACCTTTTACCATTGATGTTCATGGTCG
ACTACACTGTCTAACAGATTTTCATAAACGCTATGCACCAAGATGTGCATCATGTGGAAGGCCGATCGTACCAGATGCTGGAT
GTCAAGAAACACGTCGAGTCGTCTCAGGAAACTCAAACTATCATTTAGAATGTTTCAGAGTTCAAACACTACCTCAAAACTTA
AATCTCAAGTCACCTGCGTTTAAAGTTAGTGGTAGTATTGCCAGTTAGTGACATTGCAGCCTGGAGACATACCAATATACGTC
TGCGCTAACGGAGCTTTCCTAGCACCTTTATATTCTGAGATCCAGATGTACACAACCCAAAACAGCTCTTTGGCTTTAAATCG
GGAACGTTATCAAATTTGTCCGTGTTATACAAATTAAACATTATCTTGGATGGTTTTTCTCGCATAATGTAAGAGCTATACAG
ACTTGGTTCTTTACTTTGGCTACTGTATTTCCAAGGCACTTTTACATACGTGAATTTGTCCAGCGTTATTTACTTATAACATG
TACTAACTTCCTTTCTTCACTCAGTACACTTCTCTTTGAAATTATAGTCAAACTAAACATTGACAACTTTTCCTAATGTGAAC
TGTACGCTTGTTTTGATTTTAAATGAATTTTTTATCAATTTTTGGAAGCATTAACAAGTGCACATCCTAATAAACTTAGAACT
AGCTGGCTACAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Séquence Protéique :

MSHHSFGSGNSLYRLDSVFNERAGPRMPGTQSERRYRHPVVPISSIDAPHYAQASQLYPMRSSSERDNVYWYKPG
SLGRSSQGSSSSTIGQSIVIPVVHLGASRGSISSSSYTMASHSSENLDNTPNALQTDNGESTKSSTFRTSSVLTA
GNRPINRPAPPLSDPEAEVDALTNLLMQSMETRSSVSSAGAGGTLTSGPDGVNSSPAGSLRRGSGLNSQFGRLQQ
HSGLSSGAGGTVNGGRGSPSATVITSTSTTGSSSTNSPTESASSMCNSGDTTSAVTNATFGQNICFRCRRSLFPP
EGTTLSGSINSTNNVVTLTGALGVKLHVACFTCYRCAAPLKSDAYYHNLRRLLCPACVRDGAVEACSNCHRPIGD
RVVHALGMPYHPNCFVCVVCAGRLDSRPFTIDVHGRLHCLTDFHKRYAPRCASCGRPIVPDAGCQETRRVVSGNS
NYHLECFRVQTLPQNLNLKSPAFKVSGSIAS. (481 AA)

Les domaines d'interaction protéine-protéine LIM sont surlignés en vert

SmPP2C : XM_002575792.1

Séquence complète de l'ARNm :

ATTCAATACTGACGATGCTCAGGGTCATGACTCGAAGTTGTTGAGCCCTCACGCTACTCTATGCTCCCTTAATACACGAAGTA
CCTACTGGCTAAACGCAGACCGCTACACGTTATAGACTTCAGTCTCTTGCCTCTTTAGAACATCCTTTCACCACAAGCGTCAA
GTGTATATACTTTTATTGTAAGAAGTGAACTGAAGAATGACTAGTTAGATGAAGYAGTACGAACGGTGACTGTAGTGTCCTTT
ATTTGGCGTAAATGGGTCAGTCTTTATGTGCTCCTGTTTTATCCAAGGAAACAAAAAGCTGGCAAAATGAAAATTATAGTGTG
GCAGTATCCAGCATGCAAGGATGGCGTGTACATATGGAGGACGCTCATATGTGTTTACTAGAGCTTCCTGGTGATCCAAAGGC
TGCCTATTTCTCAGTTTTTGATGGACATGGAGGTACAAGGGTGGCAAATCATGCAAGTCGTCATCTTCATGAGAAAATTATTG
AACAAAGTGAATATGGTCGAAACAATATAAAAGAGGCTATTCGTCATGCCTTTCTTTCTATGGATGCTGAGATGCAATCTGAA
ATGACTACATATTCTGTTAAACCATCGACACCGAAATTAGACAGCTCAGTTAATTTAACAGGTACTGGTTCAGTTGTGGCACT
GAAAGATAGTACTGTTGAAACACATGACAGTAAAGCAAGCTTCTCTTTGAAAATTCCAAATCCAGGCGATGAATTGGCTGGAT
CTACTGGAATAATAGTCTTATTGAAAGATCAAATGCTTTACTGCGGAAATGCTGGAGACAGCCGTGCAGTATGCAGCAGACGT
GGAGTCGCAGAACCTTTGTCTACAGATCACAAACCAACTCTACGTGCTGAGAAAGAGCGTATTTCTGCTGCTGGTGGTTGGGT
CGATGCAAAACGTGTGAATGGGAACCTTGCATTGTCACGAGCTTTCGGTGATTTTGTCTTCAAGCGTAACCCACATCAGTCTG
CCGAAAACCAAATCGTAACTGCAAATCCGGATGTTTTTGTTCGACGACTTTCAGTCGAAGACGATGAATTTATTGTGCTGTGT
TGCGATGGTATATGGGATGTAATGACAAATCAGGAAGTTGTAAGCTTTGTTCGCCTGCGACTCAGTTATGGTATGCTTCCATC
GAAAGTGTGTGAAGAACTTATGATGCGATGTTTAGCACCTGATTGTCATACAAATGGTTTGGGCTGTGATAACATACTGTCGT
TCTGGTCTGTCTCTTACAAGGGCGTCCGTTCTCGGATTTGCAACGCAAGTGTTCTCGGTCGTGCCCAGCCGGTCCAGCAGCCG
ATATTTTAGGTACATGAAGCTATGGGAaCTTAtcgCCGTAGAGGtctTTTTTGTGGTtccAgCTGAGGGCTTCGTCTCGTTAC
CTATTTTGACCTAAtctTTCAAATAATTTTTACCGTTTCCTGTGTAGtctTCcATTTTGTTtctaaGAAAAGTAaCTTGTGGT
tctGtcttccagATAATACATTTTCcAGAAACGATACtcttcacTGcatGCTacaATTTTAAAAATtcgGGGAGTTtcgGGAT
GATACcaaAAGTTGTTagGTTTTacNNtGCTTGTTGGGCGCTaTGcaTTAtCCTTGTTGGTNgacgTGTTACATAAATATaac
tTAtCAAATTGTatGGAAGTTTGCTTAtcaaGGTAAGtAAactAtCCTatTGAATAaAATTGCatTTAactatNgNAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAA

Séquence protéique :

MGQSLCAPVLSKETKSWQNENYSVAVSSMQGWRVHMEDAHMCLLELPGDPKAAYFSVFDGHGGTRVANHASRHLH
EKIIEQSEYGRNNIKEAIRHAFLSMDAEMQSEMTTYSVKPSTPKLDSSVNLTGTGSVVALKDSTVETHDSKASFS
LKIPNPGDELAGSTGIIVLLKDQMLYCGNAGDSRAVCSRRGVAEPLSTDHKPTLRAEKERISAAGGWVDAKRVNG
NLALSRAFGDFVFKRNPHQSAENQIVTANPDVFVRRLSVEDDEFIVLCCDGIWDVMTNQEVVSFVRLRLSYGMLP
SKVCEELMMRCLAPDCHTNGLGCDNILSFWSVSYKGVRSRICNASVLGRAQPVQQPIF (358 AA)

SmSirt7 : XM_002573861.1

Séquence complète de l'ARNm :

AACCGTCACGGTTTTACTCTTGTGATTTGTTGCATGGCATCTCAAGATTGGCATCGTGATGCAGCCATTTTGGCTCGCCTCAT
TAAGGATAATAAGGGAAGTGTTGTCATTTATACTGGTGCTGGCATAAGTACATCGGCGTGCATCCCAGATTATAGAGGGACAA
ACGGTTTGTGGACTACGCAGTCAAATCGCGTAACAGGCGTTAATTCAGTGCTACCTACCGTTGGTTTTAACAAAAATGATCAA
GCGCAATGTAATGAGGTCCCAAAACTACAGGATAAAATACCCAAATGTGAATCACGGATTAAAACTTCCAAAAAGTCAAAAAA
TACCAACTTAAAGTTACGACTTCCAGAAGCAACCATTGCAAAGCCAACATTCACTCATATGGCTATCAAAGTTTTGGTAGATG
AAGGATATGCTCGACATGTCGTTTCTCAAAATGTTGATGGCTTACACGTGCGCAGTGGTTTAAGTCGTGAAAAACTTTCGGAG
CTACATGGTAATTTATTTATTGAACAATGCATCGCTTGTGAATACGCTGTTTTCCGGACTTTTGACGTCGCCGAAACAACTTC
TCGTTCACACCATTTTACTGGACGCATTTGTCCTCAATGTCGTAATTTACACCCTGTTGAAAGTACAATAGCCAGTGATATAC
TAAGAAAAACAGCTGAACATTTGGCAGTATCTAGATACAAGAAAAATGTATCAAATGAAAATCTTATGTTGAGTTACCGATAT
GCTGCAAGAAAATTAGCCAGATCTTTTGAAGGTGTACGTCTTAAAGCAGTGGAACATTTGCGCAATACTCAAAAGTCTGAGAG
GCTGACGGACTCAGTTCTTACGAAGGCACCTTTGCTAAGAGATGTTGTTGTACACTTTTTTGAACGACAACCAGAGATGGGGT
TAACAGAAATATATCGCATTCGATCAGCAATCGAAGCTGTACATGGTCGTAAAGTTCTTCAAGATGCTGTCAATGCCACTTCA
AATGACTGTAAAGTTTTGGATCATGGATGCAAACGTTCCCATGAAGAGTCAAAAAAATATCTCATTGGATCCCCATGGTTTAA
AAGAATGCGTCCTGCTATGAAGATGGAATGTCAAGATCTCTGTAAAACATCAGAAGCAGTTGATGTAAAACCTATCTCTCCGG
ATTCTCTGGATACTCCCGCTAAATTAATTGTTGTTGTTGGTTCATCTTTAACTGTTTTGCGCAATTATTCATTTTTATGGCCT
TATGGCCTTGGGAGGTGTGGTCAACTAAGTTCGTCGAGCGAACATAAAAAGAAACCCACATGTATTGATTCTGTTTTCAAATC
GACTTCAATCCCTGATACCCCTGAAAATTGTCGGTTGGTTATTATCAATTTGCAACCAACATGCAAAGATGTGGTTGCTGATT
TGGTAATTCGTGTTCCTTGTGATGAACTATTTCGTGTTATCATGTCAGATCACTTAGAAATAGATGTTCCACAATATGACCAC
AGGCATGATCCTCTTTATTCAATCGGTCTTTCTTTATCTCCAGAAGAAGAATGCACACGTACTCGTCCGAACATCCCATTTTC
TTCCGTATAATATTGTTTCAGAATTTTTCTCTCTGTGGTGTACAGTTTCACATGATTTGGTTGTAGCTATTGATTACTGTTTC
GTTCTTTAGACGTAGAATAAACGTTTCTCTTTTGTACTCAAAACAAGAACCAGTACCTTTGTAAATAATAAGGTATGTTTCCA
TAATTCAAAGAACCTAATAGAATTGCATCGTATCATGGTAAAAAA

Séquence protéique :

MASQDWHRDAAILARLIKDNKGSVVIYTGAGISTSACIPDYRGTNGLWTTQSNRVTGVNSVLPTVGFNKNDQAQC
NEVPKLQDKIPKCESRIKTSKKSKNTNLKLRLPEATIAKPTFTHMAIKVLVDEGYARHVVSQNVDGLHVRSGLSR
EKLSELHGNLFIEQCIACEYAVFRTFDVAETTSRSHHFTGRICPQCRNLHPVESTIASDILRKTAEHLAVSRYKK
NVSNENLMLSYRYAARKLARSFEGVRLKAVEHLRNTQKSERLTDSVLTKAPLLRDVVVHFFERQPEMGLTEIYRI
RSAIEAVHGRKVLQDAVNATSNDCKVLDHGCKRSHEESKKYLIGSPWFKRMRPAMKMECQDLCKTSEAVDVKPIS
PDSLDTPAKLIVVVGSSLTVLRNYSFLWPYGLGRCGQLSSSSEHKKKPTCIDSVFKSTSIPDTPENCRLVIINLQ
PTCKDVVADLVIRVPCDELFRVIMSDHLEIDVPQYDHRHDPLYSIGLSLSPEEECTRTRPNIPFSSV (517
AA)

Protéine contenant un domaine SH2 : XM_002581273.1

Séquence complète de l'ARNm :

ACGCGAATTTAAATTAAATAGAATTTAAAACTGGTCAGCTTGAGAAGAGATGTTTGAGGATTGTAAAGAATGCGATTATGAAT
TTTCCTGATAACTCTTTCCAATACAGAATATAAATATATTCAGATAATACTATTGGATCTCATGGACCTTTTGAAATGAAATA
TGTCAACTCATACTCTAATAACCAAGAACAGTTCGTCAGTTATTTCAACGAAAACAAACCAAGGAAAcACGATAAAAGCTGAT
CTCTTCAATGCTTCTTTACCAACTTATCCTTCTGACAAGCAAAATATACCCAATAATATTGATACAAAGATAACATCAGCATC
AACTTTGCCTGTAAAGGAATCAATTATCAGTCATAATAATACCAGCGATAATTTGACAAATTACATTTCTTCATCTTTACAAG
ATAAAAAATGCACAATGAAACAGGATACACTAATCACTTCTCAACCAATCAAAATACAGTTACGTGAAGAATCTAAAGAGTGT
AGAATCAAGCAAAAATTGGATCTTATGAATGCATCAATAAGTGAACAGAATTACAATAAATCTCATTTCTTACAAAATTCTCG
ACCACATATATGCATGCCACCAAGATGTCCACCAGATGGTGCGGCAGTTCATGAAATCTCTCCATCCAATCTCAGTAAATCAA
ATAAATCTGTCATTTATGAAAATTTAATTGATAGATATTTATTAATGGAACATGATAATCATTTAACAAAAGAAATCTCTCCA
CAATCATTAGTTACTACGTGTACTGTTAACAGCGTTACAACAACACCAACTTTTATTGATAATTCCTCCAATACAAATAATCA
CGTGAACAATAATGCTAAAGACATTATGACACACAGAGTTTCAACTCAAAGTACTCAAACAAATTTCGACATAATGACGAGTC
ATCTAACCTCAGAATCGACTAATTCTTATCTGTCCCCATCCAAGAAAATTGTAAATATCCCTACCCAACCTCATTCACCAACC
GATACAAATACTTGGTTCCCACCTCCACCTCCAACACCACTTCGAGATTCGATAATGAATTCTACAAATGTTGATTTGAAAGC
ACCGCACTATCATGAACATTGTCGTCCAGATGAAGTTCGTTCATTAGTTATGGACAAAATTTCTGATAAATCCTCTAATATCA
TTACTAATTTAAACGTATCTTCAATTTCTGAATTAAACTGTTCAACACAAATTAGTACGTCTGTTGCTTCAATAACAAATTTA
AAATTATCCTCATCTCCACCAACACCACCTTTACCTCCACCGTCTTCCCCACCCCGTCCACCATCAGTTCCTCCAAGACATCC
AGCTACTTCATTACAATATAAAATAGAACTGACAGATTTACCGAAAACTGTATCTGAAAAGGCAAAGAACAATAGTGTTTCGG
AGAAATCGGAAAACAAATCTCATCAAAACTATCCTGACACGAATAACACATTATCAGTACAAACACCTTTGAGAACATCATGT
AAAAATTCCGCCACAGCTTACATTCCAAATAAACAGAGTTCAATTTGTCAATCAGATAAATTATCAGATTCTTCCGCAATGAA
AATTGGCAATGAAACCAAAATATTAACAAATAATTCCTCTGAGATGACAGAATCTAAGGCACAATCAGTTTCAGCTAGTGATC
TAGATGAAAGAAACAAAGATTCAACAAATTATCCTCTCGATGGAAGATCTGTTGTTCCATGGGATTCGAATCAAGAAGACACC
ACCGTCTTACTTTCAGCCACTTCATCACAAAAAACACTTCAAGCAAATGAAACGGATATAATTAAATCAACGTGCATTATTTC
TCACGCTCCAACAATAACTTCTTCTACTTCATTCCCTGATAAAAGAAATGTCAACTGGGCATTTTCAAACCAACATATTTCTT
CTTATCCTTTAGAAAAACTGGATTCACTTAATCTTGACTCAACAAACCCTGTTTTAATTAAAAAACAATCAGTAAAATTTCAT
GAATCAAACAGATTGCAAAATGATCAAAAGTCAAATGTCACTGTAACTAGACCAAATTTTTTATCAGATTTCATATTGATAAA
ATCTACACACCCTGATCAGCCATCTATTAAACGCCTTATTTCACCTGATGATTTGAAAAATGAACGTACTATTCGAAAACATT
ATAATATTACAAATAATCATGATCTAAATCAATCTGTCTTGTTACAGAATGAAGAACAAGATGAATTTGTACCATTTATTTAT
TCAGTAAAAGATCCAACACTTTTAAATCATCATAACCGAGAATTACTAATAAATAGTCATCCAGAATTACAATCAAATCAACA
AATTGATGTAGCTTGGTTGAAAGCTCAACAAAGGATTGAATTGATCAATTCAAATAACTCACGAAACGGAATTCGTCGATCTT
GTCGTGATTTCCCTCAGCGCCAAATCAGTGCACAACCCACATTTACGAATATACAACCAGGTGTTATGCATTTATCTCCAACA
AGAACACATAAAGAACATTTCACCTCTAGAAATCCACCTACCAGTAAGAATAGTAATGTACTTTTGATGACACAATCTAGTTT
ACCAGCTGGATTTCCTGAACAACAACCAGAATATTTTATACATTACAGACACAAATCTGATAATCTTGTTCATACTAATCCTA
ACTTTGTCACAGATACGAGATCGACTCGTATGTCCGGCGATTGTACACATGTACAGTACTATCCTCAAAGAAATCGTTCATAT
AATTCTGAGAACTCCTGTATGACAGATTTAATTGCACCAAGTTACAACAATAGTATGACGCAATCTGTATTCTTCCCTCTAGA
TTCAGGATGGGGTCCAACAGATGTTAAATCAAATGATTCAACCAGCGCTAAACACAAAAAACATCGTTCAAATATGATTCGTT
CACACAGTCAACGTACTGCCGATCCACAATCTAATTTATTAGAAGGCAATCAGTTAAGCACGTCTTCAGATCACACAAGATGT
TTAATACCTTCAAAATATTATCATCGTAATTTAAGTCAAACAGTACCAGCCAATCCAGATAGTAATTCCATTTGGCCTCCAGT
TCTTGTTCAGTGGCATAGAAGACGACCAAATGTTGCTGCTAGTTCAGAAAATTTCCCCGACATAATAGATTACCAGGGAAGTA
AAAGATACAATGAGAATCTACACATTCCAGCTGAATATTATAGACATCAAAAATCAGATTTTTCACGTCATCATAGTAGTAGT
ACAACAGCGATATCTGAACAACTTGAAAATCAACTATGGTTTCACCGTGATCTTTCACGTTCACATGCAGAAAAATTATTGAA
GTCTACACCGACAGGTAGTTTTCTTGTAAGAAGAAGTGAGACAAGTAAAACAGAACTATCATTATCAATAAAACGAGAAAGTG
ATGTACTCCATATGAAAATTTCACAGGATCCTGAAACCGGAGGTTATGTTCTAGGCGAATATAGTCAACCATATCCAAGTGTT
TCATCTATGATTTATCGTTATTCACGAACTTTGCTACCAGTACGTGGTACAACTCCGGTGTTGTTGCGCTTCCCAATCAGTCG

TATTGCATTTTCACACTAAATAAATCAAACAAATTATAACTATGTGTCAGTTATACATTCTATTTACTTAGTGATTTATTTAT
ACGTCTCTTTGTTAATTTTTTTtCTAACAGATATTGGTGATGATCATTTTGTTTTACGATCCTCTCCCCCATTACTTTTACAA
TTTCTTTTTCCATGTTCCTTTTaTTTTATGACTTTGTTGTCCATTTTCATTGAATTTCATTTTCTTCGTATTTATACCTATTT
AACATTTCAATGTAACTGTCAACTTGTCCTACATTTATTTACAGTAGTACACATATAGAGTCTTTCGTATTAGTACTATGATG
GATAAATTTTAAAAAAATGTTACCGATGTTTAACACAAATTCTCCTGGTTATGCAACTACAGTTTAACTAGCATTTAGTAATT
GTTTATTTATACCAGTGCTTTTTTTACGAACAGTGAACAAAACACACATGTTTATTCTTTAACTCTTCGTTGATTTCTTTCCA
TTTTGTAGGTTCATAACTCAAATTTTGTCCGTTTTCCTTCCCGAATCGAATGTAATGTCTTCTAGTTAATGACTGTCTAATTA
CGCAATATTTATATTATCCAACTCACTGATATAGTCCGGTAATCTTATTCTGTTTTTAAGCCTATTTAGACTATTTTACACAC
AGATTAAACGTATTCACTTTCAATAACTAGGCAAAAATATTTGAGAGAGAATCTTTAACACGCACAAGCTTTGGACACCTTAT
GTATATTAAACACTATTAAATAACTTGACtTTTTTTTCTTCATCCGCTTTCTCATTTATTGAATTATGGATATTGTATTTGAT
TGGCTAGTTTGAATTTTTAAGAATTGTGCTACTTTAGGTTGTAATTACTTTTATTGCTTTGAATTTTGTTTTGTTTTTGTTTT
TTGGTCACTTAAGTTTATAACAAAAATGTTGGGAACAATAGTACCGCATTTTATTTATATCTTTCTCCAAGAGAACATTTATT
CTTAATAATCGTCACTATCATTGTAATTGTTACTATTATTATCAATGTCATTATTTCTTTCGAATATTCATTGTTGTATAATT
TTTACTACTGACTTATAGAGTTGCTGTTCTTGCGTCTCTATAATATAAAACTTCAGCTTTAAtgccAAAAAAAAAAAAAAAA

Séquence protéique :

MSTHTLITKNSSSVISTKTNQGNTIKADLFNASLPTYPSDKQNIPNNIDTKITSASTLPVKESIISHNNTSDNLT
NYISSSLQDKKCTMKQDTLITSQPIKIQLREESKECRIKQKLDLMNASISEQNYNKSHFLQNSRPHICMPPRCPP
DGAAVHEISPSNLSKSNKSVIYENLIDRYLLMEHDNHLTKEISPQSLVTTCTVNSVTTTPTFIDNSSNTNNHVNN
NAKDIMTHRVSTQSTQTNFDIMTSHLTSESTNSYLSPSKKIVNIPTQPHSPTDTNTWFPPPPPTPLRDSIMNSTN
VDLKAPHYHEHCRPDEVRSLVMDKISDKSSNIITNLNVSSISELNCSTQISTSVASITNLKLSSSPPTPPLPPPS
SPPRPPSVPPRHPATSLQYKIELTDLPKTVSEKAKNNSVSEKSENKSHQNYPDTNNTLSVQTPLRTSCKNSATAY
IPNKQSSICQSDKLSDSSAMKIGNETKILTNNSSEMTESKAQSVSASDLDERNKDSTNYPLDGRSVVPWDSNQED
TTVLLSATSSQKTLQANETDIIKSTCIISHAPTITSSTSFPDKRNVNWAFSNQHISSYPLEKLDSLNLDSTNPVL
IKKQSVKFHESNRLQNDQKSNVTVTRPNFLSDFILIKSTHPDQPSIKRLISPDDLKNERTIRKHYNITNNHDLNQ
SVLLQNEEQDEFVPFIYSVKDPTLLNHHNRELLINSHPELQSNQQIDVAWLKAQQRIELINSNNSRNGIRRSCRD
FPQRQISAQPTFTNIQPGVMHLSPTRTHKEHFTSRNPPTSKNSNVLLMTQSSLPAGFPEQQPEYFIHYRHKSDNL
VHTNPNFVTDTRSTRMSGDCTHVQYYPQRNRSYNSENSCMTDLIAPSYNNSMTQSVFFPLDSGWGPTDVKSNDST
SAKHKKHRSNMIRSHSQRTADPQSNLLEGNQLSTSSDHTRCLIPSKYYHRNLSQTVPANPDSNSIWPPVLVQWHR
RRPNVAASSENFPDIIDYQGSKRYNENLHIPAEYYRHQKSDFSRHHSSSTTAISEQLENQLWFHRDLSRSHAEKL
LKSTPTGSFLVRRSETSKTELSLSIKRESDVLHMKISQDPETGGYVLGEYSQPYPSVSSMIYRYSRTLLPVRGTT
PVLLRFPISRIAFSH. (1141 AA)

Le domaine d’interaction protéine-protéine SH2 est surligné en vert

SmMek7 : XM_002574592.1

Séquence complète de l'ARNm :

GCCCTTGGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAAGCATAACTTACGTGTTATTGTTTGGCACCACTTGAATTC
GCTGATGCAGTAACTCACAGATAGACATATTATTCGTCCTATGGGCATGATCTCTGTCGCTTCCTTTACAAAATA
CTTTTGATATGATCAATGTTGTTTAAGCCCATCAGCAGCTAATATTTTTATGGCGCAGTAGTCTACCTATGTCAA
ATGAACTCTCGGTTGGTTGTTCAGCCCGACAGTTTCTGGTGACTTCTGAAAATGGGTCGGGATATGATGTTTGCA
ATTCAACATCGGTCGGTTCCCCGCGCAGAAATGTCACCCGTTtCMAGSGCCCTACAGCCTTGCTATGTGAAAGAC
AACGTTCTGAATCCCCTGCAATACATTCAAAGAGTCGACAGCGAGATGTTTCCGTTAATACTAATCAACAAAACG
ATAGATATGATTTTGAATCTTTGCAAAAAGAAATTACCAAAAGAAGTGGCGTCCTATTGTTTGGAAACAAGGTTT
TGCTCGCTAAAACAGATGATTTTGCAAACGAAGGTTGTCTAGGTTCCGGTACGTGTAGCTCTGTGTACAAAATGC
GACATCGTACCAAGTCCAACATAGTAATGGCAGTTAAGCAAATGCGTGTGTCATCTACATATGAAGAGGAAAATA
AGCGTATCATGATGGATCTAAATATTGTTACGAAATGTTTCGATTGCTCTTATATCGTCGAGTGCTACGGGATAT
TCTTCTCCGGAGGTGATGTTTGGATATGCATGGAAGTCATGTCAACCTGCTTAGATAAGCTGTATCATGATCTTC
ATCGTCCATTTCCTGAAAAGGTTTTGGGGAAAGTGACAGTTGCTATTACCACTGCTTTGGACTATTTAAAACGAA
AACATAACGTTATGCATAGAGACGTTAAACCGTCTAATATGCTCTTAAGTTACCAAGGTGTAATTAAGTTATGTG
ACTTCGGGATAAGTGGGATTCTTAAGGATTCTATTGCCCGTTCGCGGCAGCCGGGATGCACTGGCTATATGGCTC
CAGAACGTCTAAACAACTCAACATATGATGTTCGTGCAGACATTTGGTCACTTGGAATATCATTATTGGAATTGG
CAACCGGATCTTTCCCATATACTGGGACCCATATTGAATTTGCTATTATGACTAAAATAATATCAGACCCACCTC
CATCGTTACCTCACCATATACCTTTTACCCCTGCGTTCCGTCAATTCGTCGAGCTATGCTTAACAAAGGACCACA
CTCAGCGCCCAAAATATCGCTCATTAATGAGTACTGGATTTTTTGTTCGGCACAACAAGGAGCCTCATGATGTAC
TAGAGTGGCTTAAGGGATTACCATTACCACACTTACAGTGTTTAGATGAAAGGACGACCAATAATTTGGATTGCG
AAACTCCTACAAGTATCACATCCTCTATGAATTTTCTGACTAACATGGTTGAATCTCCCGAATCAGTGACCACTC
ATAGTCCAGATATTTCCAGGGGTGTGAGTAATATCTCTCTTGATGACTCTTCTGATTCGAAGAAGGCATCATGGG
AAAATATAAATAATCAAGCTGAGATAGACGTTACATTAGTTGCAGCACCTAAGGTAAATTCTGATTCTAACGAGC
AAGCACAGTTCACTATTCACAAATCTTCAGTAACTTCTGACCATTTTGTTAACGAAAATATTTCCCCTCAACTTT
CGTCATTTACAATTAGTGAACAGTTTTCTGCCGGTCAAAATCCTCATTTTTTTAAGACCCAAAATACAATAGTTG
ATCAGAGTTCAGAAAATTTTATTCACCTGCTAGAGGGAAAGTCCACTAAGTTTCTCTCCCAGGGTTCTTCAGGCT
ACGGATCTGCAGGTTCTGATAGTTCTCCTGGATCTCTTGGAAGTGATAGTCGCCCACCAAGTTCCTCCCAAGTTC
TTGATATGGTATTATCTAGCAGAAGCGTTAATGGGATCCCTCCTTTACCAGCAGTTCAGCGTTCCAAACCATCGT
ACACTCTCAGAGTCAATAAACCCAATAAATATTTGAACAATATTTTGGAAAACAATGTTAGTCGATCTGATTCGT
CGATCCGTCCCACTGTGTCAGATTCGTTTTCTAATCATCCTAGTTGTCAAGTCTCCTCTGTGCATTCAATAAGTG
GTTACGATCAGTGGAGTACGTTATCCCTATCATCTAGAACAACTCATATACCTACATCTCAACCTGTTACGGAAA
ATTCTGTTCATAATCAACTAACATCACTCATTGAAAAATTTGAACCCAGTTCGAATAAAGGAGTTGGTTTATGTG
CTAGCGCGAAACATGAAAAGCGTACCCCTTTAGATAATGATTCCGAAGAAAAAGGTAAAAGTTCTGGTTCTTCAA
GGACGGAATGGATTTGTGGTCGTCCCCATATAAACAAACGGAAAGTAGTTGGCCAATCGCGTTCCTCTTCTGTTG
GTGCTCAGTTACAACGCTCTCCCGCCCAAAGATGGTTAGTCAAACCACCACAAATTAGAAGAAATCTTCAAGTCG
ACCAAAATTCTTCAATATGTGTACACAATGATACCACTCGTATACGCTCGCCAGTAATTCCAAATGCTACCTCAT
CCATATTAAACCCGAACTATGGGGCCATTTTAGGAAAAAATACGTCTCCACAACAATACCATCATCATTATTTCT
ATTATTATTATTATTATGACAACCAACTCGATAAAAATAATCTAAATAAACCATCTAGTACATCCTGGGTGGCCA
GAGAGAATATAAGTACGCTTGGTAGAAATTCACCATCTTATTTTACTGGTTCAAATTCCAACTCACTGGTTAATA
ACTCTCTGCCCACAAGCAACATATCACCTATTCTTTCAGGAAGAATGTGTCAACGGTTAAATACTCATCCAATCC

CAAGACAAAGCAGTTTACAGTTCCCATCTAACGATTTAAAATCTTCCAAGGCGCAGTCAGACTCACTTTTTTTCT
CTGGAATGTTAGGATCACATCTACCTATGACTTCACAATCCACTTATCAGATTATATCCAGCGAGTCCCACGGGC
GACACCTTAACCGAAATAGTTTTCAACATCCACTTGTATTCAGTAATTCAACGTTAAGAGACTCTGGTACATTAA
CAAAAAGAGGCGAACATCCTAAACATACACACAGATCAATGTCACAACCTCCTAAATTACGAGATTGGCTATCTT
TTGAAACAGAATTGTGAAGATACACCTCATGACACTAATGCATATCAACAGGAATATCGAAATCCATTTGTGTTC
CTAAACTTAGTTCCAGCTCACCTTTGTCTTTCGATGCTTGCATCAGCATTTTGTTGTTAAGGCGGTTTTATTGAT
CATCTTCAAATGCTCACATTCATTTTTCGTCTTTCCATTCTCCATACAAAATGCATAACCTACAAAAGCTTTCAG
TAACTTCTCTTAAATATGTTTATTGGTAATCGATTGGGTTACTTCTGTACATACTAGTGTAAATTATGGTCTTCA
TTGTAATTTATTTCCTGACAGTTTTATTTGAAGTCAGTTACCTAGTTGTATTATTGTTTTGTTAGTCAAGTCTTG
AATTTTTGGATGATTTTTAAAAACAATCTTTCAACGAATTcatGGTAGGTTCCAGAAtatAAAATATTTTTAAGa
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Séquence protéique :

AHQQLIFLWRSSLPMSNELSVGCSARQFLVTSENGSGYDVCNSTSVGSPRRNVTRFXXPTALLCERQRSESPAIH
SKSRQRDVSVNTNQQNDRYDFESLQKEITKRSGVLLFGNKVLLAKTDDFANEGCLGSGTCSSVYKMRHRTKSNIV
MAVKQMRVSSTYEEENKRIMMDLNIVTKCFDCSYIVECYGIFFSGGDVWICMEVMSTCLDKLYHDLHRPFPEKVL
GKVTVAITTALDYLKRKHNVMHRDVKPSNMLLSYQGVIKLCDFGISGILKDSIARSRQPGCTGYMAPERLNNSTY
DVRADIWSLGISLLELATGSFPYTGTHIEFAIMTKIISDPPPSLPHHIPFTPAFRQFVELCLTKDHTQRPKYRSL
MSTGFFVRHNKEPHDVLEWLKGLPLPHLQCLDERTTNNLDCETPTSITSSMNFLTNMVESPESVTTHSPDISRGV
SNISLDDSSDSKKASWENINNQAEIDVTLVAAPKVNSDSNEQAQFTIHKSSVTSDHFVNENISPQLSSFTISEQF
SAGQNPHFFKTQNTIVDQSSENFIHLLEGKSTKFLSQGSSGYGSAGSDSSPGSLGSDSRPPSSSQVLDMVLSSRS
VNGIPPLPAVQRSKPSYTLRVNKPNKYLNNILENNVSRSDSSIRPTVSDSFSNHPSCQVSSVHSISGYDQWSTLS
LSSRTTHIPTSQPVTENSVHNQLTSLIEKFEPSSNKGVGLCASAKHEKRTPLDNDSEEKGKSSGSSRTEWICGRP
HINKRKVVGQSRSSSVGAQLQRSPAQRWLVKPPQIRRNLQVDQNSSICVHNDTTRIRSPVIPNATSSILNPNYGA
ILGKNTSPQQYHHHYFYYYYYYDNQLDKNNLNKPSSTSWVARENISTLGRNSPSYFTGSNSNSLVNNSLPTSNIS
PILSGRMCQRLNTHPIPRQSSLQFPSNDLKSSKAQSDSLFFSGMLGSHLPMTSQSTYQIISSESHGRHLNRNSFQ
HPLVFSNSTLRDSGTLTKRGEHPKHTHRSMSQPPKLRDWLSFETEL (1021 AA)

Le domaine Serine/Threonine kinase est surligné en vert

BIBLIOGRAPHIE

A

Ahier A., Khayath N., Vicogne J., Dissous C., Insulin receptors and glucose uptake in the human parasite *Schistosoma mansoni*, Parasite 15 (4) : 573-579, 2008

Aleshin A., Finn R.S., SRC: A century of science brought to the clinic, Neoplasia. 12(8): 599-607, 2010

Alonso D., Muñoz J., Gascón J., Valls M.E., Corachan M., Failure of standard treatment with praziquantel in two returned travelers with Schistosoma haematobium infection, Am J Trop Med Hyg. 74 (4):703, 2006

Andrade L.F., Nahum L.A., Avelar L.G.A., Silva L.L., Zerlotini A., Ruiz J.C., Oliveira G., Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*, BMC Genomics, 6; 12: 215, 2011

Annerén C., Lindholm C.K., Kriz V., Welsh M., The FRK/RAK-SHB signaling cascade: a versatile signal-transduction pathway that regulates cell survival, differentiation and proliferation. Curr Mol Med. 3(4):313-24, 2003

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science. 284(5415):770-6, 1999

Ashton P.D., Harrop R., Shah B., Wilson R.A., The schistosome egg: development and secretions, Parasitology. 122 (3): 329-338, 2001

de Azeveto S.V., Hartfelder K., The insulin signaling pathway in honey bee (Apis mellifera) caste development—differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae, J Insect Physiol. 54(6): 1064-1071, 2008

B

Bae J.H., Lew E.D., Yuzawa S., Tomé F., Lax I., Schlessinger J., The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by secondary SH2 domain binding site, Cell.138(3):514-524, 2009

Bahia D., Mortara A., Kusel, J.R., Andrade L.F., Ludolf F., Kuser P.R., Avelar L., Trolet J., Dissous C., Pierce R.J., Oliveira G., *Schistosoma mansoni* : expression of Fes-like tyrosine kinase SmFes in the tegument and terebratorium suggests its involvement in host penetration. Exp Parasitol 116: 225-232, 2007

Baines AJ., The spectrin-ankyrin-4.1-adducin membrane skeleton: adapting eukaryotic cells to the demands of animal life. Protoplasma. 244(1-4):99-131. Review. 2010

Beckmann et Grevelding C.G., Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* in vitro, Int J Parasitol. 40(5): 521-526, 2010

Beckmann S., Buro C., Dissous C., Hirzmann J., Grevelding C.G., The syk kinase SmTK4 of Schistosoma mansoni is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis, PLoS Pathog. 6(2):e1000769, 2010a

Beckmann S. Quack T., Burmeister C., Buro C., Long T., Dissous C., Grevelding C.G., Schistosoma mansoni: signal transduction processes during the development of the reproductive organs, Parasitology. 137(3):497-520, 2010b

Beltran S., Cézilly F., Boissier J., Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes, PLoS One. 3(10): e3328, 2008

Beltran S., Boissier J., Are schistosomes socially and genetically monogamous? Parasitol Res. 104(2): 481-483, 2009

Berriman M., Haas B.J., LoVerde P.T., Wilson R.A., Dillon G.P., Cerqueira G.C., Mashiyama S.T., Al-Lazikani B., Andrade L.F., Ashton P.D., Aslett M.A., Bartholomeu D.C., Blandin G., Caffrey C.R., Coghlan A., Coulson R., Day T.A., Delcher A., DeMarco R., Djikeng A., Eyre T., Gamble J.A., Ghedin E., Gu Y., Hertz-Fowler C., Hirai H., Hirai Y., Houston R., Ivens A., Johnston D.A., Lacerda D., Macedo C.D., McVeigh P., Ning Z., Oliveira G., Overington J.P., Parkhill J., Pertea M., Pierce R.J., Protasio A.V., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Sajid M., Salzberg S.L., Stanke M., Tivey A.R., White O., Williams D.L., Wortman J., Wu W., Zamanian M., Zerlotini A., Fraser-Liggett C.M., Barrell B.G., El-Sayed N.M., The genome of the blood fluke Schistosoma mansoni.Nature, 460(7253):352-358, 2009

Biolchini Cde. L., Neves R.H., Hulstijn M., Gomes D.C., Machado-Silva J.R., Development of *Schistosoma mansoni* worms in mice analyzed by bright field and confocal microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 101 Suppl 1:261-5, 2006

Bloch E.H., In vivo microscopy of schistosomiasis. II. Migration of Schistosoma mansoni in the lungs, liver, and intestine, Am J Trop Med Hyg, 29(1): 62-70, 1980

Blume-jensen P., Hunter T., Oncogenic kinase signaling, nature, 411: 355-365, 2001.

Boerner J.L., Demory M.L., Silva C., Parsons S.J., Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II. Mol Cell Biol. 24(16):7059-71, 2004.

Bradshaw J.M, Mitaxov V., Waksman G., Investigation of phosphotyrosine recognition by the SH2 domain of the Src kinase, J.Mol.Biol 293, 971-985, 1999

Brauner-Osborne H., Wellendorph P., Jensen A.A., Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors. Curr Drug Targets 8: 169–184, 2007

Brehm K., The role of evolutionarily conserved signaling systems in *Echinococcus multilocularis* development and host-parasite interaction, Med Microbiol Immunol 199: 247-259, 2010

C

Capron A., Capron M., Riveau G., Vaccine development against schistosomiasis from concepts to clinical trials, Br Med Bull. 62: 139-148, 2002

Capron A., Riveau G., Capron M. and Trottein F., Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. Trends Parasitol 21 : 143-149, 2005

Cargnello M., Roux P.P., Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiol Mol Biol Rev; 75(1):50-83, 2011.

Carlo J.M., Osman A., Niles E.G., Wu W., Fantappie M.R., Oliveira F.M.B., LoVerde P.T., Identification and characterization of an R-Smad ortholog (SmSmad1B) from Schistosoma mansoni, FEBS J. 274(16): 4075-4093, 2007

Carpenter G., Ji Q., Phospholipase Cγ- as a signal-transducing element, Exp Cell Res. 253(1): 15-24, 1999.

Carpenter G., Liao H.J., Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. Exp Cell Res. 315(9):1556-66. 2009

Cheng T.C., Bier J.W., Studies on molluscan schistosomiasis: an analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni*, Parasitology. 64(1):129-141, 1972

Cheng G-F., Lin J-J., Jin Y-X., Fu Z-Q., Jin Y-M., Zhou Y-C., Cai Y-M., Dose-dependent inhibition of gynecophoral canal protein gene expression in vitro in the schistosome (Schistosoma japonicum) by RNA interference, Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 37(6): 386-390, 2005

Cheong J.K., Virshup D.M., Casein kinase 1: complexity in the family, Int J Biochem Cell Biol. 43(4): 465-469. Epub 2010 Dec 9, 2011

Chernin E., Dunavan C.A., The influence of host-parasite dispersion upon the capacity of Shistosoma mansoni miracidia to infect Australorbis glabratus. Am J Trop Med Hyg., 11:455-71, 1962

Chishti A.H., Kim A.C., Marfatia S.M., Lutchman M., Hanspal M., Jindal H., Liu S.C., Low P.S., Rouleau G.A., Mohandas N., Chasis J.A., Conboy J.G., Gascard P., Takakuwa Y., Huang S.C., Benz E.J. Jr, Bretscher A., Fehon R.G., Gusella J.F., Ramesh V., Solomon F. , Marchesi V.T., Tsukita S., Tsukita S., Hoover K.B., The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane, Trends Biochem Sci. 23(8):281-282, 1998

Cobb M.H., Sang B.C., Gonzalez R., Goldsmith E., Ellis L., Autophosphorylation activates the soluble cytoplasmic domain of the insulin receptor in an intermolecular reaction. Cobb J Biol Chem. 264(31): 18701-18706, 1989

Collins III J.J., King R.S., Cogswell A., Williams D.L., Newmark P.A., An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy, PLoS NTD 5 (3): e1009, 2011

D

Delcourt N., Bockaert J., Marin P., GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. Trends Pharmacol Sci. 28(12):602-7, 2007

Dewalick S., Bexkens M.L., van Balkom B.W., Wu Y.P., Smit C.H., Hokke C.H., de Groot P.G., Heck A.J., Tielens A.G., van Hellemond J.J., The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton. Int J Parasitol. 41(5): 523- 532, 2011

Dissous C, Grzych J.M., Capron A., Schistosoma mansoni shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. Nature.8;323(6087):443-5, 1986

Dissous C., Dissous C.A., Capron A., Stimulation of Schistosoma mansoni miracidia by a 80 kDa glycoprotein from Biomphalaria glabrata. Mol Biochem Parasitol. 21 (3):203-9, 1986

Dissous C., Khayath N., Vicogne J., Capron M., Growth factor receptors in helminth parasites : signaling and host-parasite relationships ; FEBS Lett, 580 : 2968-2975, 2006

Dissous C., Ahier A., Khayath N., Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis, Bioessays. 29(12): 1281-1288, 2007

Dissous C., Grevelding C.G., Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: a tangible perspective?, Trends Parasitol, 27(2):59-66, 2011

Doherty J.F., Moody A.H., Wright S.G., Katayama fever: an acute manifestation of schistosomiasis, Hospital for Tropical Diseases, London BMJ. 313 (7064): 1071-2, 1996

Duchek P., Roth P., Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during Drosophila oogenesis, science 291: 131-133, 2001

Duchek P., Somogyi K., Jékely G., Beccari S., Rørth P., Guidance of cell migration by Drosophila PDGF/VEGF receptor, cell 107: 17-26, 2001

E

Edersberger I., Knobloch J., Kunz W., Cracks in the shell—zooming in on eggshell formation in the human parasite *Schistosoma mansoni*, Dev Genes Evol, 215 (5): 261-267, 2005

Engelman J.A., Luo J., Cantley L.C., The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism, Nat Rev Genet. 7(8): 606-619, 2006

Erasmus D.A., A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female Schistosoma mansoni, Parasitology. 67(2): 165-183, 1973

F

Favelyukis S., Till J.H., Huubard S. R., Miller W. T., Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. Nature, 8: 1058-1063, 2001.

Felder C.B., Graul R.C., Lee A.Y., Merkle H-P., Sadee W., The Venus FlyTrap of periplasmic binding proteins: An ancient protein module present in multiple drug receptors, AAPS PharmSci, 1 (2), 1999

Fenwick A., Webster J.P., Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. Curr Opin Infect Dis.19 (6):577-82. Review, 2006

Fitzpatrick J.M., Hoffmann K.F., Dioecious *Schistosoma mansoni* express divergent gene repertoires regulated by pairing. Int J Parasitol. 36(10-11):1081-9. 2006

Frame M.C., Patel H., Serrels B., Lietha D., Eck M.J., The FERM domain : organizing the structure and function of FAK, Nat Rev Mol Cell Biol. 11 : 802-14, 2010

Franke T.F., PI3K/AKT: getting it right matters, Oncogene 27, 6473-6488, 2008

Freitas T.C., Jung E., Pearce E.J., TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathog 3: e52, 2007

Freitas T.C., Jung E., Pearce E.J., A bone morphogenetic protein homologue in the parasitic flatworm, Schistosoma mansoni, Int J Parasitol. 39(3): 281-287, 2009

G

Garrett T.P.J., McKern N.M., Lou M., Elleman T.C., Adams T.E., Lovrecz G.O., Zhu H.J., Walker F., Frenkel M.J., Hoyne P.A., Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha, Cell 110: 763-773, 2002

Geiger B., Ayalon O., Cadherins. Annu Rev Cell Biol. 8:307-32, 1992

Gouignard N., Ahier A., Dissous C., Contribution à l'étude des VKR, une nouvelle famille de Récepteurs Tyrosine Kinase, mémoire M2R, 2008

Greer P., Closing in on the biological functions of FPS/FES and FER, Nat Rev Mol Cell Biol. 3(4): 278-289, 2002

Gryseels B., Polman K., Clerinx J., Kestens L., Human schistosomiasis, Lancet, 368: 1106-1118, 2006

H

Haas W., Schmitt R., Characterization of chemical stimuli for the penetration of Schistosoma mansoni cercariae. II. Conditions and mode of action. Z Parasitenkd. 66(3):309-319, 1982

Haglund K., Sigismund S., Polo S., Szymkiewicz I., Di Fiore P.P., Dikic I., Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation, Nat Cell Biol. 5(5): 461-466, 2003

Hanks S.K, Hunter T., The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification; FASEB 1995

Hauck C,R., Hsia D. A., Schlaepfer D. D., The focal adhesion kinase –A regulator of cell migration and invasion, IUBMB life, 53: 115-119, 2002

Huang F., Sorkin A., Growth factor receptor binding protein 2-mediated recruitment of the RING domain of Cbl to the epidermal growth factor receptor is essential and sufficient to support receptor endocytosis, Mol Biol Cell. 16(3): 1268-1281, 2005

Huang F., Kirkpatrick D., Jiang X., Gygi S., Sorkin A., Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain, Mol Cell. 21(6): 737-748, 2006

Hubbard S.R., Till J.H., Protein tyrosine kinase structure and function, Annu. Rev. Biochem. 69: 373-398, 2000

Hubbard S.R., Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. Nature, 5: 464-470, 2004.

Hunter T., Sefton B.M., Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine, Proc Natl Acad Sci U S A. 77(3): 1311-135, 1980

Hunter T., Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. Cur.op.Cell.Biol, 21: 140-146, 2009

Hsu H-J., LaFever L., Drummond-Barbosa D., Diet controls normal and timorous germline stem cells via insulin-dependent and independent mechanisms in *Drosophila*, Dev Biol, 313 (2): 700-712, 2008

I

Irusta P.M., DiMaio D., A single amino acid substitution in a WW-like domain of diverse members of the PDGF receptor subfamily of tyrosine kinases causes constitutive receptor activation. EMBO J. 17(23): 6912-6923, 1998

Irusta P.M., Luo Y., Bakht O., Lai C.C., Smith S.O., DiMaio D., Definition of an inhibitory juxtamembrane WW-like domain in the platelet-derived growth factor beta receptor. J Biol Chem. 277(41): 38627-38634, 2002

J

Jaffe A.B, Hall A., Rho GTPases: Biochemistry and Biology, Annu. Rev. Cell Dev. Biol 21: 247-269, 2005

Jones M.K., How Bong S., Green K.M., Holmes P., Duke M., Loukas A., McManus D.P., Correlative and dynamic imaging of the hatching biology of *Schistosoma japonicum* from eggs prepared by high pressure freezing, PLoS NTD 2 (11) e334, 2008

K

Kai M., Miyazaki T., Ohkura Y., High-performance liquid chromatographic measurement of guanidino compounds of clinical importance in human urine and serum by pre-column fluorescence derivatization using benzoin. J Chromatogr. 311(2):257-66, 1984

Kamakura M., Royalactin induces queen differentiation in honeybees. Nature. 473(7348): 478-83., 2011

Kannan N., Taylor S.S., Zhai Y., Venter J.C., Manning G., Structural and functional diversity of the microbial kinome, PLoS Biol 5: e17, 2007

Kapp K., Knobloch J., Schlusser P., Sroka S., Lammers R., Kunz W., Grevelding C.G., The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization, Mol Biochem Parasitol 138: 171-182, 2004

Karlsson T., Welsh M., Modulation of Src homology 3 proteins by the proline-rich adaptor protein Shb. Exp Cell Res. 231 (2): 269-75, 1997

Kay B.K., Williamson M.P., Sudol M., The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. FASEB J. 14(2): 231-241, 2000

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 274: 659-676, 2007

Kim H.G., Hwang S.Y., Aaronson S.A., Mandinova A., Lee S.W., DDR1 receptor tyrosine kinase promotes prosurvival pathway through Notch1 activation. J Biol Chem. 286(20):17672-81, 2011

Knobloch J., Winnen R., Quack M., Kunz W., Grevelding C.G., A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs, Gene 294: 87-97, 2002

Knobloch J., Kunz W., Grevelding C.G., Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*, Int J Parasitol 36: 1261-1272, 2006

Knobloch J., Beckmann S., Burmeister C., Quack T., Grevelding C.G.,Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*, Exp Parasitol 117: 318-336, 2007

Konrad C., Kroner A., Spiliotis M., Zavala-Góngora R., Brehm K., Identification and molecular characterization of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*, Int J Parasitol. 33(3): 301- 312, 2003

Krebs E.G., An accidental biochemist, Annu Rev Biochem. 67:xii-xxxii, 1998

Kroiher M., Miller M.A., Steele R.E., Deceiving appearances: signaling by “dead” and “fractured” receptor protein-tyrosine kinases, Bioessays 23: 69-76, 2001

Kuhn M., Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases, Handb exp pharmacol. 191: 47-69, 2009

Kuriyan J., Cowburn D., Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 26: 259-288, 1997

Kusel J.R., Studies on the structure and hatching of the eggs of *Schistosoma mansoni*, Parasitology, 60(1): 79-88, 1970

L

Ladbury J.E., Lemmon M.A., Zhou M., Green J., Botfield M.C., Schlessinger J., Measurement of the binding of tyrosyl phophopeptides to SH2 domains: A reappraisal. Proc. Nalt. Acad . Sci, 92: 3199-3203, 1995

Lafever L., Feoktistov A., Hsu H-J., Drummond-Barbosa D., Specific roles of target of rapamycin in the control of stem cells and their progeny in the *Drosophila* ovary, Development 137: 2117-2126, 2010

De Lamare Biolchini C., Neves R.H., Hulstijn M., Gomes D.C., Machado-silva J.R., Development of *Schistosoma mansoni* worms in mice analyzed by bright field and confocal microscopy, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 101: 261-265, 2006

Lammers T., Peschke P., Ehemann V., Debus J., Slobodin B., Lavi S., Huber P., Role of PP2Calpha in cell growth, in radio- and chemosensitivity, and in tumorigenicity. Mol Cancer.;6:65, 2007

LaValle C.R., George K.M., Sharlow E.R., Lazo J.S, Wipf P., Wang Q.J., Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy, BBA 1806: 183-192, 2010

Leiper R.T., Atkinson E.L., OBSERVATIONS ON THE SPREAD OF ASIATIC SCHISTOSOMIASIS, Br Med J, 1(2822):201-192.4, 1915

Lemmon M.A., Ferguson K., Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains, Biochem. J. 350: 1-18, 2000

Lemmon M.A., Membrane recognition by phospholipid-binding domains, Nat Rev Mol Cell Biol. (2):99-111, 2008

Lemmon M.A., Schlessinger J., Cell signaling by receptor tyrosine kinases, cell 141: 1117-1134, 2010

Leonard C.J., Aravind L., Koonin E.V., Novel families of putative protein kinases in bacteria and Archeae: evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily, Genome Res. 8: 1038-1047, 1998

Liu H., Chen X., Focia P.J., He X., Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases, EMBO J. 26(3): 891-901, 2007

Livak K.J., Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 25(4):402-8, 2001

Loker E.S., Brant S.V., Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes, Trends Parasitol. 22(11): 521-528, 2006

Long T., Cailliau K., Beckmann S., Browaeys E., Trolet J., Grevelding C.G., Dissous C., Schistosoma mansoni Polo-like kinase 1: A mitotic kinase with key functions in parasite reproduction, Int J Parasitol. 40(9): 1075-1086, 2010

LoVerde P.T., Osman A., Hinck A., Schistosoma mansoni: TGF-β signaling pathways, Exp Parasitol. 117(3):304-17, 2007

Ludolf F., Bahia D., Andrade L.F., Cousin A., Capron M., Dissous C., Pierce R.J., Oliveira G., 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(1): 163-172, 2007

M

Machida K., Mayer B.J., The SH2 domain : versatile signaling module and pharmaceutical target, BBA 1747 : 1-25, 2005

Manning G., Plowman G.M., Hunter T., Sudarsanam S., Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. Trends in bio sciences, 27: 514-520, 2002a

Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S., The protein kinase complement of the human genome, science, 298 1912-1934, 2002b

Manning G., Genomic overview of protein kinases, WormBook, dec 13: 1-19, 2005.

Margeta-Mitrovic M., Jan Y.N., Jan L.Y., Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABA(B) receptors., Proc Natl Acad Sci U S A. 4;98(25):14649-54. 2001

Martin D.M.A., Miranda-saavedra D., Barton G.J., Kinomer V. 1.0 : a database of systematically classified eukaryotic protein kinases, Nucleic Acids Res. 37(Database issue) : D244-250. Epub 2008 Oct 30, 2009

Maurel D., Comps-Agar L., Brock C., Rives M.L., Bourrier E., Ayoub M.A., Bazin H., Tinel N., Durroux T., Prezeau L., Trinquet E., Pin J.P., Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies : application to GPCR oligomerization, Nat Method 5 : 561-567, 2008

McManus D.P., Loukas A., Current statut of vaccines for schistosomiasis, Clinical microbiology 21 (1) 225-242, 2008Miranda-saavedra D., Barton G.J., Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases, Proteins 68 : 893-914, 2007

Michaelson D., Korta D.Z., Capua Y., Hubbard E.J.A., Insulin signaling promotes germline proliferation in C.elegans, development 137: 671-680, 2010

Miranda-Saavedra D., Barton G.J., Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. Proteins. 68(4):893-914, 2007

Mitri C, Parmentier ML, Pin JP, Bockaert J, Grau Y., Divergent evolution in metabotropic glutamate receptors. A new receptor activated by an endogenous ligand different from glutamate in insects. J Biol Chem; 279(10):9313-20. 2004

Mitri C., Soustelle L., Framery B., Bockaert J., Parmentier M.L., Grau Y., Plant insecticide L-canavanine repels Drosophila via the insect orphan GPCR DmX. PLoS Biol. 7(6):e1000147. 2009

Montell D.J., Rorth P., Spradling A.C., Slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP, Cell. 71(1): 51-62, 1992

Morgan J.A., DeJong R.J., Kazibwe F., Mkoji G.M., Loker E.S., A newly-identified lineage of *Schistosoma*. Int J Parasitol. 33(9): 977-985, 2003

Móscai A., Ruland J., Tybulewicz V.L.J., The SYK tyrosine kinase : a crucial player in diverse biological functions, Nat Rev Immunol. 10(6): 387-402, 2010

Mourão M.M., Dinguirard N., Franco G.R., Yoshino T.P., Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *schistosoma mansoni*, using RNA interference. PLoS Negl Trop Dis. 3 (8) : e502, 2009

Muller A.J., Pendergast A.M., Havlik M.H., Puil L., Pawson T., Witte O.N., A limited set of SH2 domains binds BCR through a high-affinity phosphotyrosine-independent interaction, Mol Cell Biol. 12(11): 5087-5093, 1992

N

Nakamura F., Stossel T.P., Hartwig J.H., The filamins: organizers of cell structure and function. Cell Adh Migr. 5(2):160-9. 2011

Neves R.H., de Lamare Biolchini C., Machado-Silva J.R., Carvalho J.J., Branquinho T.B., Lenzi H.L., Hulstijn M., Gomes D.C., A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda : Schistosomatidae) analysed by confocal laser scanning microscopy, Parasitol Res 95: 43-49, 2005

Nix D.A., Fradelizi J., Bockholt S., Menichi B., Louvard D., Friederich E., Beckerle M.C., Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus. J Biol Chem. 276(37):34759-67. 2001

Nollen P.M., Patterns of sexual reproduction among parasitic platyhelminths, Parasitology, 86 (Pt 4): 99-120, 1983

Nzila A., Okombo J., Becker R.P., Chilengi R., Lang T., Niehues T., Anticancer agents against malaria: time to revisit? Trends Parasitol. 26(3): 125-129, 2010

O

Oger F., Bertin B., Caby S., Dalia-Cornette J., Adams M., Vicogne J., Capron M., Pierce R.J., Molecular cloning and characterization of Schistosoma mansoni Ftz-F1 interacting protein-1 (SmFIP-1), a novel corepressor of the nuclear receptor SmFtz-F1. Mol Biochem Parasitol. 148(1):10-23, 2006

Ogiso H., Ishitani R., Nureki O., Fukai S., Yamanaka M., Kim J.H., Saito K., Sakamoto A., Inoue M., Shirouzu M., Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains, Cell 110: 775-787, 2002

Oliveira K.C., Carvalho M.L., Maracaja-Coutinho V., Kitajima J.P., Verjovski-Almeida S., Non-coding RNAs in schistosomes: an unexplored world. An Acad Bras Cienc. 83(2):673-94, 2011

Osman A., Niles E., LoVerde P.T., Identification and characterization of a Smad2 homologue from Schistosoma mansoni, a transforming growth factor-β signal transducer, J Biol Chem. 276(13):10072-10082, 2001

Osman A., Niles E., LoVerde P.T., Expression of functional *Schistosoma mansoni* Smad4, J Biol Chem. 279(8): 6474-6486, 2004

Osman A., Niles E.G., Verjovski-Almeida S., LoVerde P.T., *Schistosoma mansoni* TGF-β Receptor II: Role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene, PLoS Pathog. 2(6): e54, 2006

Ostman A., Böhmer F.D., Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases, TRENDS in cell biology 11 (6): 258-265, 2001

P

Patel D.S., Garza-Garcia A., Nanji M., McElwee J.J., Ackerman D., Driscoll P.C., Gems D., Clustering of genetically defined allele classes in the Caenorhabditis elegans DAF-2 insulin/IGF-1 receptor, Genetics. 178(2): 931-946, 2008

Patel A., Fondrk M.K., Kaftanoglu O., Emore C., Hunt G., Frederick K., Amdam G.V., The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development, PLoS One. 2(6) : e509, 2007

Pawson T., Kofler M., Kinome signaling through regulated protein-protein interactions in normal and cancer cells, Curr Opin Cell Biol. (2):147-153, 2009

Pearce E.J., Progress towards a vaccine for schistosomiasis, Acta Trop. 86(2-3): 309-313, 2003

Pearce L.R., Komander D., Alessi D.R., The nuts and bolts of AGC protein kinases, Nat Rev Mol Cell Biol.11(1) : 9-22, 2010

Perovic S., Krasko A., Prokic I., Müller I.M., Müller W.E., Origin of neuronal-like receptors in Metazoa: cloning of a metabotropic glutamate/GABA-like receptor from the marine sponge Geodia cydonium. Cell Tissue Res. 296(2):395-404, 1999

Pin J.P., Galvez T., Prezeau L., Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. Pharmacol Ther 98: 325-354, 2003

Popiel I., Basch P.F., Reproductive development of female Schisotosoma mansoni (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments, J. Exp. Zool, 232: 141-150, 1984.

Q

Quack T., Knoblock J., Beckmann S., Vicogne J., Dissous C., Grevelding C.G., The Formin-homology protein SmDia interacts with the Src kinase SmTK and the GTPase SmRho1 in the gonads of *Schistosoma mansoni*, PLoS One. 4(9): e6998, 2009

R

Ramachandran H., Skelly P.J., Shoemaker C.B., The Schistosoma mansoni epidermal growth factor receptor homologue, SER, has tyrosine kinase activity and is localized in adult muscle, Mol Biochem Parasitol. 83(1): 1-10, 1996

Rinaldi G., Morales M.E., Alrefaei Y.N., Cancela M., Castillo E., Dalton J.P., Tort J.F., Brindley P.J., RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. Mol Biochem Parasitol. 167(2):118-26, 2009

Roepstorff K., Grøvdal L., Grandal M., Lerdrup M., van Deurs Bo, Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer, Histochem Cell Biol, 129: 563-578, 2008

Rorbach J., Nicholls T.J., Minczuk M., PDE12 removes mitochondrial RNA poly(A) tails and controls translation in human mitochondria. Nucleic Acids Res; 39(17):7750-63, 2011

Ross A.G.P., Bartley P.B, Sleigh A.C., Olds G.R., Li Y., Williams G.M., McManus D.P., Schistosomiasis**,** N Engl Med, 346 (16): 1212-1220, 2002

Rost M., Döring T., Prange R., gamma2-Adaptin, a ubiquitin-interacting adaptor, is a substrate to coupled ubiquitination by the ubiquitin ligase Nedd4 and functions in the endosomal pathway. J Biol Chem. 283(46): 32119-30, 2008

Rubin G.M., Yandell M.D., Wortman J.R., Gabor Miklos G.L., Nelson C.R., Hariharan I.K., Fortini M.E., Li P.W., Apweiler R., Fleischmann W., Cherry J.M., Henikoff S., Skupski M.P., Misra S., Ashburner M., Birney E., Boguski M.S., Brody T., Brokstein P., Celniker S.E., Chervitz S.A., Coates D., Cravchik A., Gabrielian A., Galle R.F., Gelbart W.M., George R.A., Goldstein L.S., Gong F., Guan P., Harris N.L., Hay B.A., Hoskins R.A., Li J., Li Z., Hynes R.O., Jones S.J., Kuehl P.M., Lemaitre B., Littleton J.T., Morrison D.K., Mungall C., O'Farrell P.H., Pickeral O.K., Shue C., Vosshall L.B., Zhang J., Zhao Q., Zheng X.H., Lewis S., Comparative genomics of the eucaryotes, Science. 287 (5461) : 2204-2215, 2000

S

Samuelson J.C., Stein L.D., *Schistosoma mansoni*: increasing saline concentration signals cercariae to transform to schistosomula. Exp Parasitol. 69(1):23-29, 1989

Santos T.M., Machado C.R., Franco G.R., Pena S.D., Characterization and comparative functional analysis in yeast of a *Schistosoma_mansoni* Rho1 GTPase gene. Mol Biochem Parasitol. 125(1-2):103-12, 2002

Sardet C., Prodon F., Prulière G., Chenevert J., Polarisation des œufs et des embryons: principes communs, Med Sci (Paris). 20(4): 414-423, 2004

Sato M., Tabata T., Hashimoto K., Nakamura K., Nakao K., Katsuki M., Kitano J., Moriyoshi K., Kano M., Nakanishi S., Altered agonist sensitivity and desensitization of neuronal mGluR1 responses in knock-in mice by a single amino acid substitution at the PKC phosphorylation site. Eur J Neurosci. 20(4):947-55, 2004

Schäcke H., Schröder H.C., Gamulin V., Rinkevich B., Müller I.M., Müller W.E., Molecular cloning of a tyrosine kinase gene from the marine sponge *Geodia cydonium*: a new member belonging to the receptor tyrosine kinase class II family. Mol Membr Biol. 11 (2): 101-7, 1994

Schiller M.R., Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases-GEFs what's the link, Cell Signal. 18(11): 1834-1843, 2006

Schindler C., Levy D.E., Decker T., JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines, J Biol Chem. 282(28):20059-20063, 2007

Schlessinger J., Lemmon M.A., SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling, Sci. STKE 191, re 12, 2003

Schlessinger J., Plotnikov A.N., Ibrahimi O.A., Eliseenkova A.V., Yeh B.K., Yayon A., Linhardt R.J., Mohammadi M., Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-Heparin complex Reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization, Mol Cell 6: 743-750, 2000

Schussler P., Grevelding C.G., Kunz W., Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in Schistosoma mansoni by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction, Parasitology 115: 629-634, 1997

Schutte C.H.J., Studies on the South African strain of *Schistosoma mansoni*. The intra-molluscan larval stages. South. Afri. J. Science, 70: 299-302, 1974

Sherrill J.M., Insufficiency of self-phosphorylation for the activation of epidermal growth factor receptor. Biochemistry. 36(19): 5677-5684, 1997

Shrivastava A., Radziejewski C., Campbell E., Kovac L., McGlynn M., Ryan T.E., Davis S., Goldfarb M.P., Glass D.J., Lemke G., Yancopoulos G.D., An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors, Mol Cell. 1(1): 25-34,1997

Shoemaker C.B., Ramachandran H., Landa A., dos Reis M.G., Stein L.D., Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor, Mol Biochem Parasitol 53: 17-32, 1992

Snodgrass, R.E., Anatomy of the honey bee, 101-184-655, 1956

Steinauer M.L., The sex lives of parasites: investigating the mating system and mechanisms of sexual selection of the human pathogen *Schistosoma mansoni*. Int J Parasitol. 39(10): 1157-1163, 2009

Soulsby M., Bennett M., Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases, Physiology (Bethesda).24 : 281-289, 2009

Spiliotis M., Kroner A., Brehm K., Identification, molecular characterization and expression of the gene encoding the epidermal growth factor receptor orthologue from the fox-tapeworms *Echinococcus multilocularis*, gene 323: 57-65, 2003

T

Tabata T., Kano M., Calcium dependence of native metabotropic glutamate receptor signaling in central neurons. Mol Neurobiol. 29(3):261-70, 2004

Tan P.B., Kim S.K., Signaling specificity: the RTK/RAS/MAP kinase pathway in metazoans. Trends Genet. 15(4): 145-149, 1999

Taylor S.S., Kornev A., Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins, Trends Biochem Sci. 36(2):65-77, 2011

Tepass U., FERM proteins in animal morphogenesis, Curr Opin Genet Dev. 19(4) : 357-367, 2009

Thien C.B.F., Langdon W.Y., Negative regulation of PTK signaling by Cbl proteins, Growth Factors, 23 (2): 161-167, 2005

Till J.H., Becerra M., Watty A., Lu Y., Ma Y., Neubert T.A., Burden S.J., Hubbard S.R., Crystal structure of the MuSK tyrosine kinase: insights into receptor autoregulation. Structure. 10(9):1187-1196, 2002

Tissenbaum H.A., Ruvkun G., An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 148(2): 703-717, 1998

Tomar A., Schlaepfer D.D., Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility, Curr Opin Cell Biol. 21 (5): 676-683, 2009

Totsukawa G., Wu Y., Sasaki Y., Hartshorne D.J., Yamakita Y., Yamashiro S., Matsumura F., Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. J Cell Biol. 164(3):427-39, 2004

Tyler J.M., Hargreaves W.R., Branton D., Purification of two spectrin-binding proteins: biochemical and electron microscopic evidence for site-specific reassociation between spectrin and bands 2.1 and 4.1, Proc Natl Acad Sci U S A. 76(10): 5192-5196, 1979

V

van Amerongen R., Mikels A., Nusse R., Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors, Sci Signal. 1(35): re9, 2008

Vicogne J., Pin J.P., Lardans V., Capron M., Noêl C., Dissous C., An unusual receptor tyrosine kinase of Schistosoma mansoni contains a Venus FlyTrap module, Mol Biochem Parasitol. 126(1): 51-62, 2003

Vicogne J., Cailliau K., Tulasne D., Browaeys E., Yan Y.T., Fafeur V., Vilain J.P., Legrand D., Trolet J., Dissous C., Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth Schistosoma mansoni, J Biol Chem. 279 (36), 37407-37414, 2004

Vogel W., Gish G.D., Alves F., Pawson T., The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. Mol Cell. 1(1):13-23, 1997

W

Walsh D.A., Perkins J.P., Krebs E.G., An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. J Biol Chem. 243 (13): 3763-3765, 1968

Webster B.L., Southgate V.R., Littlewood D.T., A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*. Int J Parasitol. 36(8): 947-955, 2006

Welsh M., Mares J., Karlsson T., Lavergne C., Bréant B., Claesson-Welsh L., Shb is a ubiquitously expressed Src homology 2 protein. Oncogene. 9(1):19-27, 1994

Wiesmann C., Ultsch M.H., Bass S.H, de Vos A.M., Crystal structure of nerve growth factor complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor, Nature. 401(6749):184-8, 1999

Williamson M.P., The structure and function of proline-rich regions in proteins. Biochem J. 297 (Pt 2): 249-260, 1994

Wu R., Durick K., Songyang Z., Cantley L.C., Taylor S.S., Gill G.N., Specificity of LIM domain interactions with receptor tyrosine kinases. J Biol Chem. 271(27):15934-41, 1996

X

Xua D., Curtis J., Fenga Z., Minchella D.J., On the role of schistosome mating structure in the maintenance of drug resistant strains. Bull Math Biol 67: 1207-1226, 2005

Y

Yamauchi T., Neuronal Ca2+/Calmodulin-Dependent protein kinase II-Discorvery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory, Biol Pharm Bull. 28 (8): 1342-1354, 2005

Yan Y., Tulasne D., Browaeys E., Cailliau K., Khayath N., Pierce R.J., Trolet J., Fafeur V., Ben Younes A., Dissous C., Molecular cloning and characterisation of SmSLK, a novel Ste20-like kinase in *Schistosoma mansoni*. Int J Parasitol, 37(14):1539-50, 2007

Z

Zeng L., Sachdev P., Yan L., Chan J.L., Trenkle T., McClelland M., Welsh J., Wang L.H., Vav3 mediates receptor protein tyrosine kinase signaling, regulates GTPase activity, modulates cell morphology, and induces cell transformation, Mol Cell Biol. 20(24): 9212-9224, 2000

Zhang X., Gureasko J., Shen K., Cole P.A., Kuriyan J., An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor, cell 125: 1137-1149, 2006