



**HAL**  
open science

# Structure, Fonction et Evolution des Récepteurs Venus Kinase : rôles dans la reproduction du parasite *Schistosoma mansoni*

Mathieu Vanderstraete

► **To cite this version:**

Mathieu Vanderstraete. Structure, Fonction et Evolution des Récepteurs Venus Kinase : rôles dans la reproduction du parasite *Schistosoma mansoni*. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S044 . tel-01071348

**HAL Id: tel-01071348**

**<https://theses.hal.science/tel-01071348>**

Submitted on 3 Oct 2014

**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 :

## **THÈSE**

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II**  
Discipline Parasitologie - Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

**Mathieu VANDERSTRAETE**

Le 6 décembre 2013

**Structure, fonction et évolution des  
récepteurs Venus Kinase**  
-  
**Rôles dans la reproduction du parasite  
*Schistosoma mansoni***

Devant le jury composé de

**Président**

**Professeur El Moukhtar Aliouat**

**Rapporteurs**

**Docteur Anne-Françoise Burnol  
Professeur Pierre De Meyts**

**Examineurs**

**Professeur Christoph Grevelding  
Docteur Jérôme Vicogne  
Docteur Colette Dissous**



# Remerciements

*Je remercie le Docteur Camille Locht, directeur du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de cette structure.*

*Je voudrais également remercier le Docteur Raymond Pierce, qui dirige l'équipe 2 « Biologie Moléculaire du Schistosome: Développement et Reproduction », au sein de laquelle j'ai évolué durant quatre ans.*

*Merci aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de juger mon travail. Je vous en suis très reconnaissant.*

*Un énorme merci au Docteur Colette Dissous: Colette, c'est difficile d'exprimer en quelques lignes tout ce que tu m'as apporté durant ces quatre ans. Dans les remerciements de mon mémoire de M2, je disais que tu étais un puits de science. Trois ans plus tard je le pense d'autant plus, et cela va d'ailleurs bien au delà du domaine de la biologie. Je suis très admiratif de la façon dont tu conçois la science et la recherche et je pense que tu as déteint sur moi ! J'ai réellement apprécié te cotoyer au quotidien pendant ces quatre années. Inutile de te préciser à quel point j'ai appris à tes côtés, ça me paraît tellement évident quand je me revois en 2009! Merci pour toutes les libertés que tu m'as laissé prendre, aussi bien à la paillasse que dans l'écriture et dans la participation aux congrès. L'étude des VKR est vraiment un sujet en or, et je n'ai aucun doute que d'ici peu la communauté scientifique reconnaitra tes travaux à leur juste valeur. Merci!*

*J'aimerais remercier trois personnes de l'équipe en particulier, qui m'ont beaucoup aidé tout au long de ma thèse, aussi bien sur le plan professionnel que personnel.*

*- le Docteur Nadège Gouignard: Nad, merci pour tout, je sais que si j'en suis là aujourd'hui, c'est en grande partie parce que tu as su me guider et me conseiller tout au long de mon année de M2... J'ai vraiment apprécié travailler avec toi durant ces presque 3 ans. Voilà, on arrive au bout de ce foutu papier « VKR1-VKR2 », notre papier qui j'espère va couronner en beauté tout le travail que l'on a réalisé pour montrer toute l'importance de cette famille ! Merci.*

*- Marion Morel: Marion, la fausse timide! Tu es arrivée au labo pour ton stage de M1 et j'ai tout de suite senti que ça allait le faire. Depuis, tu as brillamment réussi ton M2 et tu es en train de faire la même chose pour ta thèse. Je vais quitter mes petits VKR sans l'ombre d'un doute sur le fait que la suite du travail sera de qualité. Travailler avec toi est un réel plaisir et ça va vraiment me manquer. Merci !*

*- Julien Lancelot : Ju, quand je repense à ces 3 ans, j'ai en tête les séjours en Suède et en Sardaigne, des tonnes de soirées, des concerts d'Archimède, des débats politiques à la pelle...autant te dire que ça a largement dépassé le cadre professionnel ! Tu es une des très belles rencontres de ma thèse et j'espère que le fait que je m'en aille n'empêchera pas de continuer toutes les choses que je viens d'énumérer. Sur le plan scientifique, je te remercie de m'avoir permis de participer à ton projet sirtuines et te dis MERDE pour le 13 décembre, même si je sais que tu vas gérer ça à la perfection.*

*I would also like to thank the Professor Christoph Grevelding. Christoph, I'm very grateful to you for accepting to evaluate my PhD work. I would also like to thank you for my stay in Giessen in the beginning of my thesis. I really enjoyed participating to this enriching and fruitful collaboration between Colette's lab and yours.*

*Je voudrais remercier les membres de l'EA 4020 et plus particulièrement Le professeur Jean-François Bodart, les docteurs Katia Cailliau et Edith Browaeys ainsi qu'Arlette Lescuyer. Katia, je voudrais vous remercier tout particulièrement pour tout le travail que vous avez abattu en ovocyte de Xénope, que ce soit pour les VKR, les Plk et toutes les autres kinases de parasites. Merci également d'avoir accepté de faire partie de mes jurys de CST ainsi qu'à mon jury de thèse. Ce travail ne serait pas aussi abouti sans votre aide, Merci beaucoup!*

*Merci au Docteur Jérôme Vicogne, le Christophe Colomb des VKR. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de CST et de thèse. Ce travail est aussi le tien!*

*Merci au Docteur Jamal Khalife pour ces deux derniers mois de financement qui m'ont permis de finir ma thèse dans de meilleures et moins stressantes conditions !*

*Merci à Claudine Colson et Maria Houze, qui s'occupent si bien de nous au secrétariat.*

*Je voudrais remercier tous les membres de l'équipe et du bâtiment que j'ai pu cotoyer et apprendre à connaître tout au long de ces quatre années. Dans le désordre, et j'espère, sans en oublier, merci à Thavy, Arnaud, Steph, Manu, Vitor, Jacques, Audrey, Nadège, Nico, Aline, Astrid, Gégé et Stoyan !*

*Enfin je remercie mes parents, mes frères et mes sœurs, pour le soutien qu'ils m'ont apportés durant cette période. Je garde le mot de la fin pour Chloé, qui a eu la lourde tâche de me soutenir et me supporter aussi bien le jour que la nuit, merci d'avoir été la pour moi.*



# Résumé

Les récepteurs Venus Kinase ou VKR forment une nouvelle famille de récepteurs tyrosine kinase découverte au laboratoire. Ces récepteurs sont caractérisés par une organisation atypique associant un domaine extracellulaire de type Venus Flytrap (VFT) similaire à ceux des récepteurs couplés aux protéines G de classe C, et un domaine Tyrosine Kinase (TK) intracellulaire similaire à celui du récepteur à l'insuline (IR). Cette famille est présente uniquement chez les invertébrés dont notre modèle d'étude, le parasite plathelminthe *Schistosoma mansoni*. Les travaux réalisés à ce jour suggèrent que ces protéines jouent un rôle dans le développement des stades larvaires et la reproduction sexuée.

Mon travail de thèse s'est intéressé à l'étude de cette famille de récepteurs et comporte trois axes principaux.

Le premier concerne la mise à jour de la phylogénie des VKR. Une analyse approfondie des données génomiques récentes nous a permis d'étendre la présence des VKR à près de 50 espèces dans cinq phylums invertébrés. La présence d'un VKR chez le cnidaire *Nematostella vectensis* suggère une émergence du récepteur avant l'apparition des bilatéraux. Des analyses phylogénétiques ont mis en évidence la monophylie de l'ensemble des protéines ainsi qu'une conservation importante des motifs fonctionnels VFT et TK. Des analyses de modélisation du domaine de fixation au ligand suggèrent que la majorité de ces récepteurs peuvent être activables par des acides aminés, et en priorité par la L-Arginine. La découverte de VKR chez *Nematostella vectensis*, *Lottia gigantea* ou *Capitella teleta* s'avère prometteuse dans la mesure où ces modèles se prêtent parfaitement à l'embryologie moléculaire et pourraient être utilisés pour étudier la fonction des VKR dans l'embryogenèse.

La deuxième partie de mon travail s'est intéressée à la caractérisation fonctionnelle de SmVKR1 et SmVKR2, les deux VKR de *Schistosoma mansoni*. En utilisant l'ovocyte de Xénope comme modèle d'expression, nous avons pu dans un premier temps déterminer que SmVKR1 et SmVKR2 sont activables par différents ligands. L'identification de partenaires intracellulaires par un criblage en double hybride de levure nous a permis d'identifier des partenaires d'interaction potentiels, suggérant des fonctions dans l'activation de voies TK conservées, mais également dans le remodelage du cytosquelette ou la synthèse protéique. Si les deux récepteurs activent les voies PI3K/Akt/S6K et Erk1/2, seul SmVKR1 est capable d'activer la voie JNK. Par hybridation *in situ*, nous avons pu montrer une localisation distincte des deux récepteurs dans l'ovaire, avec une expression de SmVKR2 au sein des ovocytes immatures et de SmVKR1 dans les ovocytes matures. Enfin des expériences d'ARN interférence ont confirmé un rôle de ces récepteurs dans l'ovogenèse, la diminution de leur expression entraînant des phénotypes délétères sur la croissance des ovocytes et la ponte des oeufs. L'étude des voies de signalisation SmVKR1 a été également entreprise au laboratoire, mettant en évidence l'importance de la protéine adaptatrice SmShb dans l'induction de la voie JNK par SmVKR1. L'ensemble de ces résultats suggère que SmVKR1 aurait une fonction dans la migration des ovocytes et/ou dans la reprise de méiose par l'activation de la voie JNK, tandis que SmVKR2 aurait un rôle plus précoce, dans la croissance et/ou la prolifération des ovogonies.

Enfin la dernière partie de mon travail de thèse visait à évaluer l'importance des VKR comme cibles thérapeutiques intéressantes en vue du développement de nouvelles drogues anti-parasitaires. Nous avons pu démontrer qu'une stratégie de double inhibition VKR-IR était envisageable à l'aide d'un seul inhibiteur kinase, l'AG1024, avec des effets schistosomicides à la fois sur les schistosomules et sur les adultes *in vitro*, représentant ainsi une alternative intéressante à l'utilisation actuelle du praziquantel (qui est inactif sur les formes juvéniles du parasite).

# Abstract

Venus Kinase Receptors (VKR) represent a new family of receptor tyrosine kinases discovered in the lab. These receptors are characterized by an atypical structure composed of an extracellular ligand binding domain called Venus Flytrap, similar to those of class C G-protein coupled receptors, and an intracellular Tyrosine Kinase domain, very close to those of Insulin Receptors. These proteins are exclusively found in invertebrate organisms including our lab model, the parasitic platyhelminth *Schistosoma mansoni*. Current data strongly suggest a function for these receptors in larval development and reproduction.

My thesis project concerns the study of this receptor family and is divided into three parts:

The first part consists in an update of the VKR family phylogeny. Analyses of recent genomic data have allowed us to extend the presence of VKR to 50 species present in five bilaterian phyla. The presence of one VKR in the early-branching metazoan *Nematostella vectensis* suggested that VKR arose before the bilaterian radiation. Phylogenetic and gene structure analyses showed that all receptors identified grouped monophyletically, and likely evolved from a common ancestor. Multiple alignments of tyrosine kinase (TK) and VFT domains indicated their important level of conservation in all VKRs identified up to date. We showed that VKRs had inducible activity upon binding of extracellular amino-acids and molecular modeling of the VFT domain confirmed the structure of the conserved amino-acid binding site.

The second part of my thesis project concerns the functional characterization of SmVKR1 and SmVKR2, which are two VKRs of *Schistosoma mansoni*. Using the *Xenopus* oocyte model as a protein expression system, we have been able to determine that SmVKR1 and SmVKR2 are activated by distinct and different ligands. The identification of intracellular binding partners using yeast two hybrid experiments allowed us to determine unexpected interacting proteins, suggesting functions for SmVKRs in kinase signaling and cytoskeleton remodeling. If both receptors are able to activate Akt, S6K and Erk 1/2 pathways, only SmVKR1 triggers the activation of Jnk proteins. Expression patterns were determined by in situ hybridization and highlighted the presence of both SmVKR1 and SmVKR2 transcripts in the ovary. However, their localization within the ovary is different, with SmVKR1 transcripts detected exclusively in the anterior part of the ovary while SmVKR2 transcripts were found in the posterior part that only contains immature oocytes. RNA interference experiments further confirmed the importance of SmVKR proteins in oogenesis, since the knockdown of every gene led to the appearance of deleterious phenotypes in the ovary. Taken together, all these results strongly suggest that SmVKR1 could be involved in meiosis resumption or ovulation through JNK activation, while SmVKR2 would have an earlier function in the growth and/or proliferation of oogonies.

Finally, the last part of my project concerned the assessment of VKR as a chemotherapeutic target. Taking advantage of the similarity between the catalytic domains of *S. mansoni* insulin receptors (SmIR1 and SmIR2) and Venus Kinase Receptors (SmVKR1 and SmVKR2), we studied the possibility to fight schistosomes by targeting simultaneously the four receptors with a single drug. We analyzed the potential of several IR and RTK inhibitors to inhibit kinase activities of both SmIR and SmVKR kinase domains recombinantly expressed in *Xenopus* oocytes. Among the different compounds tested, tyrphostin AG1024 emerged as the most potent inhibitor towards the four receptors. *In vitro* experiments then demonstrated that treatment with AG1024 led to dramatic effects on the viability of larval and adult schistosomes as well as on the fertility of adult worms. We assume that AG1024 represents a valuable hit compound for further design of anti-kinase drugs applicable to anti-schistosome chemotherapy.

# Mathieu Vanderstraete

Date of Birth: 09/12/1985 in Croix, France (59)  
Languages: French (Native), English  
Citizenship: French

161 rue Sadi Carnot, 59320 Haubourdin FRANCE  
Tel: +33 (0)320877172  
+33 (0)647999736  
[mathieu.vanderstraete@gmail.com](mailto:mathieu.vanderstraete@gmail.com)

## EDUCATION

- **2010- Present:** PhD student, Université Droit et Santé de Lille, France.  
Thesis title: Structure, Function and Evolution of Venus Kinase Receptors – Roles in the reproduction of *Schistosoma mansoni*  
Defense scheduled on December 6<sup>th</sup> 2013
- **2013:** D.U (Academic Degree) in Cellular Microbiology, Université Droit et Santé de Lille, France
- **2010:** Master Degree of Biology and Health Sciences, Université Droit et Santé de Lille, France
- **2009:** Master (MSc) of Biology and Biotechnology, Cell Biology option, Université des sciences et technologies de Lille, France.
- **2008:** Licence (Bsc) of cell biology and physiology, Université des sciences et technologies de Lille, France

## PROFESSIONAL EXPERIENCE

- **Sept. 2010 - present:** Predoctoral fellow, Research work at CIIL (Center of immunity and infection of Lille) CNRS UMR 8204- INSERM U1019; Fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et Technologies (Supervisor: Dr. Colette Dissous)
- **2009-2010:** Master's Research training at CIIL (Supervisor: Dr Colette Dissous)
- **2008:** Internship in a Veterinary Analysis Laboratory, Ajain, France

## TECHNICAL SKILLS

- Cloning strategies, plasmid DNA extraction, RNA extraction, Real time RT-PCR, RACE PCR, site-directed mutagenesis, Yeast two-hybrid
- Cell culture and transfection (Mammalian and Insect cells), several methods of protein extraction, immunoprecipitation, Western Blot, immunohistochemistry, fluorescence.
- Confocal and light microscopy, laser microdissection

- 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, MEGA5, BioEdit
- Preparation of *S.mansoni* miracidia and cercariae, in vitro culture of schistosomula, sporocysts and adult worms

## PUBLICATIONS:

- **Vanderstraete M**, Gouignard N, Morel M, Cailliau K, Grevelding CG, Leutner S and Dissous C. Functional characterization of *Schistosoma mansoni* Venus Kinase Receptors reveals central roles in gametogenesis and development of the parasite. Submitted.
- Lancelot J, Caby S, Dubois-Abdesellem F , **Vanderstraete M**, Trolet J, Oliveira G, Bracher F, Jung M and pierce RJ. *Schistosoma mansoni* Sirtuins : Characterization and Potential as Chemotherapeutic Targets. PLoS Negl Trop Dis 7(9): e2428.
- **Vanderstraete M**, Gouignard N, Ahier A, Morel M, Vicogne J, Dissous C. The venus kinase receptor (VKR) family: structure and evolution. BMC Genomics May 30;14(1):361
- **Vanderstraete M**, Gouignard N, Cailliau K, Morel M, Lancelot J, *et al.* Dual Targeting of Insulin and Venus Kinase Receptors of *Schistosoma mansoni* for Novel Anti-schistosome Therapy. PLoS Negl Trop Dis 7(5): e2226.
- Dissous C, **Vanderstraete M**, Beckmann S, Gouignard N, Leutner S and Grevelding CG. Tyrosine kinase signalling 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.
- 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. 2012 Sep;132(1):32-9
- Long T\*, **Vanderstraete M\***, Cailliau K, Morel, M, Lescuyer A, Gouignard N, Grevelding CG, Browaeys E and Dissous C. SmSak, the Second Polo-like Kinase of the Helminth Parasite *Schistosoma mansoni*: Conserved and Unexpected Roles in Meiosis. PLoS One 2012;7(6):e40045.
- Beckmann S, Haenel S, Cailliau K, **Vanderstraete M**, Browaeys E, Dissous C, Grevelding CG. Characterization of the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. J Biol Chem. 2011 Dec 9;286(49):42325-36.

- Morel M, **Vanderstraete M**, Gouignard N, Haenel S, Grevelding CG, Cailliau K, Dissous C. The *Schistosoma mansoni* protein SmShb interacts with and regulates SmVKR1 signaling in oocytes. In preparation.

- Carneiro VC, Abreu IC, Lopes Torres, Caby S, Lancelot J, **Vanderstraete M**, Furdas SJ, Jung M, Pierce RJ, Fantappie MR. Epigenetic Changes Modulate Schistosome Eggshell Formation and are a Novel Target for Blocking the Transmission and Pathology of Schistosomiasis. Submitted

## **INTERNATIONAL COMMUNICATIONS:**

- Venus Kinase Receptors: an invertebrate-specific family of receptor tyrosine kinases with key functions in development and reproduction. Mathieu Vanderstraete, Marion Morel, Nadège Gouignard, Jérôme Vicogne, Arnaud Ahier, Christoph. G. Grevelding, Katia Cailliau, Colette Dissous. International congress of invertebrate reproduction and development, Detroit, USA, July 2013, Oral communication.

- Receptor Tyrosine Kinases of *Schistosoma mansoni* as new potential drug targets: the example of Venus Kinase Receptors. Mathieu Vanderstraete, Marion Morel, Nadège Gouignard, Katia Cailliau, Christoph G. Grevelding, Colette Dissous. British Society for Parasitology meeting, April 2013, Bristol, UK. Oral communication.

- The *Schistosoma mansoni* protein SmShb interacts with and regulates SmVKR1 signaling in oocytes. Marion Morel, Mathieu Vanderstraete, Nadège Gouignard, Steffen Hahnel, Katia Cailliau, Christoph G. Grevelding, Colette Dissous. British Society for Parasitology meeting, April 2013, Bristol, UK. Poster

- Venus Kinase Receptors: a new family of RTK with functions in oogenesis in invertebrates. Mathieu Vanderstraete, Nadège Gouignard, Marion Morel, Jérôme Vicogne, Arnaud Ahier, Christoph G. Grevelding, Katia Cailliau and Colette Dissous. 37<sup>th</sup> symposium on hormone and cell regulation, Mont Ste Odile, France, October 2012, Poster.

- SmSak, the second polo-like kinase of *Schistosoma mansoni* acts in tandem with SmPlk1 to regulate cell division. Colette Dissous, Mathieu Vanderstraete, Thavy Long, Marion Morel, Svenja Beckmann, Christoph G. Grevelding, Edith Browaeys, Katia Cailliau. Molecular and cellular biology of helminth parasites VII, Hydra, Greece, Sept 2012. Poster.

- Molecular and functional studies of the *Schistosoma mansoni* Venus Kinase Receptors: potential roles in larval development and oogenesis. Mathieu Vanderstraete, Nadège Gouignard, Edith Browaeys, Silke Leutner, Marion Morel, Svenja Beckmann, Christoph G. Grevelding, Katia Cailliau and Colette Dissous. Molecular and cellular biology of helminth parasites VII, Hydra, Greece, Sept 2012. Oral communication.

- 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.
- 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

## HONOURS

- 13<sup>th</sup> International Congress on Invertebrate Development and Reproduction: Selected for a travel grant and awarded for the best student oral presentation.
- 37<sup>th</sup> symposium on hormones and cell regulation : selected for a travel grant
- Selected for a doctoral fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et Technologies (MENRT)

## REFERENCES

- **Dr. Colette Dissous**, PhD  
Director of Research, INSERM U1019  
Institut Pasteur de Lille  
59019 Lille Cedex, France  
+33 320877350  
[colette.dissous@pasteur-lille.fr](mailto:colette.dissous@pasteur-lille.fr)
- **Dr. Katia Cailliau**, PhD  
Assistant professor, UPRES EA4020  
Université des Sciences et technologies de Lille, bâtiment SN3  
59650 Villeneuve d'Ascq  
+33 320436569  
[katia.maggio@univ-lille1.fr](mailto:katia.maggio@univ-lille1.fr)
- **Dr. Jérôme Vicogne**, PhD  
Research assistant, UMR 8161  
Institut de Biologie de Lille  
59019 Lille Cedex  
+33 320871249  
[jerome.vicogne@ibl.fr](mailto:jerome.vicogne@ibl.fr)



# Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>CADRE DU TRAVAIL.....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>6</b>
<b>1. SCHISTOSOME ET SCHISTOSOMIASE .....</b>	<b>8</b>
1.1. TAXONOMIE .....	9
1.2. CYCLE DE VIE DU PARASITE .....	16
1.2.1 <i>Le stade œuf</i> .....	17
1.2.2 <i>Le stade miracidium</i> .....	19
1.2.3 <i>Le stade sporocyste</i> .....	20
1.2.4 <i>Le stade cercaire</i> .....	21
1.2.5 <i>Le stade schistosomule</i> .....	23
1.2.6 <i>Le stade adulte</i> .....	24
1.3. PATHOLOGIE : .....	27
1.4. TRAITEMENT ET PREVENTION.....	35
1.4.1 <i>Le praziquantel</i> : .....	35
1.4.2 <i>Autres drogues</i> : .....	38
1.4.3 <i>Méthodes de prévention</i> .....	40
1.4.4 <i>Vaccination</i> .....	41
<b>2. LES PROTEINE KINASES.....</b>	<b>44</b>
2.1. GENERALITES .....	44
2.2. STRUCTURE DES PK .....	47
2.3. LES PK HUMAINES .....	51
2.4. LES TYROSINE KINASES :.....	55
2.4.1 <i>Evolution des Tyrosine Kinases</i> .....	55
2.4.2 <i>Les TK cytoplasmiques</i> .....	56
2.4.3 <i>Les Récepteurs Tyrosine Kinase</i> .....	58
2.4.3.1 <i>Classification</i> .....	58
2.4.3.2 <i>Les mécanismes d'activation</i> : .....	60
<b>3. LES PROTEINE KINASES DE SCHISTOSOMA MANSONI .....</b>	<b>65</b>
3.1. GENERALITES .....	65
3.1.1 <i>Les Ser/Thr Kinases de S. mansoni</i> .....	66
3.1.2 <i>Les Tyrosine Kinases de S. mansoni</i> : .....	68
3.2. PROTEINES KINASE DE S. MANSONI ETUDIEES EXPERIMENTALEMENT ET LEURS ROLES DANS LA BIOLOGIE DU PARASITE .....	69
3.2.1 <i>Récepteurs protéines kinase</i> .....	69
3.2.2 <i>Protéine kinases cytosoliques</i> .....	72
<b>4. LES RECEPTEURS VENUS KINASE OU VKR.....</b>	<b>83</b>
4.1. DECOUVERTE DE SMRTK-1, UN RTK ATYPIQUE .....	83
4.2. LES VKR : UNE FAMILLE DE RECEPTEURS TYROSINE KINASE ATYPIQUES .....	85
4.3. PROJET DE THESE.....	89

<b>RESULTATS .....</b>	<b>92</b>
<b>1. LES RECEPTEURS VENUS KINASE : STRUCTURE ET EVOLUTION .....</b>	<b>94</b>
1.1. ACTUALISATION DES DONNEES PHYLOGENETIQUES CONCERNANT LES VKR.....	94
1.2. PERSPECTIVES DE RECHERCHE .....	111
<b>2. CARACTERISATION MOLECULAIRE ET FONCTIONNELLE DES VKR DE SCHISTOSOMA MANSONI .....</b>	<b>116</b>
2.1. DECOUVERTE DE SMVKR2 ET ANALYSE COMPARATIVE .....	116
2.2. LES VKR CONTRÔLENT L'OVOGENÈSE DE SCHISTOSOMA MANSONI .....	127
2.3. LES VOIES DE SIGNALISATION SMVKR1 DANS LES OVOCYTES MATURES: IMPORTANCE DE L'AXE SMSHB - JNK.....	171
<b>3. LES PROTEINE KINASES DE S. MANSONI COMME CIBLES THERAPEUTIQUES .....</b>	<b>174</b>
3.1. UN DOUBLE CIBLAGE DES SMVKRS ET SMIRS COMME NOUVELLE STRATEGIE ANTI- SCHISTOSOME .....	174
3.2. IDENTIFICATION DE PROTEINE KINASES ESSENTIELLES A LA SURVIE ET/OU A LA REPRODUCTION DU PARASITE.....	188
<b>DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION .....</b>	<b>192</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>200</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>272</b>

# Liste des abréviations

**ANF:** Atrial Natriuretic Factor  
**ATP:** Adénosine Tri-Phosphate  
**CLSM:** Confocal Laser Scanning Microscopy  
**CTK:** Cytosolic Tyrosine Kinase  
**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor  
**ePK:** Eukaryotic Protein Kinase  
**ERK:** Extracellular signal-Regulated Kinase  
**EST:** Expressed Sequence Tag  
**FGFR:** Fibroblast Growth Factor Receptor  
**FRET:** Fluorescence Resonance Energy Transfer  
**GABA:** Gamma Amino Butyric Acid  
**GPCR:** G Protein Coupled Receptor  
**GVBD:** Germinal Vesicle Breakdown  
**IGF1-R:** Insulin Growth Factor-1 Receptor  
**IR:** Insulin Receptor  
**JNK:** c-jun N-terminal Kinase  
**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**mGluR:** Metabotropic Glutamate Receptor  
**MKK4/7:** Mitogen-activated protein Kinase Kinase 4/7  
**mTOR:** Mammalian Target Of Rapamycin  
**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé  
**PBP:** Periplasmic Binding Protein  
**PG:** Progestérone  
**PH:** Pleckstrin Homology  
**PI3K:** Phosphatidyl Inositol-3-phosphate Kinase  
**PP:** Protéine Phosphatase  
**PTK:** Protéine Tyrosine Kinase  
**PZQ:** Praziquantel  
**RTK:** Receptor Tyrosine Kinase  
**SAPK:** Stress-Activated Protein Kinase  
**SH2:** Src Homology-2  
**SH3:** Src Homology-3  
**SHB:** Src Homology Containing adaptor B  
**S6K:** Ribosomal S6 protein Kinase  
**TK:** Tyrosine Kinase  
**TM:** Transmembrane domain  
**VEGFR:** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
**VFTM:** Venus FlyTrap Module  
**VKR:** Venus Kinase Receptor

# Cadre du travail

## Laboratoire d'accueil :

J'ai effectué ma thèse au sein du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), dirigé par le Dr Camille Locht, et situé sur le campus de l'Institut Pasteur de Lille. Ce centre héberge 15 équipes, parmi laquelle l'équipe 2 dirigée par le Dr Raymond Pierce et intitulée Biologie moléculaire du développement et de la reproduction du Schistosome, dans laquelle j'ai évolué. L'objectif du groupe est d'amener une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires liés au développement et à la reproduction du parasite, dans le but de développer de nouveaux outils pour le traitement de la schistosomiase. Deux mécanismes fondamentaux sont particulièrement étudiés: la signalisation kinase et le contrôle épigénétique de l'expression des gènes.

Mon travail de thèse a été encadré par le Dr Colette Dissous, qui s'intéresse au rôle des protéines kinases dans les mécanismes moléculaires liés à la fécondité du parasite. Le projet que j'ai développé concerne l'étude d'une famille de Récepteurs Tyrosine Kinase découverte au laboratoire, appelés Venus Kinase Receptors (VKR), et dont une fonction dans la reproduction est suggérée.

## Collaborations :

- **Dr Katia Cailliau-Maggio** et **Pr Jean-François Bodart**, laboratoire de régulation des signaux de division, EA 4479, IFR 147, Université des sciences et technologies de Lille Villeneuve d'Ascq, France.

*Domaines d'expertise : Signalisation Tyrosine Kinase, Régulation du cycle cellulaire, modèle ovocyte de Xénope.*

- **Pr Christoph G. Grevelding**, Institut de Parasitologie, Université Justus-Liebig, 35392 Giessen, Allemagne.

*Domaines d'expertise : Signalisation Tyrosine Kinase, mécanismes moléculaires de la reproduction, modèle Schistosoma mansoni*

- **Dr Jérôme Vicogne**, UMR8161 CNRS, Institut de Biologie de Lille, 1, rue du Pr. Calmette BP 467, 59021, Lille Cedex, France.

*Domaines d'expertise : Signalisation Tyrosine Kinase, interactions protéine-protéine, Cancer, modèle Schistosoma mansoni*

## Financements :

Mon travail de thèse a été financé par le Ministère de la Recherche et de la Technologie.



# Introduction

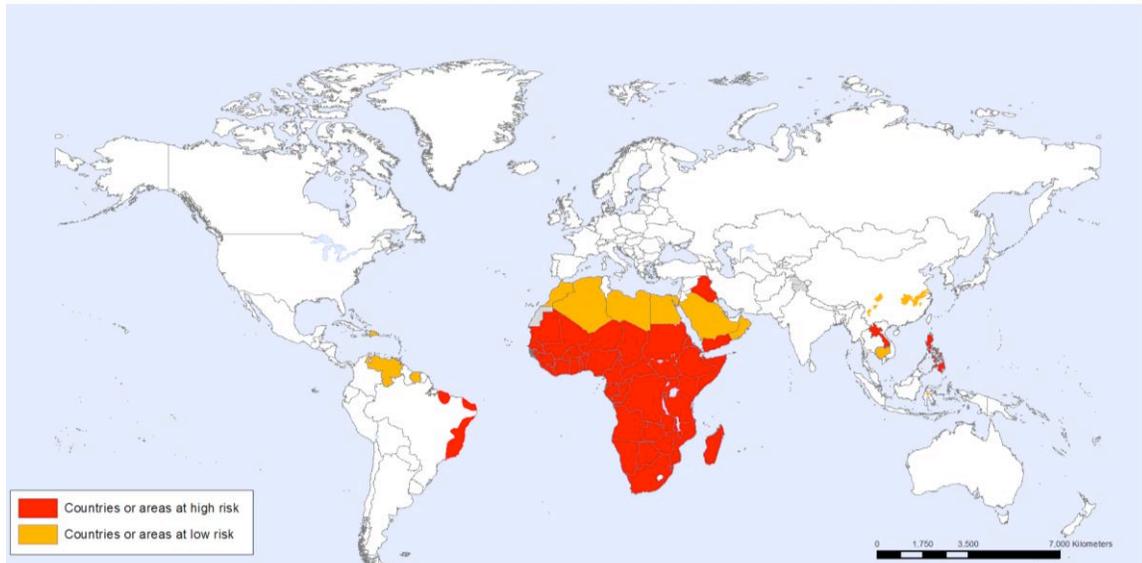


# 1. Schistosome et schistosomiase

Avec près de 250 millions de personnes infectées et environ 200 000 décès par an, la schistosomiase (ou bilharziose) est la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme. Elle fait partie d'une liste de pathologies appelées maladies tropicales négligées, qui représentent un frein considérable au développement socio-économique et humain dans les pays et communautés à faible niveau de développement. C'est une maladie sanitaire, qui sévit dans les communautés n'ayant pas accès à l'eau potable et/ou à un système d'assainissement satisfaisant. La transmission de la maladie s'effectue donc par contact avec les eaux infectées. Dans ces zones, les activités d'agriculture, de pêche, mais également domestiques et de loisirs constituent un risque de contamination important. Dans le cadre de la lutte contre les maladies tropicales négligées, l'Organisation Mondiale de la Santé a mis en place depuis plusieurs décennies une série de plans visant à réduire leur impact dans les pays pauvres. La schistosomiase fait ainsi partie d'une liste de 20 maladies pour lesquelles un plan de lutte a été érigé. Il consiste principalement en l'établissement de campagnes de chimioprophylaxie, de traitements et de prévention. Grâce à l'OMS et son action coordinatrice, plus de 28 millions de personnes ont été traitées pour la schistosomiase en 2011. La zone de prévalence de la schistosomiase couvre la majeure partie des zones tropicales et subtropicales, touchant principalement l'Afrique et le Moyen-Orient, mais également dans une moindre mesure, l'Asie du Sud-Est et certaines régions d'Amérique du Sud (Fig 1). Les zones à plus forts risques se concentrent essentiellement en Afrique, où l'on recense près de 90% des cas de schistosomiasis. Certaines régions d'Afrique tropicale sont d'ailleurs touchées de manière extrêmement critique, puisque les taux de prévalence peuvent être localement supérieurs à 50%.

La schistosomiase est une maladie que l'on peut traiter. À l'heure actuelle une seule drogue, le praziquantel, est utilisée en masse pour tuer le parasite et limiter les effets de la pathologie. Cependant en dépit de sa relative efficacité, la drogue possède un certain nombre d'inconvénients qui poussent les chercheurs à la découverte de nouvelles drogues et cibles thérapeutiques. Par ailleurs, un large pan de la recherche sur la schistosomiase s'attelle au développement d'un vaccin qui soulagerait considérablement l'impact de la maladie sur les enfants. Du fait de leur importance en termes économique,

médical et vétérinaire, les agents responsables de la pathologie, des vers plats du genre *Schistosoma* sont donc particulièrement étudiés.



**Figure 1 : Carte des pays et zones présentant un risque pour la schistosomiase en 2011** (d'après l'Organisation Mondiale de la Santé).

### **1.1. Taxonomie**

Les espèces du genre *Schistosoma* dont fait partie notre modèle d'étude *S. mansoni* sont des plathelminthes trématodes. Leur classification est la suivante :

Royaume : **Animalia**

Sous-Royaume : **Eumetazoa**

Superphylum : **Lophotrochozoa**

Phylum : **Platyhelminthes**

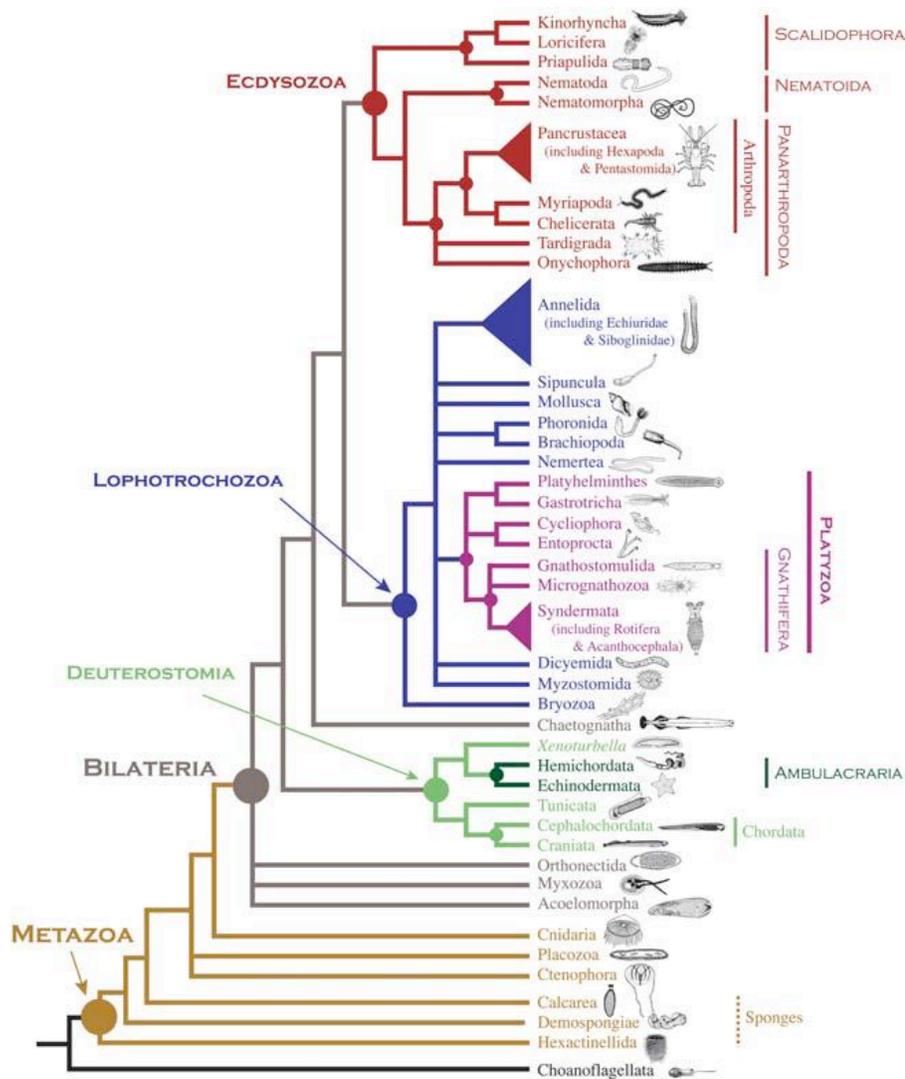
Classe : **Trematoda**

Sous-Classe : **Digenea**

Famille : **Schistosomatidae**

Genre : **Schistosoma**

La systématique étant un domaine de recherche très dynamique, la phylogénie est sans cesse construite et reconstruite. Ceci est particulièrement vrai pour le phylum des plathelminthes: en effet les premières études systématiques ont considéré les plathelminthes comme des organismes particuliers, situés à la base de l'embranchement des Bilateria. Basées sur des critères morphologiques et embryologiques erronés, elles ont donné lieu à de nombreuses imprécisions.



**Figure 2 : Classification phylogénétique des métazoaires**, d'après Halanyc (2004). Au sein de cette classification, les plathelminthes se situent dans le groupe des platyzoaires aux côtés des gnathifères. Les platyzoaires sont eux-mêmes situés au sein des lophotrochozoaires, un super-phylum regroupant l'ensemble des organismes protostomes dont le développement ne fait pas intervenir de mue cuticulaire.

L'avènement de la phylogénie moléculaire a apporté beaucoup dans le domaine de la systématique, et Halanych en 2004 a proposé une nouvelle version intégrative de la phylogénie des animaux, surtout basée sur la phylogénie moléculaire et notamment les séquences de l'ARN 18S, de la SSU (nuclear Small ribosomal SubUnit), de la LSU (Large ribosomal SubUnit) et sur la conservation et l'organisation des gènes Hox (Halanych, 2004).

Dans cette nouvelle configuration, les plathelminthes sont groupés au sein des lophotrochozoaires, dans un groupe appelé platyzoaires, regroupant comme son nom l'indique les vers plats et animaux apparentés comme les acantognathes (Fig 2).

### **- Qu'est ce qu'un plathelminthe ?**

Le phylum des plathelminthes est organisé en quatre classes, regroupant des organismes libres et des parasites (Fig 3).

Les plathelminthes libres appartiennent tous à la classe des turbellariés. On en dénombre environ 4500 espèces. L'une des particularités de ces organismes repose sur la plasticité de leur reproduction asexuée, qui peut se réaliser soit par régénération soit par scissiparité. Deux organismes modèles, *Schmidtea mediterranea* et *Dugesia japonica* sont d'ailleurs très étudiés pour comprendre les mécanismes moléculaires de la régénération, qui font intervenir des cellules souches somatiques appelées néoblastes (Rink, 2013).

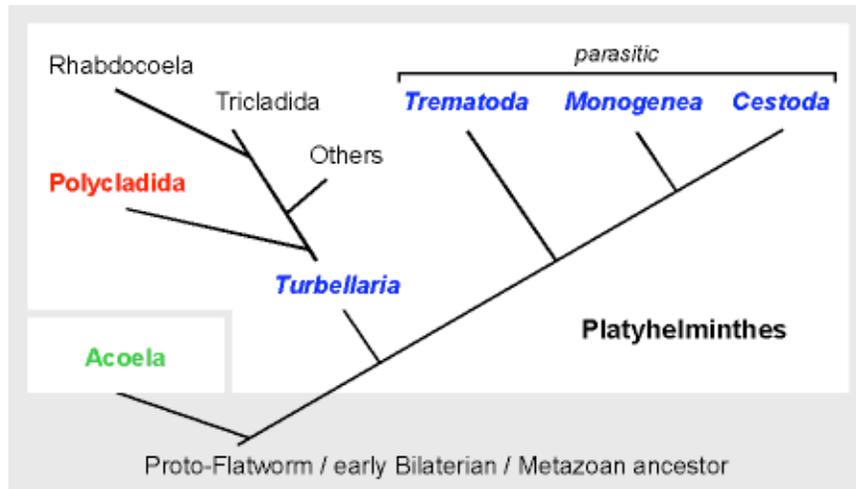
Les classes des monogènes, cestodes et trématodes regroupent exclusivement des organismes parasites.

- Les monogènes regroupent des organismes ectoparasites à cycle de vie direct et hôte unique. On estime le nombre de représentants de cette classe à 25000 environ.

- Les cestodes sont des endoparasites. À l'âge adulte ils vivent pour la plupart dans le tube digestif de leur hôte vertébré, alors que les juvéniles colonisent plutôt les tissus. Les genres les plus étudiés sont *Taenia*, *Echinococcus* et *Hymenolepis*, en raison de leur prévalence, de la largeur de leurs spectres d'hôtes (humains et bétail), mais également en raison des complications que leurs infections entraînent, comme le kyste hydatique ou la cysticercose. À l'heure actuelle, on connaît un peu plus de 1000 espèces de cestodes.

- La classe des trématodes est la plus étudiée. Le nombre d'espèces de trématodes est estimé entre 18000 et 24000 selon les études. À noter que dans la base de données NCBI, 2195 entrées sont recensées. Parmi les trématodes figurent de

nombreuses espèces parasites d'intérêt médical et/ou vétérinaire dont notre parasite d'intérêt au laboratoire, *Schistosoma mansoni*.

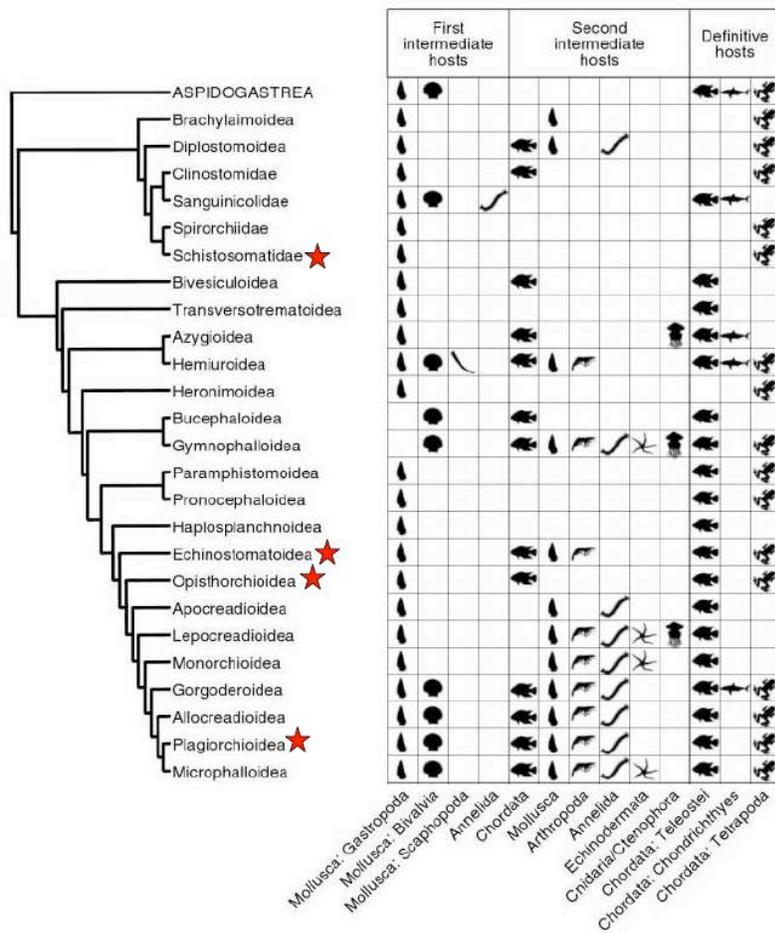


**Figure 3 : Arbre phylogénétique des Plathelminthes:** l'embranchement des plathelminthes est divisé selon les quatre classes suivantes: Turbellariés (organismes libres), Trématodes, Cestodes et Monogènes (parasites). Trématodes et Cestodes sont intensivement étudiés du fait de leurs impacts médicaux et économiques.

### **- Qu'est ce qu'un trématode ?**

La classe des trématodes est divisée en deux sous-classes : les Apidogastrea et les Digenea. Tous les trématodes d'intérêt économique ou médical appartiennent au groupe des Digenea (*i.e.* digénétique). Tous les membres de ce groupe possèdent obligatoirement un cycle de vie à deux générations, incluant une phase de multiplication asexuée et une phase de multiplication sexuée.

Les trématodes peuvent avoir des cycles de vie plus ou moins complexes, à deux ou plusieurs hôtes (Fig 4). Les espèces infectées sont d'ailleurs très diverses selon les parasites. À titre d'exemple, les Aspidogastrea possèdent un cycle à deux hôtes, un hôte intermédiaire de type mollusque, et un hôte définitif pouvant être un poisson ou une tortue. Les Echinostomatidae possèdent un cycle de vie plus complexe, nécessitant deux hôtes intermédiaires et un hôte définitif. Les espèces appartenant à la famille des Schistosomatidae telles que *S. mansoni* possèdent un cycle à deux hôtes, un intermédiaire de type mollusque gastéropode, et un hôte vertébré tétrapode.



**Figure 4 : Classification phylogénétique des familles de trématodes et de leurs hôtes.** Les étoiles rouges représentent les familles possédant des représentants capables d’infecter l’homme (d’après Littlewood, 2006)

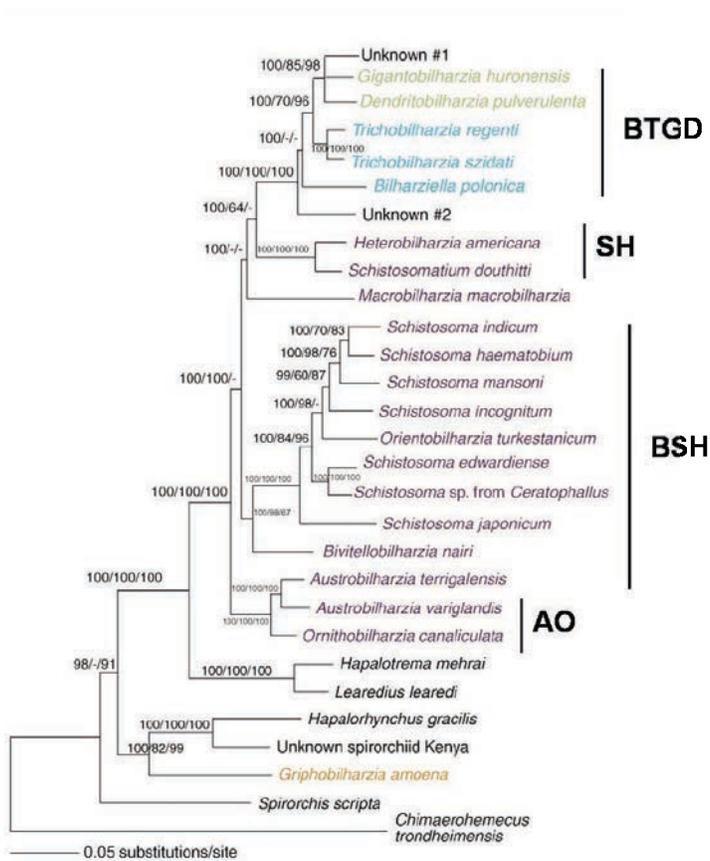
Cette hétérogénéité des cycles de vie est accentuée par une hétérogénéité des spectres d’hôtes (Fig 4). En effet, si l’hôte définitif est nécessairement un chordé, les hôtes intermédiaires peuvent être d’origines très variées: mollusques, annélides, arthropodes, cnidaires, échinodermes également voire des chordés.

En ce qui concerne les trématodes capables d’infecter l’homme, on peut les regrouper en quatre familles, selon les pathologies qu’ils génèrent :

- Les distomatoses hépato-biliaires: *Fasciola*, *Dicrocoelium*, *Clonorchis* et *Opisthorchis*
- Les distomatoses intestinales: *Fasciolopsis*, *Echinostoma* ou *Metagonimus*
- les distomatoses pulmonaires, toutes liées à des espèces du genre *Paragonimus*
- les bilharzioses ou schistosomiasés, à *Schistosoma* principalement.

## - La famille des Schistosomatidae :

La famille des Schistosomatidae regroupe des parasites de mammifères et d'oiseaux. Ses représentants figurent dans l'arbre phylogénétique présenté dans la figure 5. La dernière mise à jour de la famille des Schistosomatidae a été réalisée par Loker et Brant en 2006. Dans cette étude, les auteurs refondent l'ancienne classification en utilisant les séquences des ARN 18S et 28S, ainsi que l'ADN mitochondrial encodant Cox1.



**Figure 5 : Arbre phylogénétique des Schistosomatidae**, construit sur la base des ARN18S, 28S et de l'ADN mitochondrial encodant Cox1 (Loker and Brant, 2006). Les espèces appartenant aux taxons Gigantobilharzinae, Bilharziellinae, Schistosomatinae et Griphobilharzinae sont indiqués en vert, bleu, violet et orange, respectivement.

Ces données permettent de mettre en évidence plusieurs aspects auparavant négligés :

- *Griphobilharzia amoena*, décrit comme le schistosome du crocodile, n'appartient en réalité pas à la famille des Schistosomatidae. Celui-ci se groupe à l'intérieur du groupe sœur des schistosomes, les spirorchiires, strictement parasites d'ectothermes.

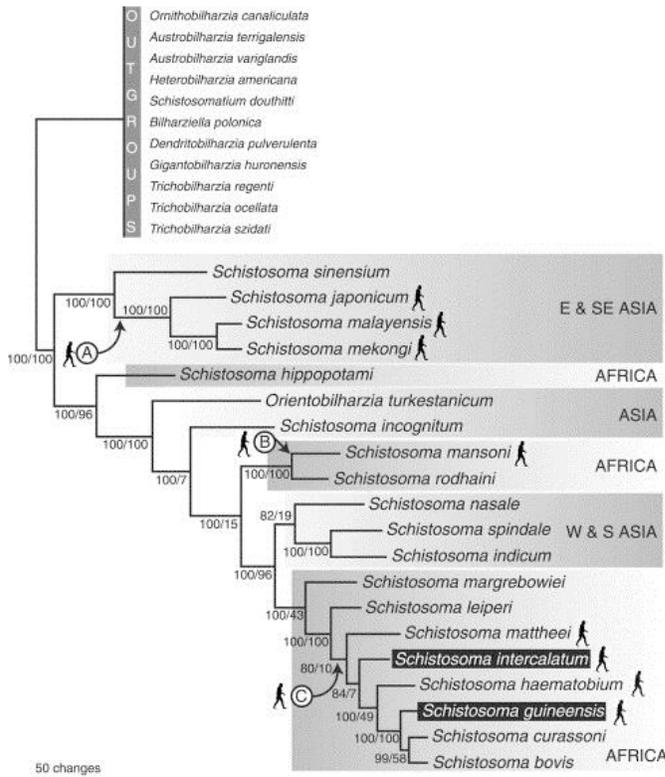
- Il existe quatre classes majeures de Schistosomes : AO (*Austrobilharzia* et *Ornithobilharzia*), BSO (*Bivitellobilharzia*, *Schistosoma* et *Orientobilharzia*), SH (*Schistosomatium* et *Heterobilharzia*) et BTGD (*Bilharziella*, *Trichobilharzia*, *Gigantobilharzia* et *Dendritobilharzia*). Ces classes nouvellement définies groupent

différemment les espèces de schistosomes comparé à l'ancienne classification basée sur la taxonomie traditionnelle (voir Fig 5).

- Le genre *Schistosoma* est polyphylétique, l'espèce *Orientobilharzia turkestanicum* s'y rattachant, en relation avec *S. intercalatum* (Webster *et al.*, 2006).

### - Qu'est ce qu'un schistosome ?

Le genre *Schistosoma* comporte à l'heure actuelle 21 membres, qui infectent exclusivement les mammifères : Homme, Primates, Rongeurs, Carnivores et Ongulés. Les schistosomes du genre *Schistosoma* possèdent de fait un réservoir naturel conséquent (Fig 6). Parmi ces 21 espèces de *Schistosoma*, 6 sont capables d'infecter l'homme de façon naturelle. Il s'agit de *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. guineensis* et *S. mekongi*. Deux autres espèces ont été retrouvées chez l'homme dans le cas de contaminations accidentelles ou d'infections hybrides. Il s'agit de *S. malayensis* et *S. mattheei*. Basé sur les dernières reconstructions phylogénétiques ainsi que sur les distributions géographiques des espèces, il est avancé que trois évènements évolutifs indépendants ont permis aux schistosomes d'utiliser l'homme comme hôte définitif (Fig 6).



**Figure 6 : Analyse phylogénétique des espèces genre *Schistosoma***, construit en utilisant les séquences ADN des petites et grandes sous-unités ribosomiques et de l'ADN mitochondrial codant Cox1. Les trois évènements évolutifs à l'origine de la capacité d'infection de l'homme sont indiqués A, B et C (Webster *et al.*, 2006).

Il existe naturellement des spécificités d'hôte selon les espèces du genre *Schistosoma*. A titre d'exemple, les hôtes intermédiaires et définitifs pour les espèces infectant l'homme sont listés en figure 7. Ainsi par exemple, les espèces de Schistosome retrouvées exclusivement en Afrique et au Moyen-Orient, *S. haematobium*, *S. guineensis* et *S. intercalatum* effectuent leur reproduction asexuée dans des planorbes du genre *Bulinus*. A l'inverse, *S. mansoni* a besoin d'un mollusque du genre *Biomphalaria*. En ce qui concerne les hôtes définitifs, le réservoir peut être très restreint avec une anthropophilie marquée (*S. haematobium*), ou plus étendue avec des capacités d'infection d'une variété importante de mammifères (*S. japonicum*).

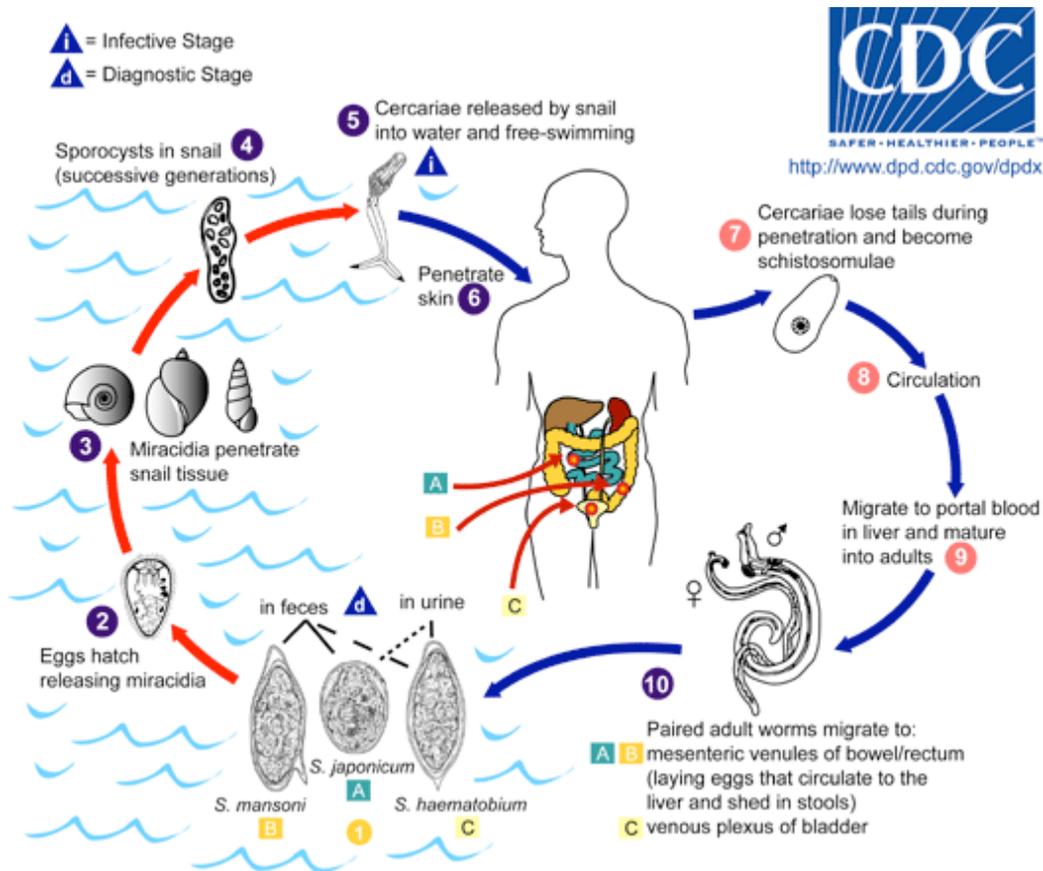
<b>Espèce</b>	<b>Hôte intermédiaire</b>	<b>Hôte définitif</b>
<i>S. guineensis</i>	<i>Bulinus</i>	Primates
<i>S. haematobium</i>	<i>Bulinus</i>	Primates
<i>S. intercalatum</i>	<i>Bulinus</i>	Primates
<i>S. japonicum</i>	<i>Oncomelania</i>	Ongulés, Primates, Carnivores, Rongeurs
<i>S. mansoni</i>	<i>Biomphalaria</i>	Primates, Carnivores
<i>S. mekongi</i>	<i>Tricola</i>	Primates, Carnivores

**Figure 7 : liste des espèces de Schistosomes capables d'infecter l'homme.**

## **1.2. Cycle de vie du parasite**

Le schistosome est un trématode digénétique. Son cycle de vie nécessite donc la présence de deux hôtes à l'intérieur desquels alternent reproductions sexuée et asexuée (Fig 8). Le schistosome va évoluer sous six formes morphologiquement distinctes : œuf, miracidium, sporocyste, cercaire, schistosomule et adulte. De manière très schématique, le stade miracidium représente le stade infectieux pour l'hôte intermédiaire. Une fois dans le mollusque, il se transforme en sporocyste qui va subir d'intenses modifications morphologiques et biochimiques, et entraîner la production de cercaires par reproduction asexuée. Ces mêmes cercaires représentent le stade infectieux pour l'homme, et vont pénétrer activement dans leur hôte en y pénétrant leur peau. Une fois à l'intérieur de leur hôte, les cercaires se transforment en schistosomules, passent dans la circulation sanguine pour rejoindre les poumons puis le foie, et subissent leur transformation en vers adultes. Ces vers adultes s'installent dans les plexus mésentérique ou vésical et pondent un nombre important d'œufs qui sont alors relargués dans les selles ou piégés dans les tissus de l'hôte, essentiellement dans le foie et la rate. Lorsqu'ils atteignent le milieu

extérieur, les œufs, qui sont issus de la reproduction sexuée, éclosent et libèrent des miracidiums, qui peuvent alors poursuivre le cycle.

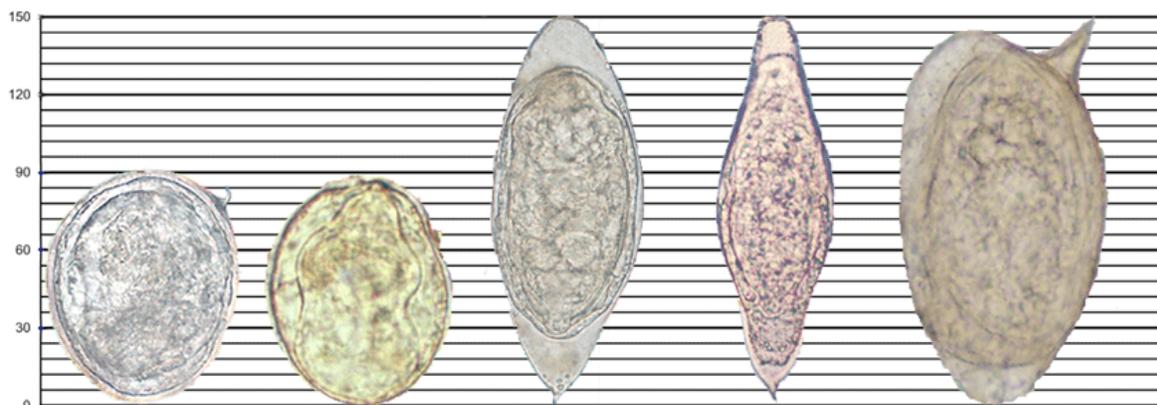


**Figure 8: cycle de vie de commun à *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. haematobium*** (D'après CDC, Centers for Disease Control and Prevention). Le stade œuf, responsable de la pathologie mais également celui qui est diagnostiqué (d) est numéroté n°1. Le stade cercaire, qui est le stade infectieux (i) pour l'homme, est numéroté en n°5.

### 1.2.1 Le stade œuf

Les œufs sont le résultat de la reproduction sexuée du schistosome. À l'intérieur de celui-ci se déroule l'embryogenèse, qui va mener à la formation du miracidium. On parle d'œuf au sens zoologique du terme, l'embryon étant entouré d'une coquille protéique. Les caractéristiques morphologiques des œufs sont différentes selon les espèces de *Schistosoma*. On va ainsi pouvoir distinguer les œufs de chaque espèce selon leur taille et la position de leurs éperons (Fig 9). Dans le cas de *S. mansoni*, les œufs sont grands, larges (140x60µm), et possèdent un éperon latéral. C'est cette grande diversité

dans la morphologie des œufs qui permet de déterminer l'espèce mise en cause lors d'infections, par un examen coprologique (voir paragraphe Diagnostic).



**Figure 9: Taille et structure d'œufs de schistosome**, en µm. De gauche à droite, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* et *S. mansoni* (D'après CDC, Centers for Disease Control and Prevention)

L'œuf se forme dans l'ootype de la femelle. L'ovocyte fécondé migre le long de l'oviducte, pour rejoindre le vitelloducte, où 35 à 40 cellules vitellines vont l'entourer. L'ensemble migre ensuite vers l'ootype. Les cellules assurent la formation de la coquille en relarguant le contenu de leurs granules de sécrétion.

Parmi les protéines contenues dans les granules figurent les précurseurs des protéines p14 et p48, spécifiquement exprimées par les cellules vitellines. À elle seule, la p14 représente 70% de la composition de la coquille, et 10% des ARNm totaux exprimés chez la femelle. Étonnamment, la coquille est également composée de protéines non structurales telles que des chaperonnes, des protéines du métabolisme ou encore des constituants du cytosquelette (deWalick *et al.*, 2011).

La coquille se forme majoritairement par réticulation des protéines, par un processus appelé « quinone tanning », consistant à convertir les résidus tyrosine en quinones, lesquels vont réagir avec des substitués nucléophiles présents sur des acides aminés tels que la lysine ou l'histidine. Cette réaction est liée à la présence d'enzymes appelées tyrosinases. Chez *S. japonicum*, l'invalidation par ARN interférence simultanée de SjTYR1 et SjTYR2 induit une diminution du pourcentage d'œufs possédant une morphologie normale, c'est-à-dire une coquille ronde (He *et al.*, 2012). Des expériences de microscopie électronique ont mis en évidence une structure présentant épines et pores, facilitant l'adhésion à l'endothélium vasculaire de l'hôte.

L'embryogenèse dure environ 6 jours. L'éclosion de l'œuf et la libération du miracidium ont lieu après la ponte et lors du contact avec l'eau douce. Les mécanismes régissant l'éclosion sont encore mal connus, mais on sait néanmoins que deux facteurs interviennent :

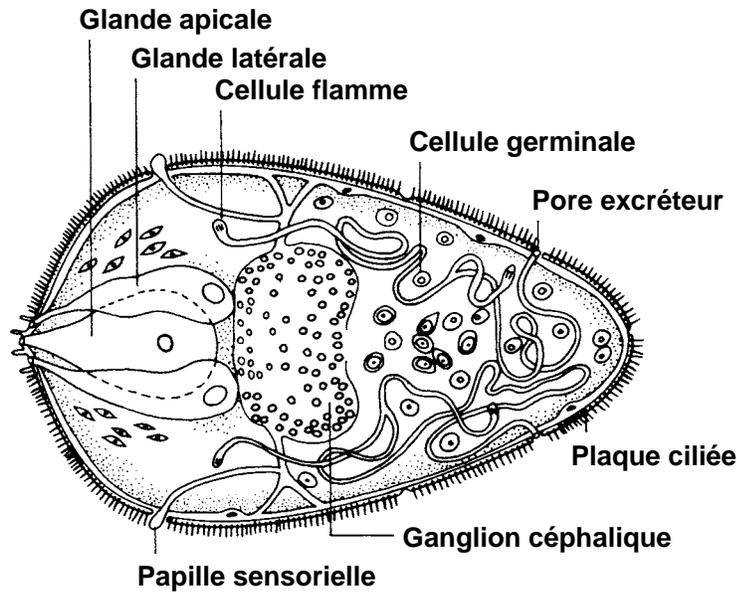
- Un choc hypo osmotique qui va activer les mouvements ciliaires et entraîner des contractions musculaires.
- L'activité protéasique de deux Leucine Aminopeptidases (caractérisées chez *S. mansoni*). On sait qu'elles sont très exprimées au stade œuf et la diminution de leur expression par ARN interférence entraîne une baisse de plus de 80% du nombre d'œufs capables d'éclore (Rinaldi *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Le stade miracidium

Le miracidium est une large nageuse ciliée en forme de poire. Elle mesure entre 150 et 180µm de long pour 70 à 80µm de large environ (Fig 10).

La surface externe du miracidium est composée de plaques ciliées qui lui permettent de nager. Sa vitesse de nage est de 2mm/s, sur une distance 5 mètres maximum. Sa durée d'infectivité est estimée à 6h. Incapable de se nourrir du fait de l'aspect rudimentaire de son tube digestif, il puise son énergie dans ses réserves de glycogène.

Les miracidiums de *S. mansoni* et *S. japonicum* possèdent un chimiotactisme et un géotactisme positif. Ceci leur permet de se mouvoir jusqu'à la surface de l'eau, là où vivent les mollusques du genre *Oncomelania* et *Biomphalaria*. À l'inverse, les miracidiums de *S. haematobium* possèdent un phototropisme négatif ce qui va les guider vers le fond et les coins ombragés, là où vivent leurs hôtes, les mollusques du genre *Bulinus*. Le miracidium va nager jusqu'à son hôte, puis s'y fixer, par son terebratorium, au niveau du pied dans le cas de *S. mansoni*. La pénétration se fait alors de manière active, aidée à la fois par les mouvements de la larve, mais également par le largage du contenu des cellules sécrétoires. Une fois la pénétration accomplie, le miracidium perd ses plaques ciliées et se transforme en sporocyste, le stade à l'intérieur duquel va se produire la reproduction asexuée.



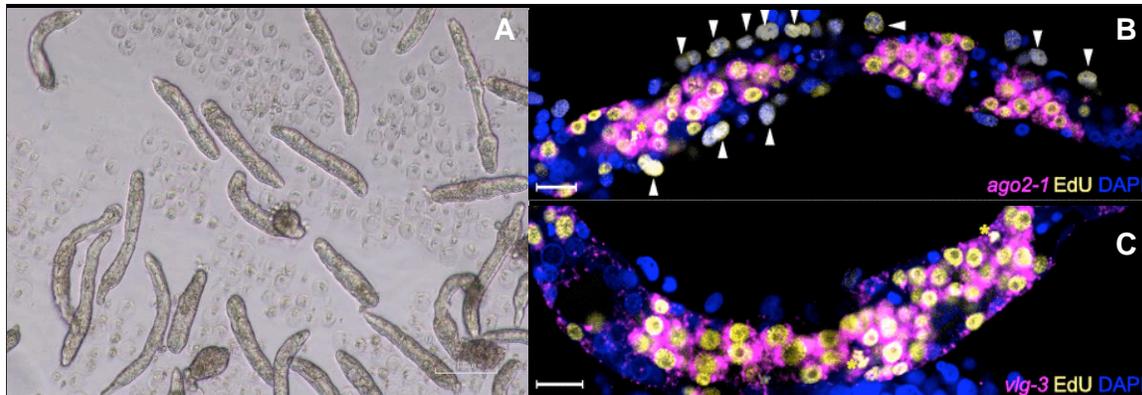
**Figure 10: Structure d'un miracidium de *Schistosoma mansoni*.** Des plaques ciliées sont présentes sur toute la surface de son tégument. Le système glandulaire est très développé, et débouche sur un organe conique appelé terebratorium situé à l'apex de l'organisme. Les cellules germinales, à l'origine de la reproduction axesuée du parasite sont disséminées dans tout l'organisme.

### 1.2.3 Le stade sporocyste

Chez *S. mansoni*, le miracidium pénètre entièrement dans le mollusque. Les plaques ciliées sont perdues deux heures après la pénétration et un nouveau tégument est synthétisé. Le sporocyste va alors s'allonger pour prendre la forme d'un sac. Les cellules germinales vont alors proliférer et le sporocyste bourgeonner pour donner naissance à une ou plusieurs générations de sporocystes secondaires (Fig 11). Ces cellules germinales expriment des marqueurs de cellules souches tels que des protéines nanos, argonaute et vasa/PL10, et possèdent des propriétés de prolifération importantes (Wang *et al.*, 2013). Ainsi, le nombre moyen de sporocystes secondaires produits par sporocyste primaire se situe entre 9 et 34, pour une moyenne de 22 sporocystes filles environ, après 12 jours d'infection.

Les sporocystes secondaires possèdent une extrémité antérieure très mobile ainsi que des cellules musculaires, qui vont leur permettre de migrer vers les organes internes du mollusque. Dans le cas de *S. mansoni*, l'hépatopancréas est le site de migration de prédilection. À l'intérieur des sporocystes secondaires, des massifs embryonnaires vont se développer et se différencier en furcocercaires, qui représentent le stade infectant pour l'hôte définitif. Celles-ci vont s'échapper du sporocyste secondaire en perforant la

membrane, puis sortir du mollusque en lysant les tissus. L'émission des cercaires est régie par la lumière et la chaleur, faisant coïncider les périodes d'émission avec celles où la probabilité de trouver un hôte est la plus forte, c'est-à-dire quand la fréquentation des points d'eaux est la plus élevée (abreuvement du bétail, travaux domestiques...). Après émission, les cercaires se retrouvent dans l'eau et nagent à la recherche de leur hôte définitif.



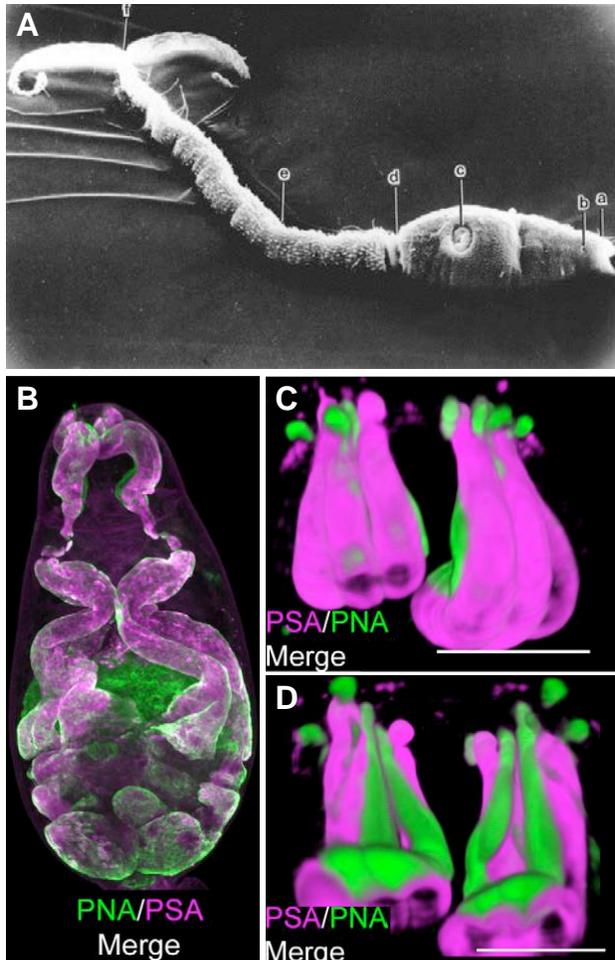
**Figure 11: Le stade sporocyste** : Structure d'un sporocyste de 48h (A). Les marqueurs de cellules souches *ago2-1* (B) et *vlg-3* (C) sont exprimés dans les cellules germinales en prolifération (échelle : 20µm). D'après Wang *et al.*, 2013.

### 1.2.4 Le stade cercaire

Les cercaires, également appelées furcocercaires chez le schistosome, représentent le stade infectant l'hôte définitif. Chez *S. mansoni*, les larves sont constituées d'un corps d'environ 125µm de long, qui seul pénètre à l'intérieur de l'hôte, et d'une queue bifide d'environ 200µm (Fig 12.A). Elles possèdent un tégument syncytial recouvert d'un glycocalyx riche en sucres, qui joue un rôle protecteur contre la faible pression osmotique de l'eau dans laquelle elles nagent. Le corps de la cercaire est occupé aux deux tiers par cinq paires de glandes de pénétration, dites pré- et post-acétabulaires, plus une glande unicellulaire appelée glande céphalique (Fig 12 B,C,D). Le rôle exact de ces glandes est à l'heure actuelle encore flou, mais plusieurs études ont mis en évidence l'implication de protéines sécrétées dans l'adhésion et la pénétration (Collins JJ 3rd *et al.*, 2011).

De manière générale, les cercaires nagent vers leur hôte en effectuant de rapides mouvements vibratiles. Selon l'espèce de schistosome considérée, on va retrouver les

cercaires soit dans la masse d'eau (*S. mansoni*, *S. haematobium*), soit à la surface, du fait de leur phototropisme positif (*S. japonicum*, *T. ocellata*).



### Figure 12 : Le stade cercaire

(A) Structure d'une cercaire de *S. mansoni* observée au microscope électronique. a: ventouse orale, b: bouche, c: ventouse ventrale, d: jonction tête-queue, e: queue, f: bifurcation de la queue bifide (Dorsey *et al.*, 2002).

(B, C, D) Imagerie confocale mettant en évidence le marquage des glandes pré et post-acétabulaires par les lectines PSA (*Pisum sativum* lectin) et PNA (Peanut lectin agglutinin). D'après Collins *et al.*, 2011.

Les larves approchent de la peau de l'hôte par chimiotactisme. Parmi les chimioattractants mis en évidence figurent les acides gras (possédant des chaînes de 10 à 14 atomes de carbone), la L-arginine ainsi que des petits peptides possédant une L-arginine terminale (Haeberlein et Haas, 2008). La pénétration de la cercaire se fait de manière active, facilitée par les sécrétions des glandes acétabulaires, qui sont capables d'hydrolyser les composants majeurs de l'épiderme et du derme tels que la kératine, le collagène, la laminine, ou encore la fibronectine (Knudsen *et al.*, 2005). Une fois à l'intérieur de l'hôte, la cercaire va subir un certain nombre de changements morphologiques et biochimiques pour se différencier en schistosomule.

Cette transition cercaire-schistosomule prend environ trois heures, et peut être divisée en six étapes :

- 1- Perte de la queue
- 2- Perte du glycocalyx et formation de microvillosités à la surface du tégument.
- 3- Formation d'un tégument heptalaminé
- 4- Déversement puis rétractation des glandes pré-acétabulaires
- 5- Passage d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie
- 6- Acquisition des antigènes de l'hôte et mise en place des mécanismes de défense

Une fois ces étapes achevées on parle alors de schistosomule, qui représente le stade juvénile et migratoire précédant le stade de maturité sexuelle, le stade adulte.

### **1.2.5 Le stade schistosomule**

Trois heures après la pénétration de la cercaire, un schistosomule se forme. Selon les espèces considérées, le schistosomule va rester plus ou moins longtemps dans le derme. Ainsi, si 90% des parasites de *S. mansoni* et *S. haematobium* restent dans l'épiderme 24h post-infection, les parasites de *S. japonicum* ont pour la plupart déjà rejoint le derme. Les schistosomules s'échappent en pénétrant les capillaires dermiques, pour ensuite se mouvoir dans la circulation veineuse afin d'atteindre les poumons *via* l'artère pulmonaire et le cœur droit. Là encore, les cinétiques sont différentes selon l'espèce de schistosome, avec un pic d'infection dans les poumons à J3 pour *S. japonicum* et J6 pour *S. mansoni*. Une série de changements morphologiques et biochimiques vont intervenir dans les poumons, parmi lesquels une augmentation importante de la surface du parasite, qui devient alors plus long et plus fin. Cette étape d' « affinement » est nécessaire pour la bonne progression du parasite à travers les capillaires pulmonaires. Après ce passage dans les poumons, le schistosomule rejoint la circulation systémique à travers le système artériel pour atteindre le foie et le système porte. C'est à cet endroit que vont avoir lieu les principaux changements morphologiques menant à la formation de vers adultes à proprement parler. Ainsi vont progressivement se développer le système digestif, excréteur et reproducteur. C'est d'ailleurs lors de cette étape que les parasites acquièrent leur dimorphisme sexuel. À 28 jours post-infection environ, les parasites sont sexuellement matures et vont s'accoupler. On parle alors de vers adultes.

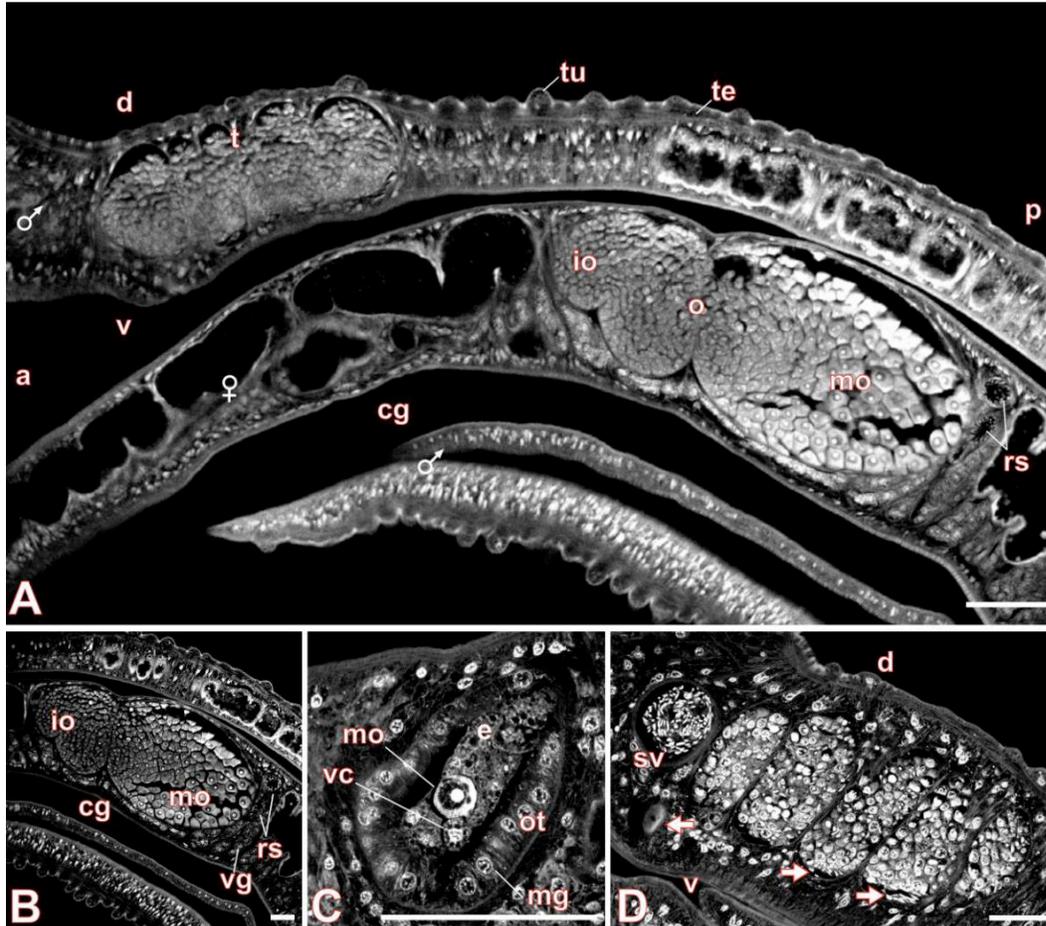
### 1.2.6 Le stade adulte

Une fois accouplés les parasites rejoignent leur micro-habitat de prédilection, à savoir les veines mésentériques pour *S. mansoni* et *S. japonicum*, et le plexus vésical pour *S. haematobium*. Le choix de ces habitats particuliers est très probablement lié au contexte reproducteur et à l'optimisation de la dissémination des œufs en vue de la propagation du cycle de vie. En effet, les plexus mésentérique et vésical sont en relation directe avec des organes excréteurs, à savoir le tube digestif et la vessie, ce qui facilite l'expulsion des œufs vers le milieu extérieur. Du fait de leur dimorphisme sexuel important, il est difficile de décrire des structures anatomiques communes à la fois au mâle et à la femelle. Les vers mâles mesurent entre 6 et 11 mm, sont trapus et recourbés, formant une gouttière appelée canal gynécophore, à l'intérieur de laquelle va venir se lover la femelle. Les vers femelles sont quant à elles plus longues, de 12 à 16 mm en moyenne, mais beaucoup plus fines. Elles sont d'une opacité plus importante, du fait de la présence d'hémozoïne dans leur tube digestif, qui est un produit de dégradation de l'hémoglobine érythrocytaire.

Le mâle de *S. mansoni* est caractérisé par la présence d'un tégument heptalaminé recouvert de tubercules. Ces tubercules sont beaucoup plus fins chez *S. japonicum*, et absents chez *S. haematobium*. Il possède également deux ventouses, une orale et une ventrale, puissantes, qui permettent l'ancrage du couple à l'endothélium vasculaire, et sa résistance au flux sanguin. En ce qui concerne leur appareil reproducteur, les mâles possèdent plusieurs testicules situés juste derrière la tête en position dorsale (8 à 9 chez *S. mansoni*) (Fig 13). Ces testicules sont reliés entre eux par un court *vas deferens* qui aboutit à une vésicule séminale, lieu de stockage des spermatozoïdes matures. L'expulsion des spermatozoïdes se fait dans la gouttière gynécophore par un cirrus, à proximité du pore génital de la femelle.

L'appareil reproducteur femelle est plus complexe, et occupe plus de 2/3 du corps (Fig 13 et 14). Il est composé d'un ovaire unique, situé dans le tiers antérieur de la femelle. L'ovogenèse suit une orientation antéro-postérieure, avec les ovocytes matures situés du côté postérieur de l'ovaire. Peu après l'ovulation, l'ovocyte remonte l'oviducte pour rejoindre une dilatation de celui-ci appelée réceptacle séminale. C'est dans ce réceptacle que se regroupent les spermatozoïdes matures en provenance du canal gynécophore,

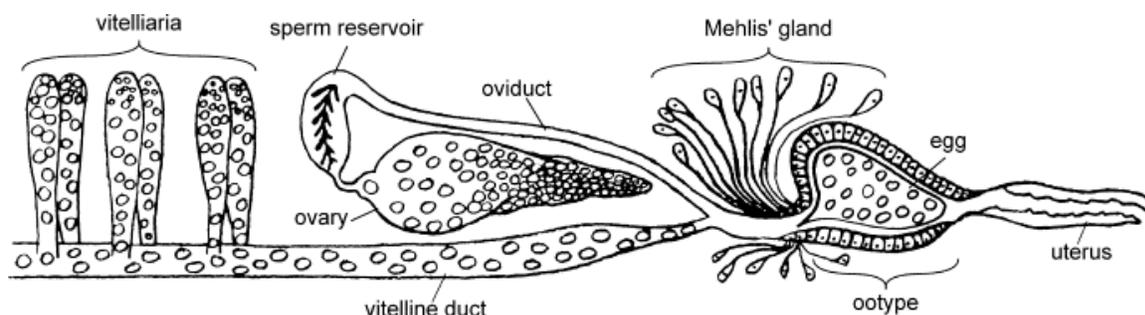
après avoir remonté le tractus génital. La fécondation a lieu dans la partie distale de l'oviducte, peu avant l'ootype. C'est dans cet organe qu'aboutissent le zygote ainsi que les cellules vitellines, et que se met en place la formation de l'œuf.



**Figure 13: Structure des appareils reproducteurs mâle et femelle de vers adultes *S. mansoni*, observée en microscopie confocale à balayage laser. Vue générale de la structure et l'orientation des organes reproducteurs chez des vers adultes accouplés (A). Ovaire d'une femelle mature (B). Ootype renfermant un œuf en formation (C). Lobes testiculaires et vésicule séminale pleine de spermatozoïdes différenciés (D). Abréviations: a: antérieur, cg: canal gynécophore, d: dorsal, e: œuf, io: ovocytes immatures, mo: ovocytes matures, mg: glande de Mehlis, o: ovaire, od: oviducte, ot: ootype, p: postérieur, rs: réceptacle séminal, sv: vésicule séminale, t: testicules, te: tégument, tu: tubercule, v: ventral, vc: cellules vitellines, vg: glande vitelline. Barre d'échelle: 60µm. (D'après Beckmann *et al.*, 2010)**

Les cellules vitellines sont issues de la glande vitelline, ou vitellarium, qui est l'organe le plus volumineux de la femelle appariée, puisqu'il occupe environ la moitié postérieure du corps. Il est composé de plusieurs follicules vitellins qui se rattachent au vitelloducte, un canal qui traverse longitudinalement le corps de la femelle pour rejoindre l'oviducte et l'ootype. Les cellules vitellines vont jouer un rôle dans la formation de l'œuf et la nutrition

de l'embryon. En effet, afin de former l'œuf, le zygote s'entoure dans l'ootype de 35 à 40 cellules vitellines extrêmement riches en gouttelettes lipidiques et vésicules de sécrétion, qui vont servir pour la formation de la coquille protéique. Les sécrétions issues des glandes de Mehlis et des cellules épithéliales cubiques de l'ootype vont également aider à ce processus (Neves *et al.*, 2005).



**Figure 14: Anatomie du système reproducteur femelle de *S. mansoni*.** (DeWalick *et al.*, 2012)

L'aspect le plus intéressant de la reproduction sexuée du schistosome concerne sa dépendance vis-à-vis de l'appariement mâle-femelle. De nombreuses études ont démontré la nécessité de l'accouplement pour la ponte et, plus encore, pour le développement des organes reproducteurs. L'accouplement induit des événements mitotiques importants, qui mènent au développement des ovaires et du vitellarium. Les stimuli induits par l'accouplement sont nécessaires pour la production d'œufs viables, mais également pour le maintien de l'état de maturité sexuelle des femelles. En effet, si une femelle appariée se sépare de son mâle, ses organes reproducteurs finiront par régresser pour revenir à un état immature (Popiel *et al.*, 1984). La nature exacte des signaux à l'origine de la maturation sexuelle est encore très discutée. Une stimulation liée à un contact direct entre molécules tégumentaires est à l'heure actuelle la piste privilégiée, même si d'autres hypothèses faisant intervenir des hormones et/ou facteurs de croissance ont également été ébauchées. L'accouplement entraîne des effets transcriptionnels sur les cellules vitellines, avec principalement l'induction de l'expression des protéines p14 et p48 de la coquille de l'œuf, qui ne s'expriment pas dans les parasites immatures. Des analyses transcriptomiques comparatives entre parasites matures et immatures ont également mis en évidence de très fortes divergences dans les profils d'expression des femelles, mais également des mâles. Les gènes dont l'expression varie avec l'appariement sont principalement impliqués dans la consommation de globules rouges, la

formation de l'œuf, le trafic intracellulaire ou encore la division cellulaire (Fitzpatrick et Hoffmann, 2006).

Une fois leur système reproducteur à maturité, les femelles schistosomes vont se mettre à pondre dans des proportions gigantesques : il est communément admis qu'une femelle *S. haematobium* pond toutes les 10 minutes (150 œufs/j). La fréquence est plus forte chez *S. mansoni* avec un œuf toutes les 5 minutes (300/j) et un par minute chez *S. japonicum* (1500 œufs par jour environ). Ces œufs seront déposés par la femelle au plus près de la vessie ou du tube digestif. On estime cependant qu'environ la moitié des œufs ne franchit pas la barrière du milieu extérieur, se retrouve emportée par la circulation sanguine puis bloquée dans les organes situés à proximité, ce qui va induire la pathologie.

### **1.3. Pathologie**

#### **1.3.1 Manifestations cliniques**

Les tout premiers symptômes de l'infection par des schistosomes sont liés à la pénétration des cercaires à travers la peau de l'hôte. La lyse des cellules du derme engendre une inflammation locale qui va se manifester par une dermatite, accompagnée la plupart du temps par un rash (Fig 15.A). Elle apparaît généralement quelques heures après la pénétration des cercaires.

Ces symptômes sont similaires, quoique moins sévères à ceux rencontrés en cas de dermatite des nageurs, une pathologie cutanée entraînant des éruptions prurigineuses. Elle apparaît généralement après une baignade dans des étangs ou lacs d'eaux douces, et correspond à la pénétration de cercaires appartenant au genre *Trichobilharzia*, qui infectent généralement les oiseaux. Les cercaires, incapables de passer dans la circulation sanguine sont alors éliminées dans le derme par le système immunitaire.

#### **- La schistosomiase aiguë et la fièvre de Katayama:**

Les premières manifestations de la schistosomiase apparaissent entre 14 et 84 jours après le premier contact avec le parasite (Ross *et al.*, 2007). Les symptômes suivants, rassemblés sous le terme fièvre de Katayama, ressemblent à ceux d'une fièvre malarique : fièvre, léthargie, myalgie, toux et maux de tête. Ces symptômes sont associés à une hyperéosinophilie ( $>0,4 \times 10^9/L$ ) et des taux élevés d'aspartate transaminase et phosphatase alcaline. Le diagnostic précis d'une infection par un schistosome est souvent

difficile à mettre en évidence car la plupart des patients vont posséder à ce stade de l'infection une sérologie négative, associée à une absence d'hématurie ou d'œufs dans les selles (Doherty *et al.*, 1996).

#### **- La schistosomiase chronique:**

La schistosomiase chronique est la phase de la pathologie la plus débilante. En réalité, ce ne sont pas les vers qui sont responsables de la pathologie, mais les œufs qui se retrouvent piégés dans les tissus et induisent des réactions inflammatoires intenses (Ross *et al.*, 2002). On distingue deux grands types d'atteintes :

##### \* Les atteintes hépatiques et gastro-intestinales:

Cette atteinte est provoquée par toutes les espèces de schistosome capables d'infecter l'homme. Les œufs expulsés dans les selles traversent la barrière intestinale en provoquant une inflammation de la muqueuse, des ulcérations et des saignements. Les symptômes associés, douleurs abdominales et diarrhées, sont corrélés à l'intensité de l'infection. La schistosomiase hépatique est principalement causée par les espèces de schistosome colonisant le plexus mésentérique, en particulier *S. mansoni* et *S. japonicum*. Celle-ci comporte deux phases : la schistosomiase hépatique inflammatoire, précoce, et la fibrose hépatique, qui apparaît plus tardivement, et qui possède un tableau clinique bien plus inquiétant en terme de débilitation et de sévérité.

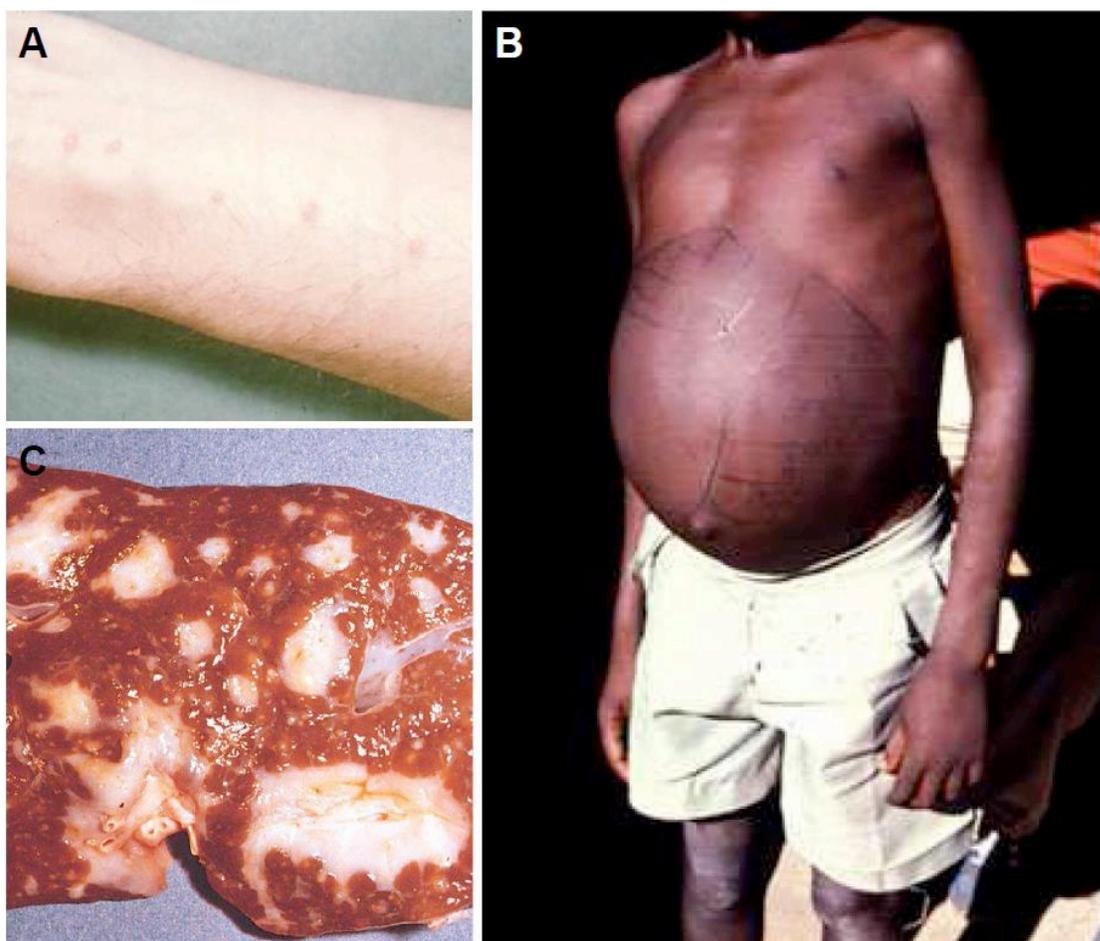
La première phase consiste en une réponse inflammatoire intense consécutive à la libération des œufs et à leur piégeage dans le foie, principalement dans la région péri-portale. Ceci est la cause majeure d'hépatomégalie chez les enfants et jeunes adultes, et est moins retrouvée chez les adultes où elle est d'ailleurs d'une intensité plus faible (Fig 15.B).

L'étape de fibrose hépatique apparaît après plusieurs années d'infection. Elle résulte de l'accumulation massive de collagène autour des œufs, à l'origine de fibroses cicatricielles (Fig 15 C). De manière progressive vont apparaître obstructions partielles de vaisseaux hépatiques, hypertension portale, splénomégalie, anémie, retard de croissance et formation de varices oesophagiennes. La complication la plus sérieuse concerne la rupture de ces varices, qui se révèle être souvent fatale.

A noter que si la fibrose est un processus lent dans le cas des infections à *S. mansoni* (5 à 15 ans), elle est beaucoup plus rapide chez *S. japonicum*, ce qui est probablement lié au nombre considérable d'œufs qu'est capable de pondre un couple de cette espèce.

\* Les atteintes de la sphère uro-génitale: la schistosomiase urinaire:

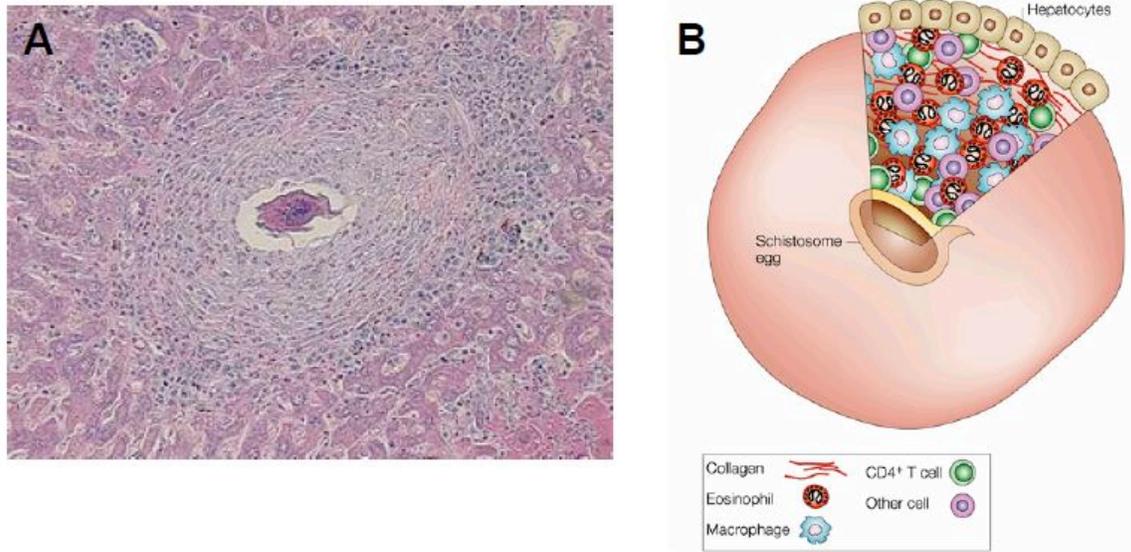
Le tropisme sélectif de *S. haematobium* pour les veines du plexus vésical fait que leurs œufs se retrouvent fréquemment coincés au niveau des parois de la vessie et des uretères. Les réactions inflammatoires et fibrotiques associées à la présence des œufs entraînent dysurie et hématurie. Les manifestations plus tardives comprennent réduction du diamètre des uretères, apparition de calcifications et atteintes rénales. De plus, la constante inflammation au niveau de la sphère uro-génitale rend propice le développement d'infections secondaires, principalement bactériennes.



**Figure 15 : Exemples d'atteintes caractéristiques aux infections à *S. mansoni*.** A) Dermatitis cutanées liées à la pénétration des cercaires à travers la peau. B) Hépatosplénomégalie typique des infections sévères aux formes intestinales de schistosome. C) Fibrose périportale hépatique dite « en tuyaux de pipe », à l'origine d'une hypertension portale sévère.

\* Le granulome bilharzien:

Une des caractéristiques centrales de la réponse immunitaire anti-schistosome consiste au développement de granulomes autour des œufs coincés dans les tissus (Fig 16). L'intensité de la pathologie est corrélée à l'importance des réponses inflammatoires de type granulomateuses.



**Figure 16 : Structure et composition du granulome bilharzien.** A) Coupe histologique de foie provenant d'un individu infecté par *S. mansoni*. On y observe un œuf au centre, entouré par des cellules immunitaires, l'ensemble formant un granulome. B) Schéma illustrant les différents types cellulaires présents au sein d'un granulome bilharzien. D'après Pearce et McDonald, 2002.

Le granulome à proprement parler est une structure fibreuse essentiellement constituée de lymphocytes T CD4+, de macrophages, d'éosinophiles et de fibroblastes, qui forment des fibrilles de collagène (Pearce et MacDonald, 2002). D'un point de vue immunologique, la formation du granulome trouve son origine dans l'activation des lymphocytes T CD4+ en réponse à la présence d'antigènes. Ceux-ci vont orchestrer la formation du granulome: en effet des cytokines de type IL-5 / IL-13 vont être sécrétées et stimuler la formation de collagène. Ces mêmes cytokines vont permettre le recrutement des macrophages de type M2 et des éosinophiles au sein du granulome, lesquels vont réguler sa formation. Si le granulome représente la cause majeure de la pathologie, il a également un rôle protecteur, en emprisonnant l'œuf et minimisant ainsi les dommages faits aux tissus (Hams *et al.*, 2013). De manière intéressante, une infection à *S. mansoni* chez des souris

immunodéprimées va entraîner une mortalité dans plus de 95% des cas, liées en particulier à l'absence de formation de granulome.

#### **- Les Schistosomiasis ectopiques:**

Hormis le foie et la rate qui représentent les deux organes classiquement touchés lors de la schistosomiasis, de nombreux cas cliniques ont témoigné de la possibilité pour d'autres organes d'être affectés par les œufs de schistosome.

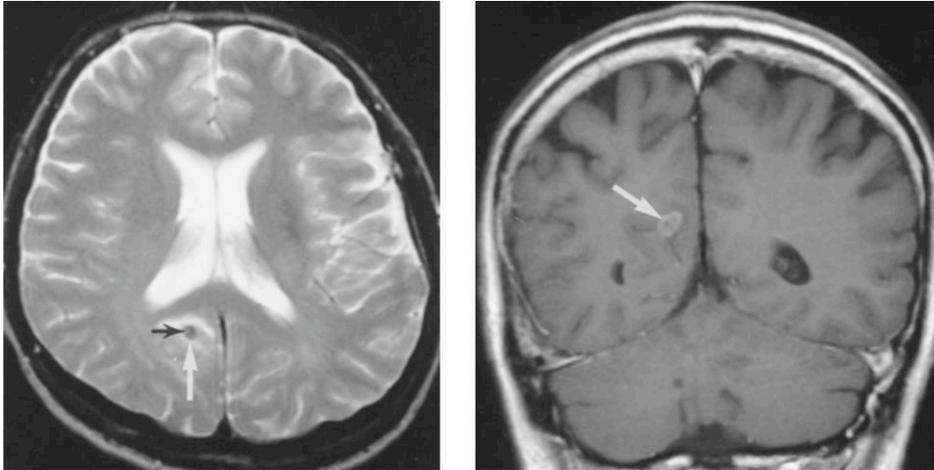
#### \* La schistosomiasis pulmonaire:

Bien que le poumon ne soit pas un organe piégeant de manière systématique les œufs de schistosome, des cas de schistosomiasis pulmonaire ont été documentés (Niemann *et al.*, 2010). Le tableau clinique associé à cette pathologie comprend fibrose pulmonaire, hypertension pulmonaire et quelquefois hypertrophie du ventricule droit.

#### \* La neuroschistosomiasis:

Des manifestations cliniques peuvent apparaître lorsque des œufs viennent se loger dans les tissus nerveux : on parle alors de neuroschistosomiasis (NS). A l'heure actuelle, il a été démontré que *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum* peuvent induire cette pathologie. Les deux premières espèces vont entraîner une forme qui touche la partie basse de la moëlle épinière, tandis que *S. japonicum* est à l'origine de la forme cérébrale de la maladie (Ferrari *et al.*, 2004).

Environ 2 à 4% des infections à *S. japonicum* sont associées à une manifestation symptomatique de neuroschistosomiasis. Le pourcentage est plus faible en ce qui concerne l'atteinte spinale, puisqu'on ne recense qu'environ 500 cas depuis sa première description en 1930. Dans sa forme aiguë, la NS à *S. japonicum* peut entraîner encéphalites et encéphalomyélites (Fig 17). L'évolution vers la chronicité est dépeinte par un panel de symptômes très divers, qui dépendent de l'importance de l'augmentation de pression intracrânienne engendrée par les granulomes: ataxie, maux de tête, nystagmus voire hémiparésie. En ce qui concerne la NS à *S. mansoni* ou *S. haematobium*, les manifestations cliniques sont les suivantes: faiblesse musculaire, perte de sensibilité au niveau des membres inférieurs et perte de certaines fonctions autonomes, notamment au niveau vésical.



**Figure 17: Neuroschistosomiase et atteintes du système nerveux central:** les lésions induites par le parasite sont détectées en imagerie de résonance magnétique. Les tâches hyperdenses correspondent aux granulomes (Preidler *et al.*, 1996).

\* Les schistosomiasis génitales:

Les schistosomiasis génitales sont majoritairement liées à une infection par *S. haematobium*, et dans une moindre mesure, à *S. mansoni*. Comme pour les autres schistosomiasis, elles sont liées aux réponses immunitaires inflammatoires et granulomateuses consécutives au piégeage des œufs. Chez l'homme, elle entraîne fibres et calcifications dans le tractus génital, principalement au niveau prostatique. La schistosomiase génitale féminine est nettement plus documentée : celle-ci peut toucher tous les organes de la sphère génitale, et fréquemment le col de l'utérus. Dans les cas les plus sévères, elle peut induire salpingites, métrites, avortements voire infertilité. Cette forme de schistosomiase facilite également la pénétration de pathogènes transmis sexuellement (Mosunjac *et al.*, 2003), et principalement les virus HPV (Human Papillomavirus) et HIV (Human Immunodeficiency Virus).

**- La co-infection:**

\* Les liens entre le schistosome et le virus HIV:

De nombreuses études expérimentales et épidémiologiques ont mis en évidence l'effet délétère d'une co-infection Schistosome - virus du SIDA. En effet, il existe une corrélation très forte entre zones d'endémicité à *Schistosoma* et zones de prévalence pour le virus du SIDA. Il a pu être montré que les infections à *Schistosoma* favorisent à la fois la pénétration mais également la progression du virus HIV-1. L'explication serait que les ulcérations induites par les œufs au niveau des muqueuses génitales, en cas de schistosomiase génitale, fragilisent les épithéliums et favorisent de ce fait la pénétration

du virus. Les réponses granulomateuses induites par la présence d'œufs favorisent la présence de cellules CD4+ et CCR5+, augmentant la probabilité pour le virus de se fixer aux cellules (Poggensee et Feldmeier, 2001). Une fois l'infection virale établie, l'environnement immunologique, majoritairement Th2, favorise clairement la progression du virus, notamment par la diminution du nombre de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques.

Il a pu être démontré que le SHIV (Simian Human Immunodeficiency Virus) se répliquait plus rapidement chez des macaques Rhésus préalablement infectés par *S. mansoni*, en comparaison à des macaques sains. L'importance de cette étude est d'autant plus grande qu'elle colle à la situation qui a le plus souvent lieu en zone d'endémie, à savoir une infection à *Schistosoma* chez les enfants et jeunes adolescents qui survient avant leur première activité sexuelle et le risque d'infection par la SIDA. L'ensemble de ces résultats met en évidence l'importance du contrôle de la schistosomiase dans les zones de prévalence du virus HIV.

#### \* Les autres types de co-infection:

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de co-infections avec d'autres organismes pathogènes. Ceux-ci sont regroupés dans un article d'Abruzzi et Fried, et passent en revue de nombreux pathogènes, incluant parasites unicellulaires, bactéries et helminthes (Abruzzi et Fried, 2011). Si ces co-infections sont pour la plupart délétères, comme c'est le cas pour *Fasciola*, *Leishmania*, *Entamoeba* ou *Salmonella*, le pouvoir pathogène de certaines espèces peut être réduit lors de co-infections :

À titre d'exemple, il a été démontré que, lors d'une infection par *P. falciparum* chez des hôtes déjà infectés par *S. haematobium*, on observait une diminution importante de la sévérité des symptômes associés aux deux parasites: diminution de la parasitémie, splénomégalie moins importante et anémie moins marquée. De manière intéressante, une co-infection chez des individus infectés par *S. mansoni* semble provoquer l'effet inverse, avec une augmentation de la sévérité des symptômes.

Enfin, il a été démontré que chez les individus infectés par le schistosome, l'efficacité du vaccin BCG était moins importante. De même, les individus subissant une co-infection Schistosome - *Mycobacterium ulcerans* vont développer plus fréquemment des ostéomyélites. Les syndromes d'éléphantiasis sont également plus fréquents lors de co-infection avec des filaires.

### **- Les liens entre schistosomiase et cancer:**

On estime à 20% le nombre de cancers liés à des pathogènes. Parmi ces agents infectieux figurent bactéries, virus mais également certains parasites helminthes, dont certaines espèces de schistosome. Il s'avère que l'inflammation chronique provoquée par la présence d'oeufs dans les tissus va créer un environnement délétère favorable à la transformation tumorale. En outre, macrophages et neutrophiles vont libérer des espèces réactives de l'oxygène, principalement N-nitrosamines et radicaux hydroxyl, qui réagissent avec l'ADN des cellules de l'hôte, entraînant cassures, mutations ou translocations.

La corrélation la plus forte entre schistosomiase et cancer concerne *S. haematobium* et le cancer de la vessie (Samaras *et al.*, 2010). En effet dans des zones à forte endémicité (Egypte, Soudan, Irak, Malawi), on observe également une incidence élevée des cancers de la vessie, et ce sont d'ailleurs souvent les cancers les plus fréquemment développés. Un certain nombre d'études épidémiologiques ont été menées à ce sujet, ce qui a permis de conclure que la schistosomiase à *S. haematobium* est effectivement un facteur de risque pour le développement de cancers de la vessie. L'International Agency for Research on Cancer a d'ailleurs classé *S. haematobium* comme agent carcinogène. Une faible corrélation épidémiologique existe entre *S. mansoni*, *S. japonicum* et certains autres types de carcinomes (colon, col de l'utérus, foie). Cependant en raison du trop petit nombre d'études réalisées, il est difficile d'affirmer avec certitude que ces liens sont bel et bien réels.

### **1.3.2 Les méthodes de diagnostic**

La méthode de diagnostic standard pour la détection des infections à *Schistosoma* est l'examen microscopique des selles et urines. En ce qui concerne les schistosomiasés intestinales, on observe la présence d'œufs sur lame après concentration des œufs par sédimentation dans une solution de glycérine, ou centrifugation dans une solution éther-formol. Cette concentration est d'ailleurs nécessaire pour la détection des infections de faible intensité. Cependant, dans les zones d'endémie, la méthode diagnostic validée par l'OMS et utilisée en routine est la technique d'étalement épais dite de Kato-Katz. Rapide d'exécution et très peu contraignante en termes de matériel technique et biologique (50 mg de selles environ), elle permet la détection d'infections à grande échelle. Cette méthode est cependant uniquement utilisée pour le diagnostic, de nombreuses études

ayant pointé du doigt son manque de sensibilité et de fiabilité pour quantifier l'intensité des infections.

Certaines méthodes de détection indirectes sont également disponibles, et pour la plupart basées sur des tests immunologiques de type ELISA, immunofluorescence ou hémagglutination. La séroconversion intervenant de manière générale entre 4 et 8 semaines après contact avec des cercaires, elle coïncide généralement avec l'apparition d'œufs dans les selles et ne représente donc pas une alternative intéressante au diagnostic coprologique. De plus, les possibles réactivités croisées des anticorps pour les antigènes d'autres plathelminthes ne permettent pas de poser un diagnostic incontestable. Au demeurant, leur coût représente également un frein dans beaucoup de pays endémiques pour la schistosomiase.

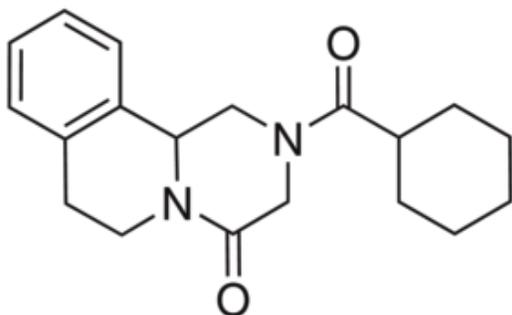
Des méthodes par PCR ont également été développées pour détecter de l'ADN parasitaire dans les selles mais également dans le plasma (Wichmann *et al.*, 2009 ; Wichmann *et al.*, 2013). L'intérêt de cette technique réside dans le fait qu'elle peut être appliquée précocement (avant la production d'œufs), et possède une sensibilité plus importante. L'utilisation de cette méthode de diagnostic permettrait de traiter de manière appropriée les patients atteints de schistosomiase aiguë et développant une fièvre de Katayama. Finalement, il existe un dernier test diagnostic appelé test d'éclosion, qui a été utilisé en Chine pour détecter les infections à *S. japonicum*. Celui-ci consistait à concentrer par filtration les œufs contenus dans plus de 25g de selles, pour les resuspendre et les exposer à une source de lumière intense, ce qui entraîne leur éclosion. Les miracidia vont alors se concentrer du fait de leur phototropisme, et le diagnostic d'une infection peut alors se faire macroscopiquement (Kumar V, Trematode Infections and Diseases of Man and Animals, 1999)

## **1.4. Traitement et prévention**

### **1.4.1 Le praziquantel**

L'arsenal thérapeutique pour traiter les schistosomiasés est restreint uniquement à quelques drogues. Parmi elles, le Praziquantel représente le traitement de premier ordre depuis le début des années 1980: Le praziquantel, acronyme tiré des termes PyRidin, AZIne, QUinoline et ANTi-(h)ELmintic, est une pyrazinoisoquinoline découverte fortuitement, car initialement synthétisée dans le but de découvrir de nouveaux agents antipsychotiques. Le composé fut ensuite testé avec succès lors d'un criblage de

molécules antihelminthiques. Depuis, ses propriétés pharmacocinétiques autorisant l'absorption orale, associées à sa très faible toxicité sur modèles animaux ont très vite fait de la molécule la première ligne de défense contre le schistosome.



**Figure 18: Structure du Praziquantel** ou (RS)-2-(Cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-one

Le praziquantel est commercialisé sous forme de mélange racémique, même si seule la forme lévogyre est active sur les schistosomes. Des études ont mis en évidence qu'une utilisation de l'énantiomère lévo exclusivement diviserait les doses curatives par 2 et entraînerait moins d'effets secondaires. Des efforts sont actuellement en cours pour adapter les techniques d'énantioséparation de la molécule à la production de masse (Liu *et al.*, 2004).

Le traitement recommandé par l'OMS consiste en une prise unique à raison de 40 à 60 mg/kg de poids corporel. Un comprimé de 600mg coûtant environ 0,08 US\$, on estime que le coût moyen d'un traitement se situe entre 0,2 et 0,3 US\$. C'est ce coût très faible qui permet d'envisager un traitement de masse dans les pays en développement. L'entreprise pharmaceutique Merck Serono distribue d'ailleurs gratuitement la molécule à plusieurs pays d'Afrique subsaharienne. Le praziquantel est également recommandé pour le traitement de la cysticercose, du taeniasis, et des distomatoses à *Clonorchis*, *Opistorchis*, et *Paragonimus*. De manière intéressante, la molécule n'a aucun effet sur *Fasciola hepatica*. Enfin, le praziquantel est aussi commercialisé à des fins vétérinaires, et est indiqué pour traiter l'ensemble des infections à trématodes et cestodes. La molécule est également disponible combinée au pyrantel, pour constituer un vermifuge à spectre large. On traite également les canards au praziquantel pour limiter la dissémination des *Trichobilharzia*, responsables de la dermatite des nageurs.

### **- Les mécanismes d'action:**

Malgré son utilisation intensive depuis plus de 30 ans, les mécanismes d'action du praziquantel sont étonnamment très peu connus. Un certain nombre d'études ont mis en évidence l'implication de canaux calciques dans la réponse du parasite à la molécule (Doenhoff *et al.*, 2008). En effet, un des effets précoces du traitement au praziquantel est la paralysie des vers. Celle-ci est la résultante d'un influx massif de calcium extracellulaire. Pica-Mattocchia et collaborateurs ont d'ailleurs montré que le blocage préalable de ces canaux par des dihydropyridines accroît la tolérance des parasites au praziquantel (Pica-Mattocchia *et al.*, 2007). Le rôle de sous-unité  $\beta$  du canal calcique  $Ca_v$  ( $Ca_v\beta$ ) dans la fixation au praziquantel est envisagé. Enfin récemment, des analyses transcriptomiques ont mis en évidence le rôle central de la protéine CamKII dans la sensibilité au praziquantel, renforçant encore un peu plus l'hypothèse selon laquelle le praziquantel perturbe l'homéostasie calcique du parasite (You *et al.*, 2013). Cependant des expériences de croisements entre souches résistantes et sensibles au praziquantel suggèrent que la drogue puisse avoir plusieurs cibles, et donc ne pas perturber uniquement le transport de calcium (Pica-Mattocchia *et al.*, 2009).

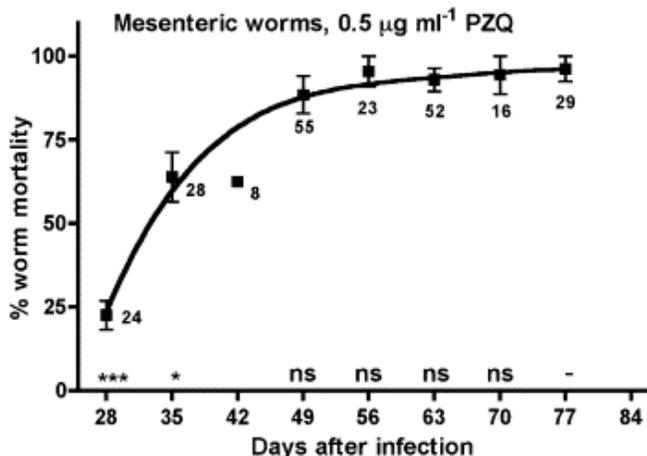
### **- Les limites du praziquantel:**

Malgré les plusieurs avantages cités ci-dessus, le praziquantel possède néanmoins deux limites majeures:

- Tout d'abord, sa relative inefficacité sur les stades larvaires. La sensibilité au praziquantel chez les schistosomules est en réalité biphasique: alors que les jeunes schistosomules de moins de 7 jours sont très sensibles à la drogue, les parasites de 3 à 4 semaines y sont quasiment insensibles (Doenhoff *et al.*, 2008). Cette sensibilité au praziquantel va remonter graduellement et la susceptibilité maximale n'est atteinte qu'après 6 à 7 semaines (Fig 19). Cette différence de sensibilité a d'ailleurs été quantifiée, et il a été estimé *in vivo* qu'il faut une concentration de PZQ 30 fois supérieure pour tuer 50% des juvéniles de 4 semaines que pour tuer 50% d'adultes de 7 semaines.

Si cet aspect ne rentre pas en compte dans le cas d'infections exceptionnelles, où les symptômes n'apparaissent que lorsque la totalité des parasites sont au stade adulte, ceci est problématique dans les zones endémiques. En effet dans le cas de réinfections régulières, une personne infectée va posséder à la fois des parasites sensibles et insensibles au praziquantel, ce qui rend difficile la guérison complète. Des protocoles

consistant en l'administration de deux doses de PZQ à intervalle de 2 à 4 semaines ont d'ailleurs été préconisés dans certains cas et se sont révélés efficaces avec une augmentation du taux de guérison.



**Figure 19 : Influence de l'âge des parasites sur l'efficacité d'action du praziquantel.** Les parasites récupérés à 4 et 5 semaines post-infection présentent un taux de mortalité plus faible en réponse au praziquantel, comparé aux parasites récupérés après 7 à 11 semaines d'infection (Botros *et al.*, 2005).

- Le second aspect négatif autour de l'utilisation de cette molécule concerne son utilisation en masse et de manière systématique qui a longtemps laissé craindre l'apparition de souches de résistantes, comme cela a été le cas pour *Plasmodium*. Une baisse importante de sensibilité au PZQ a d'ailleurs été relevée dans plusieurs zones, principalement au Sénégal et en Egypte. Cette tolérance est d'ailleurs spécifique au praziquantel puisque ces souches résistantes ne présentent pas de baisse de sensibilité à l'oxamniquine. De plus, il a été démontré chez certains cas de schistosomiase d'importation, une incapacité du praziquantel à tuer la totalité des parasites.

### 1.4.2 Les autres drogues efficaces contre le schistosome

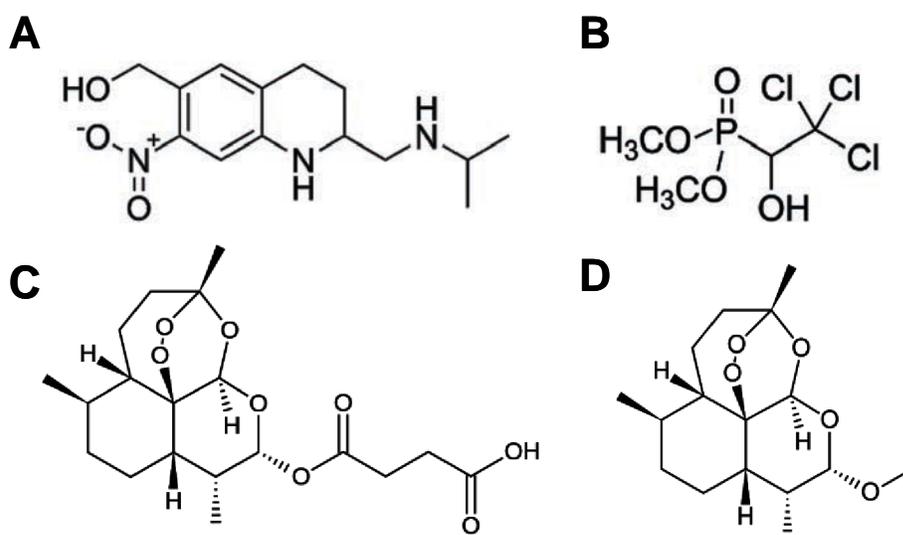
Parmi les drogues les plus efficaces sur le schistosome figure l'oxamniquine, une quinoléine commercialisée sous la marque Vansil® (Fig 20.A). Etant donné son spectre d'efficacité restreint à *S. mansoni* et son coût, la drogue fut progressivement remplacée par le praziquantel. Une méta-analyse publiée récemment souligne néanmoins que l'efficacité de l'oxamniquine est largement comparable au praziquantel pour le traitement des infections à *S. mansoni* (Danso-Appiah *et al.*, 2013).

Le métrifonate a été utilisé jusqu'en 2000 pour le traitement des infections à *S. haematobium* (Fig 20.B). Cette molécule est un organophosphoré connu pour inhiber

l'acétylcholinestérase. A partir de 2000, l'OMS va ensuite stopper ses recommandations d'utilisation du fait du manque d'efficacité de la molécule (Ross *et al.*, 2002). Cependant, une seconde méta-analyse centrée sur les traitements pour la schistosomiase à *S. haematobium* révèle que la drogue possède également une efficacité similaire à celle du PZQ (Danso-Appiah *et al.*, 2008). Elle est néanmoins toujours utilisée en médecine vétérinaire comme antiparasitaire à large spectre.

Enfin parmi les autres drogues étudiées en traitement anti-schistosome figurent les dérivés d'artémisinine, artemether et artésunate (Fig 20, C et D). Ces drogues antipaludéennes possèdent des effets schistosomicides sur les trois espèces de schistosome majeures, *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*.

De nombreux essais cliniques ont mis en évidence des vertus prophylactiques et curatives importantes des deux molécules. Mieux, il semble qu'une combinaison praziquantel - artémisinine soit plus efficace que le praziquantel seul. Cependant les belles perspectives que présentent les artémisinines dans la lutte anti-schistosome pourraient ne jamais voir le jour en raison de la crainte de voir se développer une résistance à la drogue chez *Plasmodium* dans les zones de co-endémie.



**Figure 20: Structure des molécules alternatives au Praziquantel utilisées dans la lutte anti-schistosome.** A) Oxamniquine, B) Métrifonate, C) Artésunate, D) Artémether.

### 1.4.3 Les méthodes de prévention

#### **- La chimioprévention:**

Comme préconisé par l’OMS, les pays à forte endémicité pour les helminthiases bénéficient d’un suivi particulier en terme de chimioprévention. En ce qui concerne la schistosomiase, il est préconisé de traiter régulièrement les enfants d’âge scolaire et les adultes, à une fréquence dépendante du taux de prévalence (Fig 21). Ainsi à titre d’exemple, dans les communautés où le risque de schistosomiase est élevée, tous les enfants d’âge scolaires ainsi que les adultes doivent être traités au praziquantel au moins une fois par an.

Catégorie	Prévalence chez les enfants d’âge scolaire	Mesures à prendre	
Communauté exposée à un risque élevé	≥ 50% examens parasitologiques (schistosomiase intestinale et urinaire) ou ≥ 30% questionnaire sur l’hématurie visible (schistosomiase urinaire)	Traiter tous les enfants d’âge scolaire (scolarisés ou non) une fois par an	Traiter aussi tous les adultes considérés comme exposés au risque (groupes spécifiques ou communautés entières vivant dans des zones d’endémie ; voir à l’annexe 6 des précisions sur les groupes spécifiques)
Communauté exposée à risque modéré	≥ 10% et < 50% examens parasitologiques (schistosomiase intestinale et urinaire) ou < 30%, questionnaire sur l’hématurie visible (schistosomiase urinaire)	Traiter tous les enfants d’âge scolaire (scolarisés ou non) une fois tous les deux ans	Traiter aussi tous les adultes considérés comme exposés au risque (groupes spécifiques ; voir à l’annexe 6 des précisions sur les groupes spécifiques)
Communauté exposée à un risque faible	< 10%, examens parasitologiques (schistosomiase intestinale et urinaire)	Traiter tous les enfants d’âge scolaire (scolarisés ou non) deux fois en tout (une fois à l’âge d’entrée à l’école primaire, une fois à l’âge de sortie de l’école primaire par ex.)	Le praziquantel doit être disponible dans les cliniques et dispensaires pour traiter les cas suspects.

**Figure 21: Stratégie recommandée par l’OMS pour la chimioprévention de la schistosomiase** (D’après « Chimioprévention des helminthiases chez l’homme », Organisation mondiale de la santé, 2008).

Cette chimioprévention de masse a permis en l’espace de 20 ans de diminuer drastiquement l’impact de la maladie dans certains pays en développement comme la Chine, le Brésil, ou encore la Tunisie.

### **- L'éducation et l'amélioration des conditions sanitaires:**

La schistosomiase est une maladie hydrique dont la prévalence dépend des conditions sanitaires dans lesquelles évolue sa population. Son éradication est de fait possible, sous réserve d'amélioration de l'éducation, des comportements et des conditions de salubrité. De vastes programmes éducatifs visant à améliorer la connaissance des risques de transmission pour les populations vivant en zones endémiques ont été lancés par l'OMS. Leur réussite est néanmoins mitigée dans la mesure où certains comportements sont difficiles à changer en absence de solutions alternatives pour l'accès à l'eau douce (Gryseels *et al.*, 2006). En tout état de cause, seuls les pays les plus aisés ont réussi à diminuer les cas de schistosomiase. C'est le cas notamment de l'Égypte ou de Porto-Rico. Certains autres pays ont au cours de leur histoire été capables d'éradiquer complètement la maladie: on peut citer comme exemple le Japon ou le Maroc.

### **- Le contrôle de la population vectorielle:**

De nombreuses stratégies de contrôle des populations de mollusques ont été mises en place au cours du temps. Si dans le courant des années 80 ont été mis en place des projets de traitement à grande échelle, ceux-ci ont été arrêtés du fait de leur coût et de leur impact sur les écosystèmes. Ils ont été progressivement remplacés par des initiatives plus ciblées et plus écologiques. À la recherche d'alternatives, un pan de la recherche sur le terrain s'est tourné vers l'étude de mollusquicides naturels, notamment l'implantation de végétaux poisons (Rizk *et al.*, 2012) ou l'introduction / réintroduction de prédateurs (exemple du projet crevette mené au Sénégal: <http://www.projet-crevette.org/index.php?lang=fr>). D'autres études préconisent un meilleur contrôle de la population de mollusques par l'introduction de souches résistantes à *S. mansoni*.

## **1.4.4 La vaccination**

Le développement d'un vaccin est un processus extrêmement complexe et ne se limite pas uniquement à la découverte d'antigènes. Il nécessite tout d'abord une parfaite connaissance des mécanismes immunitaires liés à l'interaction hôte-pathogène, de manière à ne pas induire de réponse non adaptée, mais surtout de ne pas amplifier une réponse qui pourrait se révéler immunopathogénique (Hotez *et al.*, 2010). La présence de trois stades parasitaires différents au sein de l'hôte intermédiaire, associé aux différentes localisations du parasite au cours de sa maturation complexifient encore plus la

compréhension de la mécanistique de la réponse immune anti schistosome. Dans la plupart des infections helminthiques (nématodes et plathelminthes), on observe un pic dans l'intensité d'infection au cours de l'enfance, qui va progressivement diminuer à l'âge adulte (Mutapi *et al.*, 1998). De ce fait, des efforts particuliers ont été consentis afin de développer des stratégies vaccinales adaptées aux enfants, qui sont les victimes de première ligne de la pathologie. Ces trente dernières années, plus d'une centaine d'antigènes de schistosome ont été caractérisés, et un quart des molécules environ se sont révélées protectrices en modèle murin. Parmi elles, les protéines Sh-28-GST, SmTSP-2, Sm14 et Sm-p80 se sont révélées particulièrement efficaces en modèles animaux, et sont de ce fait intensivement étudiées en vue du développement d'essais cliniques.

Le premier antigène, **Sh-28-GST**, est la glutathione S-transférase de *S. haematobium*, dont le développement a été initié par les équipes du Pr André Capron à l'Institut Pasteur de Lille. Actuellement en phase III (Bilhvax 3, [www.bilhvax.inserm.fr](http://www.bilhvax.inserm.fr)), c'est le seul vaccin à avoir franchi pour l'instant le stade des essais cliniques. Les résultats de phase I ont d'ailleurs été récemment publiés (Riveau *et al.*, 2012). Ce vaccin à la particularité d'être un vaccin thérapeutique, c'est-à-dire qu'il n'a pas pour but de prévenir l'infection mais de stimuler le système immunitaire des individus infectés afin qu'ils limitent l'intensité de l'infection, voire éliminent le parasite. Ce vaccin a une vocation pédiatrique, et entend être administré principalement aux enfants de 6 à 9 ans.

La tétraspanine **SmTSP-2**, une protéine tégumentaire à quatre domaines transmembranaire représente également une cible vaccinale intéressante. Les tétraspanines ont une fonction dans l'organisation des membranes cellulaires et la régulation de l'adhésion cellulaire, la motilité ou encore la différenciation. Chez *S. mansoni*, SmTSP-2 est exprimé dans la membrane externe du tégument du ver adulte, et la réduction de son expression par ARN interférence entraîne des malformations du tégument ainsi qu'une réduction du nombre de schistosomules atteignant le stade adulte (Tran *et al.*, 2010). Des expériences de protection réalisées chez la souris ont mis en évidence une réduction de 57 et 64% du nombre de vers adultes et d'œufs piégés dans le foie, respectivement (Tran *et al.*, 2006). De manière intéressante, SmTSP-2 est reconnu par les IgG1 et IgG3 des individus résistants à la schistosomiase, mais pas par les individus exposés de manière chronique, faisant de cette molécule une cible de choix.

Enfin, il a été récemment prouvé qu'une protéine chimérique SmTSP-2/ APR-1, contenant un fragment de l'acide aspartique protéase APR-1 du nématode *Necator americanus* permet double protection contre *S. mansoni* et contre *N. americanus* (Pearson *et al.*, 2010; Pearson *et al.*, 2012).

**Sm14** est une FABP, pour Fatty-Acid binding protein. Elle possède un rôle dans l'apport d'acides gras provenant de l'hôte. En effet, les schistosomes ne possèdent pas la machinerie enzymatique nécessaire à la fabrication de stérols et d'acides gras, et sont donc complètement dépendants de leur hôte. Le ciblage de cette protéine se révèle être particulièrement intéressante dans la mesure où des immunoglobulines anti-Sm14 pourraient empêcher la fonction de la protéine et de ce fait inhiber l'assimilation des lipides par le parasite (Tendler et Simpson, 2008). Ses capacités immunogéniques et protectrices ont été mises en évidence chez la souris et le mouton. De plus, des réactivités croisées ont été obtenus entre Sm14 et leurs homologues chez certaines espèces de trématodes, cestodes et nématodes. La tendance actuelle est néanmoins au développement d'un vaccin bivalent pouvant être utilisé à la fois en médecine vétérinaire chez le mouton contre les infections à *Fasciola hepatica*, et chez l'homme contre les infections à *S. mansoni*. Le vaccin, développé par la fondation Oswaldo Cruz (Brésil) va entrer prochainement en phase I d'essais cliniques.

Le dernier antigène prometteur est la calpaïne ou **Sm-p80**, qui joue un rôle important dans le renouvellement des membranes tégumentaires du parasite (Siddiqui *et al.*, 2011). Ce phénomène de renouvellement est d'ailleurs une arme importante que le schistosome emploie pour échapper au système immunitaire de l'hôte. L'aspect protecteur de cet antigène a été déterminé de manière approfondie, sous différentes formes (ADN nu, protéine recombinante, ADN + protéine recombinante) à la fois chez la souris et le babouin. Dans ces deux modèles, on obtient une réduction du nombre de parasites de l'ordre de 70 et 60% respectivement, ainsi qu'une réduction quasi totale du nombre d'œufs pondus, empêchant de fait l'apparition de la pathologie.

Ce vaccin, lui aussi à visée thérapeutique, a pour objectif de bloquer l'activité protéolytique de la protéine, par la fixation d'IgG bloquantes. De manière intéressante, les sérums de souris et babouins infectés et vaccinés par Sm-p80 reconnaissent également les protéines p80 de *S. japonicum* et *S. haematobium*, suggérant que cette stratégie vaccinale pourrait également être appliquée à ces deux autres espèces majeures de schistosome.

## 2. Les protéine kinases

### 2.1. Généralités

Les protéine kinases sont des enzymes présentes dans tous les clades du monde vivant, c'est-à-dire archées, bactéries et eucaryotes (Esser et Siebers, 2013; Kannan *et al.*, 2007, Manning *et al.*, 2002). Leur rôle est de modifier la fonction d'autres protéines en leur greffant un ou plusieurs résidus phosphate.

Pour ce faire, elles transfèrent le résidu  $\gamma$ -phosphate de l'ATP à des acides aminés possédant un groupement hydroxyl libre : Sérine, Thréonine ou Tyrosine (Fig 22). Les PK peuvent phosphoryler spécifiquement les résidus Sérine et Thréonine (Ser/Thr kinases), le résidu Tyrosine (Tyr kinases ou TK), voire sont capables de phosphoryler les trois types de résidus (kinases à double spécificité ou « dual specificity » kinases). Les protéines ainsi phosphorylées vont être chargées plus négativement, ce qui va entraîner des changements en terme d'activité enzymatique, de conformation, de localisation, de stabilité ou encore dans l'architecture des réseaux d'interactions protéine-protéine. Cette découverte majeure de la phosphorylation réversible des protéines a valu à Fischer et Krebs le prix Nobel de Physiologie en 1992.

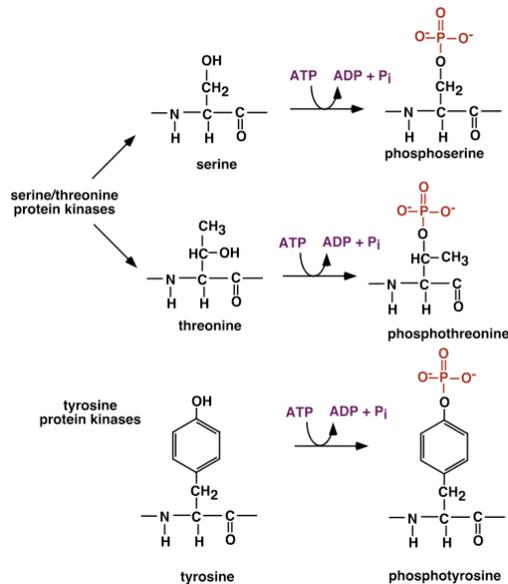


Figure 22: Les différents types de protéine-phosphorylation intervenant chez les eucaryotes (D'après H Luecke, <http://bass.bio.uci.edu/~hudel/>)

À noter que des résidus Histidine peuvent également être phosphorylés. Cette réaction est catalysée par des enzymes appelées Histidine kinases. Ces protéines, qui sont majoritairement retrouvées chez les organismes unicellulaires et les plantes jouent un rôle

dans le chimiotactisme et la régulation hormonale dans le cadre du développement (Wolanin *et al.*, 2002). Elles ne sont néanmoins pas retrouvées chez les métazoaires, ni chez la levure *S. cerevisiae*. Plus marginalement, il a été mis en évidence que des résidus Aspartate, Lysine, Arginine et Cystéine pouvaient être phosphorylés. Il semble cependant que ces phénomènes interviennent quasi exclusivement chez les bactéries, même si un cas de phosphorylation sur un résidu Aspartate de l'aldolase C a été documenté chez l'homme (Wagner et Vu, 2000). La phosphorylation est un mécanisme régulant la transduction des signaux, elle est donc par conséquent transitoire et réversible. La déphosphorylation est catalysée par des enzymes appelées phosphoprotéine phosphatases, dont le rôle est d'enlever le groupement phosphate des résidus Sérine, Thréonine et Tyrosine. Parmi ces protéines figurent la PP1, PP2A ou encore la Cdc25C, qui possèdent notamment des fonctions clés dans la régulation du cycle cellulaire.

#### **- Historique :**

L'histoire de la phosphorylation des protéines démarre à la fin des années 1930 avec la découverte par Cori et Cori de deux formes de glycogène phosphorylase, appelée a et b. Si la forme a est spontanément active, l'activité glycogénolytique de la forme b est dépendante de la présence de 5'-AMP (Cohen, 2002). Au milieu des années 1950, les travaux de Fischer et Krebs mettent en évidence que l'interconversion des formes a et b est sous dépendance de mécanismes de phosphorylation-déphosphorylation. Il sera prouvé dès 1959 que la forme b est en réalité convertie en forme a en présence d'une enzyme appelée phosphorylase kinase. Celle-ci catalyse le transfert du  $\gamma$ -phosphate d'un résidu ATP sur un résidu sérine de la phosphorylase. Les mêmes auteurs montreront ensuite que la conversion de la forme a en forme b est en revanche catalysée par une enzyme appelée PR pour phosphate-releasing, qui sera plus tard renommée protéine phosphatase 1 (PP1).

C'est à la fin des années 1960 et au cours des deux décennies suivantes que toute l'importance fondamentale de la phosphorylation des protéines voit le jour, avec notamment la découverte de la PKA, des kinases dépendantes du calcium (MLCK, Calmodulin-dependent protein kinases), mais également des cyclin dépendent kinases (CDC2) et des tyrosines kinases v-src et du récepteur à l'EGF. En parallèle, leurs spécificités en terme de régulation sont mises en évidence, avec notamment la découverte des cascades de phosphorylation, de phosphorylation multiple ou encore de l'adressage des protéines à leurs substrats. En 2013, la phosphorylation des protéines est

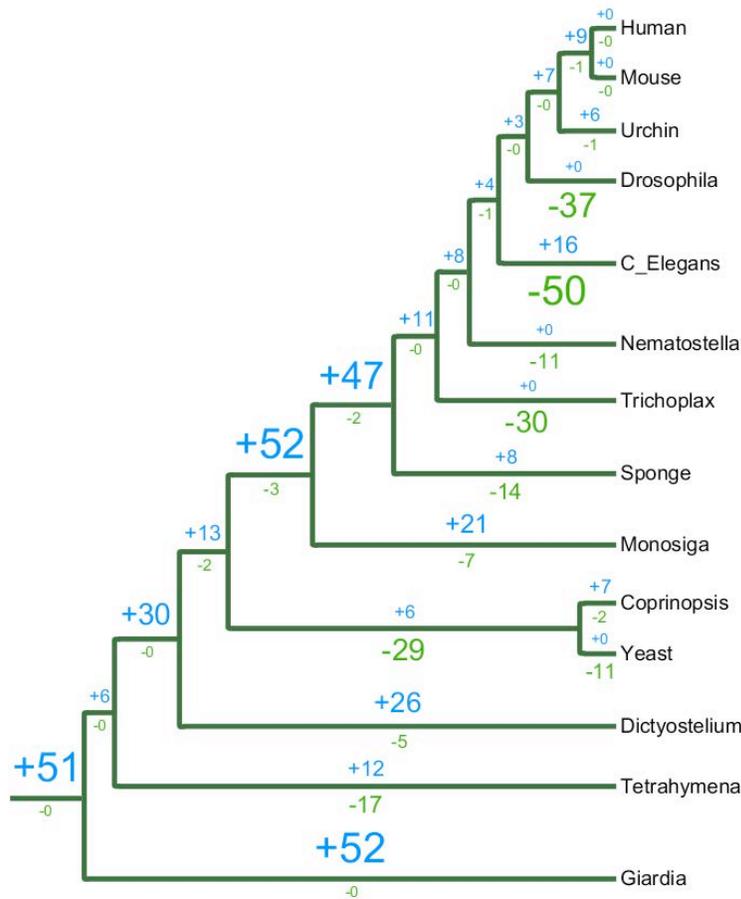
toujours la modification post-traductionnelle la plus étudiée, et les kinases sont devenues des cibles thérapeutiques de toute première importance dans le traitement des pathologies cancéreuses.

#### **- L'évolution des protéine kinases:**

Les archées possèdent uniquement 3 PK : Rio1, Rio2 et Bud32. De manière intéressante, ces trois protéines sont également conservées chez tous les métazoaires jusque chez l'homme ou elles sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et la biologie des télomères. Les bactéries possèdent quant à elles un éventail de PK bien plus large, qui comporte 20 familles. Parmi ces familles figurent les ePK (eukaryotic protein kinases), qui sont très minoritaires chez les bactéries mais qui représentent la quasi-totalité des PK chez les eucaryotes. De manière générale, les PK bactériennes ne possèdent que très peu d'identité avec leurs homologues eucaryotes, avec des pourcentages variant de 7 à 17% (Kannan *et al.*, 2007). Les PK bactériennes sont très peu étudiées, à l'exception des Histidine Kinases dans le cadre des systèmes à deux composants.

Il est estimé que le kinome représente environ 2% des gènes de la plupart des génomes eucaryotes. Ainsi chez l'homme ont été identifiées 518 PK, représentant 1,7% du génome total. Si la levure *S. cerevisiae* ne possède que 130 PK dans son génome, certaines espèces ont un nombre de PK beaucoup plus large. C'est le cas notamment de *Tetrahymena thermophila*, un cilié qui possède plus de 1069 PK (3,9% du génome), dont seulement 416 appartiennent à des familles déjà caractérisées (Fig 23). Une comparaison approfondie des kinomes de différentes espèces eucaryotes met en évidence une évolution relativement complexe (Manning *et al.*, 2002, <http://www.kinase.com>). En effet, si de manière globale au moins 53 sous-familles de PK sont conservées chez toutes les espèces eucaryotes, un nombre important de gains et pertes de PK ont eu lieu au cours de l'évolution. Un des exemples les plus parlants concerne sans doute *C. elegans*, qui a perdu 50 sous-familles de PK pourtant communes aux autres bilatéraux. À l'inverse, il possède dans son génome plus de 16 sous-familles spécifiques de PK, appelées « worm kinases » (Manning *et al.*, 2005). Cette dynamique d'évolution est corrélée à la perte et/ou l'acquisition de caractères biologiques particuliers. En effet il est intéressant de remarquer que 18 familles de PK sont conservées à la fois chez l'Homme et la drosophile, mais pas chez *C. elegans*. Parmi elles figurent des protéines impliquées dans l'immunité ou dans la neurogénèse. Ceci est en lien avec une complexité moins importante des systèmes

nerveux et immunitaires du nématode en comparaison de ceux des arthropodes et vertébrés.



**Figure 23: Evolution des protéine kinases chez les eucaryotes.** En bleu figure le nombre de familles ou sous-familles qui ont été acquises et en vert le nombre de familles et sous-familles perdues (D'après Manning *et al.*, 2002 et [www.kinase.com/evolution/](http://www.kinase.com/evolution/)).

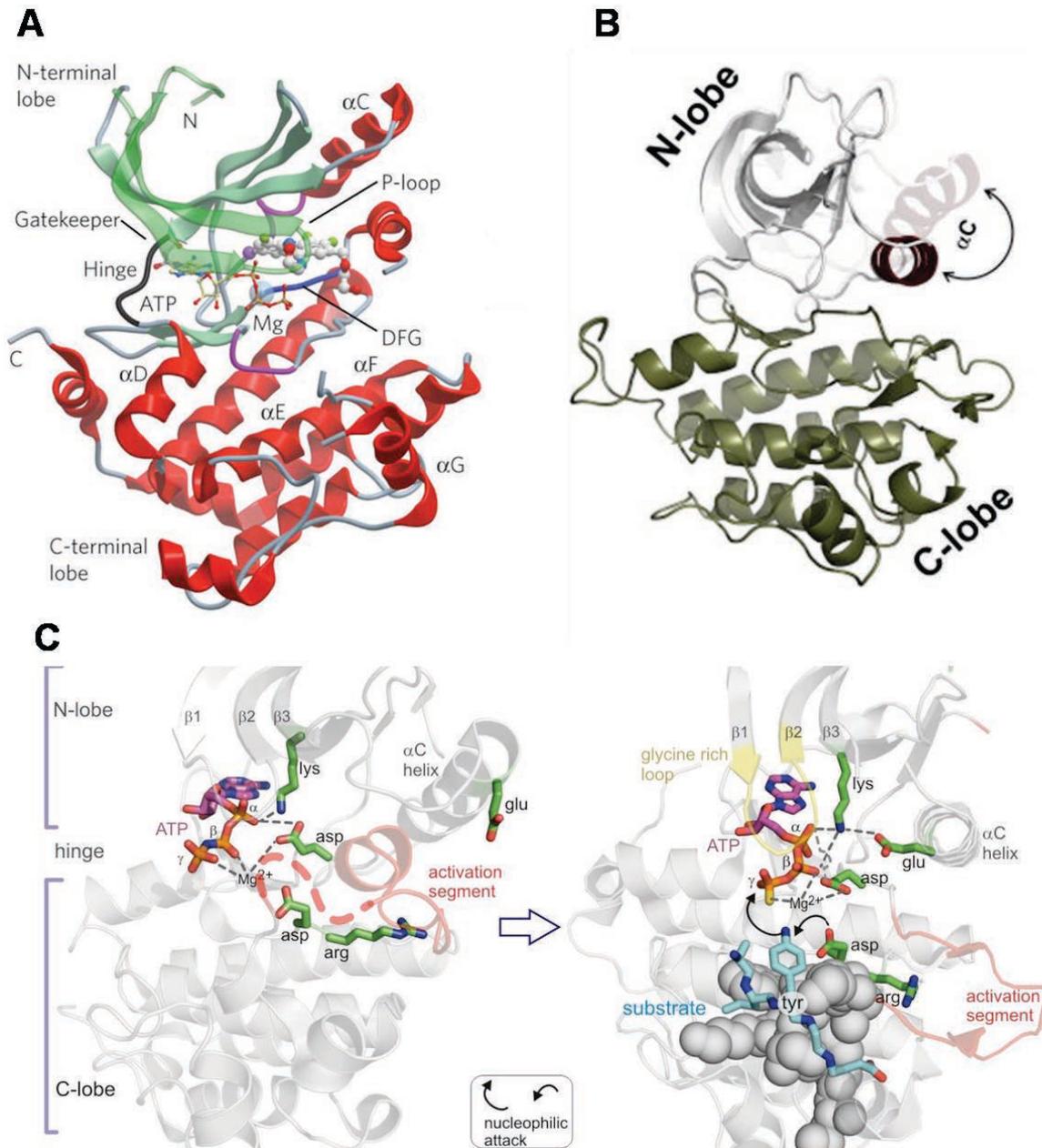
## 2.2. La structure des protéine kinases

Le domaine catalytique des PK est constitué d'un domaine catalytique de 250 à 300 acides aminés, qui comporte 11 sous-domaines majeurs, annotés de I à XI, et séparés par des régions moins conservées (Hanks *et al.*, 1988). D'un point de vue structural, le domaine PK est constitué de deux lobes, reliés par une charnière (Fig 24 A). L'espace entre les deux lobes contient le site actif à proprement parler.

Le petit lobe N-terminal contient les sous domaines I à IV. Entre les branches  $\beta 1$  et  $\beta 2$  se trouve la boucle Glycine, ou Gly-loop, au sein de laquelle se trouve le motif conservé **G-x-G-x-G (sous domaine I)**. Celui-ci est impliqué dans la fixation et la stabilisation des  $\beta$ - et

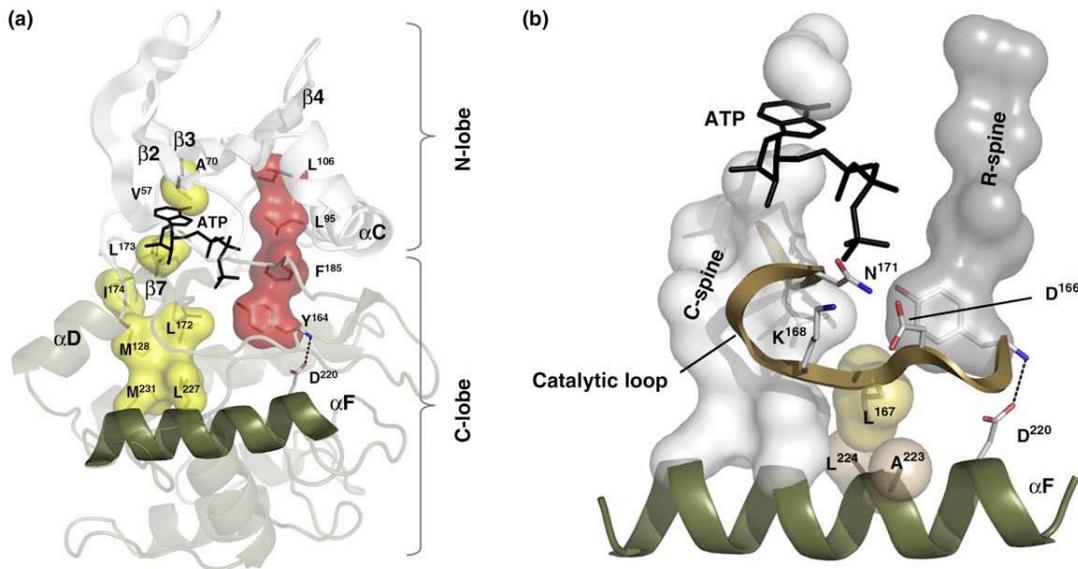
$\gamma$ -phosphates de l'ATP. Au sein de ce lobe se trouve également le motif (V)**AxK** (sous domaine II), également impliqué dans la fixation et l'orientation de l'ATP. Au sein de ce motif, le résidu Lysine est essentiel car il va quant à lui fixer et stabiliser l'  $\alpha$ -phosphate de l'ATP. Enfin, il faut noter l'importance de l'hélice  $\alpha$ C, un élément de régulation très dynamique qui occupe une place stratégique entre les deux lobes, et qui va bloquer l'entrée du site actif lorsque la kinase est en position inactive (Fig 24 B).

Le lobe C-term contient les sous-domaines V à XI. Parmi les motifs essentiels à l'activité kinase figurent les motifs **HRDLKxxN** (sous domaine VIb), impliqué dans le phosphotransfert, et **DFG** (VII), impliqué dans la fixation du cofacteur  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ , qui fixe et oriente le  $\gamma$ -phosphate de l'ATP. Un motif **APE**, situé dans le domaine VIII est presque unanimement conservé. Il a un rôle dans la stabilisation de la boucle d'activation en position ouverte. Des motifs structuraux facilitent l'activation et la stabilité de l'enzyme. Il s'agit tout d'abord de deux consensus de résidus hydrophobes non consécutifs appelés « spines », qui forment en réalité des colonnes hydrophobes, au sein même de l'enzyme (Taylor et Kornev, 2011). La colonne régulatrice, dite R-spine, est constituée de quatre motifs dont la position dans l'espace est conservée uniquement lorsque le site catalytique est sous forme active. La colonne catalytique, dite C-spine comporte en son sein le noyau purique de l'ATP. Elle aide le positionnement de l'ATP, de façon à ce que le  $\gamma$ -phosphate de l'ATP soit positionné vers le site de phosphotransfert.



**Figure 24 : Structure cristallographique du domaine catalytique d'une protéine kinase.** A) Représentation de la structure bilobée du domaine catalytique d'une PK. L'ATP, les ions  $Mg^{2+}$  ainsi que le phosphosubstrat sont représentés au sein de la poche catalytique. B) Illustration de la mobilité de l'hélice  $\alpha C$  entre les conformations actives et inactives. L'hélice ferme l'accès au site actif en conformation inactive. C) Mécanisme d'activation du domaine catalytique du récepteur à l'insuline. Dans son état inactif, la boucle d'activation occupe le site actif. Un changement de conformation permet la phosphorylation de résidu Tyrosine dans la boucle d'activation, menant à une réorganisation du lobe N-terminal permettant la pleine activité kinase (Textbook of Receptor Pharmacology, 3<sup>e</sup> édition, 2010).

Enfin la dernière caractéristique structurale des PK concerne l'hélice F. Cette structure hautement hydrophobe permet l'ancrage des deux colonnes R et C, ainsi que celui des boucles catalytique et d'activation, par des liaisons hydrophobes. Ces trois motifs vont de manière coordonnée participer à la régulation de l'activité enzymatique, et au maintien de la conformation active.



**Fig 25 : Architecture interne du domaine catalytique d'une PK.** A) Les colonnes R (rouge) et C (jaune) sont ancrées à l'hélice F dans le lobe C. L'ATP fait partie intégrante de la colonne C. B) Certains résidus de la boucle catalytique sont également ancrés à la structure du domaine catalytique. Les résidus Leu<sup>167</sup> et Pro<sup>169</sup> interagissent directement avec l'hélice F, rendant l'ensemble très rigide à la fois sous la forme inactive et sous la forme apo.

L'activation des PK est un processus complexe qui met en jeu plusieurs changements au sein du site catalytique. Ces changements peuvent être déclenchés par différents types d'évènements, en fonction de la PK considérée. Elle démarre toujours par un changement de conformation qui va permettre l'entrée d'une molécule d'ATP. De manière intéressante, la géométrie du segment d'activation, lorsque la kinase est en conformation active, est très fortement conservée parmi les PK. En revanche, ce n'est pas le cas lorsque la kinase est en forme inactive. Il existe donc une importante diversité dans les mécanismes d'activation, que je détaillerai dans la partie suivante qui se focalise sur les Tyrosine Kinases.

### 2.3. Les protéine kinases humaines

Le kinome de référence est le kinome humain, qui contient 518 PK (Fig 26), ce qui représente environ 1,7% du génome (Manning *et al.*, 2002a). Il est divisé en deux sous-groupes majeurs, les ePK (eukaryotic protein kinases) et les aPK (atypical protein kinases). Les aPK humaines sont déterminées comme telles car en dépit de leur activité protéine kinase, elles n'ont pas un profil reconnu par le modèle de l'automate de Markov à états cachés utilisé en bio-informatique pour retrouver les ePK. Ces aPK sont au nombre de 40 chez l'homme et sont regroupées au sein de 13 familles. Parmi les aPK les plus étudiées figurent la PI3K qui est impliquée notamment dans le métabolisme du glucose *via* la voie Insuline, ou encore les RIO kinases, des régulateurs importants du cycle cellulaire et de la maintenance ces chromosomes. La classification des ePK utilisée à l'heure actuelle est celle de Manning (Manning *et al.*, 2002a; Miranda-Saavedra et Barton, 2007). Elle comporte les 8 groupes suivants:

- **AGC** (pour protéine kinases A, G et C): cette famille contient 63 membres dont les protéines Akt, PKA, PKC, PKG, PDK1 ou S6K (Pearce *et al.*, 2010). Au moins 24 d'entre elles sont d'une importance majeure, puisque leur dérégulation ou l'insertion de mutations entraîne des pathologies de type hypertension, thrombocytopenie, cancer, autisme ou diabète.

- **CK1** (Cell Kinase 1): ce groupe contient 12 protéines appartenant aux sous-familles des caséine kinases, Vaccinia Related Kinases (VRK) et Tau-Tubulin Kinases (TTBK). Ces protéines sont impliquées dans des processus variés tels que la régulation de la transcription, du cycle cellulaire et du cycle circadien. Les protéines CK1 sont très étudiées pour leur capacité à phosphoryler Tau et à initier la formation de plaques amyloïdes dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

- **CMGC**: ce nom est l'acronyme des protéines CDC, MAPK, GSK3 et CLK qui composent ce groupe. Il est constitué de 61 membres dans 9 sous-familles, qui sont étudiées pour leurs rôles dans le contrôle du cycle cellulaire, les réponses aux signaux mitogènes et de stress, ou encore le contrôle métabolique et l'épissage alternatif.

Les protéines les plus étudiées dans ce groupe sont les CDC (cell division cycle), et particulièrement la CDC2 (également appelée Cdk1), qui régule la transition G2/M du

cycle cellulaire, et qui est activée dans un certain nombre de cancers de type colon, sein ou foie.

- **CAMK**: les protéines CAMK pour Calcium and Calmodulin-regulated kinases sont au nombre de 74 chez l'homme. La plupart de ces protéines sont activées par la fixation du calcium ou de la calmoduline à un domaine situé en C-terminal du domaine kinase. Les protéines les plus étudiées sont Chk1 et Chk2 pour checkpoint kinase 1 et 2, qui jouent un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire en arrêtant le cycle en réponse à un dommage de l'ADN.

- **RGC** (Receptor Guanylate Cyclases): C'est le plus petit groupe d'ePK avec seulement 5 membres chez l'homme. Ce sont en réalité des récepteurs transmembranaires qui possèdent en C-terminal un domaine Ser-Thr kinase apparemment inactif, couplé à un domaine guanylate cyclase. La fixation d'une hormone peptidique du côté N-terminal entraîne l'activation du domaine guanylate cyclase à l'origine de la formation de cGMP et de l'activation de la PKG. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique, et jouent également un rôle dans la vision et au cours développement osseux.

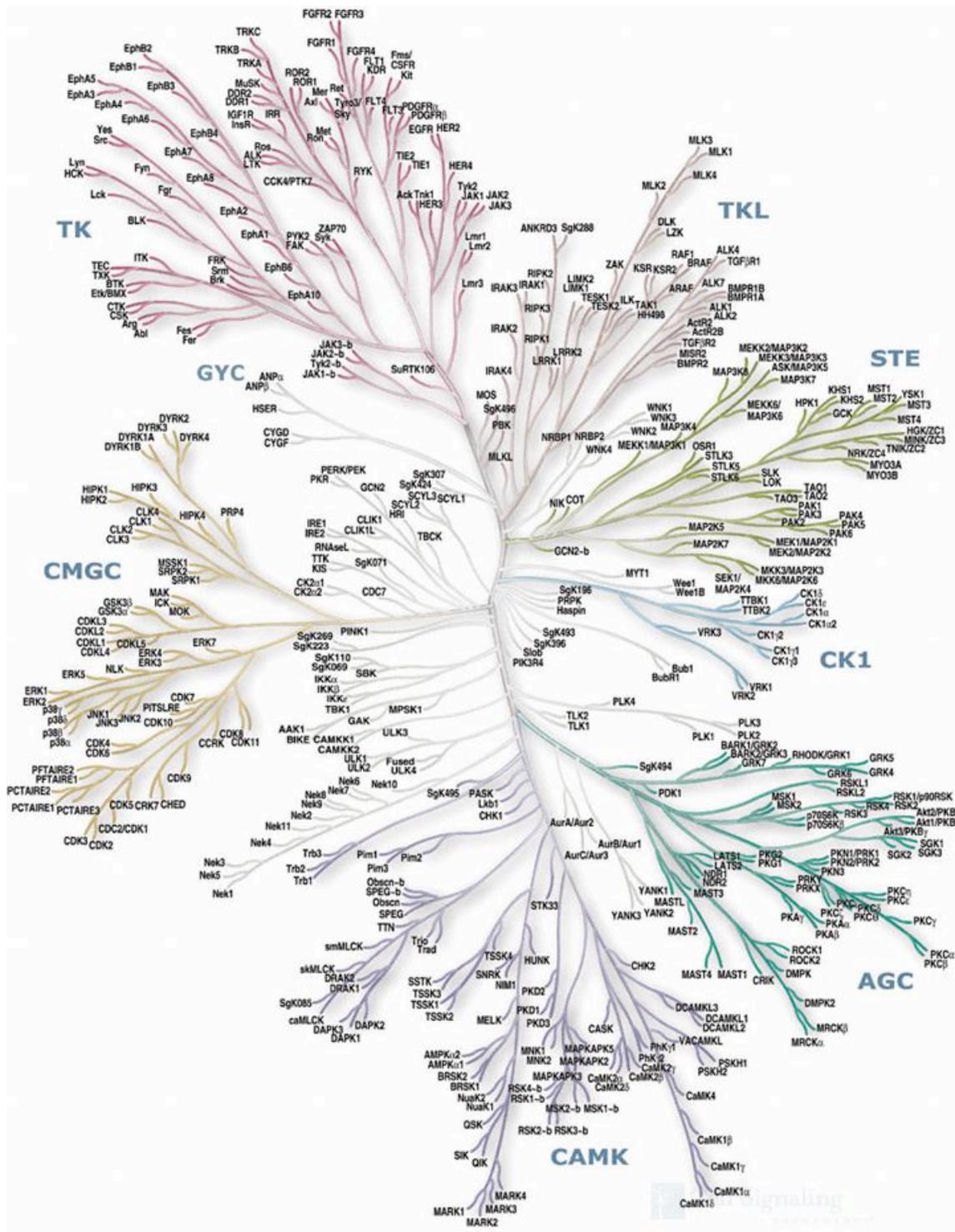
- **STE**: cette famille regroupe les 47 homologues humains des protéines Sterile 7, 11 et 20 de la levure. Parmi ces protéines figurent notamment les protéines activatrices des MAPK, également appelées MAP2K et MAP3K. Elles jouent un rôle majeur dans la transduction des signaux. Les protéines MKK1/2, MKK3 et MKK4 sont fréquemment retrouvées surexprimées, délétées ou mutées dans les cellules cancéreuses.

- **TKL**: Le groupe TKL pour Tyrosine Kinase Like, regroupe 43 protéines à activité Ser-Thr kinase, malgré une similarité de séquence avec les Tyrosine Kinases. On y retrouve principalement les récepteurs au TGF $\beta$ , au BMP et à l'activine, les MAP4K de type Raf ou encore les protéines IRAK (IL-1 Receptor Associated Kinase). Leurs dérégulations sont presque toujours associées à des pathologies cancéreuses ou des défauts de développement.

-**TK**: Le groupe des Tyrosine Kinase comporte chez l'homme 90 représentants. C'est apparemment un des groupes qui est apparu le plus tard au cours de l'évolution, puisque

les TK semblent absentes de la majorité des organismes unicellulaires, dont *S. cerevisiae*. Ces protéines jouent un rôle crucial dans un certain nombre de processus cellulaires fondamentaux, tels que la transduction des signaux, la division cellulaire, la différenciation ou encore la communication inter-cellule. Elles sont de ce fait extrêmement étudiées chez l'homme. On estime à l'heure actuelle qu'au moins 52 d'entre elles sont associées avec la survenue de pathologies cancéreuses ou développementales chez l'homme.

A noter que 83 autres ePK ne s'intègrent dans aucune de ces 8 familles. Parmi les plus étudiées figurent les Polo-like kinases (Plk1 à 5), les Nek (Nek1 à 11) ou encore les protéines Aurora (Aurora A, B et C), toutes impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.



**Figure 26: Dendrogramme représentant les 518 protéine kinases présentes chez l'Homme, basé sur les similarités de séquence du domaine catalytique. Les branches représentant les protéines ou sous-familles de protéines appartenant aux 8 familles majeures de PK sont regroupées sous une même couleur (D'après <http://www.cellsignal.com/reference/kinase/>).**

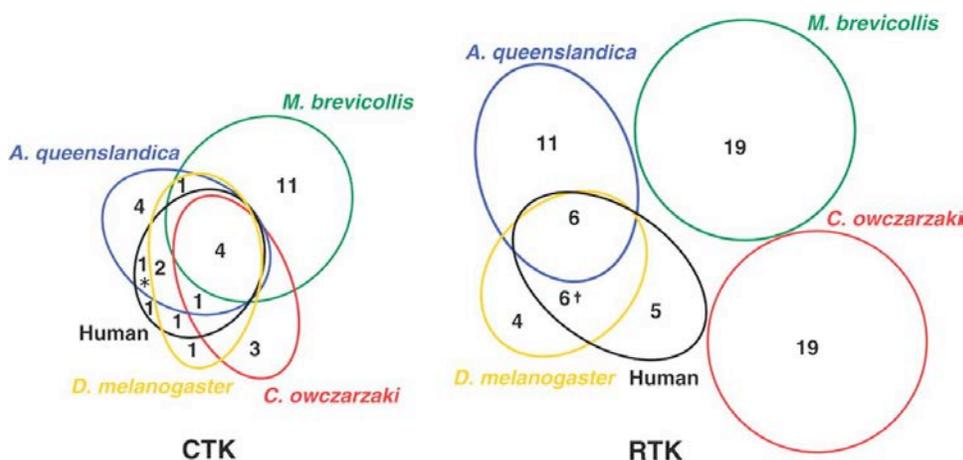
## 2.4. Les Tyrosine Kinases

Comme expliqué précédemment, les tyrosine kinases représentent une classe de PK particulière puisqu'elles sont capables de transférer un groupement phosphate sur le groupement hydroxyl d'une Tyrosine. On distingue parmi les TK deux catégories de protéines: les récepteurs tyrosine kinases, appelés RTK, et les Tyrosine Kinases Cytoplasmiques, appelées CTK ou NRTK. Chez l'homme, on dénombre 58 RTK et 32 CTK (Lemmon et Schlessinger, 2010).

### 2.4.1 L'évolution des Tyrosine Kinases

Les Tyrosine Kinases ont longtemps été considérées comme des protéines spécifiques aux métazoaires, étant donné leur absence du génome de l'unicellulaire modèle *S. cerevisiae*. Cependant en 2004, Shiu et Li publient une étude phylogénétique regroupant les données obtenues suite à l'analyse de 28 génomes eucaryotes, et révèlent la présence de quelques TK dans les génomes des unicellulaires *Entamoeba histolytica* (2), *Phytophthora infestans* (1) et *Chlamydomonas reinhardtii* (3) (Shiu et Li, 2004). Plus tard, 128 TK, 38 Tyrosine Phosphatases et 123 protéines à domaines SH2 furent mises en évidence chez le choanoflagellé *Monosiga brevicollis*, ce qui représentait un réseau Tyrosine Kinase plus élaboré que ceux des métazoaires (King et Carroll, 2001; Manning et al., 2008; Suga et al., 2008). Plus récemment, une nouvelle étude est venue confirmer la présence de TK chez les pré-métazoaires, en détaillant le tyrosine kinome des filastériens *Capsaspora owczarzaki* et *Ministeria vibrans*, qui possèdent respectivement 103 et 15 TK (Suga et al., 2012). Enfin, la publication du génome de l'amibe *Acanthamoeba castellanii* a également mis en évidence la présence d'un nombre important de PTK chez les amoebozoaires (Clarke et al., 2013). De manière intéressante, si plusieurs familles de CTK sont conservées depuis les filastériens jusqu'à l'homme, ce n'est pas le cas des RTK qui sont uniquement conservés à l'intérieur du royaume des métazoaires (Fig 27). Plus généralement, il semble que le répertoire des CTK essentielles ait commencé à s'établir chez l'ancêtre commun aux trois groupes filozoaires: filastériens, choanoflagellés et métazoaires. En revanche, les RTK se sont diversifiés grandement dans chacun de ces trois groupes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les RTK peuvent agir comme senseur de l'environnement extracellulaire, qui peut être très différent selon l'espèce

considérée. De même, il est postulé que les RTK puissent également avoir servi comme outil de communication inter-cellule à l'émergence de la multicellularité.



**Figure 27 : Diagramme de Venn détaillant la diversité et la conservation des familles de RTK et CTK à travers les Filozoa (D'après Suga et al., 2012).**

## 2.4.2 Les Tyrosine Kinases cytoplasmiques

On classe les TK cytoplasmiques humaines en 10 familles, en fonction de leurs profils phylogénétiques et de leurs domaines extra-catalytiques (Fig 28). Les TK cytoplasmiques possèdent des domaines d'interactions spécifiques leur permettant des interactions avec d'autres protéines, mais également des lipides voire de l'ADN. Ce sont des protéines clés qui possèdent un rôle central dans la transduction des signaux. Elles sont de ce fait extrêmement régulées. Leur dérégulation est d'ailleurs souvent associée à l'apparition de pathologies. A titre d'exemple, le plus connu est sans aucun doute celui de la protéine de fusion BCR-Abl, constitutivement active, et qui est à l'origine de 90% des leucémies myéloïdes chroniques et 25% des leucémies myéloblastiques aiguës.

Parmi les domaines d'interaction les plus importants figurent les domaines SH2 (Src homology domain 2), SH3 (Src homology domain 3) et PH (Pleckstrin homology).

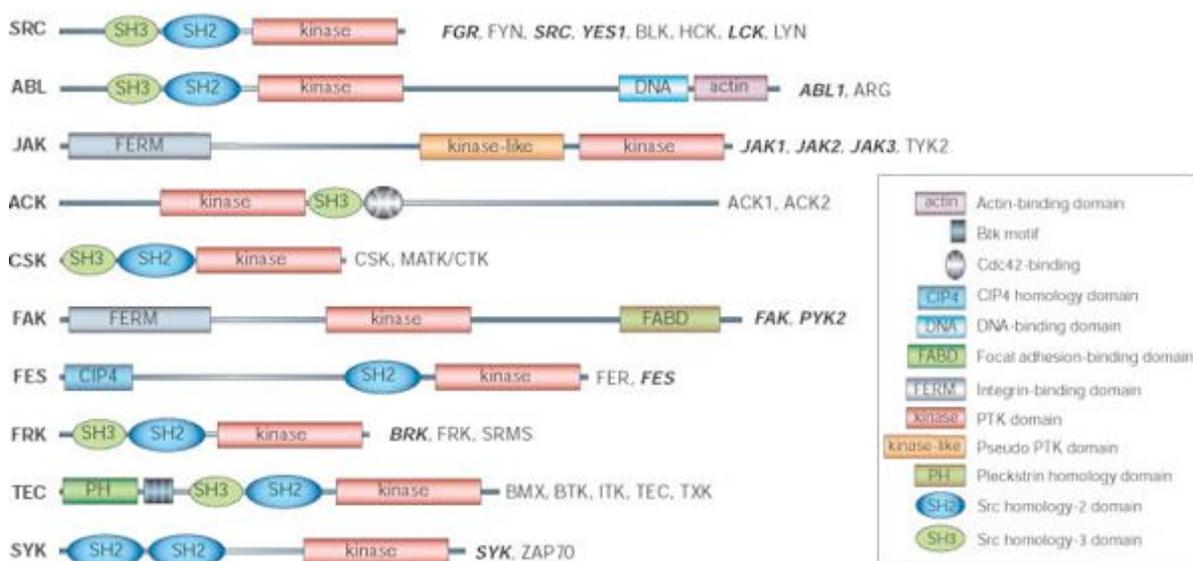
Les domaines SH2 forment des petites régions d'environ 100 acides aminés, retrouvés chez une importante quantité de protéines impliquées dans une signalisation Tyrosine Kinase. Ces domaines forment la plus grande classe de protéines capables de reconnaître des Tyrosines phosphorylées (p-Tyr). Des études, réalisées en utilisant une banque de phosphopeptides ont révélé un rôle des résidus situés entre -2 et +4 de la

phosphotyrosine dans la spécificité de reconnaissance des domaines SH2 (Filippakopoulos *et al.*, 2009). La fonction majeure et ancestrale des domaines SH2 est l'adressage des protéines à leurs substrats. Cependant l'augmentation de la complexité des réseaux de signalisation au fil de l'évolution a également complexifié le rôle de ces domaines, qui sont également capables de réguler l'activité kinase de CTK. En effet, dans le cas de la protéine Src, l'interaction intra-moléculaire entre le domaine SH2 et le phospho-résidu p-Tyr<sub>527</sub> résulte en une compaction de la protéine qui prend alors une conformation inactive. Dans cette configuration, l'activité kinase de Src est soumise à la déphosphorylation de ce résidu par une Tyrosine Phosphatase. A l'inverse, les domaines SH2 peuvent également avoir un effet positif sur l'activité catalytique. En effet, il a été démontré que la protéine Csk avait nécessairement besoin de son domaine SH2 fonctionnel pour avoir une activité enzymatique. De telles observations ont également été relevées pour les protéines Abl, Btk et Fes.

Les domaines SH3 sont des petites régions d'environ 60 acides aminés qui reconnaissent et se fixent à des séquences consensus dites poly-proline, de type x-P-x-x-P. Ces domaines SH3 prennent une conformation en forme de tonneau bêta constitué de 5 ou 6 brins bêta (Kay, 2012). Ces domaines sont retrouvés dans un nombre important de protéines de signalisation cellulaire. Ainsi, ils sont retrouvés notamment dans les familles de CTK Src, Abl, Ack, Csk, Frk ou encore Tec, mais on les retrouve également dans certaines protéines dont le rôle est relié au cytosquelette telles que la spectrine, la myosine ou encore la cortactine (Kay *et al.*, 2000). De la même façon que le domaine SH2, le domaine SH3 peut être essentiel pour une bonne régulation de l'activité Tyrosine Kinase des CTK. En effet, des mutations ou délétions au sein du domaine SH3 de Src et Abl résultent en une dérégulation de l'activité kinase qui mène à la cancérisation des cellules.

Enfin les domaines PH (Plecktrine homology) sont des régions d'environ 100 acides aminés impliqués dans la reconnaissance et la fixation des phosphatidylinositols membranaires. Parmi les 10 domaines protéiques capables de fixer les phospholipides, les domaines PH sont les plus représentés chez les eucaryotes, avec plus de 303 domaines dans 258 protéines chez l'Homme (Lemmon, 2008). Les domaines PH ont une affinité importante pour le PI(3,4)P<sub>2</sub>, le PI(4,5)P<sub>2</sub> et le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. C'est d'ailleurs le seul motif qui soit capable de reconnaître ces phospholipides. D'un point de vue structural, ils

sont formés de deux feuillets bêta antiparallèles situés de manière orthogonale, fixant la tête des phospholipides par une boucle hydrophobe située entre les brins  $\beta 1$  et  $\beta 2$  des feuillets. Les domaines PH sont retrouvés chez une variété importante de protéines telles que la Btk, PKB, Pleckstrine, Sos, IRS-1 ou encore la dynamine. Des mutations à l'intérieur du domaine PH peuvent entraîner des pathologies importantes. C'est le cas notamment de la maladie de Bruton, liée à la kinase Btk, qui engendre un désordre immunitaire important, caractérisé notamment par un déficit en immunoglobines.



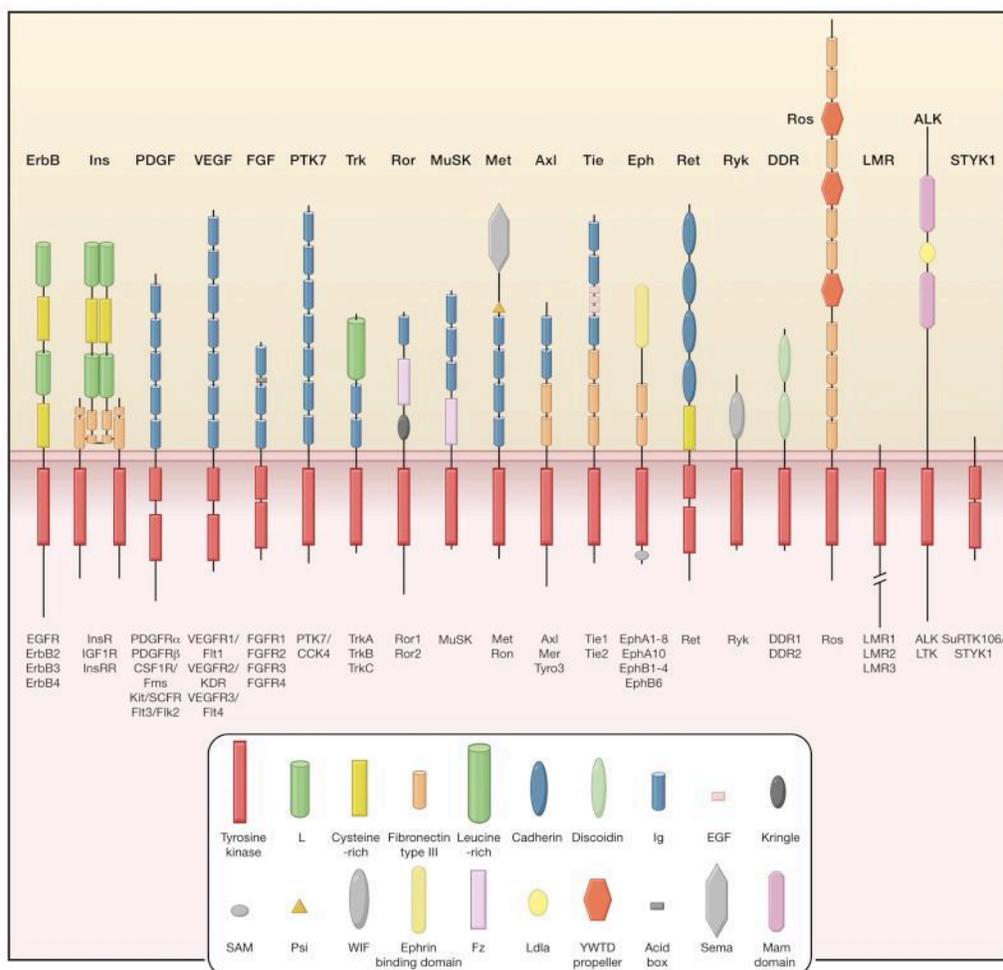
**Figure 28: Structure des différentes familles de Tyrosine Kinases Cytoplasmiques humaines** (Blume-Jansen et Hunter, 2001).

## 2.4.3 Les Récepteurs Tyrosine Kinase

### 2.4.3.1 Classification

On compte chez l'homme 58 RTK, répartis en 20 familles (Fig 29). Cette classification a été réalisée en fonction de la conservation de leur domaine tyrosine kinase, mais également en tenant compte de leur structure extracellulaire. En effet, cette partie extracellulaire présente une variabilité importante du fait de la diversité des ligands que les RTK sont capables de fixer. Si l'on considère la structure des gènes, il est intéressant de noter qu'à l'intérieur d'une même famille de RTK, la structure intron-exon est conservée au même titre que l'architecture protéique (Robinson *et al.*, 2000). Cependant de manière générale, tous les RTK possèdent une topologie similaire, à savoir une seule chaîne polypeptidique avec un domaine extracellulaire N-terminal, un domaine

transmembranaire unique et un domaine TK C-terminal. Des exceptions sont néanmoins à noter. En effet, si la grande majorité des RTK sont constitués d'une unique chaîne polypeptidique, ce n'est pas le cas des récepteurs à l'insuline (IR, IGF-1R, IRR), et des récepteurs à l'Hepatocyte Growth Factor (Met et Ron) qui possèdent une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  reliées par un ou plusieurs ponts disulfure.



**Figure 29 : Structure des 20 familles de récepteurs tyrosine kinases humains (Lemmon et Schlessinger, 2010)**

Les domaines extracellulaires des RTK humains sont extrêmement variés en termes de nature et de combinaison. Les domaines les plus fréquemment retrouvés sont les domaines immunoglobine (Ig), fibronectine de type III (FnIII) ou encore riches en Cystéine. Cette grande variation au sein des domaines extracellulaires permet de recruter des ligands également très variés. Si leur origine est vraisemblablement d'origine protéique pour tous les récepteurs, ils sont néanmoins divers en terme de poids

moléculaire, taille de chaîne ou encore modifications post traductionnelles. Ainsi par exemple, si l'insuline est de 6 kDa, l'HGF quant à lui possède un poids moléculaire supérieur à 100 kDa. Plus surprenant, le récepteur MuSK, exprimé principalement au niveau des jonctions neuro-musculaires, est activé par l'agrine, un ligand de type protéoglycane à héparane sulfate dont le poids moléculaire est supérieur à 200 kDa. Enfin, il existe une exception pour le récepteur IRR (Insulin receptor-related Receptor), qui ne semble pas posséder de ligand à proprement parler. En effet, exprimé principalement dans les compartiments à pH non neutre du rein, de l'estomac et du pancréas, il est activé par une alcalinisation du milieu extracellulaire (Deyev *et al.*, 2011).

#### 2.4.3.2 Les mécanismes d'activation

##### - La dimérisation des récepteurs:

Dans la majorité des cas, le ligand induit la dimérisation du récepteur en s'y fixant. Certains récepteurs ne suivent cependant pas cette règle : c'est le cas par exemple des IR et IGF-1R, qui évoluent en dimères liés de manière covalente, et ce même en absence de ligand. De la même façon, les récepteurs à l'EGF formeraient des oligomères, tout comme les récepteurs EphR ou Tie2 (Hubbard et Miller, 2007; Lemmon et Schlessinger, 2010).

Plusieurs exemples (Fig 30):

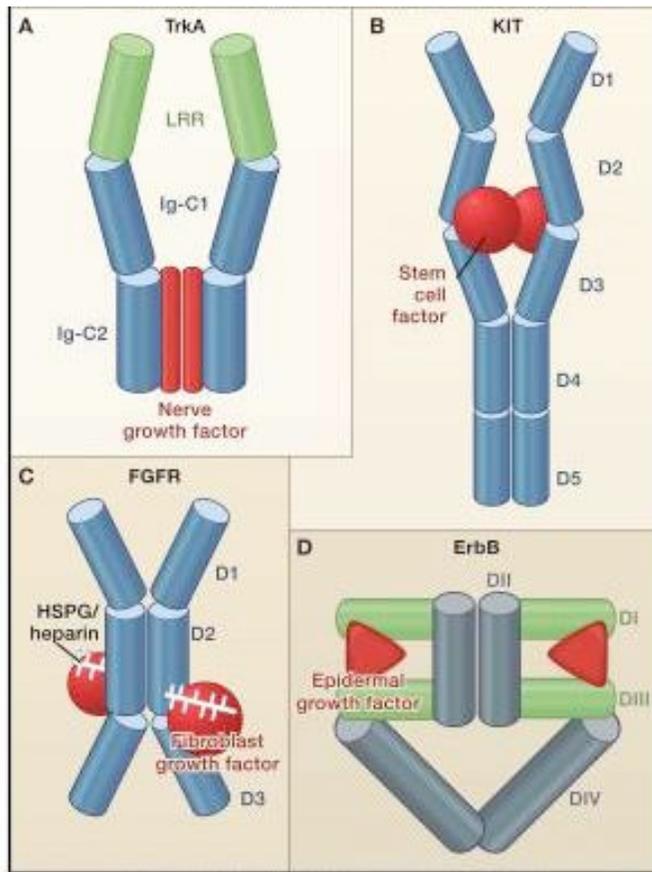
\* La dimérisation uniquement induite par le ligand : l'exemple de TrkA : L'activation de TrkA est due à la fixation d'un dimère de NGF via le domaine Ig, sans aucun contact direct entre les deux monomères (Wehrman *et al.*, 2007).

\* La dimérisation induite par le ligand et un contact physique entre les récepteurs : le cas de Kit : un dimère de SCF se fixe au niveau des régions D2-D3; la fixation du SCF induit un changement de conformation des domaines D4 et D5 qui vont alors interagir pour stabiliser la conformation active (Yuzawa *et al.*, 2007).

\* La dimérisation induite par le ligand et une ou plusieurs molécules accessoires : le cas du FGFR : L'activation des FGFR réclame une stoechiométrie 2:2:2 comprenant deux molécules de ligand, deux récepteurs mais également deux molécules d'héparine. Chaque molécule de FGF se fixe aux deux FGFR du complexe, en formant une liaison forte et une liaison moins importante. De manière simultanée, les molécules d'héparine vont se fixer au complexe de manière à augmenter et stabiliser ces interactions. Les deux

monomères de FGFR interagissent également entre eux par leurs domaines D2 (Schlessinger *et al.*, 2000). D'autres structures cristallographiques ont également mis en évidence la possibilité d'une autre conformation, de type 2 :2 :1, créant ainsi un dimère asymétrique, dont l'interface de dimérisation se situe au niveau des domaines D3 (Pellegrini *et al.*, 2000).

\* Les molécules de ligands ne contribuent pas à former l'interface de dimérisation:  
l'EGFR : L'EGFR fixe l'EGF ou le TNF $\alpha$  par deux sites distincts situés dans les domaines I et III (Ogiso *et al.*, 2002; Garrett *et al.*, 2002). La fixation du ligand entraîne le démasquage du site de dimérisation situé dans le domaine II, et va ainsi permettre au récepteur de former des complexes.



**Figure 30 : illustration des différents modes de dimérisation connus des Récepteurs Tyrosine Kinase humains (D'après Lemmon et Schlessinger, 2010).**

A) Exemple de NGF/TrkA et la dimérisation uniquement promue par le ligand.

B) Exemple du couple récepteur-ligand SCF/c-Kit, où la dimérisation concerne à la fois le ligand mais également des interactions entre deux monomères de récepteur.

C) Dimérisation induite par le ligand et une ou plusieurs molécules accessoires: l'exemple de l'activation du FGFR par le FGF et l'héparine.

D) Le ligand ne participe pas à l'interface de dimérisation : exemple du récepteur à l'EGF

La plupart des RTK humains doivent utiliser une de ces variations pour se dimériser et s'activer. Cependant, il est fort probable que d'autres mécanismes puissent exister, et ce principalement en raison de la diversité de la nature des ligands. On peut par exemple

supposer que les récepteurs DDR1 et DDR2, activés par des fibres de collagène aient un mode d'activation particulier. Il doit en être de même pour Ret, qui est activé en réponse au GDNF lorsque celui-ci est fixé à son récepteur GFR $\alpha$ , une protéine extracellulaire ancrée à la membrane par une ancre GPI (Airaksinen et Saarma, 2002).

#### **- L'activation des domaines Tyrosine Kinase:**

Comme mentionné précédemment, les domaines catalytiques des PK sont, lorsqu'ils sont sous conformation active, très similaires (Huse et Kuriyan, 2002). A l'inverse, ils sont extrêmement divergents quand ils se trouvent sous forme inactive, ce qui montre une grande diversité dans leurs mécanismes de régulation. En ce qui concerne les domaines catalytiques des RTK, leur inhibition se fait uniquement en *cis*, par tout un jeu d'interactions intramoléculaires empêchant une pleine activité catalytique. L'activation des récepteurs passe donc par le déverouillage de cette *cis*-autoinhibition, qui est initiée par la fixation du ligand.

Il existe trois grands types de *cis*-autoinhibition chez les RTK, qui sont caractérisés par la région qui est à l'origine de ce mécanisme (Fig 31). Il est intéressant de noter qu'un domaine TK peut être inhibé à la fois par plusieurs mécanismes de *cis*-autoinhibition:

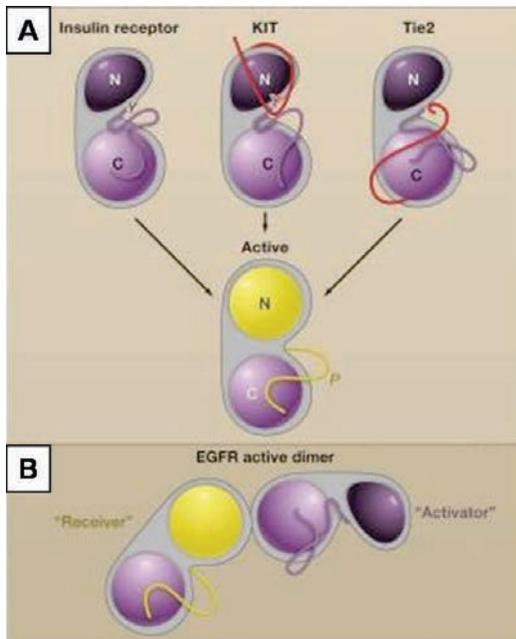
\* l'autoinhibition par la boucle d'activation: C'est le cas notamment des FGFR et des récepteurs à l'Insuline. Ainsi dans le cas de l'IR, la boucle d'activation prend une conformation telle qu'un de ses résidus, la Tyr<sub>1162</sub>, se projette directement dans le site actif afin de le masquer. Lorsque l'insuline se fixe sur le récepteur, les résidus Tyr<sub>1158</sub>, Tyr<sub>1162</sub> et Tyr<sub>1163</sub> se font phosphoryler en *trans*, et la boucle d'activation se désengage largement du site actif. Ainsi à titre d'exemple, la Tyr<sub>1158</sub> va subir un déplacement d'environ 30Å (Hubbard, 2004). Le déplacement de la boucle d'activation va permettre au domaine kinase de prendre une conformation active, en permettant notamment le déplacement de l'hélice  $\alpha$ C et la bonne orientation du lobe N-terminal et de la Gly-loop. Les FGFR suivent une règle similaire, à la différence qu'aucun résidu à proprement parler ne bloque le site actif, la boucle d'activation prenant une conformation masquant le site de fixation de la protéine substrat. Enfin, il est important de mentionner qu'il existe un certain nombre de pathologies liées à l'apparition de mutations dans la boucle d'activation. Parmi les exemples les plus couramment cités dans la littérature figure la mutation K<sub>650</sub>E du FGFR3, qui est à l'origine d'un syndrome néo-natal osseux appelé dysplasie thanatophore (Robertson *et al.*, 2000).

\* l'autoinhibition par le domaine juxta-membranaire : de nombreux RTK voient leur activité tyrosine kinase réprimée par une séquence dans le domaine juxta-membranaire. Il s'agit principalement des récepteurs KIT, Flt3, MuSK ou encore les EphR. Dans cette configuration, des résidus du domaine juxta-membranaire interagissent avec le domaine catalytique pour le stabiliser sous forme autoinhibée. Si les mécanismes ne sont pas exactement les mêmes selon le récepteur, il met en revanche toujours en jeu des résidus tyrosine dans le domaine juxta membranaire. Dans ce cas de figure, la dimérisation des récepteurs induit la trans-autophosphorylation de ces résidus tyrosine, entraînant de ce fait la levée de l'inhibition et une activité catalytique optimale.

Comme c'est le cas pour la boucle d'activation, des mutations peuvent survenir dans le domaine juxta membranaire, induisant une activation constitutive des kinases menant à l'apparition de pathologies cancéreuses ou congénitales. C'est le cas notamment des récepteurs KIT, PDGFR $\alpha$ , FLT3 et RET (Dibb *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2000).

\* l'autoinhibition par la région cytoplasmique C-terminale : ce troisième mode de régulation a été démontré à l'heure actuelle uniquement chez le récepteur Tie2. Sa particularité réside dans le fait que son domaine kinase est maintenu en conformation dite « active-like », avec une boucle d'activation située à l'extérieur du site actif, même en absence de phosphorylation. Le maintien de la *cis*-inhibition se fait via une séquence de la queue C-terminale, contenant des tyrosines, et bloquant l'accès au site actif (Shewchuk *et al.*, 2000). De la même manière que pour les deux modes de régulation précédents, la levée du blocage se fait elle aussi par trans-autophosphorylation.

Dans ces trois modes de régulation, la primo activation des récepteurs est sous la dépendance de mécanismes *trans*-autophosphorylation. Cependant tous les RTK ne sont pas assujettis à ces mécanismes, et certains sont même capables de s'affranchir de *trans*-phosphorylation pour s'activer. C'est le cas en particulier des EGFR, qui peuvent s'activer de manière allostérique (Zhang *et al.*, 2006). Ce dispositif met en jeu deux domaines TK, un dit « activateur », et un autre dit « receveur ». Le contact entre ces deux domaines va induire un changement de conformation du receveur, qui va abolir la *cis*-autoinhibition et donc activer l'enzyme (Fig 31, B).



**Figure 31 : Illustration des différents modes d'activation des domaines catalytiques des RTK.** A) Différents types d'autoinhibition : par la boucle d'activation (cas du récepteur à l'insuline), par le domaine juxtamembranaire (cas de KIT) ou par la queue C-terminale (cas de Tie2). B) activation des domaines TK des récepteurs à l'EGF de manière allostérique, faisant intervenir un domaine TK donneur et un receveur (Lemmon et Schlessinger, 2010).

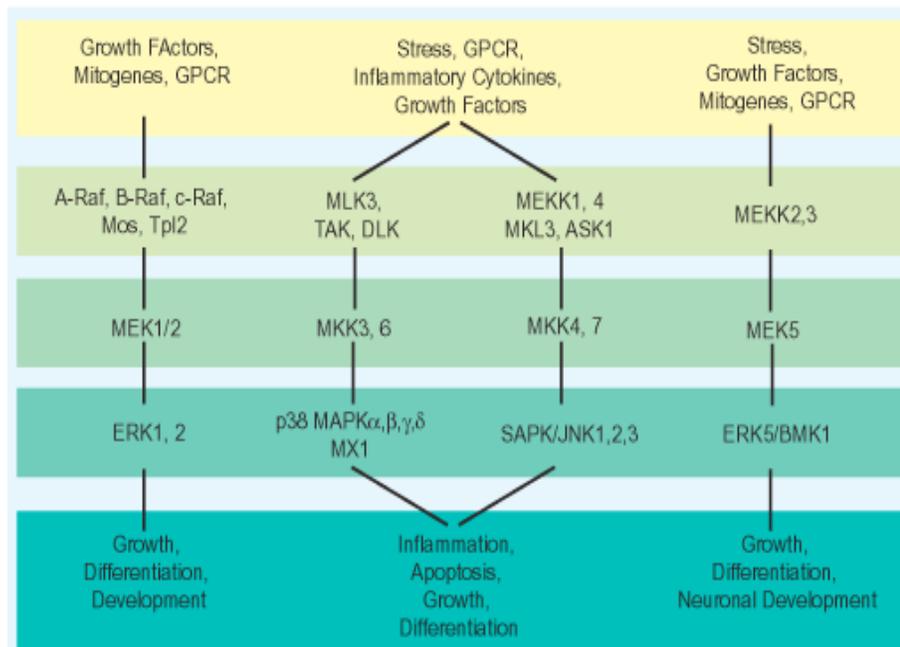
### **- De l'activation des RTK à la formation de cascades de signalisation:**

Deux étapes comprenant des événements de phosphorylation interviennent pour initier la signalisation à l'intérieur des cellules. La première étape consiste en une série de phosphorylations séquentielles qui ont pour but l'augmentation des propriétés catalytiques du domaine kinase. Ainsi, dans le cas du récepteur à l'IGF-1, plusieurs phosphorylations successives ont lieu. La première phosphorylation induit une augmentation significative de l'efficacité enzymatique. La seconde a quant à elle un effet très net sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat (Favelyukis *et al.*, 2001).

Le second événement de phosphorylations a lieu plus tardivement et a pour objectif la création de sites de fixation qui vont permettre le recrutement de molécules cytoplasmiques de signalisation, à domaine SH2 ou PTB (Phospho-Tyrosine Binding) principalement. Parmi les protéines partenaires les plus étudiées figurent Eps8, Gab1 ou encore IRS-1. Ces protéines vont à leur tour être phosphorylées par les RTK, afin d'initier une cascade de phosphorylation.

L'amorçage des voies de signalisation tyrosine kinase est souvent complexe, et fait intervenir un grand nombre de protéines adaptatrices. Les RTK possèdent plusieurs sites de recrutement de protéines adaptatrices, qui en possèdent elles-mêmes plusieurs, complexifiant à chaque niveau le réseau. Au cours du temps, des voies de signalisation dites canoniques ont été mises en évidence. Les plus étudiées sont très probablement les

MAP kinases, qui relayent les signaux extracellulaires au sein d'une cascade de phosphorylation, et vont activer des gènes cibles impliqués dans une grande variété de processus cellulaires fondamentaux tels que la migration, la prolifération ou encore la différenciation (Fig 32). Cependant au gré des progrès en matière de signalisation cellulaire, il est vite apparu que ces réseaux ne sont pas fermés mais au contraire, hautement interconnectés. Les RTK, au même titre qu'un certain nombre d'autres classes de protéines membranaires (récepteurs couplés aux protéines G, intégrines, récepteurs de l'immunité) apparaissent comme des nœuds de régulation.



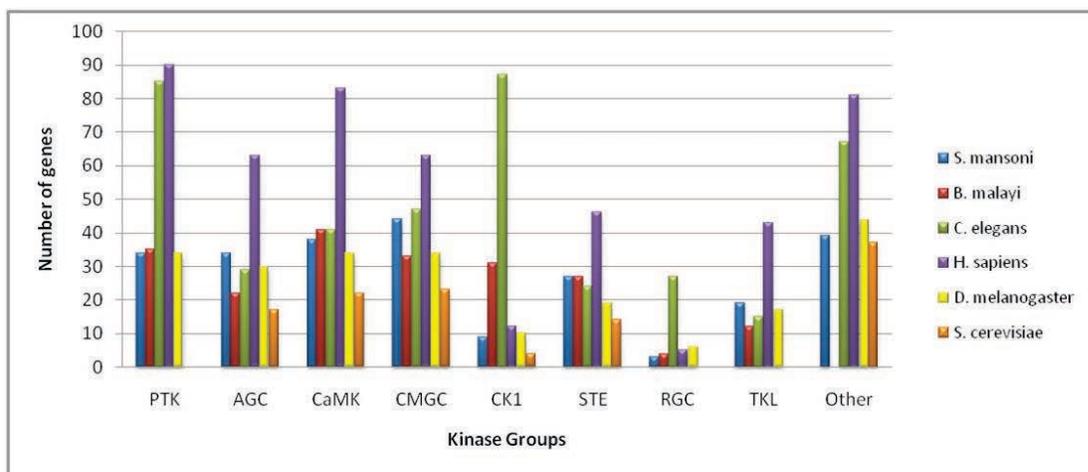
**Figure 32: Schéma illustrant les acteurs des 4 voies MAP Kinases présentes chez l'Homme:** Les voies MAPK ERK1/2, p38, SAPK/JNK et ERK5 sont impliquées dans la régulation d'une grande variété de processus cellulaires.

### 3. Les protéine kinases de *Schistosoma mansoni*

#### 3.1. Généralités

La récente publication du génome de *S. mansoni* (Berriman *et al.*, 2009) a permis de lister les protéine kinases potentielles du parasite, en pointant du doigt le potentiel thérapeutique de cette classe de protéines. Le groupe de Guilherme Oliveira (Belo Horizonte, Brésil) a identifié 252 ePK, ce qui correspond à près de 2% du protéome

prédictif total. Le kinome de *S. mansoni* possède des représentants de chaque groupe majeur d'ePK (Fig 33). Il a été noté cependant une légère sur-représentation des protéines appartenant au groupe des CMGC avec 44 homologues, contre respectivement 33 et 34 chez *Brugia malayi* et *Drosophila melanogaster* par exemple. Le groupe contenant le plus petit nombre de protéines est celui des RGC (3), une caractéristique partagée par plusieurs espèces, dont *B. malayi*, *D. melanogaster* et *Homo sapiens*. A noter que des mutations ont été détectées au niveau du site catalytique de ces trois protéines de *S. mansoni*, suggérant que celles-ci puissent être inactives.



**Figure 33: comparaison du nombre de gènes encodant des ePK chez *S. mansoni* et d'autres organismes modèles (Andrade *et al.*, 2011).**

### 3.1.1 Les Sérine/Thréonine Kinases de *S. mansoni*

Le kinome de *S. mansoni* contient 152 protéines annotées comme étant des Ser/Thr kinases. Elles appartiennent aux groupes suivants :

- **AGC** : 34 protéines au total, parmi lesquelles les kinases Akt, GRK, PKA, PKC, ou encore PKG. De manière intéressante, on ne retrouve pas de Protéine Kinase C Delta (PKCd), impliquée dans la régulation de la croissance, la différenciation et l'apoptose d'un certain nombre de cellules.
- **CAMK** : 38 membres, parmi lesquels les plus représentés sont les Calcium/Calmodulin-Regulated Kinases-like (CaMKL). Parmi ces protéines figurent la CaMK2, aux fonctions

encore inconnues chez *S. mansoni* mais identifiée comme cible thérapeutique potentielle par une approche de chémogénomique comparative (Caffrey *et al.*, 2009).

- **CMGC** : c'est la catégorie d'ePK la plus large, avec 44 membres.

Les familles de CMGC les plus étudiées sont les Cyclin-Dependent Kinases (CDKs) et les Mitogen-activated protein kinases (MAPK).

14 CDKs ont été identifiées chez *S. mansoni*, parmi lesquelles des protéines cibles pour traiter le cancer telles que Cdk1, Cdk4, Cdk8 et Cdk9, qui sont sensibles au flavopiridol par exemple.

En ce qui concerne les MAP Kinases, neuf représentants ont été identifiés. Parmi elles figurent les protéines ERK1/2, JNK, p38 et NLK, impliquées dans une très large variété de processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation, la croissance ou encore l'apoptose.

- **STE** : Ce groupe possède 22 protéines chez *S. mansoni*, dont 7 STE7 (MEK), deux STE 11 (MEKK) et 13 STE20 (MAPKKK). Ainsi cet important nombre de STE (plus de représentants que chez *D. melanogaster* ou *C. elegans*) permettrait au schistosome d'adapter ses réponses intracellulaires aux différents environnements dans lequel il se va se trouver tout au cours de son cycle de vie.

Un certain nombre d'expériences d'ARN interférence réalisées chez *C. elegans* ont mis en évidence l'essentialité de certaines CMGC mais également de plusieurs STE dans la survie du nématode. Parmi elles figurent Cdk1, Cdk7, SLK, Mek1/2 ou encore NLK, pour qui l'interférence est létale dès les premiers stades embryonnaires. Leurs homologues chez *S. mansoni* peuvent être de fait considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles, et leur fonction dans la biologie du parasite est assurément à explorer.

-**CK1** : 9 membres, avec des représentants des trois principales familles, VRK (Vaccinia Related Kinase), CK1 (Casein Kinase 1) et TTBK (Tau Tubulin Kinase). Ces protéines sont impliquées entre autres dans la réparation de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire.

-**TKL** : 19 chez *S. mansoni*, dont 15 possédant des caractéristiques de Ser-Thr kinases. On distingue parmi ces protéines Raf, les récepteurs au TGF $\beta$  I et II ou encore les Integrin-linked kinases (ILK).

- **Autres kinases** : il s'agit des protéines qui ne s'intègrent pas dans les autres groupes. On en distingue 38 chez *S. mansoni*. Parmi elles figurent les protéines Aurora, les Plk1 et 4 (SmSak) ou encore CDC7. A noter l'absence de la protéine IRAK (IL-1 Receptor Associated Kinase), probablement en lien avec le fait que le schistosome ne possède pas de système immunitaire.

### 3.1.2 Les Tyrosine Kinases de *S. mansoni*

C'est la catégorie d'ePK la plus étudiée chez *S. mansoni*. L'annotation actuelle du génome met en évidence la présence de 15 RTK et 19 CTK. Cependant, les analyses phylogénétiques réalisées par Andrade *et al.*, basées sur l'alignement de domaines kinase seuls, laisse penser que *S. mansoni* possède vraisemblablement une diversité de RTK plus importante que celle actuellement décrite:

\* **Les RTK**: ses 15 membres appartiennent aux familles suivantes : EGFR, FGFR, EphR, InsR, ROR, CCK4, MusK et VKR. Des domaines kinase proches de ceux des protéines Trk, Sev et Ryk ont également été mis en évidence, suggérant que le génome puisse également contenir des gènes codant ces récepteurs.

En revanche, le récepteur RET (rearranged during transfection) est absent chez le schistosome, malgré sa présence chez les arthropodes et certains plathelminthes tels que *Taenia asiatica*. *S. mansoni* ne possède pas non plus de PDGF/VEGF Receptor (Pvr), qui est présent chez la Drosophile et qui a une fonction majeure dans l'oogenèse.

\* **Les CTK**: le génome de *S. mansoni* possède des représentants de 10 familles majeures de TK dites cytosoliques : Abl, Ack, Csk, Fak, Fer, Fyn, Src, Syk, Tec, et Yes. De manière intéressante, les protéines Syk et Tec, impliquées dans la signalisation de l'immunité, sont retrouvées dans le génome de *S. mansoni* alors que le parasite ne possède pas a priori de système immunitaire. Il n'existe qu'une ou deux protéines spécifiques de chaque famille de CTK dans le génome du parasite (à l'exclusion de la super-famille des Src qui possède six représentants), n'autorisant que peu de redondance en termes de fonctionnalité. Ceci nous laisse donc penser que ces protéines sont essentielles à la transduction des signaux et pourraient être de ce fait des cibles thérapeutiques intéressantes (Avelar *et al.*, 2011).

## **3.2. Protéine kinases de *S. mansoni* étudiées expérimentalement et leurs rôles dans la biologie du parasite**

Les fonctions des protéine kinases représentent encore un large pan de la biologie du schistosome à explorer puisqu'à l'heure actuelle seules 16 ePK ont été étudiées expérimentalement. Les résultats indiquent des fonctions principalement dans la relation hôte-parasite, mais également dans la reproduction et le développement.

### **3.2.1 Les Récepteurs à activité protéine kinase**

- **SER:** Schistosome Epidermal Growth Factor Receptor.

C'est le premier récepteur tyrosine kinase à avoir été cloné et étudié chez *S. mansoni*, et ce dès 1992. Le premier article par Shoemaker *et al.*, rapportant la caractérisation de sa séquence codante, a mis en évidence la présence de transcrits alternatifs issus d'épissage. Parmi les différents variants observés, certains sont très probablement solubles et excrétés dans le milieu extracellulaire (Shoemaker *et al.*, 1992). Les premières expériences de localisation de SER ont permis de démontrer son expression dans les cellules musculaires (Ramachandran *et al.*, 1996). Par RT-PCR quantitative, il a ensuite été démontré une expression de SER à tous les stades parasitaires, et plus particulièrement chez l'adulte, avec une expression plus importante chez le mâle que chez la femelle (Vicogne *et al.*, 2004). L'étude fonctionnelle de la protéine en système hétérologue (cellules MDCK et ovocyte de Xénope) a permis de mettre en lumière deux aspects importants:

- tout d'abord la capacité de SER à fixer et à être activé par l'EGF humain. Ce résultat fut en réalité la première preuve montrant que des facteurs de croissance de l'hôte sont capables de réguler le développement du schistosome en fixant et activant un récepteur du parasite (Vicogne *et al.*, 2004). Cette notion a été depuis élargie à d'autres espèces parasites, et on sait maintenant que l'EGF humain est capable d'activer notamment EmER, l'EGFR d'*Echinococcus multilocularis* (Brehm, 2010).

- la conservation des voies de signalisation EGFR - dépendantes chez *S. mansoni*. En effet, lorsqu'il est exprimé en cellules de vertébré et activé par l'EGF humain, SER est capable d'activer comme chez de nombreux organismes la voie de signalisation Ras MAP kinase, aboutissant à l'activation et la phosphorylation de Erk1/2, (Vicogne *et*

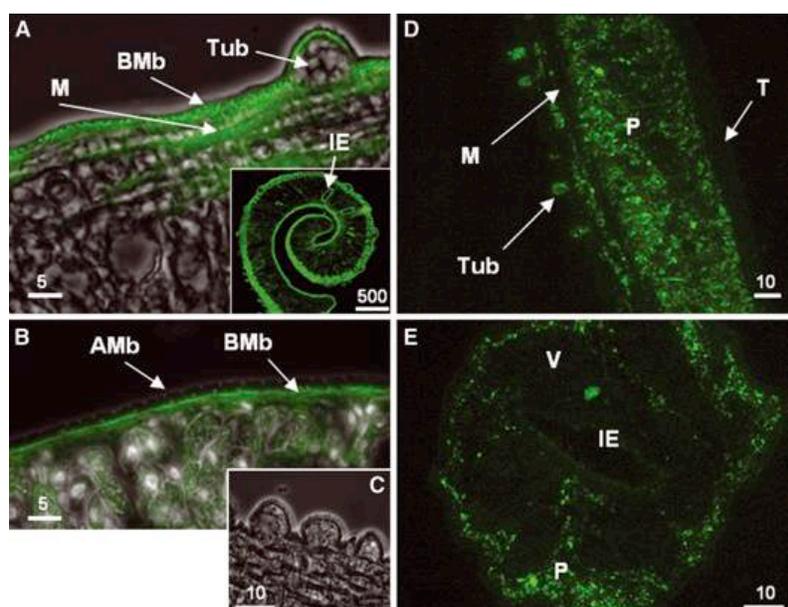
*al.*, 2004). Ainsi, il semble que la voie de signalisation EGFR soit conservée chez l'homme, mais également chez *C. elegans* ou *D. melanogaster*.

Enfin, l'EGF humain induit dans une culture *in vitro* de sporocystes une augmentation de l'incorporation de méthionine [<sup>35</sup>S] et de thymidine [<sup>3</sup>H]. Ces résultats pourraient être mis en relation avec le caractère mitogénique que revêt l'activation de la voie Erk1/2 dans de nombreux types cellulaires.

- **SmIR1 et SmIR2:** La spécificité de la niche biologique du schistosome, les veines mésentériques, a depuis plusieurs décennies soulevé un certain nombre de questions, notamment en ce qui concerne le métabolisme glucidique et le potentiel effet de l'insuline sur l'assimilation de glucose chez le parasite. Plusieurs études réalisées sur différentes espèces de Schistosomes ont rapporté des résultats contradictoires sur l'effet de l'insuline (Clemens et Basch, 1989; Levi-Schaffer et Smolarsky, 1981; Cornford, 1974). En 2007, deux récepteurs à l'insuline furent découverts par l'équipe du Dr Dissous. Ils ont été appelés SmIR-1 et SmIR-2 (Khayath *et al.*, 2007). La découverte de deux récepteurs à l'insuline était alors surprenante, l'idée générale voulant que seuls les deutérostomes aient plusieurs récepteurs à l'insuline. Plusieurs IR ont depuis été trouvés dans les génomes de *Daphnia pulex* et *S. japonicum* (Boucher *et al.*, 2010; You *et al.*, 2010). D'un point de vue structural, les deux protéines ne partagent que 26% d'identité de séquence, et ne possèdent pas certains motifs conservés comme les sites furine ou des sites de fixation aux Insulin Receptor Substrate (IRS) comme NPXY (dans le cas de SmIR-1). Aucun IRS n'a d'ailleurs été détecté dans le génome du parasite. Les deux gènes sont exprimés à tous les stades parasitaires, avec une expression plus importante de SmIR-2 que de SmIR-1. Par immunolocalisation, il a pu être montré la présence de SmIR-1 dans la membrane basale du tégument ainsi que dans les muscles et l'épithélium intestinal des vers adultes, à la fois chez les mâles et les femelles (Fig 34). SmIR-2 possède un profil d'expression différent, avec une localisation des protéines au niveau du parenchyme (Khayath *et al.*, 2007). Les IR de *S. japonicum* sont même évoqués comme candidats vaccins potentiels (You *et al.*, 2012).

L'utilisation d'un système de double hybride en levure a levé un premier doute sur la possible interaction insuline – IR. En effet, il a pu être démontré que les domaines de fixation au ligand de SmIR-1 et SmIR-2 sont capables de fixer la pro-insuline (Khayath *et al.*, 2007), tout comme le récepteur à l'insuline d' *E. multilocularis*, EmlR (Konrad *et al.*, 2003). Ils ne fixent pas en revanche pas le pro-IGF-1, au contraire de l'IR humain. La

confirmation d'un rôle de l'insuline humaine dans le métabolisme du schistosome a été apportée par Ahier *et al.* en 2008. En utilisant du 2-deoxyglucose radiomarqué au tritium, les auteurs ont prouvé qu'une concentration d'insuline de 1 $\mu$ M ajouté au milieu de culture durant 30 minutes augmentait considérablement la prise de glucose chez les adultes mais également chez les schistosomules (150 et 125% respectivement). A l'inverse, l'ajout d'inhibiteurs commerciaux d'IR, les tyrphostines AG538 et AG1024 diminue cette prise de glucose (Ahier *et al.*, 2008).



**Figure 34 : profils d'expression de SmIR-1 et SmIR-2 chez le ver adulte.** Images de microscopie de fluorescence de coupes de parasites adultes marquées avec des anticorps anti SmIR-1 (A, B) ou anti SmIR-2 (D, E) couplés à des anticorps conjugués à l'Alexa Fluor 488. SmIR-1 s'exprime dans la membrane tégumentaire basale, les muscles et l'épithélium intestinal des vers adultes. SmIR-2 est exprimé dans le parenchyme. Un contrôle négatif réalisé avec du sérum préimmun est présenté en C. Abréviations : M : muscles, P: parenchyme; BMb: membrane basale du tégument; AMb: membrane apicale du tégument; T: tégument; Tub: tubercule; V: cellules vitellines; IE: épithélium intestinal. Barres d'échelles en  $\mu$ m. D'après Khayath *et al.*, 2007.

SmIR-1 étant colocalisé avec les transporteurs de glucose SGTP1 et SGTP4 (Skelly et Shoemaker, 1996), il peut être suggéré une implication de ce récepteur dans la prise de glucose et la régulation du métabolisme glucidique. Si une fonction similaire pour SmIR-2 ne peut pas être exclue, il se pourrait néanmoins qu'une dichotomie « IR – IGFR » existe chez le parasite, avec SmIR-2 plutôt orienté vers la régulation de la croissance, comme c'est le cas pour les IGFR (Dissous *et al.*, 2007).

### - Les récepteurs au TGF $\beta$ SmT $\beta$ RI et SmT $\beta$ RII

Deux récepteurs au TGF $\beta$  ont été caractérisés chez *S. mansoni* : un récepteur de classe I de type Activin receptor-like kinase, SmT $\beta$ RI, et un récepteur de classe II, SmT $\beta$ RII (LoVerde *et al.*, 2007). En parallèle, deux ligands de type TGF $\beta$  ont été mis en évidence et clonés, SmBMP et SmlnAct. Les deux récepteurs sont exprimés à la surface du parasite.

De manière intéressante, il a été montré que SmT $\beta$ RII est capable d'interagir avec et d'activer par phosphorylation SmT $\beta$ RI, en présence des ligands humains TGF $\beta$ -1 et BMP-2. L'activation de SmT $\beta$ RI permet la phosphorylation de la protéine SmSmad2, qui va elle-même interagir avec SmSmad4 et se transloquer dans le noyau pour activer un certain nombre de gènes cibles. Parmi ces gènes cibles figurent SmGCP pour Gynecophoric Canal Protein, qui est un homologue de la Bêta-ig-h3, une protéine transmembranaire impliquée chez l'homme dans l'adhésion cellulaire.

Ainsi, il a été démontré que le traitement de couples de parasites adultes avec TGF $\beta$ -1 humain induisait une augmentation de l'expression de la SmCGP. A l'inverse, la diminution de l'expression de SmT $\beta$ RII par ARN interférence, induit une diminution de l'expression de SmCGP. L'ensemble de ces résultats semble ainsi mettre en évidence un rôle des TGF $\beta$  humains dans la régulation des interactions mâle femelle.

L'expression de SmT $\beta$ RI, SmT $\beta$ RII, SmlnAct et de certaines SmSmad dans les cellules vitellines semble également suggérer une fonction dans la reproduction et/ou l'embryogenèse. Ces suggestions sont appuyées par les résultats de Knobloch et collaborateurs, qui ont démontré que l'utilisation du TRIKI, un inhibiteur de TGF $\beta$ R diminuait de manière drastique la production d'œufs ainsi que l'activité mitotique (Knobloch *et al.*, 2007). Des expériences de micro-array ont de plus mis en évidence le fait que l'inhibiteur du TGF $\beta$ R, le TRIKI, induisait chez les femelles une diminution importante de l'expression de gènes impliqués dans la formation de la coquille de l'œuf. Parmi eux figurent fs800, Smp14 ou encore la tyrosinase SmTYR1 (Büro *et al.*, 2013). L'ensemble de ces résultats semble suggérer que la voie TGF $\beta$  joue également un rôle important au niveau de l'embryogenèse précoce et la formation de l'œuf.

### 3.2.2 Les protéines kinase cytosoliques

- **SmSLK:** Les Ser/Thr kinases appartenant au groupe Ste20 sont connues pour jouer un rôle important dans la prolifération, la croissance ou encore la morphogenèse. SLK, pour Ste20-like kinase est une GCK (Germinal center kinase) homologue de Ste20

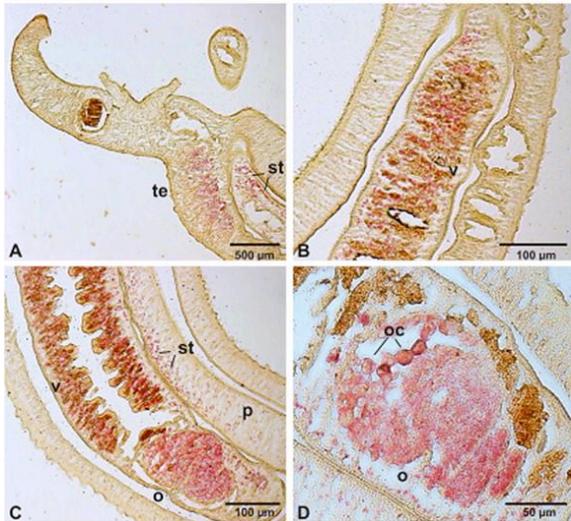
(Sterile-20) de *S. cerevisiae*, qui joue un rôle clé dans l'accouplement des levures en conduisant le signal initié par la fixation d'une phéromone à son récepteur. L'étude des SLK de vertébrés a mis en évidence leur capacité à activer les voies MAP Kinase. Les protéines SLK sont d'ailleurs considérées comme des MAP4K.

SmSLK s'exprime à tous les stades parasitaires (Yan *et al.*, 2007). Chez l'adulte, la protéine est retrouvée principalement au niveau du tégument mais également du parenchyme. Son expression en lignée cellulaire de mammifère et en ovocyte de Xénope a permis de montrer qu'elle participe à l'activation de la voie JNK. Des travaux réalisés au laboratoire suggèrent que SmSLK pourrait également se comporter comme une kinase activatrice de Plk1 (Plkk pour Polo-like kinase kinase) par un mécanisme caspase-dépendant (Dissous *et al.*, non publié). Son expression dans le tégument suggère que SmSLK pourrait être un acteur de la régulation des voies MAPK induites par l'environnement hôte (Yan *et al.*, 2007). En outre, SmSLK pourrait jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, et principalement dans l'activation de la Plk1 au cours de la transition G2/M.

- **Les Polo-like kinases SmPlk1 et SmSak** : Les Plks sont des kinases impliquées dans la progression du cycle cellulaire, et principalement pendant la phase M et la duplication du centriole. Ce sont des Ser/Thr kinases caractérisées par un domaine C-terminal appelé polo-box domain (PBD), qui est spécifique à cette famille de protéines. Ce domaine est impliqué dans la reconnaissance de phosphosubstrats et dans l'adressage de la protéine vers des compartiments subcellulaires particuliers. Les unicellulaires tels que la levure *S. cerevisiae* ou *T. brucei* possèdent une unique Plk, alors que les metazoaires en possèdent plusieurs (2 chez *D. melanogaster*, 5 chez *X. laevis* et *H. sapiens*). *S. mansoni* en possède deux, SmPlk1 et SmPlk4, également appelée SmSak (Long *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2012).

Les Plk1 sont principalement exprimées en fin de phase G2 et en phase M. De nombreuses études ont mis en évidence des fonctions de Plk1 dans la maturation du centrosome, mais également l'entrée en phase de mitose, la cytokinèse ainsi que la séparation des chromosomes (de Carcer *et al.*, 2011). La fonction de Plk1 la plus étudiée est assurément celle jouée lors de la transition G2/M, puisqu'elle contrôle directement la poursuite du cycle en phosphorylant et activant la phosphatase Cdc25C, activateur majeur du complexe MPF Cdk1/Cycline B. Cette protéine s'avère essentielle, puisqu'aussi bien la levure que la drosophile ou la souris ne peuvent survivre sans Plk1. Cette essentialité fait

de Plk1 une cible potentielle dans le cadre de la recherche de nouvelles drogues anti schistosome.



**Figure 35: profils d'expression de SmPlk1 chez le stade adulte.** Des expériences d'hybridation In Situ ont été réalisées sur des coupes d'adultes accouplés. SmPlk1 est exprimé principalement dans le vitellarium, les testicules et les ovaires. Un marquage des cellules sous-tégumentaires est également détecté chez les mâles et les femelles. Abréviations: te, testicules; o, ovaires; p, parenchyme; st, zone sous-tégumentaire; oc, ovocyte; v, vitellarium (D'après Long *et al.*, 2010).

La Plk1 de *S. mansoni*, SmPlk1, a été caractérisée au laboratoire par Thavy Long au cours de sa thèse. En utilisant principalement le modèle ovocyte de Xénope, il a pu être démontré que SmPlk1 est capable de remplacer la Plx1 endogène au sein de l'ovocyte et que son activité induit la transition G2/M. On a démontré par qPCR l'expression de SmPlk1 à tous les stades parasites. Des expériences d'hybridation *in situ* réalisées sur le stade adulte ont mis en évidence une forte expression des transcrits SmPlk1 au niveau des testicules, mais également des ovaires et des cellules vitellines, suggérant une implication dans la gamétogenèse et la formation de l'œuf (Fig 35). Ceci a été confirmé en culture *in vitro*, en utilisant un inhibiteur spécifique de Plk1, le BI2536. En effet, la mise en culture de couples de parasites avec 100nM de BI2536 entraîne chez le mâle une diminution du diamètre des lobes testiculaires ainsi que du nombre de spermatoocytes matures dans la vésicule séminale. Chez la femelle, on observe une diminution drastique du nombre d'ovocytes immatures, suggérant que SmPlk1 joue un rôle majeur dans la division des ovogonies.

- **Smp38** : La fonction de la MAP Kinase p38 a été étudiée au cours de la transition miracidium-sporocyste (Ressureição *et al.*, 2011). L'équipe de Walker a mis en évidence une forte activité de Smp38 au niveau du tégument du miracidium, et plus particulièrement au niveau des zones correspondant à la base des plaques ciliées, suggérant que l'activité

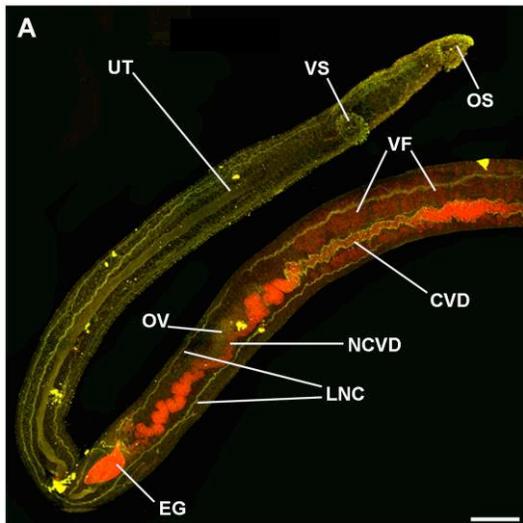
p38 pouvait avoir un rôle dans l'action locomotrice du miracidium. L'utilisation d'un inhibiteur de p38, le SB 203580, entraîne une augmentation de la vitesse de nage du miracidium, tandis que l'utilisation d'Anisomycine, un activateur de p38, diminue très fortement cette vitesse de nage. De plus, cette drogue accélère significativement la cinétique de perte des plaques ciliées, témoin de la transition miracidium-sporocyste. Par Western Blot, il a été démontré que le taux de phospho-Smp38 augmente au cours de la transition miracidium-sporocyste, et est retrouvée progressivement associée, en plus du tégument, aux cellules germinales et à la masse neurale, soulignant l'importance de l'activation de la voie p38 au cours de la transformation miracidium sporocyste.

L'importance de l'activation de la p38 a également été rapportée dans d'autres organismes invertébrés: dans la complétion de la métamorphose chez l'annélide *Hydroides elegans* (Wang et Qian, 2010), ou encore pour le développement des ailes au cours de l'embryogenèse de *D. melanogaster* (Adachi-Yamada *et al.*, 1999). En raison du caractère essentiel de p38 dans de nombreux organismes parasites, l'équipe de Walker postule que des molécules de type pyridinylimidazoles tels que le SB 203580 pourrait représenter une classe attractive de composés anti-parasitaires.

- **SmpPKA** : La sous-unité catalytique de la Protéine Kinase A a été clonée par Swierczewski et Davies en 2009, influencés par plusieurs articles relatant un possible rôle de l'AMPc dans la transformation miracidium-sporocyste et la locomotion des miracidiums (Swierczewski et Davies, 2009). Les traitements avec les inhibiteurs de PKA, H-89 et PKI 14-22 amide ont tous deux résulté en la mort des vers adultes *in vitro*. De même, des expériences d'ARN interférence ont également abouti à la mort de 75% des vers adultes sous 72h. Ces résultats mettent en exergue l'essentialité de cette kinase pour la survie du parasite.

En ce qui concerne les stades larvaires, les auteurs se sont focalisés sur le stade cercaire, qui possède les niveaux d'expression de PKA les plus élevés. Le traitement des cercaires avec respectivement 10µM de H-89 et 50µM de PKI 14-22 amide entraîne la mort des larves sous 3h (Swierczewski et Davies, 2010a). Ces résultats laissent donc penser que cibler l'activité catalytique de la PKA serait une bonne stratégie thérapeutique. De plus, l'importante conservation du domaine catalytique chez *S. japonicum* et *S. haematobium* (99%) suggère que cette stratégie puisse être applicable aux trois espèces majeures de Schistosome (Swierczewski et Davies, 2010b). D'un point de vue plus fonctionnel, une cartographie de l'activité kinase de la PKA a été réalisée chez l'adulte par

immunolocalisation, en utilisant un anticorps anti-PKA phosphorylée (De Saram *et al.*, 2013).



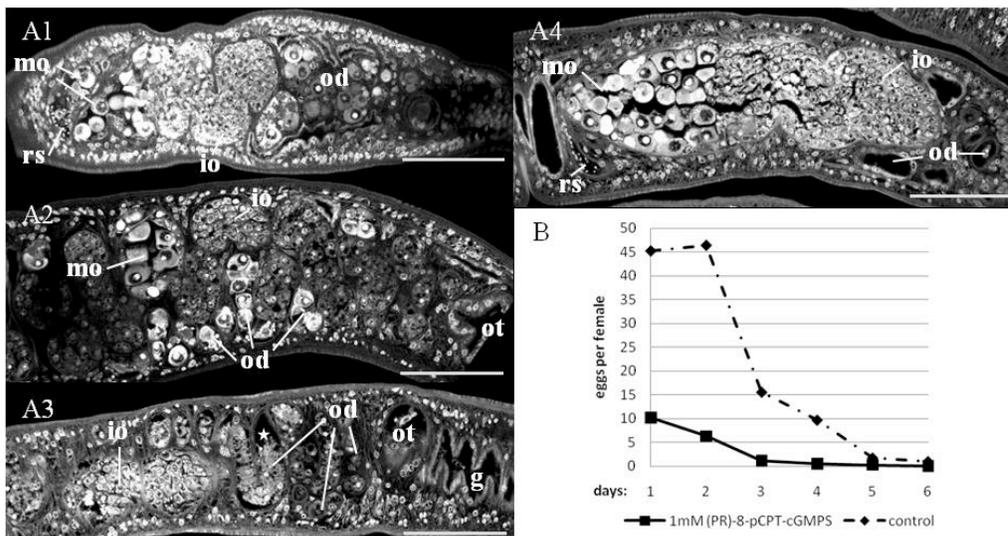
**Figure 36: Profils d'activité de la PKA chez le ver adulte.** Images de microscopie confocale de parasites marqués avec des anticorps anti PKA phosphorylée (vert) et de la rhodamine-phalloïdine (rouge). Une activité PKA intense est détectée dans le système nerveux périphérique du parasite. Abréviations: LNC, corde nerveuse longitudinale; OS, ventouse orale; VS, ventouse ventrale; CVD canal vitellin cilié; VF, follicules vitellins; NCVD, canal vitellin non cilié; UT, utérus; EG, œuf; OV, ovaire. Barre d'échelle: 100µm. D'après de Saram *et al.*, 2013.

L'activité PKA a été ainsi retrouvée principalement associée au tégument ainsi que dans les ventouses et la musculature du soma (Fig 36). De plus il a été relevé un marquage intense au niveau du système nerveux périphérique, marquage qui augmente d'intensité quand les parasites sont traités à la forskolin. Ce traitement augmente d'ailleurs de manière significative les fréquences de mouvements des parasites, qui vont présenter une hyperkinésie. L'ensemble de ces résultats suggère une fonction de la PKA au niveau de l'activité motrice et la communication nerveuse chez l'adulte.

- **SmPKC:** Peu de données sont disponibles concernant les protéines kinase C de *S. mansoni*. Bahia *et al* ont rapporté en 2006 le clonage et la caractérisation d'un premier membre de la famille des PKC, SmPKC1 (Bahia *et al.*, 2006).

SmPKC1 a été détectée dans la masse neurale, les cellules germinales, les vésicules de sécrétions, les plaques ciliées, le tégument et le térébratorium du miracidium (Ludtmann *et al.*, 2009). Au cours de la transformation miracidium-sporocyste, on observe un changement de profil de phosphorylation de SmPKC1, qui voit son activité se réduire au cours du temps. L'inhibition de l'activité PKC par le GF109230X engendre une accélération de la transformation en sporocyste, qui est caractérisée par une perte rapide des plaques ciliées. L'inactivation de l'activité kinase de SmPKC1 serait donc une étape importante pour la transformation du miracidium en sporocyste.

- **SmcGK1**: Les PKG sont des kinases dépendantes du GMP cyclique (cGMP-dependent protein kinases, ou cGKs). Elles sont connues pour avoir un rôle dans la locomotion, aussi bien chez des protozoaires pathogènes tels qu' *Eimeria* ou *Plasmodium*, mais également chez l'Homme.



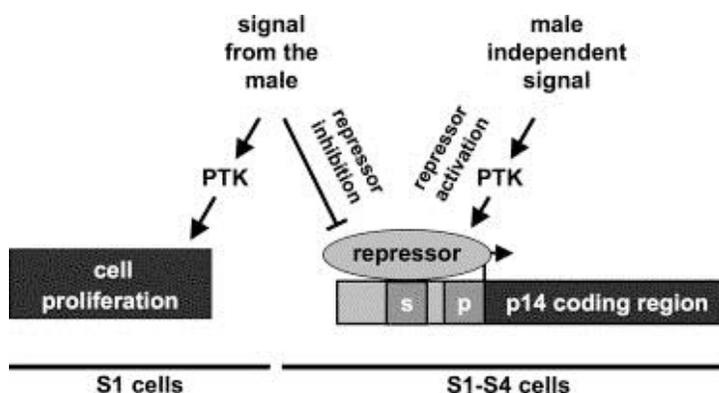
**Figure 37: Impact du traitement par l'inhibiteur (PR)-8-pCPTcGMPS sur la morphologie des organes reproducteurs de la femelle et de la ponte des œufs.** A1, A2, A3: Images de microscopie confocale mettant en évidence l'apparition d'un phénotype de congestion au sein des gonades après traitement par l'inhibiteur (PR)-8-pCPTcGMPS. A4: Ovaire contrôle non traité. Abréviations: g: tube digestif; io, ovocytes immatures; mo, ovocytes matures; od, oviducte; ot, oocyte; rs, réceptacle séminale. Barre d'échelle: 75µm). B: Comparaison de la production d'œufs de couples contrôles et de couples traités par 1mM de (PR)-8-pCPTcGMPS.

Une PKG a été identifiée chez *S. mansoni*, et appelée SmcGK1 (Leutner *et al.*, 2011). Elle est exprimée à tous les stades parasitaires. Chez l'adulte, des expériences d'hybridation *in situ* ont montré une expression dans les ovaires, les testicules et faiblement dans le vitellarium. L'utilisation d'un analogue inhibiteur du cGMP, le (PR)-8-pCPTcGMPS sur des couples d'adultes *in vitro* entraîne un phénotype Slomo pour slow motion, caractérisé par un ralentissement important des mouvements du parasite. Par microscopie confocale, les auteurs ont démontré l'apparition d'un phénotype de congestion au sein des gonades de la femelle, qui se caractérise par une augmentation importante du nombre d'ovocytes dans l'oviducte (Fig 37).

- **SmTK3**: La Src kinase SmTK3 est probablement la kinase la mieux caractérisée chez *S. mansoni*. Son expression détectée au niveau du parenchyme, mais également

dans les cellules vitellines et germinales des vers adultes ont vite laissé penser à une fonction dans la reproduction et la formation des œufs (Kapp *et al.*, 2004).

De plus, l'ajout d'herbimycine A, un inhibiteur de Src kinases, à des cultures de couples d'adultes *in vitro* diminue fortement et de manière dose-dépendante la synthèse d'ADN chez la femelle, mais, de manière intéressante pas chez les mâles (Knobloch *et al.*, 2006). De même, l'ajout de drogue a un effet négatif dose-dépendant sur la production des œufs. De façon surprenante, l'herbimycine A induit également chez les femelles une augmentation de l'expression de p14, et ce qu'elles soient appariées ou non, suggérant que la régulation de l'expression de p14 n'est pas uniquement régulée par des signaux induits par le mâle. Chez les femelles non accouplées, on n'observe plus de cellules vitellines hormis au stade S1. De plus il a été démontré que les femelles appariées n'expriment plus p14. L'équipe du Pr Grevelding suggère l'existence de deux voies de signalisation impliquant des protéine kinases Src-like: la première dépendante des signaux du mâle et à l'origine de la prolifération des cellules souches vitellines, et une seconde indépendante des signaux du mâle, entraînant la transcription du gène p14 (Fig 38). Parmi les protéine kinases Src-like potentiellement impliquées figurent SmTK3 mais également possiblement SmTK5.



**Fig 38 : Voies de signalisation Tyrosine Kinase hypothétiques, impliquant des TK de type Src-like au sein des cellules vitellines (Knobloch *et al.*, 2006).**

L'expression de SmTK3 dans différents systèmes hétérologues (cellules HEK293T, levure ou ovocyte de Xénope), ont permis de mettre en évidence un certain nombre de partenaires et/ou substrats, suggérant leur implication dans divers processus cellulaires, et notamment dans la réorganisation du cytosquelette. En effet, il a été démontré que SmTK3 est capable d'interagir avec les protéines Diaphanous (SmDia), SmRho1, p130Cas, l'intégrine  $\beta$ 1, la Vinculine ou encore la  $\beta$ -tubuline, toutes impliquées dans des

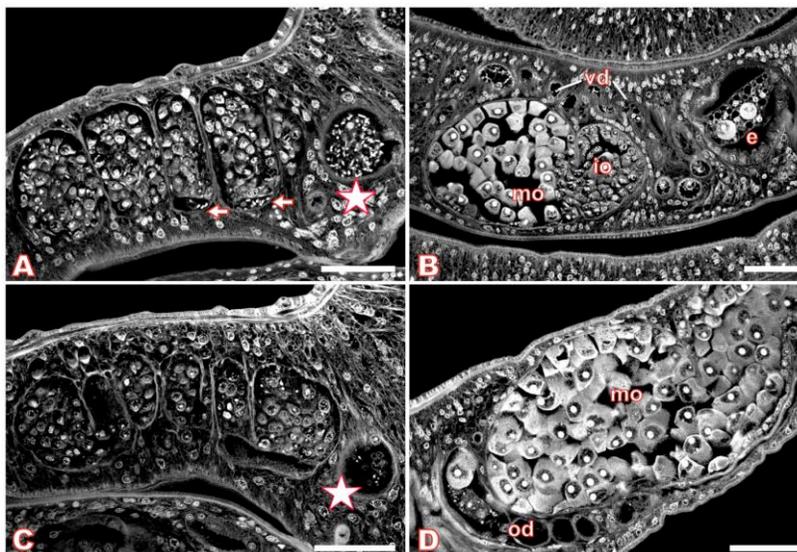
processus d'organisation du cytosquelette, principalement au niveau des plaques d'adhésion focales (Kapp *et al.*, 2004 ; Beckmann *et al.*, 2011, Quack *et al.*, 2009). Plus récemment, il a été démontré que SmTK3 interagit *in vitro* avec le RTK SmVKR1 et avec la CTK SmTK6, qui s'expriment tous deux dans les ovaires, suggérant une implication de SmTK3 dans des voies de signalisation kinase à l'origine de la croissance et/ou la maturation des ovocytes (Beckmann *et al.*, 2011).

- **SmTK4**: Les Syk kinases sont assez bien caractérisées chez les mammifères, notamment parce qu'elles possèdent des fonctions dans les voies de signalisation associées aux cellules immunitaires. Dans les cellules non hématopoïétiques, il leur a été décrit des rôles dans la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire ou encore la morphogénèse. Peu d'études ont été cependant menées chez les invertébrés. A noter que leur évolution au sein de ces organismes est peu linéaire, puisque *C. elegans* et *D. melanogaster* n'en possèdent pas, à l'inverse de l'éponge *Ephydatia fluviatilis* et du cnidaire *Hydra vulgaris* (Suga *et al.*, 1999; Manning, 2005). Les protéines Syk sont constituées d'un domaine kinase C-terminal et de deux domaines SH2 en tandem côté N-terminal. Ceux-ci sont impliqués dans la fixation de motifs contenant une tyrosine phosphorylée. Les deux domaines SH2 de Syk agissent en tandem pour reconnaître de manière plus spécifique les motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif). Elles sont d'ailleurs étudiées pour leur capacité à relayer les signaux de protéines transmembranaires telles que les intégrines ou les lectines. Chez *S. mansoni*, Syk a été nommée SmTK4 (Knobloch *et al.*, 2002). Elle est exprimée à tous les stades parasitaires. Chez l'adulte, on détecte des transcrits SmTK4 dans les cellules germinales, dans le parenchyme et également dans certaines zones sous tégumentaires.

Une recherche de partenaires homologues a été réalisée en utilisant le système du double hybride en levure, et les deux domaines SH2 de SmTK4 comme proie. Les résultats obtenus ont mis en exergue d'autres tyrosine kinases cytosoliques comme partenaires potentiels: il s'agit de SmTK3, SmTK5 (Fyn kinase) et SmTK6 (hybride Src/Abl). De manière intéressante, la mapmoduline, une protéine associée aux microtubules, a également été trouvée lors de ce criblage (Beckmann *et al.*, 2010).

Concernant l'étude de sa fonction chez l'adulte, deux stratégies ont été employées : l'ARN interférence et l'inhibition de la protéine à l'aide d'un inhibiteur spécifique, le piceatannol. Ces deux stratégies aboutissent à un phénotype similaire, à savoir des changements morphologiques important au niveau des gonades (Fig 39). De même, le traitement des

couples de parasites au piceatannol ralentit fortement la fréquence de ponte. L'ensemble de ces résultats suggère une fonction importante de SmTK4 dans l'ovogenèse et la spermatogenèse (Beckmann *et al.*, 2010).



**Figure 39 : Effet d'un traitement au piceatannol sur la morphologie des organes reproducteurs des vers adultes appariés.** Images de microscopie confocale des organes reproducteurs de parasites contrôles (A-B) et traités avec 70µM de piceatannol pendant 6 jours (C-D). Les mâles traités au piceatannol possèdent des lobes testiculaires réduits et très peu de spermatozoïdes dans la vésicule séminale. Chez la femelle, le traitement induit une augmentation du nombre d'ovocytes matures au sein de l'ovaire. Ces ovocytes sont répartis dans tout l'ovaire et plus seulement du côté postérieur. Abréviations: mo, ovocytes matures; io, ovocytes immatures; vd, vitellogénèse; od, oviducte; flèches: spermatozoïdes; astérisques: vésicule séminale. Barre d'échelle: 40µm. D'après Beckmann *et al.*, 2010.

- **SmTK6:** La Tyrosine kinase SmTK6 a été identifiée en premier lieu comme partenaire d'interaction de SmTK3. Des analyses phylogénétiques réalisées avec des homologues de Src et Abl ont révélé que celle-ci ne se place ni dans l'un ni dans l'autre de ces groupes de CTK, et ce en dépit de son architecture protéique similaire à celle des protéines Src et de SmTK3 (Beckmann *et al.*, 2011). En ce qui concerne la sensibilité aux drogues, il a été démontré que SmTK6 est sensible à la fois aux inhibiteurs de Src type herbimycine, et aux inhibiteurs d'Abl tels que l'Imatinib.

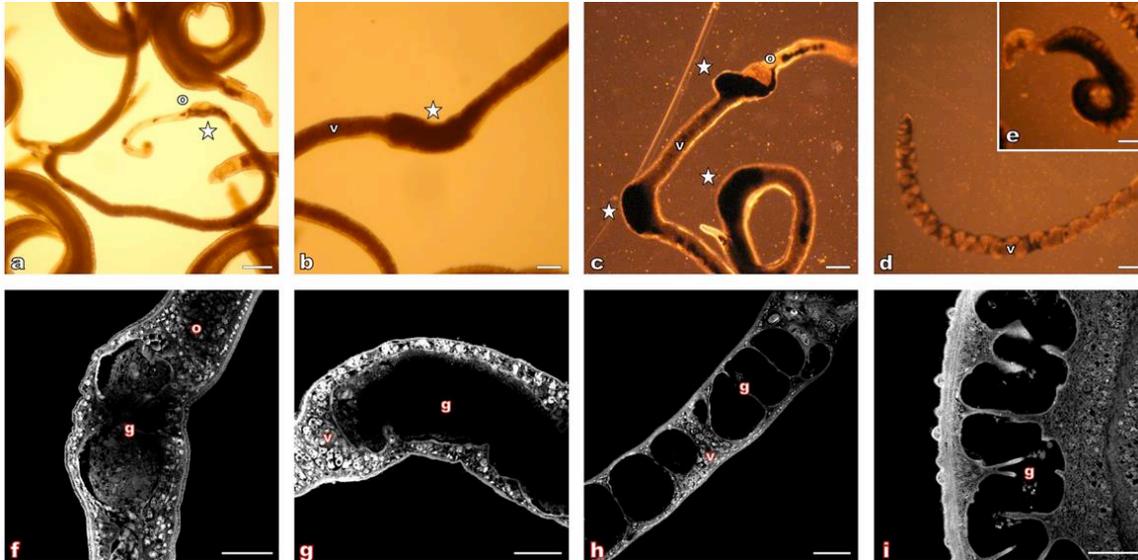
Une recherche de partenaires de voies de signalisation a mis en évidence SmTK3, SmVKR1 mais également SmDLG (Discs-large), une protéine impliquée dans la croissance des ovocytes au cours de l'ovogenèse. L'expression de SmDLG au sein des gonades et des cellules vitellines suggère qu'il puisse y exister un axe SmVKR1-

SmTK3/4/6-SmDLG au sein des ovaires, responsables de la croissance ovocytaire (Beckmann *et al.*, 2011).

- **SmAbl1 et SmAbl2:** Les protéines SmAbl1 et SmAbl2 ont été caractérisées après la découverte de SmTK6, afin de déterminer si celle-ci était ou non la seule Abl-like du génome de *S.mansoni* (Beckmann et Grevelding, 2010). Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré l'expression des deux gènes dans les organes reproducteurs, mais également le vitellarium, certaines cellules du parenchyme et le gastroderme.

Afin de comprendre les fonctions des protéines Abelson chez *S. mansoni*, les auteurs ont mis en culture des couples de vers adultes en présence d'Imatinib mesylate, un inhibiteur d'Abl utilisé avec succès dans le traitement de certains cancers. L'intérêt premier d'utiliser l'imatinib est sa très grande spécificité de cible. En effet, l'imatinib est connu pour cibler la protéine chimérique BCR-Abl, mais également et uniquement cKIT et les PDGFR. Ces RTK étant absents du génome de *S. mansoni*, il est aisé d'imaginer que cette drogue soit uniquement capable de cibler Abl chez le parasite. Des expériences d'inhibition en ovocyte de xénope ont également été menées, et montrent qu'à la fois SmAbl1 et SmAbl2 sont sensibles à l'Imatinib.

Des concentrations d'Imatinib de 25 à 100µM ont été testées, et toutes entraînent une diminution significative de la survie des parasites dès 72h. Il a été remarqué chez ces parasites traités l'apparition de renflements que Beckmann et Grevelding considèrent comme une conséquence de la désagrégation du gastroderme (Fig 40). En effet, l'observation en microscopie confocale des couples de parasites traités fait apparaître des dégradations majeures au niveau du tube digestif, avec notamment une désintégration du gastroderme. En ce qui concerne les gonades, le traitement par l'imatinib induit des phénotypes très marqués avec entre autres une désorganisation des ovaires et la présence de spermatocytes non différenciés dans la vésicule séminale. Le potentiel de l'imatinib est d'autant plus intéressant que la drogue est d'ores et déjà sur le marché, ce qui signifie que les données sur sa toxicité et sa biodisponibilité sont connues. Des expériences animales sont d'ailleurs actuellement en cours pour déterminer le potentiel de l'imatinib à réduire/abolir l'infection *in vivo* dans le laboratoire du Pr Grevelding.



**Figure 40 : Impact de l'imatinib sur la fitness de couples de parasites adultes.** Images de microscopie à champ clair et confocale mettant en évidence les phénotypes engendrés par un traitement à l'imatinib sur le parasite au stade adulte. Après 24h de traitement avec 100 $\mu$ M d'imatinib, les parasites présentent des renflements en divers endroits du corps des vers (a-c, f et g). Après 96h de traitement à 10 $\mu$ M, ces renflements en font plus fréquents et de manière plus étendue tout au long du corps du parasite (d-e, h-i). Abréviations: g, tube digestif; o, ovaire; v, vitellarium. Barres d'échelle: (a-e) 50 $\mu$ m, (f-i) 100 $\mu$ m.

- **SmFes:** La protéine SmFes a été clonée et caractérisée (Bahia *et al.*, 2007; Ludolf *et al.*, 2007) mais peu de données sont disponibles à l'heure actuelle. On sait néanmoins qu'elle est exprimée à tous les stades parasitaires, et que les protéines sont plus abondantes dans les stades cercaires et les schistosomules nouvellement transformés (Bahia *et al.*, 2007). SmFes n'est en revanche pas détectée dans les schistosomules de 7 jours maintenus en culture *in vitro*. Des expériences d'immunolocalisation ont été réalisées sur les stades miracidium, cercaire et schistosomule, mettant en exergue la présence de la protéine dans le térébratorium ainsi que dans le tégument des cercaires et schistosomules.

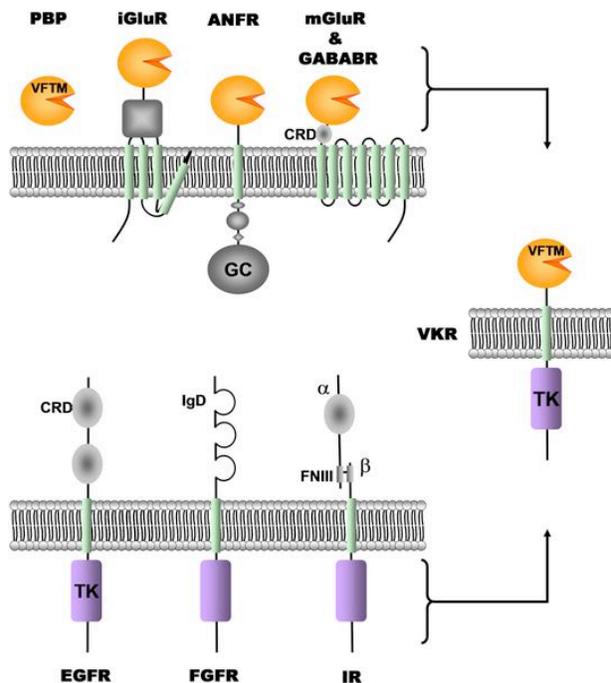
Ceci suggère une probable implication de SmFes dans la pénétration du miracidium dans son hôte intermédiaire, et dans la transformation miracidium-sporocyste.

## 4. Les Récepteurs Venus Kinase ou VKR

### 4.1. Découverte de SmRTK-1, un RTK atypique

La découverte du premier VKR de *S. mansoni* est en réalité complètement fortuite, et le résultat de tentatives préliminaires de clonage d'un récepteur à l'insuline du parasite. En effet, en utilisant des stratégies de PCR à amorces dégénérées, Jérôme Vicogne, alors étudiant en thèse dans l'équipe de Colette Dissous, a amplifié puis cloné deux séquences codant des RTK possédant un domaine catalytique proche de celui du récepteur à l'insuline humain (Vicogne *et al.*, 2003). Si le second récepteur, SmRTK-2, possède un domaine extracellulaire caractéristique de ceux des IR, SmRTK-1 possède un domaine extracellulaire atypique, composé d'un module VFT, pour Venus FlyTrap, similaire à celui des récepteurs couplés aux protéines G de classe C (Fig 41).

Les domaines VFT représentent de larges structures composées de deux lobes connectés entre eux par des séquences charnières très flexibles capables de promouvoir la fermeture du complexe suite à la fixation d'un ligand (Pin *et al.*, 2003). Ce mécanisme est similaire à celui de la fermeture des feuilles de la plante carnivore *Dionea muscipula* (appelée Venus Flytrap en anglais) sur ses proies, d'où le nom du module. Les domaines VFT sont retrouvés chez une large variété de protéines comme les protéines périplasmique bactériennes (PBP), impliquées dans le transport de petites molécules de type ions, oses ou acides aminés (O'Hara *et al.*, 1993). Les domaines VFT sont également retrouvés chez l'homme, principalement dans les récepteurs couplés aux protéines G de classe C tels que les récepteurs au GABA (GABABR1 et GABABR2), les récepteurs ionotropiques et métabotropiques au glutamate, le récepteur à l'ANF (ANFR) ou encore les récepteurs sweet taste. Ces derniers fixent également des molécules de petit poids moléculaire tels que des ions, des sucres, des acides aminés, des phéromones ou encore des petits peptides. Ces modules sont très étudiés principalement dans le cadre de la compréhension des mécanismes d'activation des GPCR de classe C neuronaux, qui jouent des rôles majeurs dans les mécanismes régissant l'addiction aux drogues, l'anxiété, la sensation de douleur, l'épilepsie ou encore la schizophrénie.

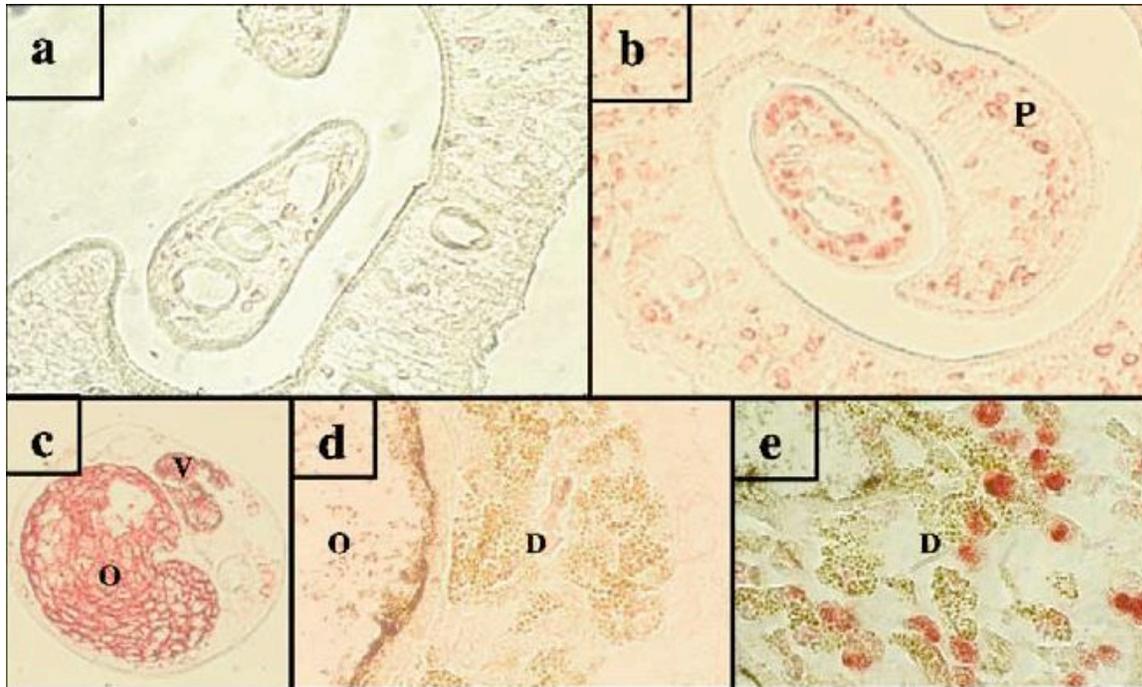


**Figure 41: Structure d'un VKR.** Ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire de type VFT ou VFTM (Venus FlyTrap Module) similaire à ceux que l'on retrouve dans les protéines périplasmiques bactériennes (PBP), les récepteurs à l'ANF ou encore les récepteurs ionotropiques et métabotropiques au glutamate. Ils possèdent un domaine intracellulaire de type TK similaire à ceux d'autres RTK et plus particulièrement à celui du récepteur à l'insuline.

Cette association entre un domaine VFT et un domaine TK n'avait jamais été décrite auparavant, et les VKR restent encore à l'heure actuelle les seules molécules connues à posséder une telle architecture. Il apparaissait alors essentiel d'entreprendre la caractérisation moléculaire de ce récepteur atypique. Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

**An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus Flytrap module.** Vicogne J, Pin JP, Lardans V, Capron M, Noël C, Dissous C. *Mol Biochem Parasitol.* 2003 Jan;126(1):51-62.

L'analyse *in silico* du domaine TK confirma dans un premier temps la présence des six motifs essentiels à l'activité Tyrosine Kinase, ce qui autorisait alors à penser que ce récepteur puisse être actif. L'expression de SmRTK-1 fut démontrée dans tous les stades parasitaires par PCR quantitative. Son profil d'expression chez l'adulte fut également déterminé par hybridation *in situ*, mettant clairement en évidence une abondance des transcrits au niveau de l'ovaire et de l'oviducte (Fig 42). Un marquage plus faible fut également observé dans le parenchyme. Des expériences similaires menées sur les miracidiums et les sporocystes ont également révélé la présence de transcrits SmRTK-1 dans les cellules entourant la masse neurale.



**Figure 42: Profils d'expression de SmRTK-1 chez le parasite adulte.** Images d'hybridation in situ mettant en évidence la présence de transcrits SmRTK-1 dans le parenchyme du parasite mâle (b) et dans l'ovaire et l'oviducte des femelles (c et e). Les contrôles négatifs (a et d) ont été réalisés avec une sonde sens.

L'ensemble de ces résultats fit suggérer une fonction potentielle de ce récepteur dans la reproduction, le développement des stades larvaires voire la communication mâle-femelle. Cependant la question principale soulevée par la découverte de ce récepteur concerne son caractère atypique. Il était important de déterminer si la présence de ce gène était une particularité propre au schistosome ou s'il était présent dans d'autres espèces, formant de fait une nouvelle famille de récepteurs.

#### **4.2. les VKR : une famille de récepteurs Tyrosine Kinase atypiques**

La recherche d'homologues à SmRTK-1 se fit initialement par recherche *in silico*, par la méthode de BLAST, à travers les bases de données génomiques : NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), Vectorbase ([www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)), Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) et certaines bases de données dédiées, comme celles de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (<http://urchin.nidcr.nih.gov/blast/index.html>). Par

cette méthode, 15 autres récepteurs appelés dès lors VKR pour Venus Kinase Receptor furent découverts, principalement dans des génomes d'arthropodes (Fig 43).

Les résultats de cette étude ont été présentés dans l'article suivant :

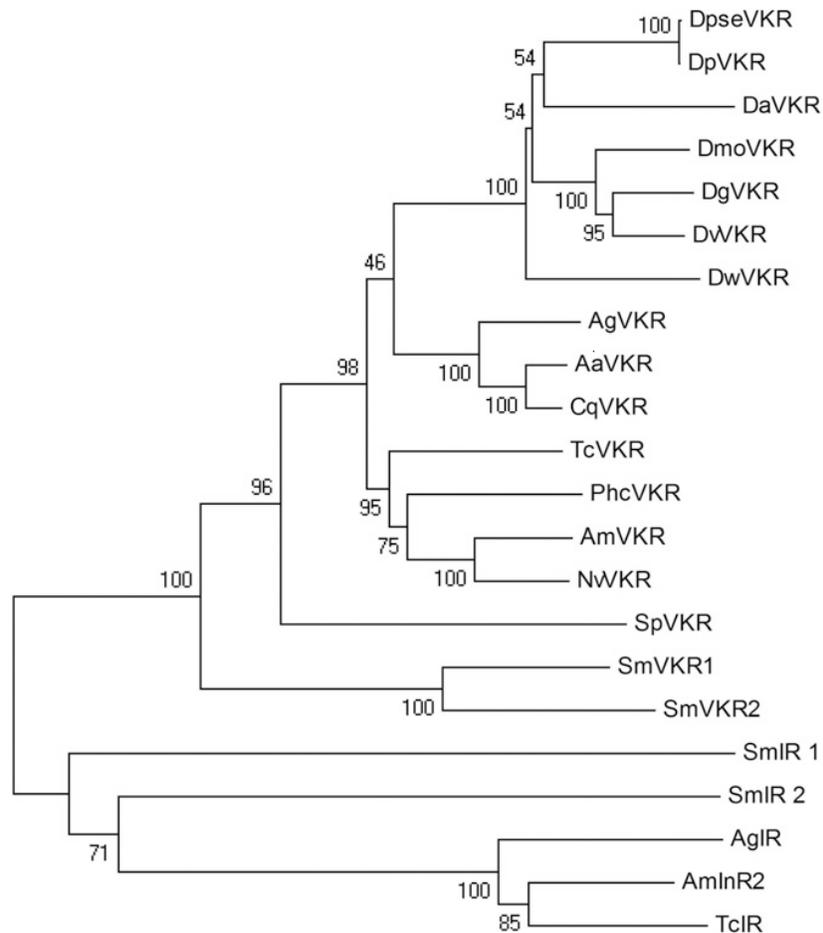
**A new family of receptor tyrosine kinases with a venus flytrap binding domain in insects and other invertebrates activated by aminoacids.** Ahier A, Rondard P, Gougnard N, Khayath N, Huang S, Trolet J, Donoghue DJ, Gauthier M, Pin JP, Dissous C. *PLoS One*. 2009 May 21;4(5):e5651.

Parmi les espèces possédant un VKR figurent des organismes d'intérêt sanitaire et économique, tels que l'abeille mellifère *Apis mellifera*, les insectes vecteurs *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* et *Culex pipiens*, ou le pou de corps *Pediculus humanus corporis*. Malgré le nombre important de génomes vertébrés disponibles, aucun *vkr* n'a été retrouvé ce qui suggère fortement que cette famille de récepteurs soit restreinte aux organismes invertébrés. Il semble également qu'aucun génome de nématode, y compris l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans*, ne possède de *vkr*. Enfin, de manière étonnante, si des *vkr* ont été retrouvés chez plusieurs espèces de drosophiles, le génome de *Drosophila melanogaster* ne semble pas posséder le gène. C'est d'ailleurs probablement l'absence de *vkr* dans les génomes de ces deux organismes invertébrés modèles qui explique pourquoi ces récepteurs n'ont pas été découverts plus tôt.

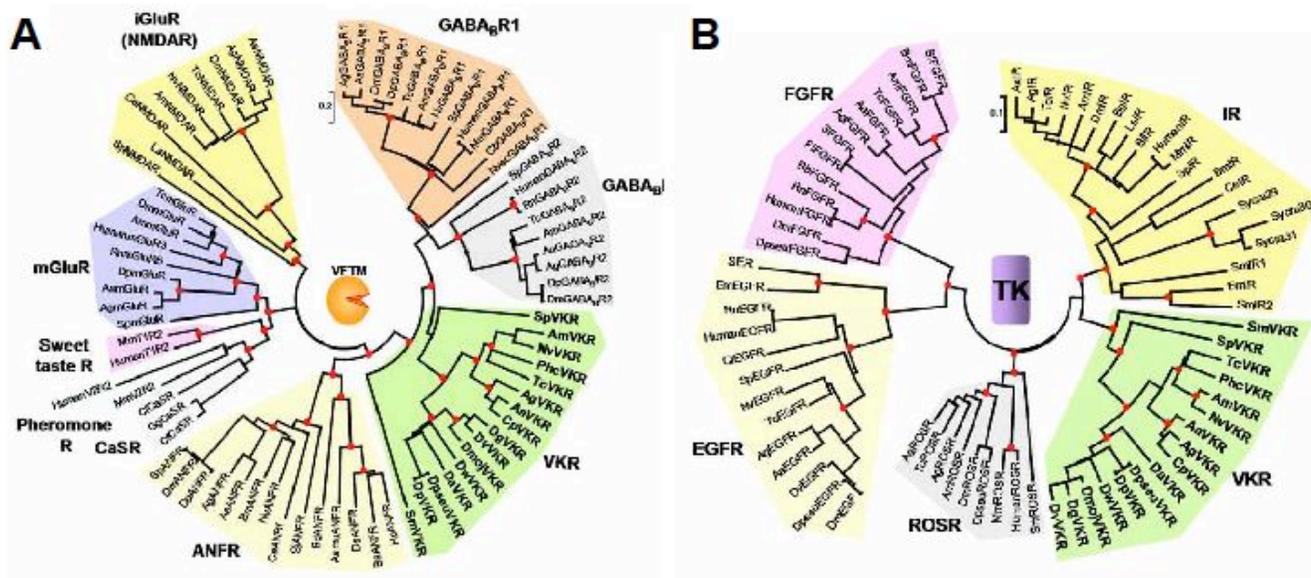
La quantification des transcrits *vkr* chez certaines de ces espèces semble conforter les résultats obtenus précédemment chez *S. mansoni*, avec une expression préférentielle de ces transcrits dans les ovaires de *S. purpuratus* et *A. gambiae*, ainsi que dans les stades larvaires des arthropodes *Tribolium castaneum* et *A. mellifera*. Des analyses phylogénétiques réalisées sur les modules VFT et TK isolés ont permis de confirmer la monophylie des VKR, renforçant de ce fait le concept de famille de récepteurs.

Les gènes *vkr* sont hautement variables en taille et mesurent entre 4 et 60 kb. Leur structure intron-exon est également variable, passant d'une relative simplicité (4 exons chez les arthropodes) à une architecture plus complexe (21 exons chez l'oursin *S. purpuratus*). On note cependant une conservation inter-phyla de certaines jonctions intron-exon, principalement dans les séquences codant les modules fonctionnels VFT et TK. Lors de mon arrivée au laboratoire en 2009, un second VKR a été découvert chez *S. mansoni* et a été appelé SmVKR2. La détermination de sa séquence codante nous a

permis d'échafauder un nouvel arbre phylogénétique confirmant son appartenance à la famille des VKR (Fig 43 et 44), portant à 17 le nombre de récepteurs identifiés.



**Figure 43 : Analyse phylogénétique des VKR.** Les relations phylogénétiques des différentes protéines ont été calculées avec les séquences des organismes suivants: *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). L'arbre est enraciné en utilisant les séquences protéiques des IR suivants comme outgroup: *S. mansoni* (SmIR-1; AAN39120; SmIR-2; AAV65745), *A. mellifera* (AmInR2; XP\_001121597), *T. castaneum* (TcIR; XP\_975373), *A. gambiae* (AgIR; XP\_320130).



**Figure 44: Les VKR représentent une famille de RTK monophylétique.** A: relations phylogénétiques entre le domaine VFT des VKR et d'autres domaines VFT parmi lesquels figurent les récepteurs métabotropiques et ionotropiques au glutamate, à l'ANFR, et des récepteurs au GABA. B: Relations phylogénétiques entre les domaines TK des VKR et ceux d'autres RTK tels que les EGRF, les IR, les ROR et les FGFR. (D'après Ahier *et al.*, 2009).

Afin de comprendre le rôle de cette famille de récepteurs dans la biologie des invertébrés, il apparaissait nécessaire d'étudier la protéine d'un point de vue moléculaire. Le choix de l'équipe s'est alors porté sur AmVKR, le VKR de l'abeille *Apis mellifera*. Des tests d'expression de la protéine recombinante en systèmes hétérologues (cellules humaines HEK293T et S2 de drosophile) ont dans un premier temps confirmé l'activité TK du récepteur.

Un modèle tridimensionnel du domaine VFT du VKR de l'abeille, AmVKR, a été généré, et a mis en évidence la présence d'une poche de fixation qui pourrait être capable de fixer des acides aminés. En effet dans ce modèle, basé sur la structure cristallographique du domaine ligand du récepteur au glutamate mGluR1, on observe une conservation de certains résidus impliqués dans la fixation des groupements  $\alpha$ -COOH et  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>. On ne retrouve cependant pas de conservation des résidus D318 et K409, impliqués dans la fixation de l'acide carboxylique de la chaîne latérale du glutamate, suggérant que le ligand puisse être différent. Ces suppositions ont été soumises à expérimentation, et il a pu être montré en système hétérologue qu'AmVKR est effectivement activable par des acides aminés. Parmi les différents acides aminés testés dans ce modèle, seule la L-arginine à une concentration de 100 $\mu$ M s'est révélée activatrice. Etant donné que tous les RTK connus agissent en oligomères, il paraissait intéressant de vérifier que les VKR soient également capables d'interagir. Des analyses

bioinformatiques ont permis de déterminer un interface de dimérisation situé à l'opposé de la poche de fixation au ligand. Cet interface de dimérisation commun aux ANFR et GPCR de classe C est d'ailleurs retrouvé conservé chez la plupart des VKR. Des expériences de FRET en cellules HEK293T ont confirmé que les VKR d'*Apis mellifera* interagissent pour former des dimères à la surface des cellules.

### **4.3. Projet de thèse**

Mon projet de recherches a été principalement centré sur la caractérisation fonctionnelle des deux VKR de *S. mansoni*, SmVKR1 et SmVKR2. Il vise à apporter de nouvelles connaissances sur l'existence et la fonction des représentants de la famille VKR et à envisager des possibilités de considérer ces récepteurs, voire les protéines de signalisation qui leur sont associées, comme de nouvelles cibles thérapeutiques contre les schistosomes. Le travail de recherches a été organisé selon les trois axes suivants:

- Tout d'abord, en ce qui concerne l'évolution des VKR, il apparaissait important de déterminer quelles espèces possèdent le gène au sein de leur génome. Cette famille de récepteurs est vraisemblablement restreinte aux invertébrés, comme en atteste leur absence de l'ensemble des génomes connus de métazoaires supérieurs. Les avancées constantes en matière de séquençage et d'annotation de génomes devaient assurément permettre de découvrir des VKR chez d'autres espèces appartenant à des phyla autres que les plathelminthes, les arthropodes et les échinodermes. De même, leur présence au sein d'organismes protostomes et deutérostomes place l'émergence de cette famille avant la radiation des bilatériens. De manière simpliste, tous les organismes bilatériens sont donc susceptibles de posséder un VKR dans leur génome. D'autre part, le schistosome étant un modèle difficile à manipuler, avec peu d'outils moléculaires et génomiques disponibles, la présence de VKR au sein d'organismes modèles plus accessibles pouvait ouvrir des perspectives intéressantes quant à une meilleure compréhension du rôle des VKR dans la biologie des organismes.

Le premier axe de ma thèse a donc concerné la recherche *in silico* de nouveaux gènes *vkr*. Des analyses de séquences et phylogénétiques ont été envisagées afin d'observer le degré de similarité des récepteurs, la conservation de leur activité kinase ainsi que de la poche de fixation au ligand au sein du domaine VFT. Ces analyses ont permis un meilleur aperçu de la distribution des VKR au sein des invertébrés, ainsi que de leurs mécanismes d'activation.

- Le second axe de ma thèse a été centré sur l'étude de la fonction des VKR de *S. mansoni*, SmVKR1 et SmVKR2. Il s'agissait dans un premier temps de déterminer les profils d'expression des deux gènes chez le ver adulte. La forte expression des VKR dans les organes reproducteurs ainsi que l'expression de SmVKR1 dans les ovaires suggère qu'ils pourraient avoir une fonction dans la reproduction du parasite. Des expériences d'ARN interférence ont été menées afin de mieux comprendre la fonction de ces récepteurs chez le ver adulte.

En parallèle, la caractérisation biochimique des récepteurs a été envisagée. Les différentes étapes liées à l'activation des VKR ont été analysées, incluant la recherche de ligands, la détermination de leur capacités d'homo- voire hétéro-dimérisation, ainsi que l'identification des partenaires d'interaction et des voies de signalisation activées.

La déorphanisation des récepteurs ainsi que la détermination des capacités de dimérisation et l'analyse des voies de signalisation ont été réalisées dans le modèle ovocyte de Xénope, en collaboration avec le Dr Katia Cailliau et le Pr Jean-François Bodart (EA 4020, Université de Lille1). La recherche de partenaires parasitaires homologues a été entreprise par criblage d'une banque d'ADNc de *S. mansoni* en levure par la technique double hybride.

- La dernière partie de mon projet de thèse s'est intéressé aux RTK et plus principalement aux VKR comme cibles thérapeutiques. Dans l'optique de la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques, les protéine kinases et plus particulièrement les TK ont été avancées comme des candidats de choix. En effet, plusieurs études mettent en évidence le caractère essentiel de plusieurs TK cytoplasmiques, leur inhibition pouvant rapidement mener à la mort du parasite *in vitro* (pour revue voir Dissous et Grevelding, 2010). Cette partie vise à montrer la preuve de concept qu'il est possible de tuer le parasite en ciblant l'activité kinase des RTK, comme cela est le cas pour le traitement des pathologies cancéreuses. Etant donnée la forte homologie des domaines TK des VKR avec ceux des récepteurs à l'insuline SmIR1 et SmIR2, il est tentant de supposer qu'une inhibition simultanée de ces récepteurs puisse être possible avec une seule molécule. Le cas échéant, le traitement pourrait avoir un impact important sur la fécondité et sur la survie du parasite. Plusieurs inhibiteurs de TK ont été testés en parallèle en ovocyte de Xénope sur les domaines catalytiques recombinants et *in vitro* sur les stades adulte et schistosomule, afin d'observer l'impact du traitement sur la fécondité et la survie du parasite.



# Résultats



# 1. Les récepteurs Venus Kinase : structure et évolution

## 1.1. Actualisation des données phylogénétiques concernant les VKR

Au cours de sa thèse, Arnaud Ahier a mis en évidence la présence de VKR dans 16 espèces d'invertébrés, principalement des arthropodes. Ses résultats ont mis pour la première fois en avant leur présence ailleurs que chez *S. mansoni*, introduisant donc la notion de famille pour ces récepteurs (Ahier *et al.*, 2009). Depuis, les avancées constantes en matière de séquençage de génome ont permis la publication d'importantes quantités de données. Des efforts particuliers ont été consentis pour l'étude des génomes d'invertébrés, ouvrant la voie à la découverte potentielle de VKR dans d'autres espèces et phyla.

Le premier article, intitulé **The venus kinase receptor (VKR) family: structure and evolution**, est le résultat d'un travail réalisé *in silico* dans les bases de données génomiques suivantes : JGI, NCBI, Vectorbase et Flybase. Cette étude réalisée au cours de ma seconde année de thèse nous a permis de mettre en avant la présence de 40 VKR au sein de 36 espèces d'invertébrés.

Parmi elles figurent des représentants des six phyla invertébrés suivants : Cnidaires, Arthropodes, Plathelminthes, Annélides, Mollusques et Echinodermes. Le phylum Arthropode est le plus représenté, avec 29 VKR découverts au sein de 27 espèces, toutes hexapodes. Nous n'avons pas trouvé de gène *vk*r chez les autres sous-embranchements majeurs du phylum, à savoir les chélicérates, myriapodes et crustacés, même si une séquence partielle pouvant correspondre à un VKR a été retrouvée chez la puce d'eau *Daphnia pulex*. De manière intéressante, deux VKR positionnés en tandem au sein d'un même scaffold ont été retrouvés dans les génomes des lépidoptères *Bombyx mori* et *Danaus plexippus*.

En ce qui concerne le phylum Plathelminthe, 7 VKR ont été identifiés chez 5 espèces différentes. Les cestodes *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis* et *Hymenolepis microstoma* possèdent un VKR au sein de leurs génomes, alors que les trématodes *S. mansoni* et *Clonorchis sinensis* en possèdent deux. Une séquence partielle pouvant correspondre à un VKR a été retrouvée chez la planaire *Schmidtea mediterranea*, mais celle-ci semblait tronquée et nous avons donc décidé de ne pas la prendre en

compte pour nos analyses. Des études phylogénétiques ont été entreprises, et un arbre a été construit en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance, plus précise que les méthodes de distance ou de maximum de parcimonie (Lopez *et al.*, 2002).

Les résultats obtenus montrent clairement que les VKR forment un groupe monophylétique, englobant la totalité des protéines identifiées. De manière surprenante, si les VKR2 des lépidoptères se rattachent parfaitement aux côtés des autres VKR d'arthropodes, DpVKR1 et BmVKR1 se distinguent et se branchent à la base de l'arbre.

D'un point de vue évolutif, la présence d'un VKR chez le cnidaire *Nematostella vectensis* met en évidence une émergence de ces récepteurs avant la radiation des bilatériens. L'origine de l'apparition de cette famille de récepteurs est d'ailleurs très floue étant donné leur absence au sein des génomes du placozoaire *Trichoplax adhaerens*, et du porifère *Amphimedon queenslandica*. A l'inverse, il a été identifié chez le choanoflagellé *Monosiga brevicollis* une protéine à l'architecture similaire à celle des VKR, qui pourrait laisser penser que l'émergence des VKR ait eu lieu chez les pré-métazoaires. Par ailleurs, l'important nombre de génomes disponibles chez les chordés ainsi que les nématodes nous permet de confirmer qu'ils ne possèdent pas de gène *vkr*.

À l'heure actuelle, il semble que parmi les deutérostomes, seuls les échinodermes possèdent un VKR. En effet, s'il est certain que les vertébrés ne possèdent pas de VKR, l'exploration des génomes de *Ciona intestinalis* (Tunicata), *Saccoglossus kowalevskii* (Hemichordata) et *Branchiostoma lanceolatum* (Cephalochordata) s'est également avérée négative, ce qui semble donc corroborer cette hypothèse.

L'analyse de la structure des gènes a mis en évidence une hétérogénéité de longueur et de nombre d'exons. Ainsi à titre d'exemple, les plathelminthes ont des gènes *vkr* plus longs, et plus complexes en terme de structure intron-exon que les *vkr* d'arthropodes. Cette hétérogénéité est néanmoins contrecarrée par une grande conservation des positions d'introns au sein des gènes. En effet, nous avons pu montrer que chaque VKR possède au moins une jonction intron-exon conservée chez d'autres espèces. L'exemple le plus marquant concerne le VKR de *N. vectensis*, pour qui 12 de ses 14 jonctions sont retrouvées au moins une fois dans les VKR d'autres espèces.

Une analyse des séquences protéiques est présentée dans cet article. Un alignement des domaines TK a été généré par ClustalW. Il met en évidence une conservation globale des séquences protéiques à travers les phyla. Si la quasi-totalité des séquences possèdent les six motifs nécessaires à une activité tyrosine kinase, ce n'est pas le cas des domaines TK

de DaVKR, NvVKR, BmVKR2, DpIVKR2, PhcVKR, HsVKR et LhVKR qui ne possèdent pas un ou plusieurs de ces motifs. Si des artefacts de séquençage ou erreurs d'annotation pourraient expliquer l'absence de ces résidus, nous ne pouvons cependant pas exclure la possibilité que ces protéines soient en réalité des pseudokinases. En tout état de cause, seul leur clonage nous permettra de lever ces interrogations.

Une analyse de séquence a également été réalisée sur les domaines VFT. Celle-ci démontre une conservation relativement importante des VFT, surtout chez les insectes, avec des pourcentages d'identité variant de 29 à 98%. Une étude a mis en évidence une séquence consensus [S]-x(22)-[TS]-x(13,14)-[R]-x(4)-[D]-x(2)-[Q]-x(24,25)-[Y]-[GA]x(74,84)-[ED], conservée dans tous les domaines VFT capables de fixer des ligands de type acide aminé (Acher et Bertrand, 2005). En recherchant cette séquence dans les domaines VFT des différents VKR, nous avons pu observer une relative conservation, nous permettant de suggérer que le ligand des VKR puisse effectivement être un acide aminé. Le premier résidu de la séquence est une Sérine, et son rôle dans la fixation de l'acide  $\alpha$ -carboxylique du Glutamate a été décrit dans le récepteur mGluR1. Ce résidu Sérine est également très conservé dans la plupart des VKR, à l'exception des VKR de lépidoptères et de cestodes. Un modèle tridimensionnel du VFT d'AmVKR a été généré, et met en évidence une conservation importante des résidus situés dans la poche de fixation du ligand. Parmi eux figurent les acides aminés E<sub>92</sub>, R<sub>107</sub>, T<sub>108</sub>, I<sub>109</sub> et Y<sub>406</sub>. Concernant le dernier résidu, nous postulons qu'il puisse interagir avec un groupement amine via une interaction cation-pi, renforçant l'hypothèse d'un ligand de type L-Arginine.

L'ensemble de ces résultats semble donc suggérer que la majorité des VKR fixe un ligand commun. Les divergences majeures observées dans les domaines VFT de cestodes et de lépidoptères laissent donc penser qu'ils puissent être capable de fixer un autre ligand.

En conclusion, cette étude met en évidence la large présence des VKR au sein des invertébrés. Leur identification chez des espèces appartenant aux phyla Cnidaire, Annélide et Mollusque renforce cette observation. D'un point de vue moléculaire, ces protéines sont pour la plupart des kinases actives, et activables par un ligand commun qui pourrait être la L-Arginine. Les travaux d'Arnaud Ahier ont mis en évidence une forte expression des VKR dans les stades larvaires et les gonades de plusieurs organismes, suggérant une fonction des ces récepteurs dans l'embryogénèse et la gamétogénèse. Si les outils disponibles chez *S. mansoni* permettent d'envisager l'étude de leur fonction dans

la gamétogenèse, ce n'est pas le cas de l'embryogenèse, qui s'avère très difficile à étudier du fait de la complexité du cycle de vie du parasite. La découverte de VKR chez *Nematostella vectensis*, *Lottia gigantea* ou *Capitella teleta* s'avère prometteuse dans la mesure où ces modèles se prêtent parfaitement à l'embryologie moléculaire, et pourraient être utilisés pour étudier la fonction des VKR dans l'embryogenèse.

## 1.2. Perspectives de recherche

Depuis la publication de l'article, de nouveaux VKR ont été retrouvés dans le génome des organismes suivants : *Aplysia californica*, *Biomphalaria glabrata*, *Glossina morsitans*, *Leptopilina heterotoma*, *Osmia cornuta*, *Sitodiplosis mosellana*, *Schistosoma haematobium*, *Schmidtea mediterranea* et *Strigamia maritima*, portant à 47 le nombre d'espèces possédant un VKR (Fig 1). Parmi ces espèces, *Glossina morsitans* et *Biomphalaria glabrata* représentent des organismes d'intérêt sanitaire important, puisqu'ils sont vecteurs des parasites *Trypanosoma brucei* et *Schistosoma mansoni* respectivement. Des EST encodant des VKR putatifs ont également été retrouvés chez d'autres représentants des phyla Mollusque, Annélide et Echinoderme tels que *Paracentrotus lividus*, *Crassostrea gigas*, et *Platynereis dumerilii*.

S'il ne subsiste plus aucun doute quant à la réalité de l'existence des VKR et de leur présence chez de nombreux invertébrés, deux axes importants restent néanmoins à approfondir :

- Le premier axe concerne l'approfondissement de notre connaissance des VKR de plathelminthes. Des collaborations ont été établies avec le Pr Klaus Brehm et le Dr Francesc Cebrià pour la caractérisation moléculaire et fonctionnelle des VKR d'*Echinococcus multilocularis* et *Schmidtea mediterranea*.

*E. multilocularis* est responsable de l'échinococcose alvéolaire, une des parasitoses les plus meurtrières de l'hémisphère nord, et les traitements chimiothérapeutiques actuellement disponibles (benzimidazoles) sont peu efficaces et génèrent beaucoup d'effets secondaires. Il est donc urgent de développer de nouvelles drogues. Parmi les cibles actuellement proposées figurent, comme pour la schistosomiase, les protéine kinases (Hemer et Brehm, 2012; Brehm, 2013). Les VKR pourraient dans ce contexte représenter des cibles thérapeutiques prometteuses dans l'optique du traitement de l'échinococcose alvéolaire, voire dans le traitement d'un panel plus important de cestodoses, étant donné la présence de ces récepteurs chez *Taenia solium*, *E. granulosus* et *H. microstoma*. D'un point de vue plus fondamental, il est intéressant de remarquer la présence d'une Proline en lieu et place d'une Sérine dans la poche de fixation ligand de tous les VKR de cestodes. Cette Sérine étant impliquée dans la fixation de molécules de type  $\alpha$ -amino acide, il est tentant de spéculer que le ligand d'EmVKR

puisse être de nature différente.

Deux VKR ont été mis en évidence chez la planaire *S. mediterranea*, SmedVKR1 et SmedVKR2. Ce modèle est le modèle invertébré par excellence pour l'étude de la régénération et de l'homéostasie tissulaire. Un panel d'outils moléculaires est disponible chez la planaire, incluant immunocytochimie de fluorescence, ARN interférence, isolement de sous-types cellulaires en cytométrie de flux, hybridation *in situ* sur organismes entiers (WISH), RNAseq ou encore microarrays. En collaboration avec le Dr Francesc Cebrià, le clonage et la caractérisation des deux VKR de *S. mediterranea* sont en cours de réalisation. La caractérisation moléculaire et phylogénétique des récepteurs sera réalisée au laboratoire, en utilisant le modèle ovocyte de Xénope pour la déorphanisation et l'étude des voies de signalisation. En parallèle, l'équipe du Dr Cebrià pourra réaliser la caractérisation fonctionnelle des récepteurs, notamment en déterminant leur profils d'expression par hybridation *in situ*, et en analysant leur fonction au sein des organes reproducteurs en observant si les planaires interférées régénèrent un tissu gonadique défectueux.

- Le second axe concerne l'émergence de la famille des VKR. En effet, la publication des génomes des choanoflagellés *Monosiga brevicollis* et *Salpingoeca rosetta* nous ont permis de mettre en évidence des RTK à l'architecture VFT-TM-TK similaire à celle des VKR (Fairclough *et al.*, 2013; Manning *et al.*, 2008).

Des analyses phylogénétiques préliminaires placent ces deux récepteurs à la base de l'arbre regroupant l'ensemble des VKR, laissant supposer leur appartenance à la famille (Fig 2). L'analyse des résidus conservés au sein du domaine VFT met en évidence la conservation d'un certain nombre d'acides aminés impliqués dans la fixation du ligand. Ainsi le résidu Sérine, impliqué dans la fixation du résidu  $\alpha$ -COOH, est conservé chez *Monosiga* et *Salpingoeca*, suggérant que le ligand soit également de type acide aminé. Un résidu Phénylalanine figure en lieu et place de la Tyr<sub>406</sub> laissant la possibilité d'une interaction cation- $\pi$  avec un acide aminé aromatique (Dougherty, 1996).

Une banque d'ADN complémentaire de *Monosiga brevicollis* a été acquise au laboratoire et nous envisageons de cloner le MbVKR putatif (annoté UTK12), puis de confirmer son appartenance à la famille des VKR. De la même manière que pour les SmVKRs, nous envisageons également de réaliser la caractérisation biochimique du récepteur afin de déterminer son/ses ligand(s) et ses capacités d'homodimérisation.

L'équipe de Ruiz-Trillo a mis en évidence le fait que, si plusieurs TK cytoplasmiques sont retrouvées depuis les filastériens jusqu'à l'homme, ce n'est pas le cas des récepteurs tyrosine kinases qui n'ont pas été conservés (Suga *et al.*, 2012). Si UTK12 s'avère être un VKR, il s'agirait de ce fait du premier représentant des RTK conservé depuis les prémétazoaires jusqu'aux deutérostomes. Des perspectives intéressantes s'ouvriraient alors à nous quant à la compréhension de l'évolution et de la conservation de la signalisation RTK à travers le règne eucaryote.

<b>Species</b>	<b>Phylum</b>	<b>Class</b>
<i>Acromyrmex echinator</i>	Arthropod	Insect
<i>Aedes aegypti</i>	Arthropod	Insect
<i>Anopheles gambiae</i>	Arthropod	Insect
<i>Apis florea</i>	Arthropod	Insect
<i>Aplysia californica</i>	Mollusc	Gasteropod
<i>Apis mellifera</i>	Arthropod	Insect
<i>Atta cephalotes</i>	Arthropod	Insect
<i>Biomphalaria glabrata</i>	Mollusc	Gasteropod
<i>Bombus impatiens</i>	Arthropod	Insect
<i>Bombus terrestris</i>	Arthropod	Insect
<i>Bombyx mori</i>	Arthropod	Insect
<i>Camponotus floridanus</i>	Arthropod	Insect
<i>Capitella teleta</i>	Annelid	Polychaete
<i>Clonorchis sinensis</i>	Platyhelminthe	Trematode
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Arthropod	Insect
<i>Danaus plexippus</i>	Arthropod	Insect
<i>Drosophila ananassae</i>	Arthropod	Insect
<i>Drosophila grimshawi</i>	Arthropod	Insect
<i>Drosophila mojavensis</i>	Arthropod	Insect
<i>Drosophila persimilis</i>	Arthropod	Insect
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	Arthropod	Insect
<i>Drosophila virilis</i>	Arthropod	Insect
<i>Drosophila wilsoni</i>	Arthropod	Insect
<i>Echinococcus granulosus</i>	Platyhelminthe	Cestode
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Platyhelminthe	Cestode
<i>Glossina morsitans</i>	Arthropod	Insect
<i>Harpegnathos saltator</i>	Arthropod	Insect
<i>Heliconius melponeme</i>	Arthropod	Insect
<i>Hymenolepis microstoma</i>	Platyhelminthe	Cestode
<i>Leptopilina heterotoma</i>	Arthropod	Insect
<i>Linepithema humile</i>	Arthropod	Insect
<i>Lottia gigantea</i>	Gasteropod	Gasteropod
<i>Megachile rotundata</i>	Arthropod	Insect
<i>Nasonia vitripennis</i>	Arthropod	Insect
<i>Nematostella vectensis</i>	Cnidarian	Anthozoan
<i>Osmia cornuta</i>	Arthropod	Insect
<i>Pediculus humanus corporis</i>	Arthropod	Insect
<i>Pogonomyrmex barbatus</i>	Arthropod	Insect
<i>Schistosoma haematobium</i>	Platyhelminthe	Trematode
<i>Schistosoma mansoni</i>	Platyhelminthe	Trematode
<i>Schmidtea mediterranea</i>	Arthropod	Insect
<i>Sitodiplosis mosellana</i>	Platyhelminthe	Trematode
<i>Solenopsis invicta</i>	Arthropod	Insect
<i>Strigamia maritima</i>	Arthropod	Chilopode
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Echinoderm	Echinoidea
<i>Taenia solium</i>	Arthropod	Insect
<i>Tribolium castaneum</i>	Arthropod	Insect



## 2. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des VKR de *Schistosoma mansoni*

### 2.1. Découverte de SmVKR2 et analyse comparative

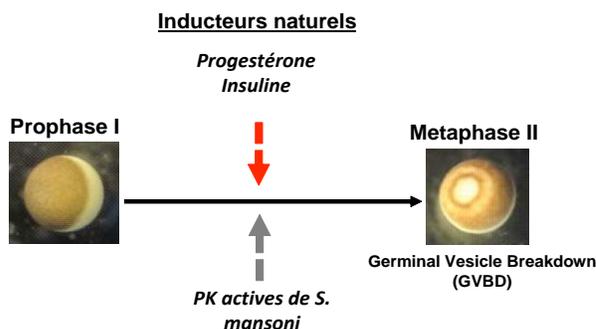
Lors de mon arrivée au laboratoire en 2009 au cours de mon Master 2, mon sujet avait pour but le clonage et la caractérisation de SmVKR2, le second VKR de *S. mansoni*, qui venait d'être identifié *in silico* à partir des bases de données.

Ce premier article, ***Schistosoma mansoni: Structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors***, apporte des premiers éléments de réponse aux interrogations soulevées par la présence de deux VKR chez *S. mansoni*. Ainsi, nous avons dans un premier temps confirmé la séquence de SmVKR2 par RACE-PCR (Smp\_153500). Celle-ci code une protéine de 1641 acides aminés, qui s'intègre parfaitement aux côtés de SmVKR1 dans l'arbre phylogénétique publié par Ahier *et al.*, 2009. La disponibilité du génome de *S. mansoni* nous a ensuite permis de déterminer et de comparer la structure intron-exon des gènes *smvkr1* et *smvkr2*: leur séquence codante est complexe car composée de 16 et 18 exons respectivement, ce qui représente des gènes d'environ 30kb. Une grande similitude d'architecture est observée, puisqu'à la fois chez *smvkr1* et *smvkr2*, ce sont les mêmes exons qui codent les domaines VFT, TM et TK. L'ensemble de ces résultats suggère que la présence de ces deux gènes soit la résultante d'une duplication de gène.

Des expériences de qPCR ont été menées sur tous les stades parasitaires, afin de déterminer les profils d'expression des deux gènes. Nous avons pu montrer dans un premier temps que si que les deux gènes sont exprimés à tous les stades parasitaires, néanmoins leur profil d'expression est différent. En effet, à l'exception des stades miracidium et sporocyste, les rapports d'expression de SmVKR1 et SmVKR2 sont largement en faveur de SmVKR2, avec des ratios SmVKR2/SmVKR1 atteignant 15 et 50 chez le schistosomule et la cercaire, respectivement. En ce qui concerne le stade adulte, on retrouve une expression légèrement plus forte de SmVKR2. Lorsque l'on considère séparément mâles et femelles, on retrouve une expression plus importante à la fois de

SmVKR1 et SmVKR2 chez la femelle que chez le mâle. Cette abondance de transcrits SmVKR1 chez la femelle pourrait être liée à sa localisation dans les ovaires (Vicogne *et al.*, 2003). Le séquençage de SmVKR2 nous a également permis de réaliser l'analyse comparative des deux protéines paralogues. Ainsi, SmVKR1 et SmVKR2 possèdent une identité globale de 40%. Ce pourcentage monte à 48% si l'on considère les domaines VFT seuls, et 71% dans le cas des domaines TK. L'analyse des motifs conservés au sein de la poche de fixation du ligand met en évidence une divergence au niveau du motif L<sub>651</sub> de SmVKR2, en lieu et place d'un résidu Tyrosine chez SmVKR1 et les 15 autres VKR identifiés à l'époque, qui suggère la potentialité que le ligand puisse ne pas être le même.

Afin de répondre à cette interrogation, nous avons entrepris l'expression des récepteurs en ovocyte de xénope, une technique déjà utilisée avec succès pour l'étude d'un certain nombre de kinases de *S. mansoni* (Vicogne *et al.*, 2004, Yan *et al.*, 2007, Long *et al.*, 2010). En plus d'exprimer de manière satisfaisante les protéines de schistosome, le modèle ovocyte possède l'avantage de permettre d'observer facilement l'activité enzymatique des kinases. En effet ces cellules de grande taille sont naturellement bloquées en prophase I de méiose. Sous l'impulsion d'une stimulation par la progestérone ou l'insuline, les ovocytes lèvent leur blocage pour atteindre la Métaphase II (Fig 3).



**Figure 3: Processus de maturation ovocytaire chez *Xenopus laevis*.** L'expression de domaines catalytiques recombinants induit la reprise de méiose et la maturation de l'ovocyte, au même titre que ses inducteurs naturels, la progestérone et l'insuline.

Cette reprise de méiose se traduit par la montée de la vésicule germinative et sa rupture, également appelée Germinal Vesicle Breakdown, ou GVBD. Ce phénomène entraîne l'apparition d'une tâche blanche dite tâche de maturation au sommet du pôle animal, qui est facilement visualisable à l'œil nu. De manière intéressante, il a été observé qu'une activité kinase exogène entraîne, au même titre que l'insuline ou la progestérone, la reprise de méiose. Comme démontré auparavant dans un essai kinase pour la protéine

recombinante AmVKR exprimée en cellules HEK293T (Ahier *et al*, 2009), nous avons pu observer que la L-Arginine est capable d'activer SmVKR1 et donc d'activer la reprise de méiose et la GVBD. L'autophosphorylation du récepteur a par ailleurs été vérifiée en Western Blot. En ce qui concerne SmVKR2, nous avons eu la surprise d'observer que le récepteur entraîne spontanément la maturation des ovocytes, suggérant qu'il puisse trouver son ligand dans le milieu ND96 de conservation des ovocytes, uniquement salin. Etant donné que certains domaines VFT sont capables de fixer des ions, et particulièrement le calcium, nous avons utilisé un milieu ND sans calcium. Ainsi, nous avons pu observer que dans ce milieu dépourvu de calcium les ovocytes exprimant SmVKR2 ne subissent plus de maturation spontanée, suggérant que l'ion  $Ca^{2+}$  puisse être un ligand de SmVKR2.

En conclusion, cet article met en évidence la présence de deux VKR chez *S. mansoni*, SmVKR1 et SmVKR2. Ils sont exprimés à tous les stades parasitaires, et de manière plus importante dans les stades larvaires et chez la femelle adulte, suggérant des fonctions dans la croissance larvaire et la reproduction. Ces deux récepteurs possèdent des propriétés biochimiques distinctes, notamment en terme de ligand, ce qui laisse penser que ces deux récepteurs puissent avoir des fonctions distinctes.

## 2.2. Les VKR contrôlent l'ovogenèse de *Schistosoma mansoni*

Les données précédemment acquises suggèrent une fonction des récepteurs VKR dans le développement des stades larvaires et la reproduction. Le fait que SmVKR1 et SmVKR2 soient activables par des ligands différents nous laisse penser que les deux gènes *vkr* pourraient avoir divergé de manière à aboutir à une diversification fonctionnelle. Ce second article, **Venus Kinase Receptors control reproduction of *Schistosoma mansoni***, amène de nouvelles données concernant les fonctions biologique et cellulaire des VKR de *Schistosoma mansoni*. Ainsi, ce travail est subdivisé en deux parties complémentaires, à savoir l'étude fonctionnelle de SmVKR1 et SmVKR2 chez le parasite adulte, et également une analyse moléculaire aux échelles de la protéine et de la cellule, afin de déterminer les caractéristiques d'activation et les fonctions cellulaires de ces deux récepteurs.

Les profils d'expression de SmVKR1 et SmVKR2 par qPCR et hybridation *in situ* mettent en évidence une abondance des deux transcrits dans l'appareil génital de la femelle. Cependant leur profil d'expression au sein même de ces organes diffère, avec une localisation des transcrits SmVKR1 dans la partie postérieure de l'ovaire, qui contient les ovocytes matures et différenciés, alors que l'on détecte une expression de SmVKR2 dans la partie antérieure de l'ovaire contenant les petits ovocytes en division. De manière intéressante, un intense marquage des transcrits SmVKR2 est détecté dans la zone entourant l'ootype, ce qui pourrait correspondre à la glande de Mehlis et/ou à l'oviducte. L'étude de la fonction de SmVKR1 et SmVKR2 au sein des ovaires a ensuite été appréhendée par ARN interférence, une technique qui s'est avérée efficace puisqu'elle entraîne la diminution de près de 80 et 60% de l'expression de SmVKR1 et SmVKR2 respectivement. Si les expériences d'ARN interférence n'ont pas entraîné de changements dans le comportement des parasites et dans l'appariement, elles ont engendré des phénomènes délétères au sein des organes reproducteurs. En effet, nous avons pu observer par microscopie confocale que la diminution de l'expression de SmVKR1 et SmVKR2 était à l'origine d'importants défauts de l'organisation antéro-postérieure de l'ovaire. Dans le cas de la diminution d'expression de SmVKR2, le phénotype associe une forte diminution de la taille de l'ovaire. Le ciblage simultané des deux gènes entraîne quant à lui un phénotype encore plus marqué. Plus intéressant, les

femelles présentant une diminution d'expression de SmVKR1 montrent des défauts dans la formation des œufs, caractérisés par une absence d'ovocytes, mais pas de cellules vitellines, dans l'ootype. L'ensemble de ces résultats indique clairement une fonction de ces récepteurs dans l'ovogénèse. Les profils d'expression semblent suggérer des fonctions distinctes.

La seconde partie de l'étude concerne la caractérisation moléculaire de SmVKR1 et SmVKR2. Les articles précédents (Ahier *et al.*, 2009; Gouignard *et al.*, 2012) ont mis en évidence que les protéines AmVKR et SmVKR1 sont activables par la L-Arginine. Dans cet article, soumis très récemment au journal Plos Biology, nous avons testé en ovocyte de Xénope la capacité des 20 acides aminés protéogéniques à activer SmVKR1 et SmVKR2. Les résultats montrent que sept acides aminés sont capables d'activer SmVKR1 tandis que quatre seulement activent SmVKR2. Comme suggéré par les travaux précédents, nous confirmons l'efficacité de la L-Arginine à activer SmVKR1 à faible concentration (1 $\mu$ M). Des expériences de mutagenèse dirigée ont ensuite mis en évidence l'importance d'un résidu Sérine dans le domaine VFT de SmVKR1 et SmVKR2 (respectivement S<sub>466</sub> et S<sub>410</sub>) dans la fixation des acides aminés.

Les RTK nécessitent de s'associer en oligomères pour s'activer. Par FRET, il a été prouvé que le VKR de l'abeille mellifère est capable de s'homodimériser en cellules mammifères. Cependant l'utilisation de cellules mammifères ne nous permet pas d'évaluer l'effet de la fixation du ligand sur la dimérisation et l'activation des récepteurs. En utilisant des versions de SmVKR1 et SmVKR2 étiquetées différemment, nous démontrons que SmVKR1 et SmVKR2 sont capables de s'homodimériser. De manière intéressante, la formation de dimères de SmVKR1 est assujettie à la présence d'ions calcium ou de L-Arginine, mais l'activation des récepteurs est dépendante uniquement de L-Arginine. Concernant SmVKR2, nous avons pu démontrer que les ions Ca<sup>2+</sup> sont nécessaires à la fois pour la formation du dimère mais également pour l'activation du récepteur. Enfin, SmVKR1 et SmVKR2 sont capables de former des hétérodimères dont l'activité est dépendante à la fois de la présence de calcium et de L-Arginine. La formation de tels complexes est cependant peu probable dans les ovocytes, étant donné les différences de profils d'expression des récepteurs.

Afin de déterminer les voies de signalisation activées par SmVKR1 et SmVKR2, nous avons entrepris l'identification de protéines partenaires en criblant une banque d'ADNc de *S. mansoni* en double hybride de levure, en utilisant les domaines intracellulaires des récepteurs comme appâts. Près de 400 clones ont été analysés, ce qui a mené à l'identification de 55 et 15 protéines partenaires respectivement. Ces partenaires ont été classés en cinq catégories majeures, selon leurs fonctions biologiques. Ainsi, nous avons identifié des protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette, le trafic vésiculaire, la signalisation kinase, la régulation de l'expression génique et la synthèse protéique. De manière générale, nous avons identifié plus de partenaires pour la protéine SmVKR1 que pour SmVKR2. Parmi les protéines interagissant avec SmVKR1 figurent la GTPase Rho1, la Ser/Thr kinase Mkk7 ou encore la protéine phosphatase PP2C, toutes impliquées dans l'activation de la voie de signalisation JNK. Des protéines adaptatrices à domaine SH2 ont également été identifiées: il s'agit de Shb et Cbl, qui interagissent avec SmVKR1 et SmVKR2 respectivement. À partir des différentes observations montrant que SmVKR1 et SmVKR2 possèdent des profils d'expression différents, des ligands distincts et des protéines partenaires différentes, nous avons exploré la possibilité que ces récepteurs puissent également activer des voies de signalisation différentes. En utilisant le modèle ovocyte de Xénope, nous avons donc analysé les profils de phosphorylation d'un certain nombre de protéines clés de signalisation: Akt, S6K, Erk1/2, JNK et p38, à la suite de l'activation de SmVKR1 et SmVKR2. Il s'est avéré que des différences dans les profils de phosphorylation ont été observées: si les deux récepteurs activent les voies Akt/S6K et Erk 1/2, SmVKR2 entraîne une hyperphosphorylation de la protéine p70 S6K. Ni SmVKR1 ni SmVKR2 n'activent la p38 $\gamma$ /SAPK3, importante pour la transition G2/M au cours de la méiose. Enfin, comme suggéré par le criblage en double hybride, SmVKR1 est capable d'activer la voie JNK, contrairement à SmVKR2.

L'ensemble de ces résultats met en évidence des fonctions de ces récepteurs dans la reproduction du parasite. Les expériences d'ARN interférence, corrélées avec les résultats obtenus avec l'utilisation d'inhibiteurs (Vanderstraete *et al.*, 2013) confirment l'importance des deux protéines dans l'ovogenèse et la formation de l'œuf, faisant de fait de ces récepteurs des cibles thérapeutiques intéressantes dans l'optique d'un traitement anti-fécondité. Les fonctions distinctes de SmVKR1 et SmVKR2 s'expliquent par des profils de localisation différents, mais également des ligands et des voies de signalisation différentes. SmVKR1 est exprimé dans les ovocytes matures et est capable d'activer la

voie JNK, qui est impliquée dans la migration cellulaire et la progression méiotique. Nous suggérons que SmVKR1 puisse entraîner la reprise de méiose et/ou la migration des ovocytes en réponse à la présence des spermatozoïdes dans le réceptacle séminal. Le signal pourrait être la L-Arginine, présente à des concentrations de l'ordre du millimolaire dans le liquide séminal. Concernant SmVKR2, son profil d'expression dans les ovocytes immatures en division nous laisse penser qu'il pourrait avoir une fonction dans la prolifération et/ou la croissance des ovocytes, en activant préférentiellement les voies de signalisation Akt/ mTORC2/ p70 S6K.

## Venus Kinase Receptors control reproduction in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*

Mathieu Vanderstraete<sup>#1</sup>, Nadège Gouignard<sup>#1</sup>, Katia Cailliau<sup>2</sup>, Marion Morel<sup>1</sup>, Silke Leutner<sup>3</sup>, Svenja Beckmann<sup>3</sup>, Christoph G. Grevelding<sup>3</sup>, Colette Dissous<sup>1</sup>.

1- Center for Infection and Immunity of Lille, Inserm U1019, CNRS-UMR 8204, University Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, France

2- EA 4479, IFR 147, Université Lille 1 Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

3- Institute for Parasitology, Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany

<sup>#</sup> These authors contributed equally to the work.

Corresponding author:

Dr. Colette Dissous

Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, France

Phone: 3 33 20 87 73 50

Fax: 3 33 20 87 78 88

E-mail: [colette.dissous@pasteur-lille.fr](mailto:colette.dissous@pasteur-lille.fr)

Running title: *S. mansoni* Venus Kinase Receptors

Keywords: *Schistosoma mansoni*; Venus Kinase Receptor; meiosis; gametogenesis; *Xenopus* oocytes; signaling pathways; oogenesis; oocyte; tyrosine kinase

Abbreviations: VKR, Venus Kinase Receptor; GVBD, germinal vesicle breakdown; PG, progesterone; JNK, c-Jun N-terminal Kinase; TK, Tyrosine Kinase, Y2H, Yeast two-hybrid

## Abstract

The Venus Kinase Receptor (VKR) is a single transmembrane molecule composed of an intracellular tyrosine kinase domain close to that of insulin receptor and an extracellular Venus Flytrap (VFT) structure similar to the ligand binding domain of many class C G Protein Coupled Receptors. This receptor tyrosine kinase (RTK) was first discovered in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*, then in a large variety of invertebrates. A single *vkr* gene is found in most of the genomes, except in *S. mansoni* in which two genes *Smvkr1* and *Smvkr2* exist. VKRs form a unique family of RTKs present only in invertebrates and their biological functions are still to be discovered.

In this work, we showed that SmVKRs are expressed in the reproductive organs of *S. mansoni*, particularly in the ovaries of female worms. Suppression of *Smvkr* expression by RNA interference induced spectacular morphological changes in female worms with a strong disorganization of the ovary, which was dominated by the presence of primary oocytes, and a defect of egg formation. Following expression in *Xenopus* oocytes, SmVKR1 and SmVKR2 receptors were shown to be activated by distinct ligands which are respectively L-Arginine and calcium ions. These receptors are active as homodimers as many other RTKs, and the possibility that they could form heterodimers was demonstrated. Signalling analysis in *Xenopus* oocytes revealed the capacity of SmVKRs to activate the PI3K/Akt/p70S6K and Erk MAPK pathways involved in cellular growth and proliferation. Additionally, SmVKR1 induced phosphorylation of JNK (c-Jun N-terminal kinase). The specific activation of JNK by SmVKR1 could be confirmed by the results of yeast two-hybrid experiments identifying several components of the JNK pathway as specific interacting partners of SmVKR1.

In conclusion, these results demonstrate the functions of SmVKR in gametogenesis, and particularly in oogenesis and egg formation. By eliciting signalling pathways potentially involved in oocyte proliferation, growth and migration, these receptors control parasite reproduction and can therefore be considered as potential targets for anti-schistosome therapies.

## Author summary

Schistosomiasis is a chronic, debilitating disease affecting more than 200 million people in the world caused by parasitic flatworms of the genus *Schistosoma*. Pathology is due mainly to massive egg production by parasites and formation of granulomas around the eggs trapped in liver and different organs. Therefore, targeting the molecular processes responsible for gonad development or egg production in schistosomes appears as a valuable strategy to reduce pathogenesis and dissemination of schistosomiasis. In the present study, we investigated the importance in the control of reproduction of schistosomes of Venus Kinase Receptors (VKRs) which are unusual receptor tyrosine kinases (RTKs) with an extracellular Venus Flytrap (VFT) ligand-binding domain. SmVKRs are expressed in female ovaries of *Schistosoma mansoni* and the knock down of their expression provoked dramatic alterations of the oocyte content in ovaries and reduction of egg formation. SmVKRs were also shown to activate different signalling pathways potentially involved in oocyte proliferation, growth and migration. Therefore our results demonstrate that VKRs are essential actors of oogenesis and egg formation in *S. mansoni*. Moreover, their presence in a large variety of invertebrate species including other helminth parasites and insect parasite vectors can open new perspectives in the control of various vector-borne infectious diseases.

## Introduction

Trematode parasites of the *Schistosoma* genus are responsible for schistosomiasis or bilharzia, one of the most important parasitic endemias worldwide in terms of mortality and morbidity. According to the World Health Organisation, more than 240 million people are currently infected by schistosomes, with about 200 000 deaths per year [1].

The pathology of schistosomiasis mostly results from the accumulation of parasite eggs in host tissues. Indeed, among the several hundreds of eggs laid daily by each female schistosome, a large part gets trapped into host tissues and elicits immune responses, such

as inflammation and granuloma formation, causing severe disorders, particularly hepatosplenomegaly, hepatic fibrosis and bladder cancer [2]. Praziquantel (PZQ) is the only drug currently used to cure schistosomiasis. This drug is active against the three main species infecting humans (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*). However, its widespread use for mass treatment since the early 80's, has already led to the emergence of drug-insensitive *Schistosoma* strains. Moreover, a limit of PZQ is that it does not affect the larval parasites and, therefore, does not provide a total clearance of the infection [3-6]. In the absence of a vaccine much efforts are currently made to characterize molecules that control survival, growth and reproduction of schistosomes in order to identify targets for novel drugs against these parasites [7-9].

In this context, several schistosome protein kinases (PK) have been studied during the last decade and some of them were shown to be involved in gametogenesis and egg formation in the parasite *S. mansoni* [10-20]. Among these kinases are cellular PKs such as Polo-like kinases (Plks), which regulate cell-cycle progression during M-phase by activating cyclin-dependent PKs. Two Plks, SmPlk1 and SmSak, have been characterized in *S. mansoni* and their role in the control of parasite reproduction has been demonstrated [17-19]. Besides these mitotic kinases, tyrosine kinases (TKs) were also shown to play essential roles in schistosome reproduction [11, 16]. TKs constitute a large family of receptor and cytosolic molecules that regulate development, cell division, differentiation and metabolism in many organisms, and they actually represent major targets in drug discovery programs against cancer and metabolic disorders [21,22]. Recent works indicated that *S. mansoni* TKs can be as well considered as interesting targets against schistosomes. By inhibiting the kinase activities of schistosome Src, Abl, and Syk cytosolic TKs with the commercial TK inhibitors Herbimycin, Imatinib, Piceatannol, respectively, dramatic changes were observed in the reproductive organs of *in vitro*-cultured adult *S.mansoni*, affecting gametogenesis and egg production [11-16]. Also, the harmful effect on schistosomes of other TK inhibitors (tyrphostins) directed against human EGF and insulin receptors revealed the importance of RTK signalling in major processes of embryogenesis and reproduction in these parasites [23-25].

Few years ago, we discovered in *S. mansoni* an atypical receptor tyrosine kinase (RTK) named Venus Kinase Receptor [26]. VKR is a transmembrane molecule composed of an

intracellular TK domain close to that of Insulin Receptor (IR), and an extracellular ligand binding domain (LBD) with a Venus Flytrap (VFT) structure similar to that of many class C G Protein Coupled Receptors (GPCR) [27]. Such a VFT-TK fusion was described for the first time in *S. mansoni*, but recent analysis of genomic data has allowed us to extend the presence of VKRs to five bilaterian phyla (Platyhelminthes, Arthropoda, Annelida, Mollusca, Echinodermata) as well as to the Cnidaria phylum [28,29]. We showed that VKR kinase activity is inducible upon binding of extracellular amino-acids and molecular modeling of the VFT domain confirmed the structure of the conserved amino-acid binding site [28]. Preliminary experiments indicated that VKRs were preferentially expressed in larvae and in gonads of several species [28], suggesting a role in development and reproduction. A single *vk*r gene was usually found in each invertebrate genome but exceptionally the genome of *S. mansoni*, as that of another trematode *Clonorchis*, contains two genes *vk*r1 and *vk*r2 with a similar organization but encoding distinct proteins [29,30]. The expression of *Smvkr1* and *Smvkr2* was shown to be variable in the different parasitic stages, likely indicating their independent regulation [30].

In this work, we investigated the function of SmVKR in the reproduction of schistosomes. We first showed that *Smvkr1* and *Smvkr2* are expressed in adult female organs at different sites, and the results of RNAi experiments suggest that SmVKR1 and SmVKR2 participate in major pathways along the maturation of oocytes in female schistosomes. The two VKRs are activated by distinct ligands, and the search for interacting partners by yeast two-hybrid screening coupled to the analysis of signalling pathways induced by SmVKRs in *Xenopus* oocytes support the hypothesis that SmVKR1 and SmVKR2 exert different roles in gametogenesis and reproduction processes in schistosomes.

## Results

SmVKR1 and SmVKR2 are expressed in female reproductive organs.

We have shown previously that SmVKRs were expressed in all developmental stages of the parasite *S. mansoni* and that the expression of SmVKR2 was globally higher than that of SmVKR1, except in the sporocyst stage [30]. Using as a reference  $\alpha$ -tubulin transcripts, we show here that both *Smvkr1* and *Smvkr2* transcripts are more abundant in female than in male adult worms, and we confirm that *Smvkr2* is transcribed more actively than *Smvkr1* in

each gender (Figure 1,A). Former studies have already indicated that SmVKR1 (firstly named SmRTK-1) was expressed in the parenchyma of male worms and in the ovary of female worms [26]. In this work, we have localized *Smvkr1* and *Smvkr2* transcripts on sections of adult worm pairs by *in situ* hybridization. Results (Figure 1,B) demonstrate the presence of abundant *Smvkr1* transcripts in the female ovary. From the staining intensity, indications were obtained for a more intense staining of the big and mature oocytes which are contained in the posterior part of the ovary whereas the immature oocytes (oogonia) are located within the smaller, anterior part of the ovary. *Smvkr1* labelling is also observed around the ootype and in the parenchyma of males. *Smvkr2* transcripts are found also in the ovary but, unlike *Smvkr1* transcripts, their abundance seemed to be higher within the anterior part of the ovary containing immature oocytes. An intense *Smvkr2* labelling was also obtained in the region of the ootype and of its surrounding area, which could correspond to the Mehlis gland and/or the oviduct (Figure 1,B). A faint but specific labelling could be observed for *Smvkr1* as well as for *Smvkr2* in male testes only when labelled sections were put for longer periods in contact with the alkaline phosphatase substrate (Figure S1).

#### Effect of SmVKR gene suppression on female reproductive organs.

*Smvkr* gene expression was targeted for suppression by introducing via electroporation *Smvkr1* or *Smvkr2* dsRNA in couples of adult parasites *in vitro*. Figure 2 shows that a 5 day-treatment of worm couples with dsSmvkr1 led to a decrease of about 80% of the amount of *Smvkr1* transcripts in total parasites with a non-significative reduction of the level of *Smvkr2* transcripts, indicating a priority targeting of the *Smvkr1* gene by dsSmvkr1. Similar treatment with dsSmvkr2 gave comparable results, showing a reduction of more than 60% of *Smvkr2* transcripts but only a small and non-significative decrease of *Smvkr1* transcripts. Concomitant introduction of both dsSmvkr1 and dsSmvkr2 induced a simultaneous and significant reduction of both transcripts (70% and 55% for *Smvkr1* and *Smvkr2* respectively).

The suppression of *Smvkr* gene expression did not result in any detectable changes in worm behavior and male-female pairing. To investigate whether RNAi-mediated silencing of *Smvkr* genes could have any impact on the morphology of parasite reproductive organs, we

examined the worm couples after 5 days of dsRNA treatment by using CLSM (Figure 3). In male worms we did not observe any significant changes in the morphology of testicular lobes of both dsSmvkr1- and dsSmvkr2-treated parasites for which we noted the presence of sperm in seminal vesicle. However, in double-targeted worms, we observed frequently a reduced diameter of the testicular lobes accompanied by a reduction of cell density in testes as well as empty seminal vesicles, compared to single dsSmvkr-treated worms or to control worms treated with dsLucRNA. In female worms, drastic changes in the structure and size of the ovary appeared when parasites were treated with dsSmvkr1 or dsSmvkr2 or both of them, compared to control dsLucRNA. Structure and content of the ovary, composed normally of differentially matured oocytes, ie, small immature oogonial cells in the anterior part and bigger germ cells in the posterior part, was drastically modified in *Smvkr*-suppressed parasites. A strong disorganization of the ovary containing predominantly big cells was observed following dsSmvkr1 or dsSmvkr2 treatment, and this phenotype was associated in Smvkr2-treated females to a strong reduction of the ovary size. When both genes were targeted, we observed an addition of the two phenotypes. The bottom insert (Figure 3,G) shows the presence of an egg formed by a fertilized oocyte and 30-40 vitellocytes in the ootype of dsLuc-treated control worms. Within the ootype of dsSmvkr1-targeted females, clusters of unorganized vitelline cells and the absence of a regular egg shell were identified indicating problems in egg formation (upper insert Figure 3,A). These results confirmed that SmVKR1 and SmVKR2 are important for gametogenesis, oogenesis and perhaps also for egg formation and thus are implicated in the reproductive functions of *S.mansoni*. Moreover, the obtention of distinct phenotypes in dsSmvkr1 and dsSmvkr2-treated females could corroborate the different localization of the receptors in the ovary, and suggested possible different functions in this organ. The mode of activation and the signalling pathways potentially elicited by SmVKR1 and SmVKR2 respectively, were further studied.

#### Activation of SmVKR1 and SmVKR2 by distinct ligands.

VKRs form a family of structurally conserved transmembrane receptors, composed of a TK intracellular domain and an extracellular VFT domain that serves for ligand binding and subsequent receptor activation. It was shown previously that VKR from the insect *Apis*

*mellifera* was activated by aminoacids, specially by arginine [28] and the capacity of L-Arg to activate SmVKR1 was then demonstrated. Indeed, following receptor expression in *Xenopus* oocytes, binding of L-Arg induced SmVKR1 autophosphorylation and the activation of pathways leading to resumption of meiosis in the oocytes ([30], Figure 4). In former studies, we showed that meiosis resumption was dependent on kinase activation [17, 18, 30] leading to Germinal Vesicle BreakDown (GVBD), a process easily detectable by the formation of a white spot at the animal pole of the oocyte. According to this, we used this assay system to test the ability of all proteinogenic L-aminoacids to behave as ligands and to activate SmVKR1 or SmVKR2 respectively. Results showed that seven L-aminoacids (Arg, Ser, Gly, Ala, Cys, Thr and Glu) had the potential to activate SmVKR1 at a 1mM concentration (Table S1) and also confirmed that L-Arg was the most potent agonist for SmVKR1 (Figure 4,A). When added at 1 $\mu$ M in the oocyte incubation medium, L-Arg was able to induce GVBD in 80% of the SmVKR1-expressing oocytes. Surprisingly, expression of SmVKR2 in oocytes induced spontaneously their maturation in the usual ND96 medium, a minimally buffered saline solution complemented with CaCl<sub>2</sub> (2.8mM) and MgCl<sub>2</sub> (1mM). This observation suggested that bivalent ions could be responsible for the spontaneous activation of SmVKR2 and the use of salt-depleted media further indicated that Ca ions (at a 1mM minimal concentration) were effectively responsible for the activation of SmVKR2 (Figure 4,B). To assess the specific action of Ca<sup>2+</sup>, we tested the effect of other bivalent ions (Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>) on SmVKR2-expressing oocytes, but none of these ions were able to induce GVBD, even when they were used at a 10mM dose in the Ca<sup>2+</sup>-depleted medium (data not shown). Additional experiments performed in ND96 medium without Ca<sup>2+</sup> demonstrated that the activation of SmVKR1 by 1 $\mu$ M L-Arg was not affected by the absence of Ca<sup>2+</sup>. They also showed that L-Arg itself was able to activate SmVKR2 but at a minimal concentration of 1mM, thus 1000- fold higher than that required for SmVKR1 (Figure 4,C). Three other L- aminoacids (Thr, Trp and Cys) also activated SmVKR2 at 1mM (Table S1).

SmVKR1 and SmVKR2 receptors share similar VFT modules (48% residue identity). VFT modules constitute the binding pocket of various receptors activated by small molecules [27]. In most class C GPCRs, they are the binding sites for natural aminoacids or derivatives and ligand binding depends on a consensus motif of 8 residues implied in the

recognition of the  $\alpha$ -aminoacid group (i.e. primary amine and carboxylic acid) [31]. Particularly, the Ser<sub>165</sub> residue which binds the COOH group of glutamate in mGluR1 and is the most conserved residue in class C GPCRs, is highly conserved in all VKRs [28,29]. In order to confirm the implication of this Ser residue in aminoacid binding to SmVKR1 and SmVKR2, we mutated the Ser<sub>466</sub> and Ser<sub>410</sub> of SmVKR1 and SmVKR2 respectively in Ala, and the mutated receptors were expressed in oocytes. GVBD assays were performed using L-Arg as a ligand. We found that a 1000-fold higher concentration of L-Arg (1mM) was required to activate the mutated SmVKR1S<sub>466</sub>A and to induce GVBD. Similarly, SmVKR2S<sub>410</sub>A failed to respond to L-Arg (Figure 4,C). Western blot results confirmed that such differences in L-Arg sensitivity were not due to a lower level of expression of the mutant receptors in oocytes. Wild type and mutated forms of SmVKR1 and SmVKR2 were detected with the same intensity in oocyte membrane extracts by anti-V5 antibodies. On the same blots, anti-phosphotyrosine (PY) antibodies revealed that phosphorylation of SmVKR1 and SmVKR2 perfectly correlates to their ability to induce GVBD in oocytes (Figure 4,D). These data confirmed the importance of the conserved Ser residue in aminoacid binding.

Among all aminoacids, Arg is the only one containing a guanidino group. Therefore, we investigated the importance of this group in the affinity of L-Arg to SmVKR1 by testing a panel of Arg derivatives devoid either of the guanidino group (ornithine), or of the  $\alpha$ -aminoacid function (creatine, agmatine) as well as two Arg analogs (D-Arg, Canavanine). Results (not shown) indicated that all these compounds were inactive on SmVKR1 and that all of them had the potential to compete and to block totally the inducing effect of L-Arg when added with a 10-fold excess ratio. Such data are in favor of a specific activating effect of L-Arg on SmVKR1, which very likely implies a precise recognition of the amino groups of the Arg molecule together with specific constraints for a correct positioning of the ligand. Further studies of structure-activity relationships are needed to elucidate the nature of the residues involved in the interaction between SmVKR1 and L-Arg.

SmVKRs function as homo- and heterodimers.

RTK activation is known to require homo- or heterodimerization of receptor molecules and similarly, it has been clearly demonstrated that the VFT modules of class C GPCRs also

function as dimers. A three dimensional model of the VKR of *A. mellifera* was previously built which suggested that a VFT dimer interface was present in VKR proteins similar to that in GPCRs. It was shown further that AmVKR proteins effectively form dimers at the cell surface [28]. In this work, we have investigated the capacity of SmVKR proteins to homo- or heterodimerize. Results in Figure 5 demonstrate that SmVKR1 and SmVKR2 are active as dimers when they are expressed in *Xenopus* oocyte. Using two versions of SmVKR1 differentially tagged with V5 or Myc epitopes, we showed by co-immunoprecipitation and Western blot analysis that SmVKR1 proteins can form homodimers at the oocyte membrane. The interaction between SmVKR1-V5 and SmVKR1-Myc molecules required the presence of  $Ca^{2+}$  or of L-Arg. However, as shown by labelling with anti-PY antibodies, SmVKR1 phosphorylation and thus kinase activation were dependent on the addition of L-Arg and could not be induced by  $Ca^{2+}$  alone. Similarly, analyses performed with SmVKR2 showed the effect of  $Ca^{2+}$  on receptor dimerization but also on its activation, both processes being independent on the addition of L-Arg (Figure 5). These data thus confirmed the previous demonstration that SmVKR1 and SmVKR2 were activated respectively by L-Arg and  $Ca^{2+}$ . Even if in the developing ovary, the detection of SmVKR1 and SmVKR2 transcripts at different sites is not in favor of their possible interaction in this organ, we cannot exclude that in certain tissues (for example in testes where they are equivalently distributed in the whole organ) the two receptors can co-interact and co-activate at the cell membrane, similarly to many other RTKs. Following co-expression of SmVKR1 and SmVKR2 in *Xenopus* oocytes, we showed effectively that they were able to interact and that this interaction occurred only when both the ligands L-Arg and  $Ca^{2+}$  were added. In these conditions, two bands were revealed by anti-PY antibodies in the precipitated heterocomplexes, corresponding respectively to activated SmVKR1 (150kDa) and SmVKR2 (170kDa) (Figure 5). When only  $Ca^{2+}$  or only L-Arg was added, a single band was revealed by anti-PY antibodies in immune complexes precipitated either by anti-V5 or by anti-Myc antibodies. These bands likely represent activated homodimers of SmVKR2-V5 and SmVKR1-Myc, respectively.

Identification of SmVKR interacting partners.

The identification of potential SmVKR signalling partners was performed by yeast two-hybrid (Y2H) screening of the *S. mansoni* cDNA library [32], using the intracellular domains (ICD) of SmVKR1 or of SmVKR2 as baits. ICD mutants bearing constitutive kinase activity due to the introduction of a negatively charged glutamic residue next to the YY autophosphorylation site [30,33](SmVKR1ICD<sup>YYRE</sup> and SmVKR2DIC<sup>YYRE</sup>) were used as baits in order to privilege the capture of partners interacting with the receptors in their activated/phosphorylated state. About 400 clones positive for  $\beta$ -galactosidase expression were selected. Prey plasmids were isolated and their sequences determined. Among these, we could identify by BLASTn analyses 55 and 15 potential protein partners for SmVKR1 and SmVKR2 respectively, which were classified according to their putative functions (Table 1). Several proteins were selected by both SmVKR1 and SmVKR2, like actin and prefoldin involved in cytoskeleton functions and coatamer subunit with roles in membrane trafficking. The NAD-dependent deacetylase sirtuin-7 involved in chromatin remodelling was also shown to interact with both ICDs. About proteins involved in phosphosignalling, we noted the selection of two important molecules Cbl and Shb, already known for their direct interaction with RTK. The E3 ubiquitin-protein ligase Cbl was only trapped by SmVKR2 and this fact might be corroborated by the prediction using UbPred program [34] of more ubiquitination sites in SmVKR2 than in SmVKR1. Secondly, an SH2 domain-containing adapter of the Shb protein family was demonstrated to bind specifically to SmVKR1 in its phosphorylated form and the role of the SH2 domain of SmShb in this interaction was recently demonstrated (results not shown). Importantly, the selection of the MAPK kinase Mek7 responsible for JNK activation as well as that of the protein phosphatase PP2C, a regulator of the activity of stress-induced MAPK pathway components [35], with SmVKR1 but not with SmVKR2, prompted us to further analyse the processes of signalling by these two receptors in order to potentially discriminate distinct pathways for each VKR .

#### Studies of SmVKR1 and SmVKR2 signalling pathways.

From the indications that SmVKR1 and SmVKR2 i) were expressed differentially in the tissues of *S. mansoni*, ii) were activated by distinct ligands, and iii) were able to interact

with different partners in the yeast expression system, we explored the possibility that these receptors could mediate distinct signalling pathways in the parasite. The *Xenopus* oocyte is a convenient model system to study signalling pathways initiated by extracellular inducers. Thus, we analyzed in oocytes expressing SmVKR1 and SmVKR2, the effect of L-Arg or of  $\text{Ca}^{2+}$  on the phosphorylation of key cellular proteins already known to be involved in RTK signalling, and particularly those belonging to PI3K/ Akt/ mTOR and MAPK pathways. In controls, we treated oocytes with PG, a natural stimulus known to induce activation of these pathways in stage VI *Xenopus* oocytes [36]. Analyses of phosphoproteins in oocyte extracts were performed 5 hours after the addition of L-Arg and  $\text{Ca}^{2+}$  ligands and prior to oocyte maturation, in order to anticipate the phosphorylation loops which will set up following the activation of MPF (Maturation Promoting Factor). Results in Figure 6 show that activation and phosphorylation of both SmVKR1 and SmVKR2 elicit in the oocyte the activation of the PI3K pathway resulting in the phosphorylation of the kinase Akt/PKB by its activating kinases PDK (phosphoinositide-dependent kinase) and mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) respectively on Thr<sub>308</sub> and Ser<sub>473</sub> residues. Akt is known to activate mTOR leading to the activation of p70S6K, a mitogen activated kinase responsible for the phosphorylation of the S6 protein of the 40S ribosomal subunit, and involved in the translational control of ribosomal proteins and elongation factors [37]. The phosphorylation of p70S6K on Thr<sub>389</sub>, a residue critical for its kinase activity, was detected in the oocytes following activation of SmVKR1 and SmVKR2 by their respective ligands. Such profiles were similar to those obtained in PG-stimulated oocytes, confirming the activation of the PI3K/Akt/S6K pathway by SmVKR1 and SmVKR2. No activation of the PI3K pathway was observed in the absence of ligand in SmVKR-expressing oocytes.

Activated RTKs constitute platforms for the recognition and recruitment of adaptor proteins with SH2 domains linking extracellular signals for RTK activation to downstream signal transduction pathways. Among these, the MAP kinase signalling cascade (Ras-Raf-MEK-ERK) plays a pivotal role and is essential for a variety of processes such as growth, differentiation, proliferation, survival and apoptosis in all eukaryotes. Using anti-phospho ERK2 antibodies, we showed that both SmVKR1 and SmVKR2 can activate downstream the canonical ERK/MAPK cascade.

JNK/MAPK pathway activation is also a classical component of RTK signalling [38,39]. Our results show that SmVKR1 when activated by L-Arg induces the phosphorylation of JNK, exactly as does the activation of *Xenopus* receptors by PG or by insulin in control oocytes (see Figure 6 and S2). However, JNK phosphorylation is not detected in the case of SmVKR2 activated by Ca<sup>2+</sup> in spite of the potential of oocytes to undergo GVBD, and this is in agreement with the fact that JNK plays a limited role in cell-cycle progression [39]. The activation of JNK by SmVKR1 corroborated the identification of JNK pathway actors, like MEK7 and PP2C, as potential interacting partners of SmVKR1 but not of SmVKR2 (Table 1), providing evidence that each VKR can elicit common but also distinct pathways. Additional data (Figure S2) also indicated that phosphorylation of JNK was inhibited by its specific inhibitor SP600125 but not by the addition of purvalanol, the inhibitor of the cyclin-dependent kinase CDK1 that is responsible for MPF activation and meiosis resumption in the oocyte. Therefore, JNK activation, which is elicited by SmVKR1 but not by SmVKR2, follows a pathway parallel to meiotic processes and this confirms the potential of SmVKR1 in specific functions.

In higher eukaryotes, activation of p38 MAPK usually correlates with cell cycle arrest. However, in *Xenopus* oocytes, p38 $\gamma$ /SAPK3 activation has been shown to be important for the meiotic G2/M progression [40]. Following activation by its upstream kinase MKK6, it phosphorylates and activates Cdc25C, the phosphatase directly responsible for MPF activity. Active mutants of MKK6 accelerate PG-induced maturation in oocytes whereas kinase-dead mutants of MKK6 or p38 $\gamma$  inhibit this meiotic progression [40]. Results in Figure 6 confirm this activation of p38 MAPK in PG-stimulated oocytes but they clearly indicate that SmVKR1 and SmVKR2 kinases are not able to induce this pathway.

## Discussion

VKR is an uncommon RTK that bears a VFT ligand-binding domain not found in any other RTK [26]. Since its first discovery ten years ago in *S. mansoni*, VKR has been found in a large variety of organisms. It is preferentially expressed in larval stages and in gonads of several organisms, suggesting its role in development and reproduction [28]. This work is centered on the functions of VKR in *S. mansoni*, and specially on the demonstration of its role in reproduction. We performed a comparative analysis of the two members SmVKR1

and SmVKR2 expressed in *S. mansoni*, studying their respective tissue distribution, the morphological and physiological impact of their knock-down expression in parasites, molecular aspects of receptor activation and cellular signalling pathways.

Firstly, we could show by *in situ* detection of transcripts that SmVKRs were expressed in parasite reproductive organs, more intensively in female ovaries than in testes, in which only a diffuse labelling was obtained. These data were in agreement with the previous observation that VKRs were massively expressed in female gonads of insects and sea urchin, and thus corroborated the hypothesis of a role of VKR in reproductive processes. Additionally, the hints towards distinct localizations of SmVKR1 and SmVKR2 inside of the schistosome ovary suggested that each receptor could potentially initiate different processes in gametogenesis and egg production. Within the vitellarium, a tissue devoted to intense mitotic activities and in which different protein kinases known to be involved in mitosis are largely expressed (SmPlk1 and SmSak polo-like kinases [17,18], SmTK3 Src kinase [13] and TGF $\beta$  receptor SmTR1[20]), *Smvkr* transcripts were not detected. This indicated that SmVKRs could play specific functions in gonads, particularly in gamete differentiation.

Recent data have shown that the well-known IR inhibitor, tyrphostin AG1024, is able to inhibit with a similar efficiency the kinase activities of SmIR1 and SmIR2 but also those of SmVKR1 and SmVKR2, hence confirming the IR-like TK properties of the four receptors [24]. Following AG1024 treatment of female parasites, a remarkable reduction of the size of the ovary was observed with a dominance of primary oocytes within the whole ovary. Additionally, the drug had a visible impact on the formation of the egg. In male schistosomes, AG1024 also affected spermatogenesis and differentiation of sperm [24]. These results already indicated that AG1024-sensitive IR-like receptor signalling played essential functions in gametogenesis. In the present study, we used RNA interference to target specifically SmVKR1 or/and SmVKR2 and to demonstrate that SmVKR were actually important actors for gamete production, oocyte maturation and egg formation.

In male worms, targeting of SmVKR1 or SmVKR2 was not sufficient to affect clearly the production of sperm but when both SmVKRs were knocked down simultaneously, a modification of the cell density in testes was noticed in a large proportion of worms, which contained no more sperm in their seminal vesicles. From this result, it can be hypothesized

that SmVKR1 and SmVKR2 may be co-expressed in male germinal cells, exerting redundant cellular functions in spermatocytes. However, we cannot fully exclude that subtle differences exist which are not detectable by this approach since the affected structures are minor compared to their clearly visible counterparts within the ovary. In female worms, the consequences of the suppression of SmVKR are spectacular, with important morphological changes in the ovary, following treatment with dsSmvkr1 or dsSmvkr2 or both. In all conditions, we observed a strong disorganization of the ovary which was dominated by the presence of primary oocytes. Additionally, in the case of dsSmvkr2 a reduction of the ovary size was found and in Smvkr1-suppressed worms an abortion of egg formation. These data confirm the essential roles of SmVKRs for female gametogenesis and egg production. Furthermore, the differences between the phenotypes observed in dsSmvkr1 or dsSmvkr2-treated parasites suggest that SmVKR1 and SmVKR2, could exert different functions at different steps of oocyte maturation (Figure 7).

Structural and functional differences between the two members of the VKR family in *S. mansoni* have been highlighted. Both SmVKR1 and SmVKR2 were shown to function as homodimers, as other insect VKRs [28] and we have shown that receptor dimerisation occurs for both SmVKR in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . The bivalent cation is sufficient to obtain dimerisation and activation of the kinase receptor in the case of SmVKR2 but not in the case of SmVKR1, which required to be activated an aminoacid, preferentially L-Arg, to bind to its VFT domain. This property was found as common to all the insect VKRs studied ([28], not published). Thus,  $\text{Ca}^{2+}$  appears to be the main activator (and/or ligand) of SmVKR2 whereas L-Arg (or other aminoacids with a lower efficiency), represents the ligand of SmVKR1. An important aspect of these studies concerns the difference in L-Arg-dependence for each SmVKR that is probably related to their different distribution inside of the ovary and thus to the availability of ligands for oocytes along their maturation in reproductive organs. It is tempting to speculate that functional activity of SmVKR1, which is mainly present in mature, primary oocytes ready to be transported to the oviduct to be fertilized by sperm in the receptaculum seminis, is regulated by L-Arg since this aminoacid is largely known to be a major sperm constituent in many organisms [41,42]. Considering as unlikely the formation of SmVKR1/SmVKR2 heterocomplexes in the ovary, their formation may be possible in the male gonad. Here, heterodimers could be

active owing to the presence of L-Arg and  $\text{Ca}^{2+}$ , which are both required to form active heterodimers, as shown in this study.

Following the demonstration by RNAi studies of the importance of SmVKR1 in schistosome reproduction, it was interesting to investigate the use, as an alternative to TK inhibitors, of antagonist ligands to block SmVKR1 activity. In this context, the fact that DmXR, a *Drosophila* GPCR with a VFT similar to that of all VKRs, could bind and be activated by the L-Arg analog, L-Canavanine [43], prompted us to check for the potential of various Arg derivatives, including L-Cana, to activate SmVKR1. Results indicated that none of the Arg derivatives tested was able to activate SmVKR1 and more importantly that all of them blocked in a competitive manner the effect of L-Arg on SmVKR1 activation. Preliminary experiments in which worms were incubated in the presence of L-Cana indicated that this L-Arg antagonist exerts a deleterious effect on reproductive organs comparable to that obtained with dsSmvkr1 treatment by RNAi (unpublished). This reinforces the idea that ligand mimics/antagonists could be, together with TK enzyme inhibitors (like tyrphostins) [24], efficient drugs to inhibit SmVKR activity and control reproduction in schistosomes. Of course, a better knowledge of the VFT structure of SmVKR1 is still required for the design of such antagonists and further SAR studies are currently in progress to identify the residues implied in L-Arg specific binding.

Not much is known about VKR signalling in schistosomes except that there is recent evidence for a cooperation of SmVKR1 with a kinase complex consisting of –in part– unusual kinases [16]. To enlarge the knowledge about binding partners of SmVKR1 but also SmVKR2, a cDNA library screening was performed using the Y2H protocol and intracellular parts of SmVKR1 and SmVKR2 with constitutive kinase activity in order to capture proteins interacting with the active receptors, and particularly those recognizing phosphotyrosines and containing SH2 or PTB domains. A large number of potential partners for SmVKR1 and SmVKR2 were trapped and they were classified in five groups according to their putative functions. Proteins involved in cytoskeleton reorganization, in vesicular trafficking, kinase signalling, gene expression or protein synthesis were captured by both SmVKR proteins and they were more numerous in the case of SmVKR1. Among the specific SmVKR1 partners, we found the Rho1 GTPase, the kinase Mek7 and the phosphatase PP2C, three proteins involved in the JNK activation pathway. Different SH2-

containing adaptor proteins interacted with SmVKR1 and SmVKR2 which were Shb and Cbl respectively.

From these data showing for each SmVKR different expression, ligand-activation and partner interactions, it seemed that SmVKR1 and SmVKR2 could elicit different cellular signalling pathways. In *Xenopus* oocytes, ligand-activated RTKs, and particularly insulin receptor, activate the Erk MAPK as well the PI3K/ Akt/ mTOR pathways. Using this cellular model, we observed that similarly to the insulin receptor, ligand-activated SmVKR1 and SmVKR2 both induce the phosphorylation of Erk1/2, Akt and p70S6K, indicating a potential role of SmVKRs in protein synthesis and cellular growth. Hyperphosphorylation of p70S6K in the case of SmVKR2 could be related to the predominant function in growth of SmVKR2 (Figure 7). Concerning the activation of the two other MAPK pathways, p38 and JNK, no phosphorylation of p38 $\gamma$ /SAPK3 was observed for SmVKR1 and SmVKR2 and JNK was only phosphorylated in SmVKR1-expressing oocytes, corroborating the results of Y2H screening and the finding that SmVKR1 interacted with Rho1, Mek7 and PP2C.

In conclusion, all these data give evidence of the roles of SmVKR in schistosome reproduction. RNAi results, together with previous results obtained with the use of TK inhibitors [24] confirm the functions of SmVKR in gametogenesis, and particularly in oogenesis and egg formation and the importance to consider these RTKs as potential targets against schistosomes in novel anti-fecundity therapies. Each receptor could be susceptible to act at different steps of oocyte maturation (Figure 7). SmVKR1, which is more expressed in mature ovocytes, would activate JNK, a pathway which is known to be involved in cell migration and meiotic progression. By this way, SmVKR1 might be responsible for meiosis resumption and/or ovocyte migration under activation by a male stimulus, L-Arg present in seminal fluid. SmVKR2 present in immature and dividing cells might be implied in priority in proliferation and growth of oocytes, thus explaining its preferential activation of the Akt/mTORC2/p70S6K pathway.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All experiments involving hamsters within this study have been performed in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No 123; revised Appendix A) and have been approved by the committee for ethics in animal experimentation of the region Nord Pas de Calais France (authorisation No.AF/2009) in the local animal house of the Pasteur Institute of Lille (Agreement No.A59-35009).

### Parasite material

A Puerto-Rican strain of *S. mansoni* was maintained by passage through albino *Biomphalaria glabrata* snails and *Mesocricetus auratus* golden hamsters. Adult schistosomes were collected by portal perfusion from infected hamsters at 42–45 days p.i, then maintained in complete M199 medium (supplemented with 10% SVF, 10mM HEPES pH 7.4, 60µg/ml Rifampicin and 50U penicillin/streptomycin) at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### *In situ* hybridization

Adult worm pairs were fixed in Bouin's solution (picric acid/acetic acid/ formaldehyde; 15/1/5) and embedded in paraplast (Paraplast plus, Sigma). Sections (5µm) were incubated in xylol to remove paraplast. Following rehydration, slides were treated with proteinase K (1µg/ml) and sections dehydrated. For hybridization, *in vitro* transcripts (corresponding respectively to nt 4057-4379 and 2617-3027 sequences of SmVKR1 (Genbank Acc N° AF101194) and SmVKR2 (Genbank Acc N° GU270860)) were synthesized and labeled with digoxigenin following the protocol of the manufacturer (Roche). The correct size of labeled sense and antisense transcripts was controlled by gel electrophoresis and the quality of RNA probes was checked by blotting and detection of digoxigenin using alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibodies, naphthol-AS-phosphatase, and Fast Red TR (Sigma). *In situ* hybridization was performed at 57°C for 16 h as previously described [32]. Sections were washed in 0,5XSSC (75mM NaCl, 7,5mM sodium citrate, pH 7) and detection of alkaline phosphatase on slides was achieved as described above.

### Microscopic examination of parasites

Worms fixed in AFA were stained for 30 min in 2,5% Hydrochloric Carmin red (Certistain®, Merck), and then destained in acidic 70% ethanol. Following dehydration in 70%, 90% and 100% ethanol, 5 min each, worms were preserved as whole-mounts in Canada balsam (Merck) on glass slides [11,44,45]. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images were taken using a Leica LSM710 microscope with a 488 nm He/Ne laser and a 470 nm long-pass-filter under reflection mode.

### RNAi experiments

SmVKR1 (640bp) or SmVKR2 (410bp) cDNA fragments were generated as dsRNA templates by PCR amplification using gene specific primers containing T7 promoter sequences (see Table S2). A luciferase dsRNA template of similar size was generated using the pGL3-basic plasmid (Promega) as template. dsRNA was prepared and purified using the Megascript RNAi kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions, and quantified spectrophotometrically (NanoVue Plus™, GE Healthcare). 20 µg of dsRNA were delivered to 8 worm couples in 100µL M199 medium by electroporation using the square-wave protocol already described (125V, 20 ms impulse at room temperature in a 4 mm cuvette) [46]. Worms were then cultured in complete M199 medium. After 5 days, microscopic examination was performed by CLSM on 4 worm couples, as described above. Gene knock-down was monitored in the remaining worms by quantitative RT-PCR. RNA was extracted using the Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit following manufacturer's instructions (Invitrogen). Reverse transcription was performed for 1h at 55°C using the ThermoScript™ RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen) and cDNA was used as template for PCR amplification using KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR Master Mix kit (Clontech) and the ABI PRISM 7300 detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). SmVKR1qPCR<sub>F</sub>/SmVKR1qPCR<sub>R</sub> and SmVKR2qPCR<sub>F</sub>/SmVKR2qPCR<sub>R</sub> primer couples (Table S2) were used to amplify respectively SmVKR1 and SmVKR2 transcripts in triplicate assays. Tubulin gene (GenBank Acc N°M80214) was used as internal control. For graphical representation, the delta-delta Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ) method was applied [47] to compare interfered worms to control dsLuc-treated parasites. The statistical significance of the levels of SmVKR1 and SmVKR2

transcript knock-down was evaluated using Student's t-test in the GraphPad Prism programme (GraphPad Software Inc.).

### Site-directed mutagenesis

Full-length SmVKR1 and SmVKR2 sequences inserted in frame into the pcDNA3.1-V5/His expression vector (Invitrogen) [30] were mutated in their respective VFT domain by replacement of Ser<sub>466</sub> and Ser<sub>410</sub> residues into Ala using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), and the SmVKR1S<sub>466</sub>AF and SmVKR2S<sub>410</sub>AF primers (Table S2) and their respective reverse complement sequences.

### Protein expression in *Xenopus* oocytes

cRNA encoding SmVKR proteins was synthesised *in vitro* using the T7 mMessage mMachine Kit (Ambion, USA) and PmeI-linearised SmVKR-pcDNA plasmids as templates, and injected in stage VI *Xenopus laevis* oocytes according to the procedure previously described [45]. Each oocyte was injected with 60 nl (60ng) of cRNA in the equatorial region and incubated at 19°C in ND96 medium (96mM NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM Hepes pH 7.4 supplemented with 50µg.ml<sup>-1</sup> Streptomycin/Penicillin, 225µg.ml<sup>-1</sup> sodium pyruvate, 30µg.ml<sup>-1</sup> trypsin inhibitor). Kinase activation was obtained by adding external ligands (amino-acids, Ca) in the incubation medium and Germinal vesicle breakdown (GVBD) was detected by the appearance of a white spot at the centre of the animal pole after 15h.

### Immunoprecipitation and Western blot analyses

Expression of SmVKR proteins in oocytes was confirmed by immunoprecipitation of membrane extracts according to the procedure described previously [48]. Following 24 h of expression, oocytes were lysed in buffer A (50 mM Hepes pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05% SDS, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg ml<sup>-1</sup> bovine serum albumin, 10 µg ml<sup>-1</sup> leupeptin, 10 10µg ml<sup>-1</sup> aprotinin, 10µg ml<sup>-1</sup> soybean trypsin inhibitor, 10µg ml<sup>-1</sup> benzamidine, 1 mM PMSF, 1 mM sodium vanadate) and centrifuged at 4°C for 15 min at 10,000 g. Membrane pellets were resuspended and incubated for 15 min at 4°C in buffer A containing 1% Triton X-100 and

then centrifuged under the same conditions. Supernatants were incubated with anti-V5 or anti-Myc antibodies (1:100; Invitrogen) overnight at 4°C. Protein A-Sepharose beads (5 mg; Amersham Biosciences) were added for 1 h at 4 °C. Beads were washed three times and resuspended in Laemmli sample buffer. Eluted immune complexes were subjected to a 7.5% SDS-PAGE, then analyzed by Western blotting using anti-V5 (1:50,000), anti-Myc (1:50,000) or PY20 (1:10,000; anti-phosphotyrosine, BD Biosciences) antibodies and the advanced ECL detection system (Amersham Biosciences).

Oocyte proteins phosphorylated during the activation of signalling cascades by SmVKR, were detected by Western blot analyses of oocyte lysates. Oocytes were lysed in buffer A containing 0.5% Triton X-100 and centrifuged at 12,000g for 15 min at 4°C. The following primary antibodies were used to detect total or phosphorylated Akt, S6K, ERK2, JNK and P38 oocyte kinases: anti-Akt1 (C-20) (1:5000), anti-p70 S6 Kinase alpha (H160) (1:10000) and anti-ERK2 (1:10000) were from Santa Cruz Biotechnology; anti-phospho Akt (Thr308) and anti-phospho Akt (Ser 473) (1:5000) from Upstate Biotechnology; anti-phospho p44/p42 MAPK (ERK1/2) (Thr 202/Tyr 204) (1:10000), anti-phospho p70 S6 Kinase (Thr 389) (1:5000) and anti-phospho p38 MAPK (Thr 180/Tyr 182) from Cell Signalling Technology; anti-c-jun N-terminal kinase JNK (1:10000) from Sigma; anti-active JNK polyclonal antibodies (1:8000) from Promega; p38 (Xp38 $\gamma$ /SAPK3) antiserum prepared by immunizing rabbits with purified GST-Xp38 $\gamma$  [40] was kindly provided by Prof. A.R. Nebreda (Barcelona, Spain). Mouse, rabbit or goat Trueblot® secondary antibodies (eBioscience) were used as secondary antibodies and chemoluminescence was revealed using the advanced ECL detection system (Amersham Biosciences).

### Yeast cDNA library screening

Intracellular domains (ICD) of SmVKR1<sup>YYRE</sup> and SmVKR2<sup>YYRE</sup> [30] were amplified by PCR using respectively SmVKR1<sup>YYRE</sup>ICDF / SmVKR1<sup>YYRE</sup>ICDR and SmVKR2<sup>YYRE</sup>ICDF / SmVKR2<sup>YYRE</sup>ICDR as primers (Table S2). Insertion of SmVKR1<sup>YYRE</sup>ICD and SmVKR2<sup>YYRE</sup>ICD in pGBKT7 plasmid (Gal4-BD-containing vector) was performed by directional cloning using EcoRI/PstI and BamHI/NcoI restriction sites respectively. Fusion of bait proteins in frame with Gal4-BD was checked by sequencing. Y187 yeasts were transformed by pGBKT7 bait constructs using the Lithium acetate method and plated on

selective growth media, as described in the Yeast Protocols Handbook (Clontech). Transformed Y187 cells were then mated with the *S. mansoni* library formed by pGAD (Gal4-AD-containing vector)-transformed AH109 cells, as described before [32]. Diploid yeasts were selected on the quadruple dropout medium, SD-Leu/ -Trp/ -His/ -Ade. Positive clones were submitted to the beta-galactosidase filter assay using X-Gal substrate, following manufacturer's instructions (Yeast Protocols Handbook, Clontech). Confirmed clones were amplified and plasmid DNA was extracted using the NucleoSpin® Plasmid QuickPure kit (Macherey Nagel), after lysis of yeasts with glass beads (Sigma). Plasmid DNA was used to transform chemically competent DH5α bacteria (Invitrogen). Two successive rounds of plating on ampicilline-containing plates were performed to select bacteria containing pGADT7-Rec plasmids. Insert sequences were determined and the nature of preys identified using the BLASTn tool.

#### *In silico* analyses

Sequences were analyzed using the LASERGENE package (DNASar, Madison, WI, USA). BLASTn analyses of sequences obtained from the library screening were performed using the NCBI databank <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/Blast.cgi>.

#### Acknowledgments

Thanks are due to Prof. Jean-François Bodart for helpful advices and to Prof. Angel Nebreda (Barcelona, Spain) for the gift of Xp38γ/SAPK3 and phospho p38 antibodies.

#### Author contributions

Conceived and designed the experiments: CD, MV, NG, KC, CGG. Performed the experiments: MV, NG, KC, SB, MM. Analyzed the data: MV, NG, CD, KC, CGG. Contributed reagents/materials/analysis tools: CGG, KC. Wrote the paper: CD, MV, NG. Revised the manuscript and finally approved the version of the manuscript for publication: CD.

#### Funding

This research was supported by the Institut de la Sante et de la Recherche Medicale and Université Lille Nord de France. MV, MM and NG fellowships were from the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche, France.

### Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

### References

1. WHO (2013) Schistosomiasis. WHO Media Centre, Fact sheet N°115. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>
2. Ross AG, Bartley PB, Sleigh AC, Olds GR, Li Y, et al. (2002) Schistosomiasis. *N Eng J Med* 346: 1212-1220.
3. Doenhoff, MJ and Pica-Mattocchia, L (2006) Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Exp Rev Anti-Infect Ther* 4: 199–210.
4. Pica-Mattocchia L, Doenhoff MJ, Valle C, Basso A, Troiani AR et al. (2009) Genetic analysis of decreased praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop* 11: 82–85.
5. Doenhoff MJ, Cioli D and Utzinger J (2008) Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* 21: 659–667.
6. Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN et al. (2009) Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e504.
7. Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP et al. (2009) The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460: 352-358.
8. Aman A (2009) *Schistosoma japonicum* Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host parasite interplay. *Nature* 460: 345–351.
9. DeMarco R and Verjovski-Almeida S (2009) Schistosomes- proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug Discov Today* 14: 472–478.

10. Dissous C, Ahier A, and Khayath N (2007) Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. *BioEssays* 29: 1281–1288.
11. Beckmann S, Quack T, Burmeister C, Buro C, Long T et al. (2010) *Schistosoma mansoni*: signal transduction processes during the development of the reproductive organs. *Parasitology* 137: 497-520.
12. Dissous C and Grevelding CG (2011) Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: a tangible perspective? *Trends Parasitol* 27: 59–66.
13. Knobloch J, Beckmann S, Burmeister C, Quack T, Grevelding CG (2007) Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 117: 318-336.
14. Beckmann S, Buro C, Dissous C, Hirzmann J, Grevelding CG (2010) The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis. *PLoS Pathog* 6(2):e1000769.
15. Beckmann S, Leutner S, Gougnard N, Dissous C, and Grevelding CG (2012) Protein kinases as potential targets for novel anti-schistosomal strategies. *Curr Pharm Des* 18 (24): 3579–3594.
16. Beckmann S, Hahnel S, Cailliau K, Vanderstraete M, Browaeys E et al. (2011) Characterization of the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 286: 42325-42336.
17. Long T, Cailliau K, Beckmann S, Browaeys E, Trolet J et al. (2010) *Schistosoma mansoni* Polo-like kinase 1: A mitotic kinase with key functions in parasite reproduction. *Int J Parasitol* 40: 1075-1086.
18. Long T, Vanderstraete M, Cailliau K, Morel M, Lescuyer A et al. (2012) SmSak, the second Polo-like kinase of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*: conserved and unexpected roles in meiosis. *PLoS One* 7(6):e40045.
19. Dissous C, Grevelding CG, Long T (2011) *Schistosoma mansoni* Polo-like kinases and their function in control of mitosis and parasite reproduction. *An Acad Bras Cienc* 83: 627-635.
20. LoVerde PT, Andrade LF, Oliveira G (2009) Signal transduction regulates schistosome reproductive biology. *Curr Opin Microbiol* 12: 422-428.

21. Zwick E, Bange J, Ullrich A (2001) Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* 8: 161–173.
22. Johnson LN (2009) Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Q Rev Biophys* 42: 1–40.
23. Ahier A, Khayath N, Vicogne J, Dissous C (2008) Insulin receptors and glucose uptake in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasite* 4: 573–579.
24. Vanderstraete M, Gouignard N, Cailliau K, Morel M, Lancelot J et al. (2013) Dual targeting of insulin and venus kinase receptors of *Schistosoma mansoni* for novel anti-schistosome therapy. *PLoS Negl Trop Dis* 7(5):e2226.
25. You H, Zhang W, Jones MK, Gobert GN, Mulvenna J et al. (2010) Cloning and characterization of *Schistosoma japonicum* insulin receptors. *PloS One* 5(3):e9868.
26. Vicogne J, Pin JP, Lardans V, Capron M, Noël C et al. (2003) An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus Flytrap module. *Mol Biochem Parasitol* 126(1):51-62.
27. Pin JP, Galvez T, Prézeau L (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98(3):325-354.
28. Ahier A, Rondard P, Gouignard N, Khayath N, Huang S et al. (2009) A new family of receptor tyrosine kinases with a venus flytrap binding domain in insects and other invertebrates activated by aminoacids. *PLoS One* 4(5):e5651.
29. Vanderstraete M, Gouignard N, Ahier A, Morel M, Vicogne J et al. (2013) The venus kinase receptor (VKR) family: structure and evolution. *BMC Genomics* 14:361.
30. Gouignard N, Vanderstraete M, Cailliau K, Lescuyer A, Browaeys E et al. (2012) *Schistosoma mansoni*: structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors. *Exp Parasitol* 132(1):32-39.
31. Acher FC, Bertrand HO (2005) Amino acid recognition by venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. *Biopolymers* 80:357-366.
32. Quack T, Knobloch J, Beckmann S, Vicogne J, Dissous C et al. (2009) The formin-homology protein SmDia interacts with the Src kinase SmTK and the GTPase SmRho1 in the gonads of *Schistosoma mansoni*. *PLoS One* 4:e6998.
33. Webster MK, D'Avis PY, Robertson SC, Donoghue DJ (1996) Profound ligand-independent kinase activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the activation loop

mutation responsible for a lethal skeletal dysplasia, thanatophoric dysplasia type II. *Mol Cell Biol* 16: 4081–4087.

34. Radivojac P, Vacic V, Haynes C, Cocklin RR, Mohan A et al. (2010) Identification, analysis and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78(2):365-380.

35. Hanada M, Kobayashi T, Ohnishi M, Ikeda S, Wang H et al. (1998) Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. *FEBS Lett* 437(3):172-176.

36. Schmitt A, Nebreda AR (2002) Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *J Cell Sci* 115:2457-2459.

37. Pullen N, Thomas G (1997) The modular phosphorylation and activation of p70S6K. *FEBS Lett* 410:78-82.

38. Bagowski CP, Xiong W, Ferrell JE Jr (2001) c-Jun N-terminal kinase activation in *Xenopus laevis* eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway. *J Biol Chem* 276(2):1459-1465.

39. Mood K, Bong YS, Lee HS, Ishimura A, Daar IO (2004) Contribution of JNK, Mek, Mos and PI-3K signaling to GVBD in *Xenopus* oocytes. *Cell Signal* 16(5):631-642.

40. Perdiguero E, Pillaire M-J, Bodart J-F, Hennersdorf F, Frödin M et al. (2003) Xp38 $\gamma$ /SAPK3 promotes meiotic G2/M transition in *Xenopus* oocytes and activates Cdc25. *EMBO J* 22:5746-5756.

41. Sarkar BCR, Luecke RW, Duncan CW (1947) The amino acid composition of bovine semen. *J Biol Chem* 171:463-465.

42. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P et al. (2009) Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino acids* 37(1):153-168.

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

44. Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Gomes DC (1998) Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 Suppl 1: 303–307.

45. Neves RH, de Lamare Biolchini C, Machado-Silva JR, Carvalho JJ, Branquinho TB, et al. (2005) A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. *Parasitol Res* 95:43-49.
46. Krautz-Peterson G, Bhardwaj R, Faghiri Z, Tararam CA, Skelly PJ (2010) RNA interference in schistosomes: machinery and methodology. *Parasitology* 137:485-495.
47. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
48. Vicogne J, Cailliau K, Tulasne D, Browaey E, Yan YT et al. (2004) Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 279: 37407-37414.
49. Browaey-Poly E, Cailliau K, Vilain JP (2000) 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* 267:6256-6263.
50. Nawaratna SS, McManus DP, Moertel L, Gobert GN, Jones MK. (2011) Gene atlasing of digestive and reproductive tissues in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 5(4):e1043.
51. Gobert GN, McManus DP, Nawaratna S, Moertel L, Mulvenna J et al. (2009) Tissue specific profiling of females of *Schistosoma japonicum* by integrated laser microdissection microscopy and microarray analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 3(6):e469.

## Figure legends

Figure 1: SmVKR1 and SmVKR2 expression patterns in adult worms. A: Quantification of *Smvkr1* and *Smvkr2* transcripts in adult female and male worms by quantitative RT-PCR. Tubulin transcripts were used as internal controls for each condition. For graphical representation, values were expressed as relative fold-difference using the  $\Delta\Delta C_t$  method and the *Smvkr1*  $\Delta C_t$  value in males as reference. Values are expressed as the mean (+/- SEM) of three determinations. B: Localization in sections of paired adult worms of *Smvkr1* and *Smvkr2* transcripts by *in situ* hybridization. *Smvkr1* transcripts were detected

in mature oocytes (a) whereas *Smvkr2* transcripts were detected in immature oocytes and in the area surrounding the oocyte (b). No expression of *Smvkr1* (c) and *Smvkr2* (d) was detected in the vitellarium. Sense probes of *Smvkr1* and *Smvkr2* were used respectively as controls in e and f. Abbreviations: io: immature oocytes, mo: mature oocytes, ot: oocyte, v: vitellarium. Scale bar: 100 $\mu$ m.

**Figure 2:** Efficiency of SmVKR1 and SmVKR2 knock-down by RNA interference in adult worm pairs. Worm couples were electroporated and incubated for 5 days either with ds*Smvkr1* or ds*Smvkr2* or with both of them as described in Materials and Methods. Control worms were treated in the same conditions with irrelevant dsLuc RNA. Levels of *Smvkr1* (A) and *Smvkr2* (B) transcripts were determined by quantitative RT-PCR in each worm sample. RNAi treatment with ds*Smvkr1* or with ds*Smvkr2* results in specific reduction of *Smvkr1* and *Smvkr2* transcripts respectively. Treatment with both ds*Smvkr1* and ds*Smvkr2* affects the expression of both *Smvkr1* and *Smvkr2* genes. For graphical representation, the  $\Delta\Delta$ Ct method was used to evaluate the relative expression of transcripts in interfered parasites compared to control dsLuc-treated parasites. Statistical analysis was performed using the Student's t-test and values are expressed as mean $\pm$  SEM of three determinations (\*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

**Figure 3:** Morphological analysis of reproductive organs from worms treated with ds*Smvkr1* or ds*Smvkr2* RNA. CLSM images of whole-mount preparations of *S. mansoni* worm couples stained with carmine red. Worms were treated exactly as described in Fig. 2 with ds*Smvkr1* (A, B), ds*Smvkr2* (C, D), ds*Smvkr1* and ds*Smvkr2* (E, F) or control dsLuc (G, H) RNA. The morphology of female (left) and male (right) reproductive organs was analyzed. io: immature oocytes, mo: mature oocytes, ot: oocyte, sv: sperm vesicle, t: testes. Scale bar : 20 $\mu$ m.

**Figure 4:** Ligand determination of SmVKR1 and SmVKR2. Importance of a conserved Ser residue of the VFT domain in amino-acid binding and activation of the receptors. A) Dose-effect of selected aminoacids on the activation of SmVKR1 and potential to induce GVBD in *Xenopus* oocytes. L-Arg is the most potent activator of

SmVKR1 and is active at 1 $\mu$ M. B) Dose-effect of Ca<sup>2+</sup> on the capacity of SmVKR2 to induce GVBD. C) Importance of Ser<sub>466</sub> on the potential of L-Arg to activate SmVKR1. SmVKR1 mutated on its Ser<sub>466</sub> residue present in the VFT domain requires 10<sup>3</sup> fold higher amounts of L-Arg to be activated. The mutation of Ser<sub>410</sub> in the VFT of SmVKR2 (which can be activated by 1mM L-Arg in the absence of Ca<sup>2+</sup>) also abolishes its capacity to be activated by L-Arg, confirming the importance of this Ser residue highly conserved in the amino acid binding motif of VFT [28, 31]. D) Western blot analysis of membrane extracts of oocytes expressing wild-type and mutated SmVKR proteins confirming the expression of the receptors and indicating their level of phosphorylation (activation) following L-Arg binding. SmVKR1S<sub>466</sub>A is not recognized by anti-phosphotyrosine antibodies in the presence of L-Arg 1 $\mu$ M and SmVKR2S<sub>410</sub>A is no more phosphorylated with L-Arg even added at 10mM.

**Figure 5:** Homo- and hetero-dimerisation of SmVKR. Requirement of Ca<sup>2+</sup> and/or L-Arg for receptor dimerisation and kinase activation. cRNAs encoding different tagged versions (Myc or V5) of SmVKR1 and SmVKR2 were injected in *Xenopus* oocytes. Oocytes were incubated for 5h in ND96 medium with or without Ca<sup>2+</sup> and L-Arg, as indicated. Membrane soluble extracts were immunoprecipitated (IP) by anti-V5 or anti-Myc antibodies and analysed by Western Blot (WB) with anti-V5, anti-Myc or anti-phosphotyrosine (pY20) antibodies. L-Arg and Ca<sup>2+</sup> induce respectively the formation of active homodimers of SmVKR1 and SmVKR2. SmVKR1/SmVKR2 active heterodimers can be formed in the presence of L-Arg and Ca<sup>2+</sup> (two bands of 170kDa and 150kDa corresponding respectively to SmVKR2 and SmVKR1 are labelled by anti-PY antibodies).

**Figure 6:** Analysis of signaling pathways triggered by SmVKR activation in *Xenopus* oocytes. SmVKR1-Myc and SmVKR2-Myc proteins were expressed in *Xenopus* oocytes for 5h in ND96 incubation medium with or without their respective ligands (L-Arg 1 $\mu$ M and Ca<sup>2+</sup> 1mM). Oocyte lysates were analyzed by Western blot to detect the phosphorylation state of Akt, S6K, ERK2, JNK and p38 $\gamma$  following SmVKR1 and SmVKR2 activation by L-Arg and Ca<sup>2+</sup> respectively. As a control, SmVKR1-expressing oocytes were stimulated by progesterone (PG), the natural hormonal stimulus for oocyte maturation. Immunoprecipitation of oocyte extracts by anti-Myc antibodies allowed us to

confirm the expression of receptors (WB anti-Myc) and their activation/phosphorylation (WB anti-pY20) in the presence of their respective ligands. Results show that both SmVKR1 and SmVKR2 activate Akt and Erk2 pathways. S6K can be phosphorylated by both receptors, but more importantly by SmVKR2. Only SmVKR1 can trigger JNK activation. The p38 $\gamma$  pathway, is activated in control PG-stimulated oocytes, but not under activation of SmVKR1 or SmVKR2.

Figure 7: Summary of the major signalling pathways triggered by the activation of SmVKR and potentially regulating fate and differentiation of oocytes in female schistosome organs. Proteins identified by Y2-H screening (blue) and kinases detected for their activation in *Xenopus* oocytes (orange) are indicated. Proved and direct interactions between proteins are indicated by full arrows.

Table 1: List of proteins identified by yeast-two-hybrid analyses using intracellular domains of SmVKR1 and SmVKR2 as baits. Proteins were classified in functional groups and Genbank accession numbers are indicated. Ticks indicate sequences already shown to be overexpressed in ovary by transcriptomic analyses of *S. mansoni* [50] and *S. japonicum* [51]. Asterisks indicate the proteins for which the interaction of full length sequences with VKR has been confirmed in yeast.

Supplementary Figure 1: Localization of *Smvkr1* and *Smvkr2* transcripts in male *S. mansoni* testes by *in situ* hybridization. Transcripts of *Smvkr1* (A) and *Smvkr2* (B) were detected in testes following overexposure to the dye substrate. Scale bar: 50 $\mu$ m.

Supplementary Figure 2: The JNK pathway activated by SmVKR1 is sensitive to the JNK inhibitor SP600125 but is independent on the activation of MPF. As in the case of PG or insulin-stimulated *Xenopus* oocytes, phosphorylation of JNK in SmVKR1-expressing oocytes is inhibited by its specific inhibitor SP600125 but not by the addition of purvalanol, the inhibitor of the cyclin-dependent kinase CDK1 that is responsible for MPF activation and meiosis resumption in the oocyte.

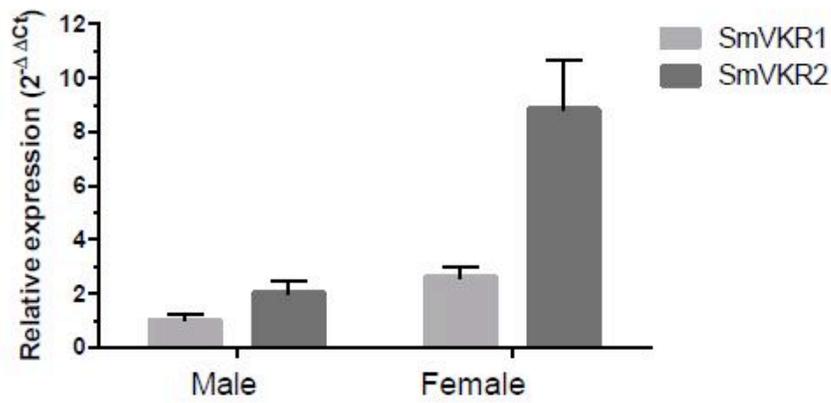
Supplementary Table 1: Induction of GVBD in *Xenopus* oocytes expressing SmVKR1 and SmVKR2 by various L-aminoacids (each added at 1mM). Induction of GVBD by progesterone (PG) in non-injected oocytes is not affected by the presence of L-aminoacids.

Supplementary Table 2: List of oligonucleotide sequences used as primers.

# Figures

Figure 1:

**A**



**B**

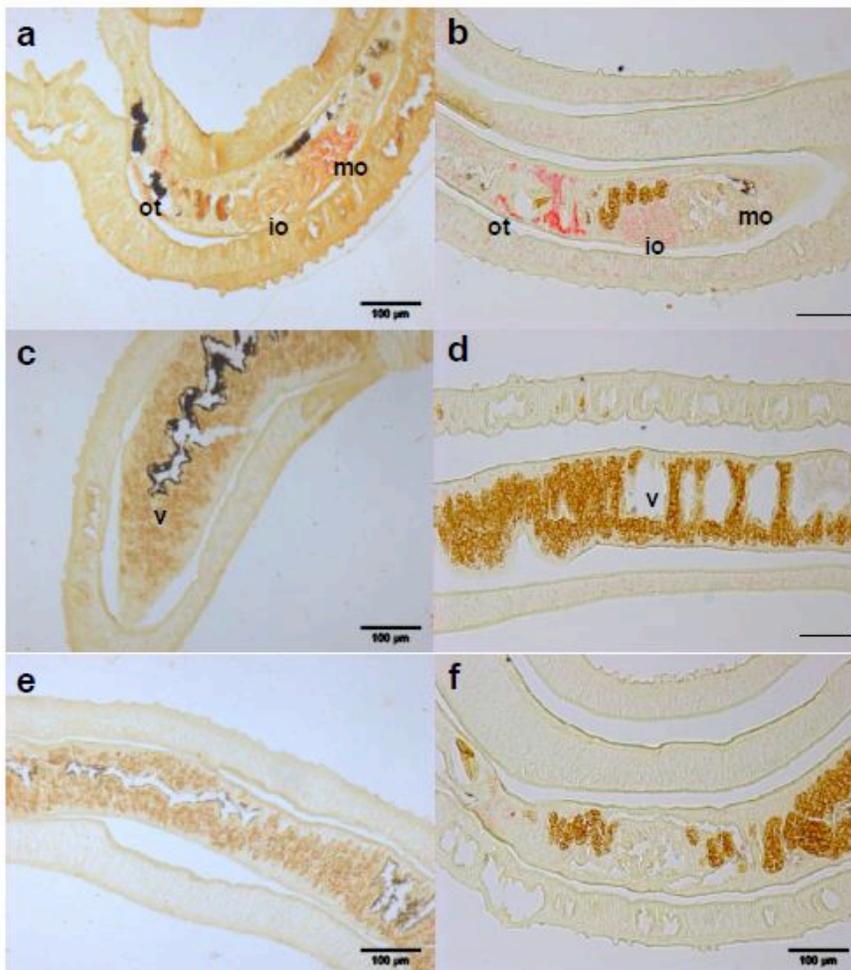
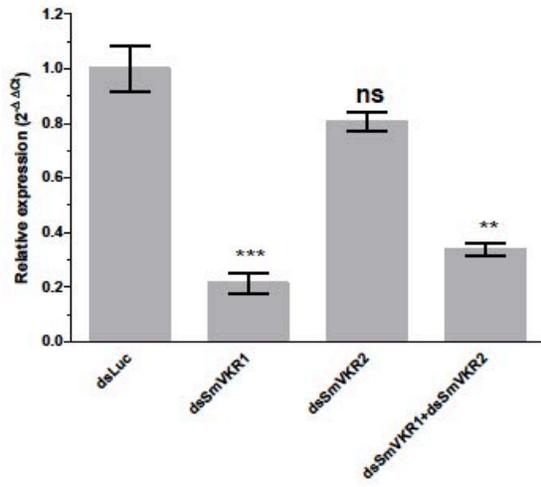


Figure 2:

**A**



**B**

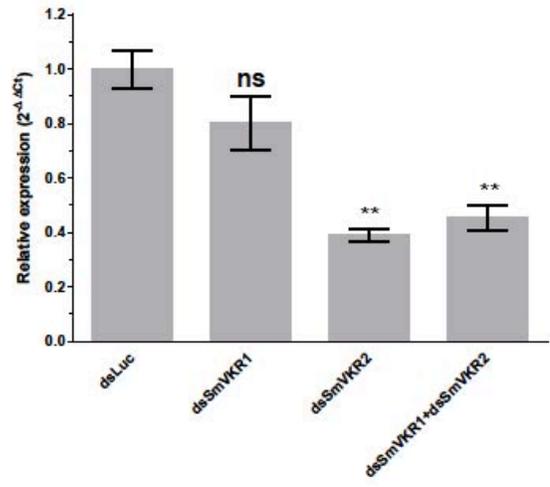


Figure 3:

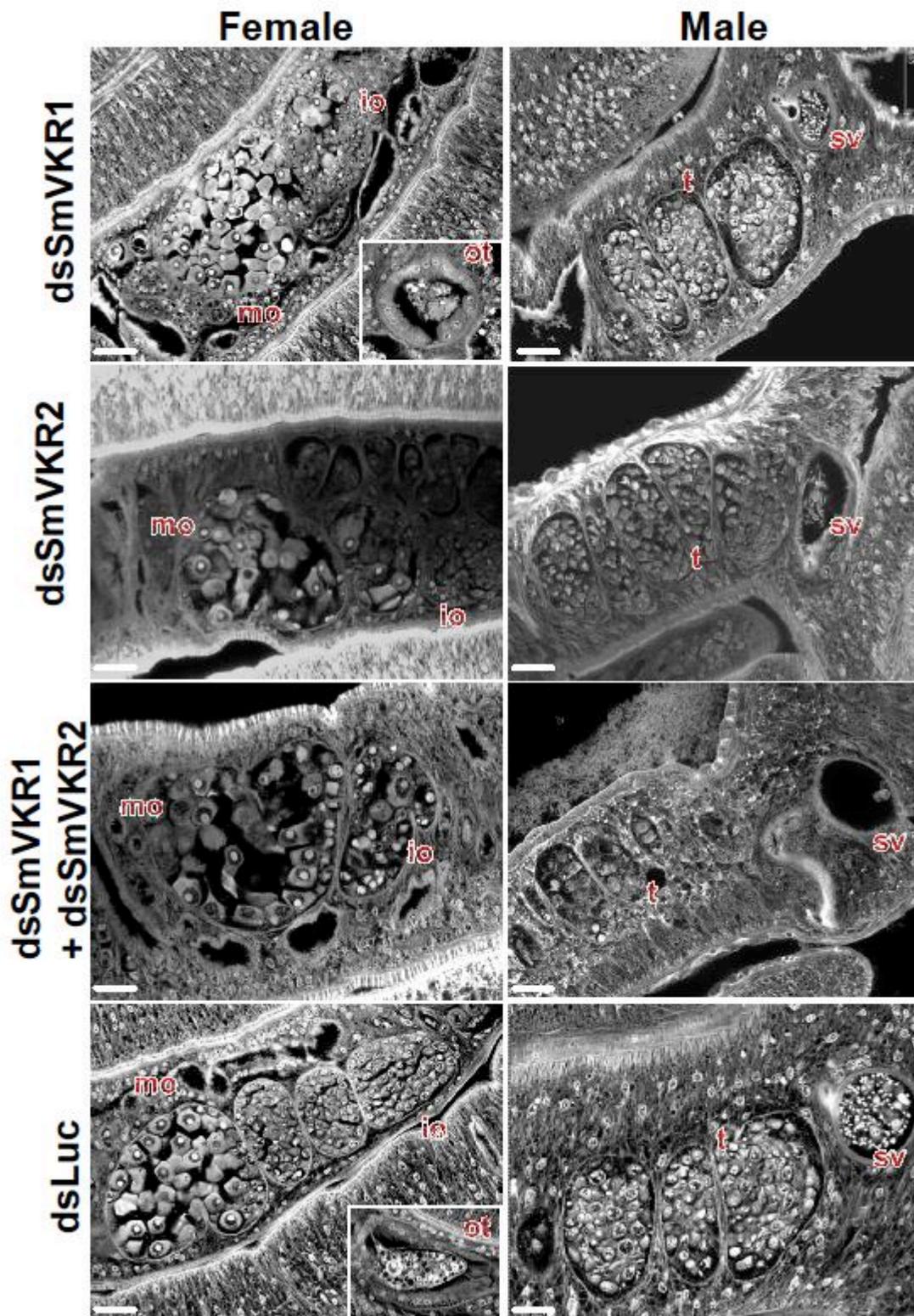


Figure 4:

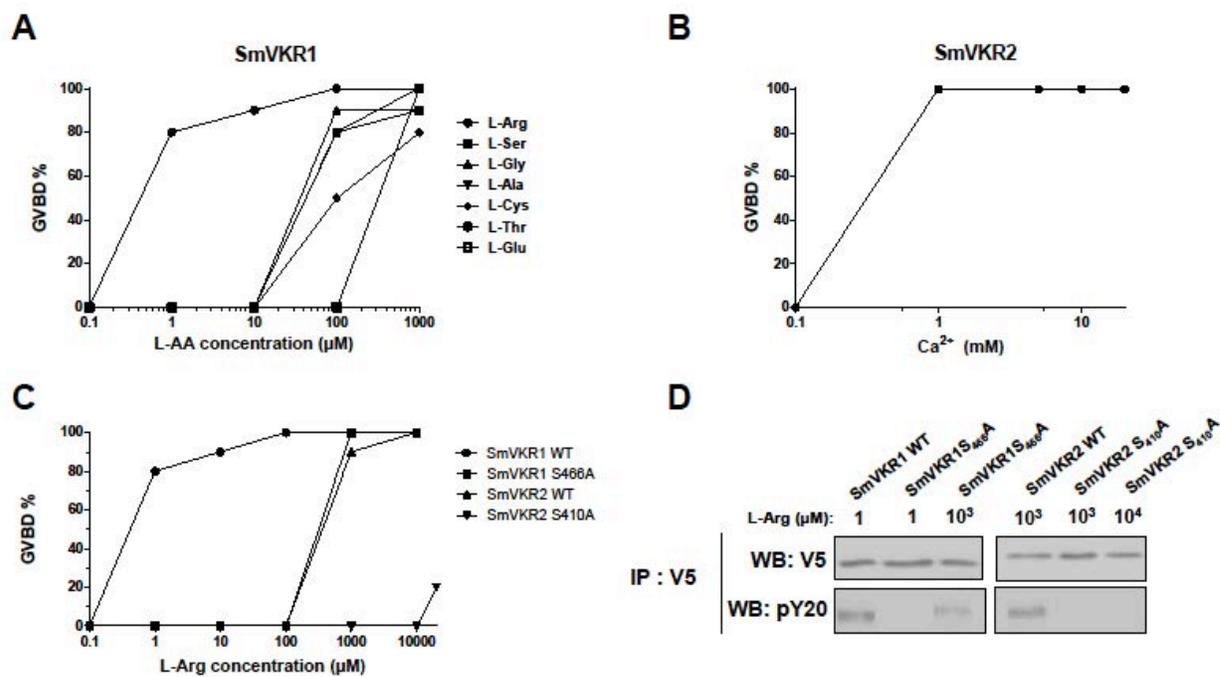


Figure 5:

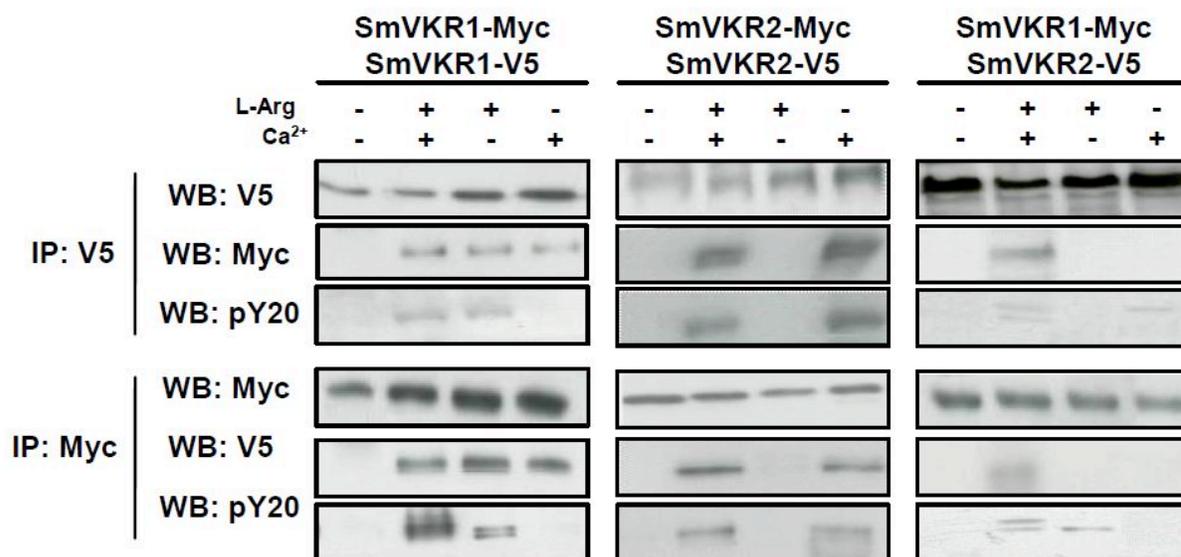


Figure 6:

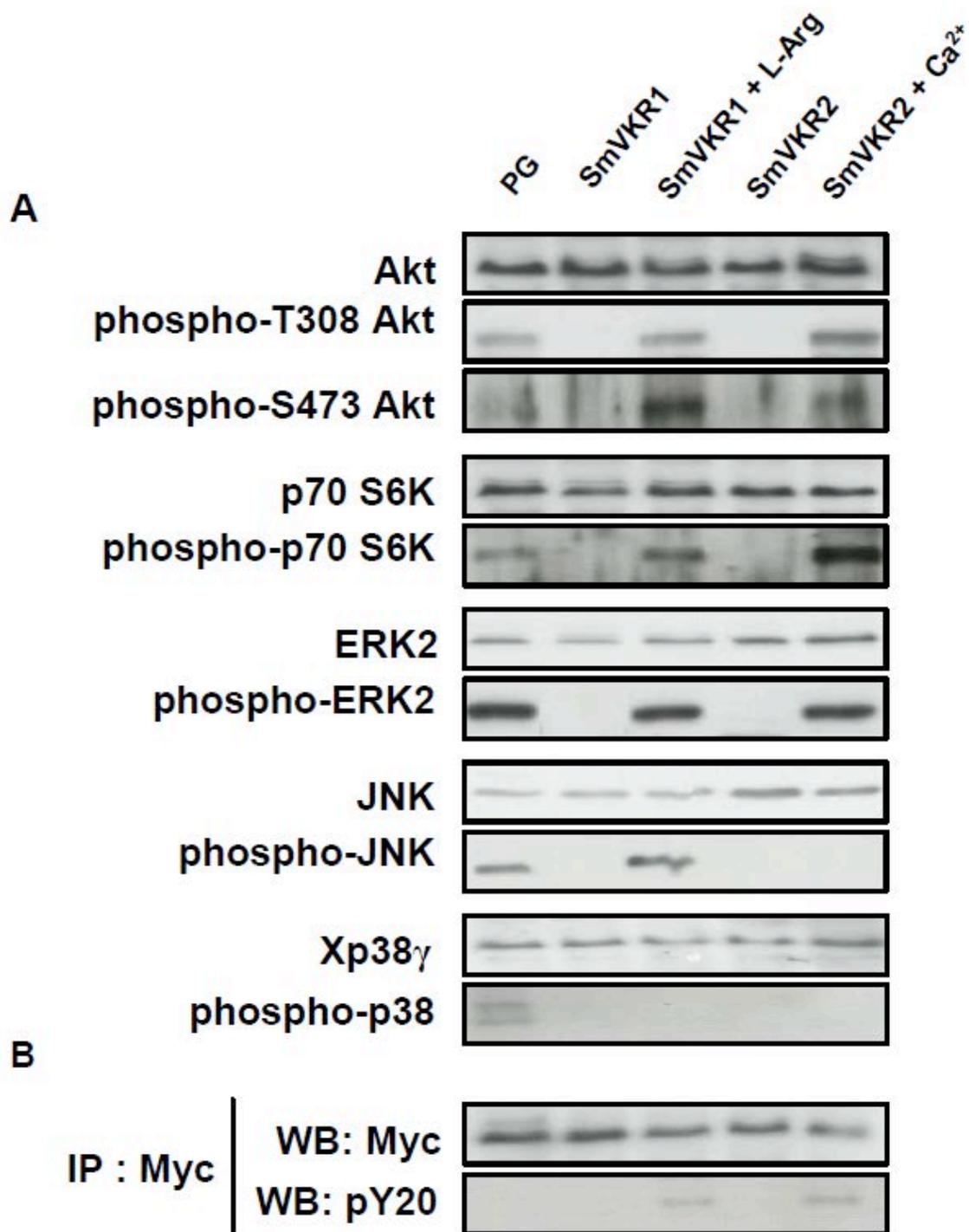


Figure 7:

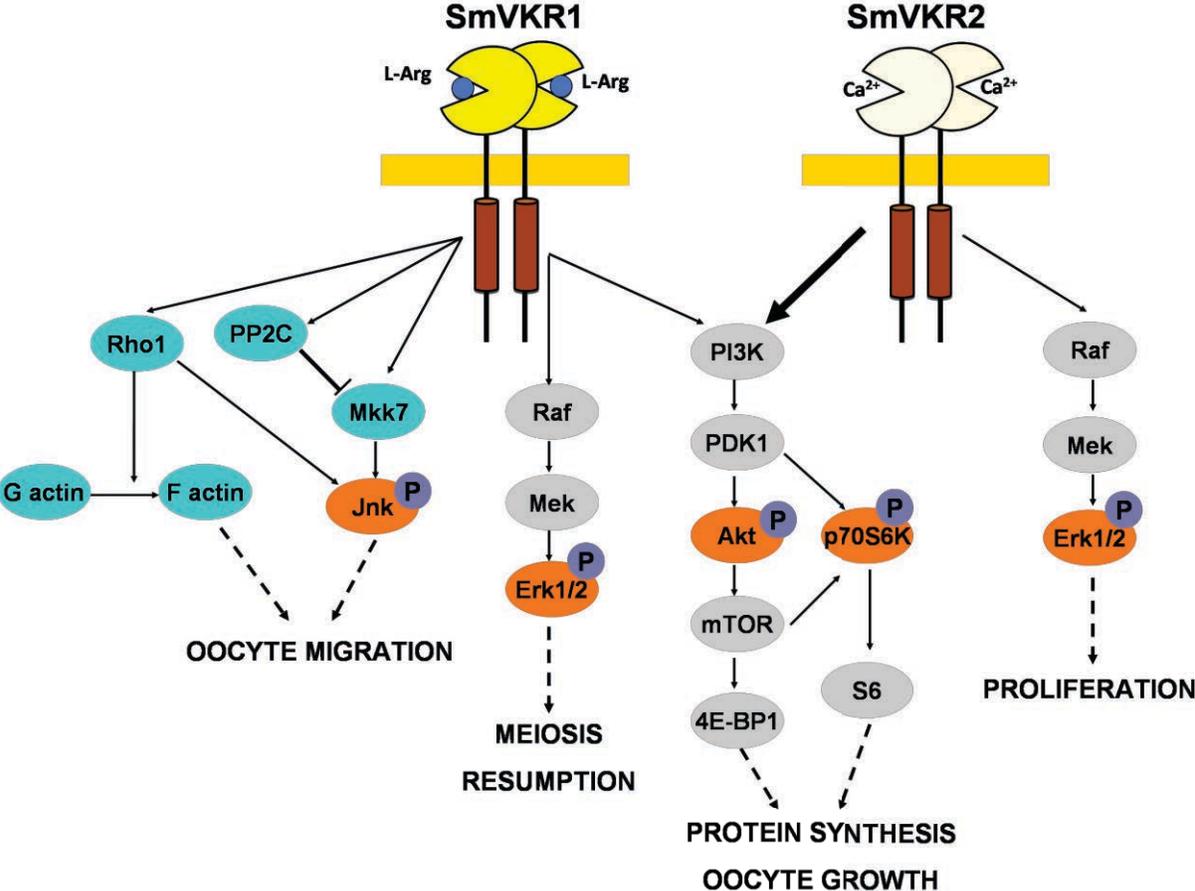


Table 1:

Functional group	Identified proteins	Accession N°	Identified with		Overexpression in ovary	
			SmVKR1	SmVKR2	<i>S. mansoni</i>	<i>S. japonicum</i>
Cytoskeleton arrangement	Fibrillin 2	U54588.1	X			
	Rho GTPase (SmRho1)	* AY158212.1	X		✓	✓
	Spectrin, Beta chain	XM_002579838.1	X			✓
	Zyxin/trip6	XM_002575737.1	X			
	Actin	XM_002580135.1	X	X	✓	✓
Membrane trafficking	Prefoldin subunit	XM_002578485.1	X	X	✓	✓
	Junctophilin-like protein	XM_002576132.1	X			
	Synaptotagmin	XM_002576619.1	X		✓	✓
	Coatamer gamma subunit	XM_002580203.1	X	X		
Gene expression	Expressed protein (similar to ARID2)	XM_002577690.1	X			
	Expressed protein (Btz domain)	XM_002572591.1	X			
	Ftz-F1 interacting protein	AY456264.1	X			✓
	HRX histone methyltransferase	XM_002574332.1	X			
	Notch	XM_002574857.1	X			✓
	Nuclear autoantigenic sperm protein	XM_002577077.1	X			✓
	Peter-pan related protein	XM_002580320.1	X		✓	✓
	Plac8 homolog	XM_002573812.1	X		✓	
	Pre-mRNA processing protein prp39-related	XM_002579875.1	X		✓	✓
	TFIIA Large subunit	XM_002579091.1	X		✓	✓
	tRNA d(2)-isopentenylpyrophosphatase	XM_002571087.1		X		
	Cellular nucleic acid binding protein	XM_002581028.1	X	X	✓	
Phosphosignalling	Sirtuin 7 (Sirt7)	* KC993857.1	X	X	✓	
	Mek7	* XM_002574592.1	X			✓
	PP2C	* XM_002575792.1	X		✓	✓
	Shb-like protein	* JN864885.1	X			
Protein synthesis	Cbl	XM_002571919.1		X	✓	
	Elongation factor 1-alpha	Y08487.1	X		✓	✓
	Methionyl aminopeptidase 2 (M24 family)	XM_002572527.1	X		✓	
	Ribosomal protein S2	XM_002572774.1	X			
	40S ribosomal protein S28, putative	XM_002573998.1	X		✓	✓
	PDE-12 like protein	* XM_002577997.1		X	✓	
	60S ribosomal protein L26-like	DQ480541.1		X		✓
Diverse enzymes	Elongation factor Tu GTP binding domain containing 1 isoform 6-related	XM_002571419.1	X	X		
	ATP-dependent transporter	XM_002576209.1	X			✓
	Autophagy-related protein 101 like	XM_002577493.1	X			
	Carboxypeptidase	XM_002581470.1	X			✓
	Cathepsin B	M21309.1	X		✓	✓
	Chitobiosyldiphosphodolichol alpha-mannosyltransferase	XM_002571918.1	X			
	GAPDH	XM_002576948.1	X			✓
	Glutathione peroxidase	M86510.1	X			✓
	Microsomal glutathione s-transferase	XM_002576747.1	X			✓
	NADH-cytochrome B5 reductase	XM_002576573.1	X			✓
	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kD subunit	XM_002578142.1	X		✓	✓
	Ornithine aminotransferase	EU042598.1	X			✓
	Peptidylprolyl isomerase	XM_002577985.1	X			
	Subfamily T1A non-peptidase homologue (T01 family)	XM_002574652.1	X		✓	
	Thimet oligopeptidase (M03 family)	XM_002574355.1	X			✓
	Zinc metalloproteinase	XM_002573446.1	X			
	26S protease regulatory subunit S10b	XM_002573132.1	X			
Endoglycosylceramidase	XP_002577487.1		X			

Supplementary Figure 1:



Supplementary Figure 2:



Supplementary Table 1:

AA (1mM)	GVBD (%)		
	PG	SmVKR1	SmVKR2
Ala	100	100	0
Arg	80	100	100
Asn	100	0	0
Asp	100	0	0
Cys	80	80	90
Gln	90	0	0
Glu	100	100	0
Gly	90	80	0
His	100	0	0
Ile	100	0	0
Leu	100	0	0
Lys	100	0	0
Met	90	0	0
Phe	100	0	0
Pro	100	0	0
Ser	100	90	0
Thr	100	100	90
Trp	90	0	80
Tyr	100	0	0
Val	100	0	0

Supplementary Table 2:

Name	Primer Sequence
SmVKR1HISF	5'-CTGGTGATCCGTCTCCAAGT-3'
SmVKR1HISR	5- AAACGTATGGCCACAGGAAG-3'
SmVKR2HISF	5'-GGACCAACAACAACAATCGTATGATCC-3'
SmVKR2HISR	5'-CGAGGCATATCTAAATCAGCCAATTCTG-3'
SmVKR1RNAiF	5- GGACTCAAATTCACCCACCCCTCATGTC-3'
SmVKR1RNAiFT7	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACACCCACCCCTCATGTC-3'
SmVKR1RNAiR	5'-GATTGACATGACAGGAGATGAAG-3'
SmVKR1RNAiRT7	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGATGACAGGAGATGAAG-3'
SmVKR2RNAiF	5'-GTCTACATACCTGCGAACTACC-3'
SmVKR2RNAiFT7	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTACTGTCTACATACCTGCGAACTACC-3'
SmVKR2RNAiR	5'-GACTAACGGTGTCAACAGTTGAGC-3'
SmVKR2RNAiRT7	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTACTGACTAACGGTGTCAACAGTTGAGC-3'
SmVKR1qPCRF	5'- AGACATTGATATCCACCTGCC-3'
SmVKR1qPCRR	5'-AACGCCATTACGCTTCG-3'
SmVKR2qPCRF	5'- CATTACCTTTTCAACCAACTGTGG-3'
SmVKR2qPCRR	5'-GGACACTTGATAATATCAGAA-3'
SmVKR1S466AF	5'-GATCGCTGCTCTGTGTGCGGATTCAATAGAACC-3'
SmVKR2S410AF	5'-CTATCGCTGCTCTATGCGCAGACTCTATAGAGGCTG-3'

### **2.3. Les voies de signalisation SmVKR1 dans les ovocytes matures: importance de l'axe SmShb - JNK**

La caractérisation fonctionnelle et moléculaire de SmVKR1 et SmVKR2 a mis en évidence une fonction majeure de ces récepteurs dans l'ovogenèse. Afin de mieux comprendre et mieux cerner la fonction de ces récepteurs dans l'ovogenèse, un approfondissement de nos connaissances concernant les voies de signalisation VKR est nécessaire. Nous avons choisi de nous intéresser plus en détail à la voie de signalisation SmVKR1, et ce pour deux raisons majeures :

- SmVKR1 est le récepteur qui possède le plus d'analogies fonctionnelles et structurales avec la majorité des autres VKR, principalement ceux d'insectes.
- Le criblage en double hybride a mis en évidence une quantité beaucoup plus importante de partenaires potentiels pour SmVKR1, nous permettant d'échafauder plus d'hypothèses quant à sa signalisation intracellulaire.

Parmi les protéines interactrices identifiées en levure figure une protéine à domaine SH2, homologue des protéines Src homology 2 domain containing adaptor protein B ou Shb. Sa caractérisation fonctionnelle et l'étude de son implication dans la voie de signalisation SmVKR1 est actuellement en cours au laboratoire par Marion Morel.

Les protéines Shb sont des protéines adaptatrices possédant un domaine SH2, un domaine PTB ainsi que des sites de fixation de domaines SH3. Elles sont exprimées dans un large panel de types cellulaires, et possèdent des fonctions dans la régulation de l'angiogenèse, de la progression tumorale, de l'homéostasie glucidique ou encore dans la reproduction (Christoffersson *et al.*, 2012; Akerblom *et al.*, 2009; Calounova *et al.*, 2010; Gustafsson *et al.*, 2013). Les protéines Shb interagissent préférentiellement avec des RTK parmi lesquels figurent le FGFR-1, le VEGFR-2 ou encore les PDGFR. De même, elles jouent un rôle d'adaptateur pour le recrutement d'un certain nombre de protéines de signalisation telles que Src, Abl, PLC $\gamma$ , FAK ou encore PI-3K. L'établissement d'une lignée de souris Shb *-/-* par l'équipe du Professeur Welsh a permis de mettre en évidence un rôle pléiotrope de la protéine. De manière intéressante, les souris Shb *-/-* présentent des défauts dans l'ovogenèse ainsi que dans l'embryogenèse précoce, avec notamment des

anomalies dans le déroulement de la méiose I et une augmentation du nombre d'ovocytes bloqués aux stades Pachytène de Prophase I (Kriz *et al.*, 2007; Calounova *et al.*, 2010).

La protéine SmShb a été clonée à partir de cDNA de vers adultes, puis son appartenance à la famille des Shb confirmée par analyse phylogénétique. Par hybridation *in situ*, une expression préférentielle de SmShb a été détectée dans les ovocytes matures ainsi que dans les testicules et les cellules vitellines.

En combinant des analyses d'interaction en levure et ovocyte de Xénope, nous avons pu confirmer que SmShb fixe spécifiquement SmVKR1 seulement dans sa forme active, et n'est pas capable d'interagir avec les autres RTK IR-like du schistosome que sont SmVKR2, SmIR-1 et SmIR-2. Des expériences de mutagenèse ont pu mettre en évidence que SmVKR1 se fait phosphoryler sur son résidu Y<sub>979</sub> dans le domaine juxtamembranaire, et que ce résidu sert de point d'ancrage au domaine SH2 de la protéine SmShb.

De manière intéressante, le complexe SmVKR1-SmShb n'induit pas la GVBD en ovocyte de Xénope, et SmShb contraint même le signal induit par SmVKR1 à emprunter en priorité la voie JNK qui à elle seule, n'est pas capable d'entraîner la reprise de méiose. De nombreuses études ont mis en avant l'implication de la protéine Shb dans la régulation des voies de signalisation PI3K/Akt (Welsh *et al.*, 2002), S6K (Calounova *et al.*, 2010), Erk1/2 (Cross *et al.*, 2002; Lindholm *et al.*, 2002) et JNK/Rac1 (Lindholm *et al.*, 2002). Shb serait également impliqué dans la modification du cytosquelette et la migration cellulaire en réponse à des facteurs de croissance tels que le VEGF-A ou le PDGF (Hooshmand-Rad *et al.*, 2000; Matsumoto et Mugishima, 2006). Afin de déterminer quels signaux intracellulaires sont déclenchés par le complexe SmVKR1-SmShb, l'identification de partenaires intracellulaires de SmShb a été entreprise. Pour ce faire, la banque d'ADNc de vers adultes réalisée en levure a été criblée, en utilisant comme appât la protéine SmShb. Parmi les protéines partenaires, une d'entre elles présente un intérêt particulier et est actuellement étudiée au laboratoire. Il s'agit de RhoU (ou Wrch-1 pour Wnt-regulated Cdc42 homolog 1), une GTPase impliquée chez l'homme dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, à l'origine de l'adhésion et la migration cellulaire (Chuang *et al.*, 2007). Plus particulièrement, RhoU serait nécessaire au maintien de l'actine sous sa forme G polarisée, et régulerait la migration cellulaire en activant les voies de signalisation SAPK/JNK (Loebel et Tam, 2012). Enfin, l'incubation de parasites adultes en présence de l'inhibiteur de JNK SP600125 entraîne une diminution de la ponte des œufs qui est corrélée à une augmentation importante de la taille de l'ovaire ainsi que du nombre

d'ovocytes matures, suggérant un défaut dans l'ovulation ou la migration des ovocytes matures.

L'ensemble de ces résultats, associés à ceux précédemment obtenus dans le cadre de l'étude des voies de signalisation des VKR de *S. mansoni*, suggère fortement l'importance de la voie de signalisation SmVKR1-SmShb-JNK dans les ovocytes matures. Au sein des ovocytes matures, le complexe SmVKR1-SmShb recruterait des Rho GTPases, qui vont à leur tour activer la voie MKK4/7-JNK, à l'origine du remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à la migration des ovocytes (Fig 3).

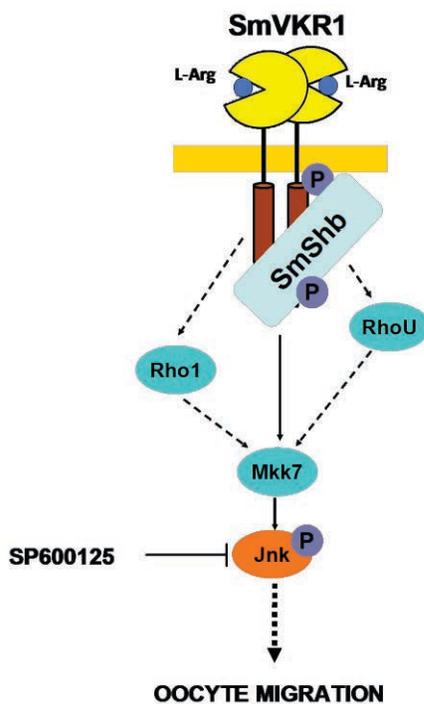


Figure 3 : Schéma illustrant les voies de signalisation possibles pour SmVKR1-SmShb dans les ovocytes matures de *S. mansoni*.

### 3. Les protéine kinases de *S. mansoni* comme cibles thérapeutiques

#### 3.1. *Un double ciblage des SmVKRs et SmIRs comme nouvelle stratégie anti-schistosome*

Le traitement de la schistosomiase repose à l'heure actuelle sur l'utilisation d'une seule drogue, le praziquantel. Son usage en masse depuis le début des années 1980 a mené à l'émergence de souches tolérantes à la molécule, rendant nécessaire le développement de nouvelles drogues. De nombreuses classes de protéines de schistosomes ont été étudiées afin de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques et parmi les plus intéressantes figurent les Tyrosine Kinases. En effet, cette classe de protéines possède des fonctions essentielles dans la régulation d'un certain nombre de processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation ou encore la migration. L'expression des TK est très souvent dérégulée lors de pathologies cancéreuses et certaines TK constituent d'ailleurs des cibles thérapeutiques validées pour le traitement du cancer. En ce qui concerne le schistosome, plusieurs études ont mis en évidence un rôle majeur des TK cytoplasmiques dans la survie du parasite (Dissous et Grevelding, 2010). L'article suivant, **Dual targeting of insulin and venus kinase Receptors of Schistosoma mansoni for novel anti-schistosome therapy**, démontre pour la première fois que les RTK pourraient également constituer de bonnes cibles thérapeutiques. L'interrogation qui est à la base de ce travail concerne les RTK et leur potentiel thérapeutique dans la lutte anti-schistosome. La très grande homologie des domaines catalytiques des VKR avec ceux des récepteurs à l'insuline nous a amenés à nous demander si un ciblage simultané de ces quatre récepteurs était envisageable, et le cas échéant, si l'impact sur le parasite serait suffisant pour entraîner sa mort. Nous nous sommes donc focalisés sur ces quatre récepteurs SmIR1, SmIR2, SmVKR1 et SmVKR2.

Pour ce faire, les domaines intracellulaires IR-like des quatre récepteurs SmIR1, SmIR2, SmVKR1 et SmVKR2 ont été clonés, à la fois dans leurs formes sauvage et constitutivement active. Les domaines intracellulaires ont ensuite été exprimés en ovocyte de Xénope afin d'analyser leur activité kinase. Les domaines intracellulaires dans leur forme constitutivement active s'autophosphorylent et induisent la reprise de méiose

observée par l'apparition de la GVBD dans les ovocytes de Xénope. L'expression de ces formes actives entraînant spontanément la reprise de méiose, nous disposons alors d'un système nous permettant un criblage de molécules inhibitrices. Quatre inhibiteurs d'IR ou IGF-1R ont été testés dans ce modèle: AG538, AG1024, AG1478 et HNMPA-(AM)<sub>3</sub>. Les composés SU11274 et BIBF1120, des inhibiteurs des récepteurs MET et FGFR respectivement, ont quant à eux été utilisés comme témoins négatifs. De manière intéressante, nous avons observé que les quatre molécules inhibitrices d'IR possèdent un pouvoir inhibiteur sur les quatre domaines intracellulaires. Les concentrations minimales nécessaires pour inhiber chacun des 4 domaines TK diffèrent cependant, et la drogue ayant les effets les plus marqués est la tyrphostine AG1024, qui inhibe à 100% la GVBD induite par les domaines TK dès 1µM. C'est donc l'effet de cette molécule que nous avons étudié sur des cultures de parasites *in vitro*. Les effets de la drogue ont été étudiés sur les deux stades parasitaires évoluant chez l'homme :

- Des schistosomules transformés mécaniquement ont été cultivés *in vitro* durant 5 jours en présence de différentes concentrations d'AG1024. Nous avons pu observer un effet de la drogue sur la survie des parasites en culture, avec un pourcentage de survie qui décroît de manière temps- et dose-dépendante. Ainsi, une concentration de 50µM du composé tue 100% des parasites sous 48h, alors que des schistosomules traités avec 25µM de drogue meurent sous 5 jours. Des expériences de TUNEL montrent que la drogue induit l'apoptose chez le schistosomule, comme cela a déjà été décrit sur des lignées de cellules humaines. Cette apoptose apparaît de manière dose-dépendante également.

- En ce qui concerne les vers adultes, nous avons pu montrer que de faibles concentrations d'AG1024 (1 à 5µM) mènent au désaccouplement des parasites et à une diminution de la ponte. On détecte d'ailleurs un arrêt complet de la ponte chez les couples traités avec 5µM du composé. Utilisé à des concentrations plus élevées, l'AG1024 entraîne également la mort des parasites sous 2 à 5 jours. Etant donné l'impact du traitement sur la ponte, ainsi que la forte expression des VKR au sein des ovaires, nous avons décidé d'observer l'effet d'une concentration sub-létale d'AG1024 sur la morphologie des organes reproducteurs. Des observations par microscopie confocale à balayage laser mettent en évidence que le traitement à l'AG1024 engendre des phénotypes plus ou moins marqués sur les ovaires et les testicules selon la concentration de drogue utilisée. Ainsi à 1µM, si l'on n'observe aucun changement morphologique au

niveau des testicules, on remarque une élévation du nombre d'ovocytes matures au sein de l'ovaire, un phénotype similaire à celui observé chez les parasites interférés pour SmVKR1 (voir partie 2.2 des résultats). Une concentration de 5 $\mu$ M entraîne l'apparition d'une population de cellules indifférenciées au sein de la vésicule séminale qui normalement ne contient que des spermatozoïdes à la forme allongée, suggérant un effet délétère de la drogue sur la spermatogenèse. Chez les femelles on observe une réduction très importante de la taille des ovaires, qui est associée à une modification de l'organisation antéro-postérieure des ovocytes. Ces anomalies au niveau des ovaires se répercutent dans la formation des œufs au sein de l'oocyte, où l'on observe des anomalies de forme, de structure, voire des œufs sans ovocyte.

L'ensemble de ces résultats montre qu'une inhibition simultanée des 4 RTK IR-like est possible avec un seul composé. L'AG1024 montre des effets schistosomicides à la fois sur les schistosomules et sur les adultes *in vitro*, ce qui représente une caractéristique intéressante que ne possède pas le praziquantel (qui est inactif sur les juvéniles). Ces résultats, qui nécessitent évidemment d'être confirmés *in vivo* dans des modèles animaux constituent cependant une base de travail intéressante en ce qui concerne la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques alternatives. Ainsi, les TK et plus précisément les RTK pourraient constituer des candidats sérieux au développement de nouvelles drogues. Leur conservation dans tout le phylum des plathelminthes laisse supposer qu'une telle stratégie puisse également être appliquée chez d'autres parasites d'intérêts vétérinaire et/ou médical tels que *Fasciola*, *Clonorchis* ou encore *Echinococcus*. Enfin, cet exemple met en avant le concept de drogues multi-kinases, dont certaines comme le Sunitinib (Sutent<sup>®</sup>) ou le Sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>) ont prouvé leur efficacité dans le traitement de pathologies cancéreuses. Nous postulons que l'utilisation de drogues multi-kinases serait également efficace pour tuer le parasite.

### **3.2. Identification de protéine kinases essentielles à la survie et/ou à la reproduction du parasite**

Du fait de leurs fonctions pléiotropes, les PK sont des cibles thérapeutiques intéressantes, pour le traitement de pathologies variées telles que les cancers, l'athérosclérose ou encore de la douleur (voir <http://www.clinicaltrial.gov>). Un point de vue conjoint de notre équipe et de celle du Pr Grevelding repose sur le fait que les drogues anti-cancer et principalement les inhibiteurs de protéine kinases pourraient être de bons candidats pour le traitement de la schistosomiase (Dissous et Grevelding, 2010). Le génome de *S. mansoni* code pour 252 PK dont seulement 16 ont été à l'heure actuelle caractérisées (Andrade *et al.*, 2011). Appréhender les fonctions de l'ensemble des protéines formant le kinome de *S. mansoni* représente donc un objectif de premier ordre. Cependant le schistosome est un modèle d'étude difficile, et l'on dispose à l'heure actuelle de peu d'outils de biologie moléculaire pour appréhender la fonction des gènes de manière globale. Si l'ARN interférence est maintenant possible, sa mise en place est toujours délicate et ne se prête pas à une application à grande échelle. Afin de pallier cette limite technologique et de réaliser une étude plus large du kinome de *S. mansoni*, nous avons décidé d'utiliser une stratégie basée sur l'utilisation d'inhibiteurs kinases et l'évaluation de leur impact sur la physiologie et la survie du parasite, l'objectif étant d'identifier à la fois de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et des PK ayant des fonctions clés dans la gamétogenèse.

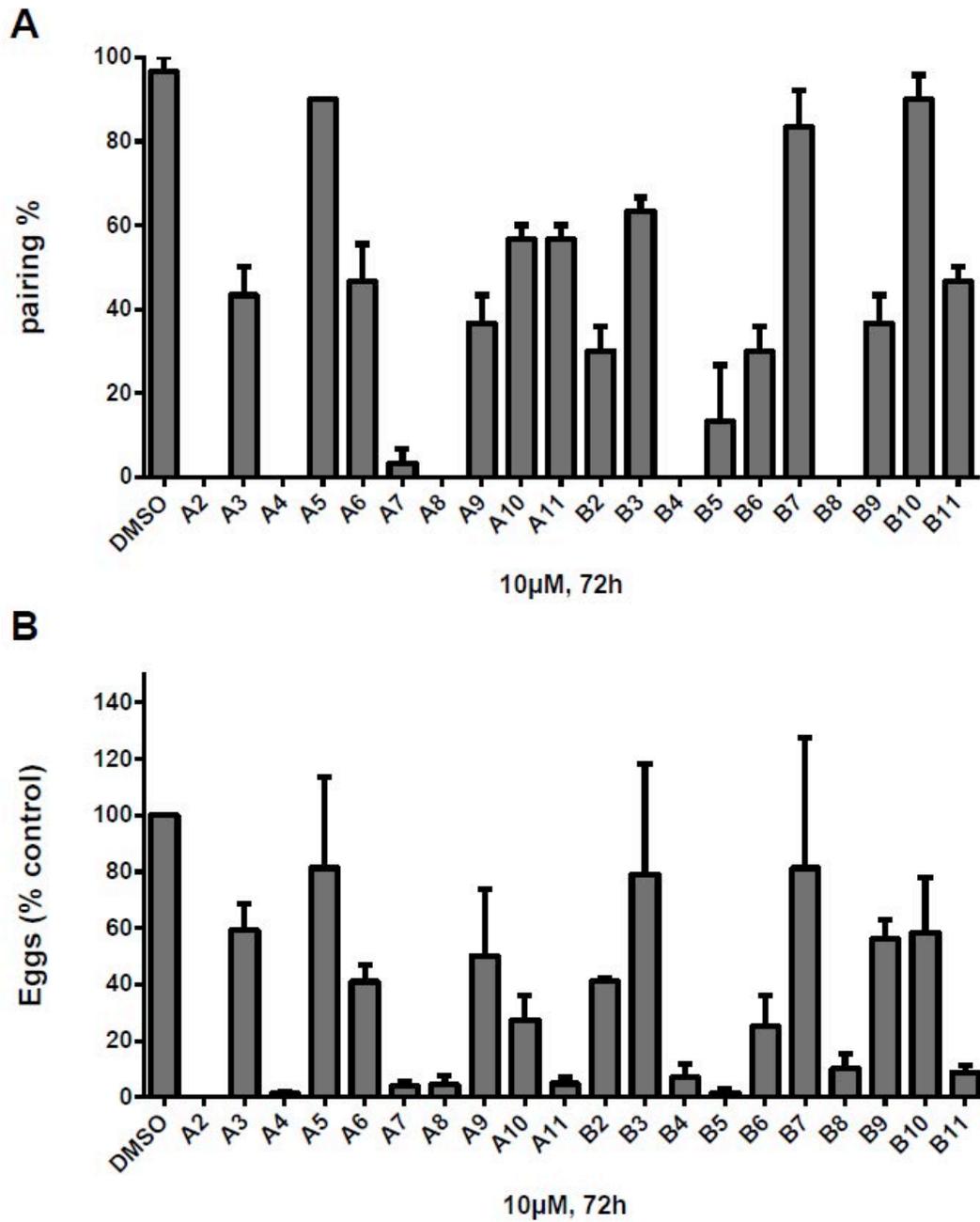
Pour ce faire, nous avons commencé le criblage d'une banque d'inhibiteurs commerciaux de protéine kinases. La banque que nous avons choisie, l'InhibitorSelect™ 96-Well Protein Kinase Inhibitor Library I (Millipore), contient 80 inhibiteurs de PK qui sont pour la plupart des compétiteurs d'ATP hautement sélectifs, réversibles et capables de traverser la membrane cellulaire. Les tests mis en place reposent sur l'observation de l'impact des drogues sur la viabilité des schistosomules et des vers adultes *in vitro*. En parallèle, nous mesurons d'autres paramètres tels que la ponte des œufs et l'accouplement des vers. Les inhibiteurs sont testés dans un premier temps à une concentration de 10µM durant 72h avec renouvellement journalier du milieu. Les données de viabilité et d'appariement sont récupérées toutes les 24h, et le nombre total d'œufs pondus est déterminé à la fin de la période de traitement (Fig 4). Le criblage est actuellement en cours de réalisation, mais il nous a d'ores et déjà fourni des résultats

intéressants. Sur les 40 composés testés en trois réplicats biologiques sur les schistosomules, 17 d'entre eux ont entraîné la mort d'une population de 500 schistosomules en moins de 72h (Tableau 2). Cinq composés ont un effet schistosomicide important, entraînant la mort des schistosomules en moins de 24h. Il s'agit des inhibiteurs d'Akt, PKC, d'EGFR et Lck/Tie2. Chez l'adulte, quatre de ces composés entraînent une diminution de la ponte corrélée à une baisse du taux d'appariement, le maintien de l'accouplement *in vitro* étant considéré comme un signe de bonne « santé » des parasites en culture.

En ce qui concerne les PK impliquées dans la reproduction, le criblage met en évidence que des inhibiteurs d'EGFR (composé B11, PubChem compound ID: 9843206) et de la GSK-3 (composé A11, PubChem compound ID: 2396) diminuent de manière drastique la ponte sans que celle-ci soit corrélée à un effet sur l'accouplement des vers (Fig 4). Si les rôles des récepteurs à l'EGF dans l'ovogenèse et la fécondation sont bien connus (Cheung *et al.*, 2011; Sundaram, 2006), les fonctions de la protéine GSK-3 dans ces mécanismes sont nettement moins évidentes.

Plusieurs études traitent néanmoins du rôle de cette protéine dans la maturation des ovocytes comme acteur de la signalisation insuline (Uzbekova *et al.*, 2009; Swain *et al.*, 2007; Acevedo *et al.*, 2007). L'étude la plus intéressante, et celle qui nous conforte dans l'hypothèse que GSK3 jouerait un rôle dans la reproduction du schistosome, a été réalisée par Rentzsch *et al* chez *Hydra vulgaris* (Rentzsch *et al.*, 2005). Dans cet article, les auteurs mettent en évidence une expression importante de HvGSK3 à la fois lors de l'ovogenèse et de la spermatogenèse. L'inhibition de GSK3 par le Lithium empêche la poursuite de l'ovogenèse et donc la reproduction sexuée de l'hydre.

Une fois le criblage de la banque d'inhibiteurs terminé, nous envisageons tout d'abord le clonage des protéines d'intérêt qui seront identifiées afin de vérifier par leur expression en ovocyte de Xénope que ces protéines sont bien les cibles des composés ayant un effet sur le parasite. Le caractère essentiel des protéines pour la survie et/ou la reproduction des parasites sera ensuite confirmé par ARN interférence. Le cas échéant, l'impact sur les organes reproducteurs sera observé en microscopie confocale à balayage laser.



**Figure 4: Effet des composés sur l'appariement et la ponte des oeufs de couples de vers adultes cultivés *in vitro*.** A, Effet des inhibiteurs de PK sur l'appariement (A) et la ponte (B) des couples de parasites après 72h de culture.

Composé	N°	Cible	Effet Schistosomicide
AG1024	A2	IGF1R/ VKR	-
AGL 2043	A3	PDGFR/Kit	-
<b>Akt Inhibitor IV</b>	<b>A4</b>	<b>Akt</b>	<b>++</b>
Akt Inhibitor V, Triciribine	A5	Akt	-
<b>Akt Inhibitor VIII</b>	<b>A6</b>	<b>Akt</b>	<b>+</b>
<b>Akt Inhibitor X</b>	<b>A7</b>	<b>Akt</b>	<b>+++</b>
<b>PDK1/Akt/Flt Dual Pathway Inhibitor</b>	<b>A8</b>	<b>PDK1/Akt</b>	<b>+++</b>
<b>Aurora Kinase Inhibitor II</b>	<b>A9</b>	<b>Aurora</b>	<b>+</b>
Bcr-abl Inhibitor	A10	Bcl-Abl	-
Bisindolylmaleimide I	A11	GSK-3	-
Bisindolylmaleimide IV	B2	PKC	-
BPIQ-I	B3	EGFR	-
<b>Chelerythrine Chloride</b>	<b>B4</b>	<b>PKC</b>	<b>+++</b>
Compound 56	B5	EGFR	-
DNA-PK Inhibitor II	B6	DNA-PK	-
DNA-PK Inhibitor III	B7	DNA-PK/PI3K	-
PI-103	B8	DNA-PK, mTOR	-
Diacylglycerol Kinase Inhibitor II	B9	DAG Kinase	-
DMBI	B10	PDGFR	-
<b>EGFR/ErbB-2 Inhibitor</b>	<b>B11</b>	<b>EGFR</b>	<b>+++</b>
EGFR Inhibitor	C2	EGFR	-
EGFR/ErbB-2/ErbB-4 Inhibitor	C3	<b>EFGR</b>	<b>+</b>
Flt-3 Inhibitor	C4	Flt-3	-
Flt-3 Inhibitor II	C5	Flt-3	-
<b>cFMS Inhibitor</b>	<b>C6</b>	<b>cFMS</b>	<b>+</b>
Gö 6976	C7	PKC	-
<b>Gö 6983</b>	<b>C8</b>	<b>PKC</b>	<b>+</b>
GTP-14564	C9	FLT3/PDGFR	-
<b>Herbimycin A</b>	<b>C10</b>	<b>Src</b>	<b>++</b>
<b>Flt-3 Inhibitor III</b>	<b>C11</b>	<b>Kit/Abl/Src</b>	<b>++</b>
<b>IGF-1R Inhibitor II</b>	<b>D2</b>	<b>IGFR</b>	<b>++</b>
IRAK-1/4 Inhibitor	D3	IRAK1 et 3	-
JAK Inhibitor I	D4	Jak/Tyk	-
JAK3 Inhibitor II	D5	JAK3	-
<b>JAK3 Inhibitor IV</b>	<b>D6</b>	<b>JAK/EGFR</b>	<b>++</b>
<b>JAK3 Inhibitor VI</b>	<b>D7</b>	<b>JAK3</b>	<b>+</b>
<b>Lck Inhibitor</b>	<b>D8</b>	<b>Lck/Kdr/Tie2</b>	<b>+++</b>
LY 294002	D9	PI3K	-
LY 303511	D10	PI3K	-
<b>Met Kinase Inhibitor</b>	<b>D11</b>	<b>Met</b>	<b>++</b>

**Tableau 2: Effet schistosomicide de 40 inhibiteurs de protéine kinases testés sur des cultures de schistosomules *in vitro*. +++ : mort de 100% des schistosomules en moins de 24h, ++: mort de 100% des schistosomules en moins de 48h, +: mort de 100% des schistosomules en moins de 72h, -: incapacité à tuer l'ensemble d'une population de schistosomules en 72h.**

# **Discussion générale et conclusion**



Les invertébrés englobent 98% du nombre total d'espèces animales connues à ce jour, parmi lesquelles figurent de nombreux organismes d'intérêt médical, sanitaire ou agro-alimentaire. D'importantes avancées ont été faites ces dernières années en termes de séquençage de génomes et l'augmentation exponentielle du nombre d'espèces séquencées autorise maintenant les analyses phylogénétiques à l'échelle du règne animal. Cet apport important de données nous a permis de découvrir une nouvelle famille de Récepteurs Tyrosine Kinase spécifiques des organismes invertébrés, les VKR. Les gènes *vkr* ont été retrouvés presque exclusivement dans des génomes d'organismes protostomes, et principalement chez les arthropodes. Ils ne sont pas présents dans les génomes des organismes modèles *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*, ce qui pourrait d'ailleurs expliquer pourquoi cette famille de récepteurs n'a pas été découverte plus tôt. La présence ou l'absence de VKR au sein d'un phylum donné ne constitue pas une règle générale et l'on peut trouver des espèces ne possédant pas de VKR chez les arthropodes. De même, certaines espèces ou groupes d'espèces possèdent plusieurs VKR au sein de leur génome, posant la question d'une diversification fonctionnelle.

La question de l'origine des VKR fait le lien avec une thématique passionnante. Des analyses génomiques successives ont placé l'émergence des RTK chez l'ancêtre commun aux métazoaires et amoebozoaires (Clarke *et al.*, 2013), soit il y a près de 600 millions d'années (Miller, 2012). Cette classe de protéines est à l'heure actuelle intensivement étudiée car il est avancé que l'invention des RTK par ces organismes pourrait avoir facilité l'apparition de la multicellularité. Cette hypothèse est d'ailleurs appuyée par le fait que chez l'éponge *Amphimedon queenslandica*, un des organismes multicellulaires les plus simples, une expansion importante des TK a été observée, avec plus de 150 RTK parmi lesquels des homologues d'EphR, d'IR ou encore de Met (Srivastava *et al.*, 2010). Si certaines classes de TK cytosoliques sont conservées depuis les eucaryotes unicellulaires jusqu'aux organismes multicellulaires, ce n'est pas le cas des RTK, qui possèdent de fortes divergences en termes de structure, en accord avec l'hypothèse de recombinaison des modules fonctionnels de Yarden et Ullrich (Yarden et Ullrich, 1988; Suga *et al.*, 2012). Nous disposons à l'heure actuelle des génomes complets de certains prémétazoaires appartenant aux phylums des Amoebozoa (*Acanthamoeba castellanii*), Filasterea (*Capsaspora owczarzakii*) et Choanoflagellata (*Monosiga brevicollis* et *Salpingoeca rosetta*). Toutes ces espèces possèdent plusieurs RTK putatifs, mais

cependant seuls *M. brevicollis* et *S. rosetta* possèdent des protéines à l'architecture similaire de celle de VKR (King *et al.*, 2008; Manning *et al.*, 2008). Une des priorités du laboratoire à l'heure actuelle est de cloner cette protéine chez *M. brevicollis* afin de confirmer son appartenance à la famille des VKR. Le cas échéant, VKR représenterait la seule famille de RTK conservée depuis les unicellulaires jusqu'aux métazoaires, et il serait alors tentant de spéculer que ce récepteur ait pu être un outil important pour la communication cellule-cellule et l'établissement de la multicellularité.

La caractérisation biochimique de ce récepteur en ovocyte de Xénope apporterait des réponses significatives aux questions que nous nous posons en terme de conservation de la signalisation Tyrosine Kinase. En effet, au-delà de la déorphanisation du récepteur qui est envisageable dans ce modèle, il serait intéressant d'observer si la conservation des protéines de signalisation est telle que ce récepteur puisse être capable d'activer les voies de signalisation du Xénope. Le choanoflagellé *M. brevicollis* possède un système MAP kinase intermédiaire entre celui, simple, des champignons, et celui des métazoaires supérieurs. Ainsi, il possède les voies Erk1/2 et Erk5, ainsi que certains membres des cascades associées à l'activation des protéines p38. De manière intéressante, elle ne possède pas de voie JNK ce qui permettrait une analyse comparative intéressante avec les VKR de métazoaires et notamment SmVKR1. L'ensemble de ces travaux futurs permettrait une meilleure connaissance de la mise en place des caractéristiques propres à la signalisation RTK chez les choanoflagellés.

Les différents travaux réalisés sur les VKR depuis 2003 ont mis en évidence une fonction importante de ces récepteurs dans la biologie des invertébrés, et plus particulièrement dans la reproduction du parasite *Schistosoma mansoni*. Des expériences de qPCR et d'hybridation *in situ* nous ont renseigné sur l'importance de l'expression des deux gènes dans les ovocytes. Si SmVKR2 est exprimé massivement dans les ovogonies et ovocytes en croissance, SmVKR1 a uniquement été détecté dans les cellules germinales dites matures, c'est-à-dire bloquées en prophase I de méiose et prêtes à être fécondées (Justine, 1980). Des approches combinées d'ARN interférence et d'utilisation d'inhibiteurs ont permis la mise en évidence de fonctions centrales mais néanmoins différentes de SmVKR1 et SmVKR2 dans l'ovogenèse du parasite. Le modèle ovocyte de Xénope s'est révélé extrêmement utile pour la caractérisation biochimique des récepteurs, c'est-à-dire la déorphanisation, l'analyse structurale des domaines VFT et TK, la détermination des capacités d'oligomérisation et l'étude des protéines partenaires et des voies de

signalisation. Là encore, si certaines similitudes entre les récepteurs ont été recensées, SmVKR1 et SmVKR2 possèdent des caractéristiques différentes, tant au niveau des ligands que des partenaires intracellulaires et voies de signalisation activées.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement deux fonctions cellulaires différentes pour ces récepteurs :

Mon point de vue personnel est qu'au sein des ovocytes matures, SmVKR1 est activé par un ligand de type acide aminé contenu dans le sperme du réceptacle séminal. Il serait alors responsable de l'activation de voies de signalisation responsable de la migration des ovocytes à travers l'oviducte. L'ovulation à proprement parler est un phénomène qui fait intervenir chez *S. mansoni* une réorganisation du cytosquelette qui se traduit par l'émission de pseudopodes (Jurberg *et al*, 2009). Cette réorganisation du cytosquelette pourrait être activée par une voie JNK impliquant les protéines SmShb, et les Rho GTPases SmRho1 et/ou SmRhoU. En ce qui concerne SmVKR2, nous disposons à l'heure actuelle de moins de données que pour SmVKR1. Les profils de phosphorylation des protéines de signalisation en ovocyte de Xénope penchent vers une activation massive de la voie Akt/ mTORC2 / S6K, qui supporterait l'hypothèse d'un rôle dans la croissance des ovocytes. Cependant nous ne pouvons pas exclure que SmVKR2 puisse posséder également une fonction mitogène qui participerait à l'importante production d'ovocytes chez la femelle accouplée.

Toujours en ce qui concerne le modèle *Schistosoma mansoni*, il est important de noter que des transcrits codant pour les deux protéines ont été détectés également dans les testicules, mais également dans le parenchyme du ver adulte. De même, des analyses par qPCR ainsi qu'une approche préliminaire d'ARN interférence réalisée chez le sporocyste suggère fortement une fonction des deux récepteurs dans la croissance de ce stade larvaire (Thèse de Nadège Gouignard, 2011). Il semble donc plus que probable que les VKR aient des fonctions plus larges dans les cellules somatiques du parasite à tous les stades. Une analyse fonctionnelle plus étendue mais également plus précise est nécessaire pour comprendre plus en détail la fonction de ces récepteurs dans la biologie des invertébrés. Le modèle *Schistosoma mansoni* est un modèle fascinant mais possède néanmoins de nombreuses limites technologiques qui représentent un frein à la compréhension de la fonction précise des VKR. Ainsi, il serait intéressant d'étudier les VKR chez d'autres organismes pour lesquels on dispose d'outils plus performants, comme *Tribolium castaneum*, *Strongylocentrotus purpuratus* et *Nematostella vectensis* pour

lesquels des outils particulièrement adaptés à l'étude de l'embryogenèse existent. La collaboration que nous avons établie avec le Dr Cebrià va nous permettre d'étudier de manière plus large la fonction des VKR dans chez la planaire *Schmidtea mediterranea*, un organisme phylogénétiquement proche du schistosome.

La lutte contre la schistosomiase nécessite de manière urgente le développement de nouvelles drogues. En effet, le praziquantel, seul médicament utilisé à l'heure actuelle, possède un spectre d'action limité et l'apparition de résistances est une menace réelle du fait de son utilisation massive. Si plusieurs candidats vaccins sont en ce moment en phase d'essais cliniques, la tendance actuelle est au pessimisme quant au développement rapide d'un vaccin.

Parmi les classes de protéines qui pourraient représenter des cibles thérapeutiques intéressantes figurent les protéine kinases. Ces dernières années, plusieurs études ont mis en évidence la possibilité de tuer le parasite en ciblant ces protéines. Certains composés utilisés en thérapie anti-cancer se sont révélés efficaces *in vitro* (Dissous et Grevelding, 2010). L'absence de VKR chez les vertébrés et plus particulièrement chez l'homme fait de cette famille de récepteurs une cible thérapeutique potentielle pour un traitement anti-schistosome. Les travaux réalisés au cours de cette thèse semblent confirmer l'importance des VKR dans la survie de *S. mansoni*, même si des expériences *in vivo* sont indispensables afin de confirmer ces résultats encourageants *in vitro*. Plus largement, le criblage d'une banque d'inhibiteurs de protéine kinases, que nous avons démarré au laboratoire, mettra en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, et parmi elles figurent déjà les récepteurs à l'EGF, extrêmement étudiés dans les cancers du sein et du poumon. Déterminer l'efficacité d'inhibiteurs commerciaux d'EGFR tels que le gefitinib, l'erlotinib ou encore le lapatinib sur la viabilité du parasite appuyerait un peu plus l'hypothèse selon laquelle les drogues anti-cancer sont des composés hautement efficaces et directement applicables.

Au delà du schistosome et de la schistosomiase, la présence de VKR chez de nombreux organismes parasites et vecteurs de pathogènes permet d'envisager ces récepteurs comme cibles thérapeutiques afin de: 1- réduire la population d'espèces vecteurs du genre *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* ou *Biomphalaria*, 2- traiter les maladies parasitaires causées par des plathelminthes des genres *Taenia*, *Echinococcus*, *Schistosoma* ou encore *Clonorchis*.

Le développement de molécules pour traiter les maladies tropicales négligées est soumis à des contraintes importantes en termes de coûts de production. Les marges bénéficiaires des entreprises pharmaceutiques se révèlent souvent restreintes du fait de la pauvreté de la population nécessitant les traitements. L'utilisation de molécules anti-cancer pour le traitement de la schistosomiase est donc financièrement difficile à imaginer. Cependant la perte des droits d'exclusivité liés aux brevets déposés sur les molécules favorisera le développement de génériques et fera baisser les coûts de commercialisation. Dans cette optique, nous pouvons espérer que d'ici plusieurs années ces molécules seront utilisables pour le traitement de la schistosomiase.



# **Bibliographie**



## A

- Abruzzi A, Fried B.** Coinfection of *Schistosoma* (Trematoda) with bacteria, protozoa and helminths. *Adv Parasitol.* 2011;77:1-85.
- Acevedo N, Ding J, Smith GD.** Insulin signaling in mouse oocytes. *Biol Reprod.* 2007 Nov;77(5):872-9.
- Adachi-Yamada T, Nakamura M, Irie K, Tomoyasu Y, Sano Y, Mori E, Goto S, Ueno N, Nishida Y, Matsumoto K.** p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):2322-9.
- Ahier A, Khayath N, Vicogne J, Dissous C.** Insulin receptors and glucose uptake in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasite.* 2008 Dec;15(4):573-9.
- Ahier A, Rondard P, Gougnard 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.
- Airaksinen MS, Saarma M.** The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 2002 May;3(5):383-94
- Akerblom B, Barg S, Calounova G, Mokhtari D, Jansson L, Welsh M.** Impaired glucose homeostasis in *Shb*<sup>-/-</sup> mice. *J Endocrinol.* 2009 Nov;203(2):271-9.
- Andrade LF, Nahum LA, Avelar LG, Silva LL, Zerlotini A, Ruiz JC, Oliveira G.** Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics.* 2011 May 6;12:215.
- Avelar LG, Nahum LA, Andrade LF, Oliveira G.** Functional Diversity of the *Schistosoma mansoni* Tyrosine Kinases. *J Signal Transduct.* 2011;2011:603290.

## B

- Bahia D, Avelar L, Mortara RA, Khayath N, Yan Y, Noël C, Capron M, Dissous C, Pierce RJ, Oliveira G.** SmPKC1, a new protein kinase C identified in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jul 7;345(3):1138-48.
- Bahia D, Mortara RA, Kusel JR, Andrade LF, Ludolf F, Kuser PR, Avelar L, Trolet J, Dissous C, Pierce RJ, Oliveira G.** *Schistosoma mansoni*: expression of Fes-like tyrosine kinase SmFes in the tegument and terebratorium suggests its involvement in host penetration. *Exp Parasitol.* 2007 Jul;116(3):225-32.

- Beckmann S, Buro C, Dissous C, Hirzmann J, Grevelding CG.** The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis. *PLoS Pathog.* 2010 Feb 12;6(2):e1000769.
- Beckmann S, Quack T, Burmeister C, Buro C, Long T, Dissous C, Grevelding CG.** *Schistosoma mansoni*: signal transduction processes during the development of the reproductive organs. *Parasitology.* 2010 Mar;137(3):497-520.
- Beckmann S, Grevelding CG.** Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* in vitro. *Int J Parasitol.* 2010 Apr;40(5):521-6.
- Beckmann S, Hahnel S, Cailliau K, Vanderstraete M, Browaeys E, Dissous C, Grevelding CG.** Characterization of the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 2011 Dec 9;286(49):42325-36.
- Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Perteau M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell BG, El-Sayed NM.** The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature.* 2009 Jul 16;460(7253):352-8.
- Blume-Jensen P, Hunter T.** Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):355-65
- Botros S, Pica-Mattoccia L, William S, El-Lakkani N, Cioli D.** Effect of praziquantel on the immature stages of *Schistosoma haematobium*. *Int J Parasitol.* 2005 Nov;35(13):1453-7.
- Boucher P, Ditlecadet D, Dubé C, Dufresne F.** Unusual duplication of the insulin-like receptor in the crustacean *Daphnia pulex*. *BMC Evol Biol.* 2010 Oct 12;10:305.
- Brehm K.** The role of evolutionarily conserved signalling systems in *Echinococcus multilocularis* development and host-parasite interaction. *Med Microbiol Immunol.* 2010 Aug;199(3):247-59.
- Brehm K.** Protein Kinases as Drug Targets in the Treatment of alveolar Echinococcosis. Chapitre du livre *Protein Phosphorylation in Parasites: Novel Targets for Antiparasitic Intervention, First Edition.* Wiley-VCH. 2014.
- Brognaard J, Hunter T.** Protein kinase signaling networks in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Feb;21(1):4-11.
- Buro C, Oliveira KC, Lu Z, Leutner S, Beckmann S, Dissous C, Cailliau K, Verjovski-Almeida S, Grevelding CG.** Transcriptome Analyses of Inhibitor-treated Schistosome Females Provide Evidence for Cooperating Src-kinase and TGF $\beta$  Receptor Pathways Controlling Mitosis and Eggshell Formation. *PLoS Pathog.* 2013 Jun;9(6):e1003448.

## C

- Caffrey CR.** Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Curr Opin Chem Biol.* 2007 Aug;11(4):433-9.
- Caffrey CR, Rohwer A, Oellien F, Marhöfer RJ, Braschi S, Oliveira G, McKerrow JH, Selzer PM.** A comparative chemogenomics strategy to predict potential drug targets in the metazoan pathogen, *Schistosoma mansoni*. *PLoS One.* 2009;4(2):e4413.
- Calounova G, Livera G, Zhang XQ, Liu K, Gosden RG, Welsh M.** The Src homology 2 domain-containing adapter protein B (SHB) regulates mouse oocyte maturation. *PLoS One.* 2010 Jun 16;5(6):e11155.
- Cheung LS, Schüpbach T, Shvartsman SY.** Pattern formation by receptor tyrosine kinases: analysis of the Gurken gradient in *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Dec;21(6):719-25.
- Christoffersson G, Zang G, Zhuang ZW, Vågesjö E, Simons M, Phillipson M, Welsh M.** Vascular adaptation to a dysfunctional endothelium as a consequence of Shb deficiency. *Angiogenesis.* 2012 Sep;15(3):469-80.
- Chuang YY, Valster A, Coniglio SJ, Backer JM, Symons M.** The atypical Rho family GTPase Wrch-1 regulates focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Sci.* 2007 Jun 1;120(Pt 11):1927-34.
- Clarke M, Lohan AJ, Liu B, Lagkouvardos I, Roy S, Zafar N, Bertelli C, Schilde C, Kianianmomeni A, Bürglin TR, Frech C, Turcotte B, Kopec KO, Synnott JM, Choo C, Paponov I, Finkler A, Heng Tan CS, Hutchins AP, Weinmeier T, Rattei T, Chu JS, Gimenez G, Irimia M, Rigden DJ, Fitzpatrick DA, Lorenzo-Morales J, Bateman A, Chiu CH, Tang P, Hegemann P, Fromm H, Raoult D, Greub G, Miranda-Saavedra D, Chen N, Nash P, Ginger ML, Horn M, Schaap P, Caler L, Loftus BJ.** Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol.* 2013 Feb 1;14(2):R11.
- Clemens LE, Basch PF.** *Schistosoma mansoni*: insulin independence. *Exp Parasitol.* 1989 Feb;68(2):223-9.
- Cohen P.** The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2002 May;4(5):E127-30.
- Collins JJ 3rd, King RS, Cogswell A, Williams DL, Newmark PA.** An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Mar 8;5(3):e1009
- Cornford EM.** Effects of insulin on *Schistosomatium douthitti*. *Gen Comp Endocrinol.* 1974 Jul;23(3):286-93.

**Cross MJ, Lu L, Magnusson P, Nyqvist D, Holmqvist K, Welsh M, Claesson-Welsh L.** The Shb adaptor protein binds to tyrosine 766 in the FGFR-1 and regulates the Ras/MEK/MAPK pathway via FRS2 phosphorylation in endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Aug;13(8):2881-93.

## D

**Danso-Appiah A, Utzinger J, Liu J, Olliaro P.** Drugs for treating urinary schistosomiasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Jul 16;(3):CD000053.

**Danso-Appiah A, Olliaro PL, Donegan S, Sinclair D, Utzinger J.** Drugs for treating *Schistosoma mansoni* infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Feb 28;2:CD000528.

**De Cárcer G, Manning G, Malumbres M.** From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle*. 2011 Jul 15;10(14):2255-62.

**De Saram PS, Ressurreição M, Davies AJ, Rollinson D, Emery AM, Walker AJ.** Functional mapping of protein kinase A reveals its importance in adult *Schistosoma mansoni* motor activity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e1988.

**Dewalick S, Bexkens ML, van Balkom BW, Wu YP, Smit CH, Hokke CH, de Groot PG, Heck AJ, Tielens AG, van Hellemond JJ.** The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton *Int J Parasitol*. 2011 Apr;41(5):523-32.

**Dewalick S, Tielens AG, van Hellemond JJ.** *Schistosoma mansoni*: the egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. *Exp Parasitol*. 2012 Sep;132(1):7-13.

**Deyev IE, Sohet F, Vassilenko KP, Serova OV, Popova NV, Zozulya SA, Burova EB, Houillier P, Rzhovsky DI, Berchatova AA, Murashev AN, Chugunov AO, Efremov RG, Nikol'sky NN, Bertelli E, Eladari D, Petrenko AG.** Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor. *Cell Metab*. 2011 Jun 8;13(6):679-89.

**Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD.** Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat Rev Cancer*. 2004 Sep;4(9):718-27.

**Dissous C, Ahier A, Khayath N.** Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. *Bioessays*. 2007 Dec;29(12):1281-8.

**Dissous C, Grevelding CG, Long T.** *Schistosoma mansoni* Polo-like kinases and their function in control of mitosis and parasite reproduction. *An Acad Bras Cienc*. 2011 Jun;83(2):627-35.

**Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J.** Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Dec;21(6):659-67. d

**Doherty JF, Moody AH, Wright SG.** Katayama fever: an acute manifestation of schistosomiasis. *BMJ*. 1996 Oct 26;313(7064):1071-2.

**Dougherty DA.** Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science*. 1996 Jan 12;271(5246):163-8.

## E

**Esser D, Siebers B.** Atypical protein kinases of the RIO family in archaea. *Biochem Soc Trans*. 2013 Feb 1;41(1):399-404.

## F

**Fairclough SR, Chen Z, Kramer E, Zeng Q, Young S, Robertson HM, Begovic E, Richter DJ, Russ C, Westbrook MJ, Manning G, Lang BF, Haas B, Nusbaum C, King N.** Premetazoan genome evolution and the regulation of cell differentiation in the choanoflagellate *Salpingoeca rosetta*. *Genome Biol*. 2013 Feb 18;14(2):R15.

**Favelyukis S, Till JH, Hubbard SR, Miller WT.** Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol*. 2001 Dec;8(12):1058-63

**Ferrari TC.** Involvement of central nervous system in the schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(5 Suppl 1):59-62. Epub 2004 Oct 13.

**Filippakopoulos P, Müller S, Knapp S.** SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 Dec;19(6):643-9.

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

## G

**Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW.** Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):763-73.

**Gougnard N, Vanderstraete M, Cailliau K, Lescuyer A, Browaeys E, Dissous C.** *Schistosoma mansoni*: structural and biochemical characterization of two distinct Venus KinaseReceptors. *Exp Parasitol*. 2012 Sep;132(1):32-9.

**Gougnard N.** Caractérisation moléculaire des Récepteurs Venus Kinase : étude fonctionnelle chez le parasite *Schistosoma mansoni*. Thèse de doctorat, 2011. <http://www.theses.fr/159710065>

**Gustafsson K, Heffner G, Wenzel PL, Curran M, Grawé J, McKinney-Freeman SL, Daley GQ, Welsh M.** The Src homology 2 protein *Shb* promotes cell cycle progression in murine hematopoietic stem cells by regulation of focal adhesion kinase activity. *Exp Cell Res*. 2013 Jul 15;319(12):1852-64.

**Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L.** Human schistosomiasis. *Lancet*. 2006 Sep 23;368(9541):1106-18.

## H

**Haerberlein S, Haas W.** Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitol Res*. 2008 Mar;102(4):657-62.

**Halanych KM.** The new view of animal phylogeny. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2004. 35:229–56

**Hams E, Aviello G, Fallon PG.** The *schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front Immunol*. 2013 Apr 15;4:89.

**Hanks SK, Quinn AM, Hunter T.** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. 1988 Jul 1;241(4861):42-52.

**He Y, Cai G, Ni Y, Li Y, Zong H, He L** siRNA-mediated knockdown of two tyrosinase genes from *Schistosoma japonicum* cultured in vitro. *Exp Parasitol*. 2012 Dec;132(4):394-402.

**Hooshmand-Rad R, Lu L, Heldin CH, Claesson-Welsh L, Welsh M.** Platelet-derived growth factor-mediated signaling through the Shb adaptor protein: effects on cytoskeletal organization. *Exp Cell Res*. 2000 Jun 15;257(2):245-54.

**Hotez PJ, Bethony JM, Diemert DJ, Pearson M, Loukas A.** Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Nov;8(11):814-26.

**Hubbard SR.** Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Jun;5(6):464-71.

**Hubbard SR, Miller WT.** Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Apr;19(2):117-23.

**Huse M, Kuriyan J.** The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*. 2002 May 3;109(3):275-82

## J

**Jakus Z, Fodor S, Abram CL, Lowell CA, Mócsai A.** Immunoreceptor-like signaling by beta 2 and beta 3 integrins. *Trends Cell Biol*. 2007 Oct;17(10):493-501

**Jurberg AD, Gonçalves T, Costa TA, de Mattos AC, Pascarelli BM, de Manso PP, Ribeiro-Alves M, Pelajo-Machado M, Peralta JM, Coelho PM, Lenzi HL.** The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. *Dev Genes Evol*. 2009 May;219(5):219-34.

**Justine JL.** Étude ultrastructurale de la gamétogenèse de *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 (Trematoda : Schistosomatidae). *Thèse de troisième cycle*. (1980)

## K

**Kannan N, Taylor SS, Zhai Y, Venter JC, Manning G.** Structural and functional diversity of the microbial kinome. *PLoS Biol.* 2007 Mar;5(3):e17.

**Kapp K, Knobloch J, Schüssler P, Sroka S, Lammers R, Kunz W, Grevelding CG.** The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Dec;138(2):171-82.

**Kay BK, Williamson MP, Sudol M.** The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 2000 Feb;14(2):231-41.

**Kay BK.** SH3 domains come of age. *FEBS Lett.* 2012 Aug 14;586(17):2606-8.

**Khayath N, Vicogne J, Ahier A, BenYounes A, Konrad C, Trolet J, Viscogliosi E, Brehm K, Dissous C.** Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *FEBS J.* 2007 Feb;274(3):659-76.

**King N, Carroll SB.** A receptor tyrosine kinase from choanoflagellates: molecular insights into early animal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 18;98(26):15032-7.

**King N, Westbrook MJ, Young SL, Kuo A, Abedin M, Chapman J, Fairclough S, Hellsten U, Isogai Y, Letunic I, Marr M, Pincus D, Putnam N, Rokas A, Wright KJ, Zuzow R, Dirks W, Good M, Goodstein D, Lemons D, Li W, Lyons JB, Morris A, Nichols S, Richter DJ, Salamov A, Sequencing JG, Bork P, Lim WA, Manning G, Miller WT, McGinnis W, Shapiro H, Tjian R, Grigoriev IV, Rokhsar D.** The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature.* 2008 Feb 14;451(7180):783-8.

**Knobloch J, Winnen R, Quack M, Kunz W, Grevelding CG.** A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene.* 2002 Jul 10;294(1-2):87-97.

**Knobloch J, Kunz W, Grevelding CG.** Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 2006 Oct;36(12):1261-72.

**Knobloch J, Beckmann S, Burmeister C, Quack T, Grevelding CG.** Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol.* 2007 Nov;117(3):318-36.

**Knudsen GM, Medzihradszky KF, Lim KC, Hansell E, McKerrow JH.** Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Mol Cell Proteomics.* 2005 Dec;4(12):1862-75.

**Konrad C, Kroner A, Spiliotis M, Zavala-Góngora R, Brehm K.** Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol.* 2003 Mar;33(3):301-12.

**Kriz V, Agren N, Lindholm CK, Lenell S, Saldeen J, Mares J, Welsh M.** The SHB adapter protein is required for normal maturation of mesoderm during in vitro differentiation of embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2006 Nov 10;281(45):34484-91.

**Kumar V.** Trematode Infections and Diseases of Man and Animals. Springer. 1999.

## L

**Lemmon MA, Schlessinger J.** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010 Jun 25;141(7):1117-34.

**Leutner S, Beckmann S, Grevelding CG.** Characterization of the cGMP-dependent protein kinase SmcGK1 of *Schistosoma mansoni*. *An Acad Bras Cienc.* 2011 Jun;83(2):637-48.

**Lemmon MA.** Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9(2):99-111.

**Levi-Schaffer F, Smolarsky M.** *Schistosoma mansoni*: effect of insulin and a low-molecular-weight fraction of serum on schistosomula in chemically defined media. *Exp Parasitol.* 1981 Dec;52(3):378-85.

**Lindholm CK, Henriksson ML, Hallberg B, Welsh M.** Shb links SLP-76 and Vav with the CD3 complex in Jurkat T cells. *Eur J Biochem.* 2002 Jul;269(13):3279-88.

**Littlewood DTJ.** The evolution of parasitism in flatworms. Chapitre du livre Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry immunology and physiology. 2006. CABI Publishing.

**Liu Y, Wang X, Wang JK, Ching CB.** Structural characterization and enantioseparation of the chiral compound praziquantel. *J Pharm Sci.* 2004 Dec;93(12):3039-46.

**Loebel DA, Tam PP.** Rho GTPases in endoderm development and differentiation. *Small GTPases.* 2012 Jan-Mar;3(1):40-4.

**Loker ES, Brant SV.** Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes. *Trends Parasitol.* 2006 Nov;22(11):521-8.

**Long T, Cailliau K, Beckmann S, Browaeys E, Trolet J, Grevelding CG, Dissous C.** *Schistosoma mansoni* Polo-like kinase 1: A mitotic kinase with key functions in parasite reproduction. *Int J Parasitol.* 2010 Aug 1;40(9):1075-86. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.03.002.

**Long T, Vanderstraete M, Cailliau K, Morel M, Lescuyer A, Gouignard N, Grevelding CG, Browaeys E, Dissous C.** SmSak, the second Polo-like kinase of the helminth

parasite *Schistosoma mansoni*: conserved and unexpected roles in meiosis. *PLoS One*. 2012;7(6):e40045.

**Lopez P, Casane D, Philippe H.** Heterotachy, an important process of protein evolution. *Mol Biol Evol*. 2002;19:1-7.

**Loverde PT, Osman A, Hinck A.** *Schistosoma mansoni*: TGF-beta signaling pathways. *Exp Parasitol*. 2007 Nov;117(3):304-17.

**Ludolf F, Bahia D, Andrade LF, Cousin A, Capron M, Dissous C, Pierce RJ, 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*. 2007 Aug 17;360(1):163-72.

**Ludtmann MH, Rollinson D, Emery AM, Walker AJ.** Protein kinase C signalling during miracidium to mother sporocyst development in the helminth parasite, *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol*. 2009 Sep;39(11):1223-33.

## M

**Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S.** Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci*. 2002 Oct;27(10):514-20.

**Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S.** The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002 Dec 6;298(5600):1912-34.

**Manning G.** Genomic overview of protein kinases. *WormBook*. 2005 Dec 13:1-19.

**Manning G, Young SL, Miller WT, Zhai Y.** The protist, *Monosiga brevicollis*, has a tyrosine kinase signaling network more elaborate and diverse than found in any known metazoan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 15;105(28):9674-9.

**Matsumoto T, Mugishima H.** Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb*. 2006 Jun;13(3):130-5.

**Miller WT.** Tyrosine kinase signaling and the emergence of multicellularity. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jun;1823(6):1053-7.

**Miranda-Saavedra D, Barton GJ.** Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins*. 2007 Sep 1;68(4):893-914.

**Mosunjac MB, Tadros T, Beach R, Majmudar B.** Cervical schistosomiasis, human papilloma virus (HPV), and human immunodeficiency virus (HIV): a dangerous coexistence or coincidence? *Gynecol Oncol*. 2003 Jul;90(1):211-4.

**Mutapi F, Ndhlovu PD, Hagan P, Spicer JT, Mduluza T, Turner CM, Chandiwana SK, Woolhouse ME.** Chemotherapy accelerates the development of acquired immune responses to *Schistosoma haematobium* infection. *J Infect Dis.* 1998 Jul;178(1):289-93.

## N

**Neves RH, de Lamare Biolchini C, Machado-Silva JR, Carvalho JJ, Branquinho TB, Lenzi HL, Hulstijn M, Gomes DC.** A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. *Parasitol Res.* 2005 Jan;95(1):43-9.

**Niemann T, Marti HP, Duhnsen SH, Bongartz G.** Pulmonary schistosomiasis - imaging features. *J Radiol Case Rep.* 2010;4(9):37-43.

## O

**Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S.** Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell.* 2002 Sep 20;110(6):775-87.

**O'Hara PJ, Sheppard PO, Thøgersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL, Mulvihill ER.** The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron.* 1993 Jul;11(1):41-52.

## P

**Pearce EJ, MacDonald AS.** The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jul;2(7):499-51.

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

**Pearson MS, Pickering DA, Tribolet L, Cooper L, Mulvenna J, Oliveira LM, Bethony JM, Hotez PJ, Loukas A.** Neutralizing antibodies to the hookworm hemoglobinase Na-APR-1: implications for a multivalent vaccine against hookworm infection and schistosomiasis. *J Infect Dis.* 2010 May 15;201(10):1561-9.

**Pearson MS, Pickering DA, McSorley HJ, Bethony JM, Tribolet L, Dougall AM, Hotez PJ, Loukas A.** Enhanced protective efficacy of a chimeric form of the schistosomiasis vaccine antigen Sm-TSP-2. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(3):e1564.

**Pellegrini L, Burke DF, von Delft F, Mulloy B, Blundell TL.** Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature.* 2000 Oct 26;407(6807):1029-34.

**Pin JP, Galvez T, Prézeau L.** Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2003 Jun;98(3):325-54.

**Pica-Mattoccia L, Valle C, Basso A, Troiani AR, Vigorosi F, Liberti P, Festucci A, Cioli D.** Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel. *Exp Parasitol.* 2007 Apr;115(4):344-51.

**Pica-Mattoccia L, Doenhoff MJ, Valle C, Basso A, Troiani AR, Liberti P, Festucci A, Guidi A, Cioli D.** Genetic analysis of decreased praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 2009 Jul;111(1):82-5.

**Poggensee G, Feldmeier H.** Female genital schistosomiasis: facts and hypotheses. *Acta Trop.* 2001 Jun 22;79(3):193-210.

**Popiel I, Cioli D, Erasmus DA.** The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. *Int J Parasitol.* 1984 Apr;14(2):183-9

**Preidler KW, Riepl T, Szolar D, Ranner G.** Cerebral schistosomiasis: MR and CT appearance. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1996 Sep;17(8):1598-600.

## Q

**Quack T, Knobloch J, Beckmann S, Vicogne J, Dissous C, Grevelding CG.** The formin-homology protein SmDia interacts with the Src kinase SmTK and the GTPase SmRho1 in the gonads of *Schistosoma mansoni*. *PLoS One.* 2009 Sep 10;4(9):e6998.

## R

**Ramachandran H, Skelly PJ, Shoemaker CB.** The *Schistosoma mansoni* epidermal growth factor receptor homologue, SER, has tyrosine kinase activity and is localized in adult muscle. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Dec 2;83(1):1-10.

**Rentzsch F, Hobmayer B, Holstein TW.** Glycogen synthase kinase 3 has a proapoptotic function in *Hydra* gametogenesis. *Dev Biol.* 2005 Feb 1;278(1):1-12.

**Ressurreição M, Rollinson D, Emery AM, Walker AJ.** A role for p38 MAPK in the regulation of ciliary motion in a eukaryote. *BMC Cell Biol.* 2011 Jan 26;12:6.

**Ressurreição M, Rollinson D, Emery AM, Walker AJ.** A role for p38 mitogen-activated protein kinase in early post-embryonic development of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 2011 Nov;180(1):51-5.

**Rinaldi G, Morales ME, Alrefaei YN, Cancela M, Castillo E, Dalton JP, Tort JF, Brindley PJ.** RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol Biochem Parasitol.* 2009 Oct;167(2):118-26.

**Riveau G, Deplanque D, Remoué F, Schacht AM, Vodougnon H, Capron M, Thiry M, Martial J, Libersa C, Capron A.** Safety and immunogenicity of rSh28GST antigen in humans: phase 1 randomized clinical study of a vaccine candidate against urinary schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(7):e1704.

**Rink JC.** Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev Genes Evol.* 2013 Mar;223(1-2):67-84.

**Rizk MZ, Metwally NS, Hamed MA, Mohamed AM.** Correlation between steroid sex hormones, egg laying capacity and cercarial shedding in *Biomphalaria alexandrina* snails after treatment with *Haplophyllum tuberculatum*. *Exp Parasitol.* 2012 Oct;132(2):171-9.

**Robertson SC, Tynan JA, Donoghue DJ.** RTK mutations and human syndromes when good receptors turn bad. *Trends Genet.* 2000 Jun;16(6):265-71.

**Robinson DR, Wu YM, Lin SF.** The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 2000 Nov 20;19(49):5548-57.

**Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP.** Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis.* 2007 Mar;7(3):218-24.

**Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP.** Schistosomiasis. *N Engl J Med.* 2002 Apr 18;346(16):1212-20.

## S

**Samaras V, Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Peppas G, Falagas ME.** Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review. *J Infect Dev Ctries.* 2010 Jun 3;4(5):267-81.

**Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M.** Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell.* 2000 Sep;6(3):743-50.

**Shewchuk LM, Hassell AM, Ellis B, Holmes WD, Davis R, Horne EL, Kadwell SH, McKee DD, Moore JT.** Structure of the Tie2 RTK domain: self-inhibition by the nucleotide binding loop, activation loop, and C-terminal tail. *Structure.* 2000 Nov 15;8(11):1105-13.

**Shoemaker CB, Ramachandran H, Landa A, dos Reis MG, Stein LD.** Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Jul;53(1-2):17-32.

**Shiu SH, Li WH.** Origins, lineage-specific expansions, and multiple losses of tyrosine kinases in eukaryotes. *Mol Biol Evol.* 2004 May;21(5):828-40.

**Siddiqui AA, Siddiqui BA, Ganley-Leal L.** Schistosomiasis vaccines. *Hum Vaccin.* 2011 Nov;7(11):1192-7.

**Skelly PJ, Shoemaker CB.** Rapid appearance and asymmetric distribution of glucose transporter SGLT4 at the apical surface of intramammalian-stage *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 16;93(8):3642-6.

**Srivastava M, Simakov O, Chapman J, Fahey B, Gauthier ME, Mitros T, Richards GS, Conaco C, Dacre M, Hellsten U, Larroux C, Putnam NH, Stanke M, Adamska M, Darling A, Degnan SM, Oakley TH, Plachetzki DC, Zhai Y, Adamski M, Calcino A, Cummins SF, Goodstein DM, Harris C, Jackson DJ, Leys SP, Shu S, Woodcroft BJ, Vervoort M, Kosik KS, Manning G, Degnan BM, Rokhsar DS.** The Amphimedon queenslandica genome and the evolution of animal complexity. *Nature.* 2010 Aug 5;466(7307):720-6.

**Suga H, Koyanagi M, Hoshiyama D, Ono K, Iwabe N, Kuma K, Miyata T.** Extensive gene duplication in the early evolution of animals before the parazoan-eumetazoan split demonstrated by G proteins and protein tyrosine kinases from sponge and hydra. *J Mol Evol.* 1999 Jun;48(6):646-53.

**Suga H, Sasaki G, Kuma K, Nishiyori H, Hirose N, Su ZH, Iwabe N, Miyata T.** Ancient divergence of animal protein tyrosine kinase genes demonstrated by a gene family tree including choanoflagellate genes. *FEBS Lett.* 2008 Mar 5;582(5):815-8.

**Suga H, Dacre M, de Mendoza A, Shalchian-Tabrizi K, Manning G, Ruiz-Trillo I.** Genomic survey of premetazoans shows deep conservation of cytoplasmic tyrosine kinases and multiple radiations of receptor tyrosine kinases. *Sci Signal.* 2012 May 1;5(222):ra35.

**Sundaram MV.** RTK/Ras/MAPK signaling. *WormBook.* 2006 Feb 11:1-19.

**Swain JE, Ding J, Brautigan DL, Villa-Moruzzi E, Smith GD.** Proper chromatin condensation and maintenance of histone H3 phosphorylation during mouse oocyte meiosis requires protein phosphatase activity. *Biol Reprod.* 2007 Apr;76(4):628-38.

**Swierczewski BE, Davies SJ.** Conservation of protein kinase A catalytic subunit sequences in the schistosome pathogens of humans. *Exp Parasitol.* 2010 Jun;125(2):156-60.

**Swierczewski BE, Davies SJ.** Developmental regulation of protein kinase A expression and activity in *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 2010 Jul;40(8):929-35.

## T

**Taylor SS, Kornev AP.** Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* 2011 Feb;36(2):65-77.

**Tendler M, Simpson AJ.** The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. *Acta Trop.* 2008 Nov-Dec;108(2-3):263-6.

**Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, Don TA, McManus DP, Correa-Oliveira R, Loukas A.** Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med.* 2006 Jul;12(7):835-40

**Tran MH, Freitas TC, Cooper L, Gaze S, Gatton ML, Jones MK, Lovas E, Pearce EJ, Loukas A.** Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. *PLoS Pathog.* 2010 Apr 15;6(4):e1000840.

## U

**Uzbekova S, Salhab M, Perreau C, Mermillod P, Dupont J.** Glycogen synthase kinase 3B in bovine oocytes and granulosa cells: possible involvement in meiosis during in vitro maturation. *Reproduction.* 2009 Aug;138(2):235-46.

## V

**Vicogne J, Pin JP, Lardans V, Capron M, Noël C, Dissous C.** An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus Flytrap module. *Mol Biochem Parasitol.* 2003 Jan;126(1):51-62.

**Vicogne J, Cailliau K, Tulasne D, Browaeys E, Yan YT, Fafeur V, Vilain JP, 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.

## W

**Wagner PD, Vu ND.** Histidine to aspartate phosphotransferase activity of nm23 proteins: phosphorylation of aldolase C on Asp-319. *Biochem J.* 2000 Mar 15;346 Pt 3:623-30.

**Wang B, Collins JJ 3rd, Newmark PA.** Functional genomic characterization of neoblast-like stem cells in larval *Schistosoma mansoni*. *Elife.* 2013 Jul 30;2:e00768.

**Wang H, Qian PY.** Involvement of a novel p38 mitogen-activated protein kinase in larval metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans* (Haswell). *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2010 Jul 15;314(5):390-402.

**Webster BL, Southgate VR, Littlewood DT.** A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*. *Int J Parasitol.* 2006 Jul;36(8):947-55.

**Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC.** Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron.* 2007 Jan 4;53(1):25-38.

**Welsh N, Makeeva N, Welsh M.** Overexpression of the Shb SH2 domain-protein in insulin-producing cells leads to altered signaling through the IRS-1 and IRS-2 proteins. *Mol Med.* 2002 Nov;8(11):695-704.

**Wichmann D, Panning M, Quack T, Kramme S, Burchard GD, Greveling C, Drosten C.** Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):e422.

**Wichmann D, Poppert S, Von Thien H, Clerinx J, Dieckmann S, Jensenius M, Parola P, Richter J, Schunk M, Stich A, Zanger P, Burchard GD, Tannich E.** Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. *BMC Infect Dis.* 2013 Jan 30;13:55.

**Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB.** Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* 2002 Sep 25;3(10):REVIEWS3013.

## Y

**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.

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

**You H, Zhang W, Jones MK, Gobert GN, Mulvenna J, Rees G, Spanevello M, Blair D, Duke M, Brehm K, McManus DP.** Cloning and characterisation of *Schistosoma japonicum* insulin receptors. *PLoS One.* 2010 Mar 24;5(3):e9868.

**You H, Gobert GN, Duke MG, Zhang W, Li Y, Jones MK, McManus DP.** The insulin receptor is a transmission blocking veterinary vaccine target for zoonotic *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol.* 2012 Aug;42(9):801-7.

**You H, McManus DP, Hu W, Smout MJ, Brindley PJ, Gobert GN.** Transcriptional responses of in vivo praziquantel exposure in schistosomes identifies a functional role for calcium signaling pathway member CamKII. *PLoS Pathog.* 2013 Mar;9(3):e1003254.

**Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J.** Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell.* 2007 Jul 27;130(2):323-34.

## Z

**Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J.** An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell.* 2006 125:1137–1149.

